

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**AVALIAÇÃO TOXICOLÓGICA DOS BENZODIAZEPÍNICOS
DIAZEPAM E MALEATO DE MIDAZOLAM SOBRE O
DESENVOLVIMENTO
PRÉ-NATAL DE RATOS WISTAR**

Autora: Karine de Almeida Gehlen

**PORTO ALEGRE
2003**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**AVALIAÇÃO TOXICOLÓGICA DOS BENZODIAZEPÍNICOS
DIAZEPAM E MALEATO DE MIDAZOLAM SOBRE O
DESENVOLVIMENTO
PRÉ-NATAL DE RATOS WISTAR**

Autora: Karine de Almeida Gehlen

**Dissertação apresentada como requisito
para obtenção do grau de Mestre em
Ciências Veterinárias na área de
Toxicologia e Farmacologia Veterinária.**

**Orientador: Dr. João Roberto Braga de
Mello.**

PORTO ALEGRE

2003

KARINE DE ALMEIDA GEHLEN

Avaliação toxicológica dos benzodiazepínicos diazepam e maleato de midazolam sobre o desenvolvimento pré-natal de ratos Wistar.

Dissertação para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Veterinárias na área de Farmacologia e Toxicologia.

Orientador: Dr. João Roberto Braga de Mello.

Porto Alegre, __/__/____.

Componentes da banca examinadora:

*Dedico aos meus pais, Carmen e Nelson,
pelo exemplo de vida e dedicação.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais Carmen e Nelson por terem possibilitado e priorizado meus estudos. Mas, gostaria de agradecer principalmente pelo amor incondicional, cumplicidade e exemplo de determinação e força, pois foi graças a isso que cumpri essa etapa.

Aos meus irmãos Patrícia e Braian pelo carinho e compreensão nos momentos mais difíceis.

Ao meu marido Anuar por seu amor, paciência, estímulo e doação.

Aos meus amigos e colegas de trabalho, Jussara, Viviane, Cardoso, Márcio, Virgínia, Inês, Beatriz e Paulo, pela ajuda prestada em diversas situações, obrigada de coração.

Aos colegas de laboratório, principalmente à Beatriz, Vanessa e Eliane pelo auxílio e ensinamentos.

Ao meu orientador Dr. João Roberto Braga de Mello, pela orientação e pela confiança em meu trabalho.

Ao admirável Professor Dr. Augusto Langeloh pela ajuda prestada.

Ao professor David Driemeier, por mais um auxílio prestado nas fotos, sempre disposto a ajudar.

Aos funcionários, professores e colegas da pós-graduação, muito obrigada.

Agradeço a Deus, ao meu anjo da guarda e todos os seres de luz que nos rodeiam, nos protegendo e orientando por este trabalho realizado, e principalmente, pelo bebê que fui presenteada no final desta etapa.

Ao meu filhinho, que deu uma razão maior a minha existência, mesmo ainda tendo poucos meses de gestação, justificando ainda mais este estudo realizado.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	8
LISTA DE FIGURAS	9
LISTA DE ABREVIACOES.....	11
RESUMO.....	12
<i>ABSTRACT</i>	13
1 INTRODUÇÃO	14
2 REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1 Benzodiazepínicos.....	17
2.1.1 Histórico.....	17
2.1.2 Estrutura química e classificação.....	18
2.1.3 Farmacocinética.....	19
2.1.4 Mecanismo de ação.....	21
2.1.5 Efeitos farmacológicos e indicações.....	22
2.1.6 Doses sugeridas.....	23
2.1.7 Reações tóxicas e efeitos colaterais.....	24
2.2 Uso de medicações durante a gestação.....	26
2.3 Teratologia.....	29
2.4 Avaliação de toxicidade reprodutiva.....	36
2.5 Efeitos dos benzodiazepínicos durante a gestação.....	40
3 OBJETIVOS	42
3.1 Objetivos gerais	42
3.2 Objetivos específicos	42
4 MATERIAIS E MÉTODOS	43
4.1 Medicações.....	43
4.2 Animais.....	44
4.3 Acasalamento.....	44
4.4 Tratamento dos animais.....	45
4.5 Gestação.....	45
4.6 Sacrifício das progenitoras e cesariana.....	46
4.7 Método de coloração dos fetos.....	47

4.8 Diagnóstico das alterações ósseas.....	48
4.9 Variáveis avaliadas.....	48
4.9.1 Taxas reprodutivas.....	48
4.9.2 Taxas avaliadas nos fetos.....	49
4.10 Análise estatística.....	49
5 RESULTADOS.....	50
5.1 Desenvolvimento ponderal das ratas durante a gestação.....	50
5.2 Consumo de ração das ratas durante a gestação	51
5.3 Consumo de água das ratas durante a gestação	52
5.4 Massa relativa dos órgãos das ratas	53
5.5 Índices reprodutivos das ratas	54
5.2 Variáveis fetais	55
6 DISCUSSÃO.....	65
6.1 Toxicidade materna	65
6.2 Toxicidade fetal	67
7 CONCLUSÕES	72
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	73

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Dosagens e vias de administração indicadas do diazepam e midazolam em cães, gatos, homens e ratos, conforme indicação	23
Tabela 2. Período de desenvolvimento embrio-fetal de várias espécies animais, segundo Bernardi (1999).....	28
Tabela 3. Medicções reconhecidas como teratogênicas para humanos.....	33
Tabela 4. Medicamentos que produzem teratogênese, anomalias fetais ou efeitos tóxicos no desenvolvimento de animais, segundo Bernardi (1999).....	34-35
Tabela 5. Massa relativa dos órgãos das progenitoras dos grupos de tratamento diazepam e maleato de midazolam e controle no dia da cesariana	55
Tabela 6. Índices reprodutivos das progenitoras tratadas com diazepam, maleato de midazolam e água destilada (controle) no período de organogênese. Valores expressos em número total, média \pm erro padrão da média ou percentual	56
Tabela 7. Índices dos fetos cujas progenitoras foram tratadas com diazepam, maleato de midazolam e água destilada (controle) durante a organogênese. Valores médios dos grupos expressos em média \pm erro padrão da média ou percentual.....	57
Tabela 8. Alterações esqueléticas dos fetos cujas progenitoras foram tratadas no período de organogênese com diazepam, maleato de midazolam e água destilada (controle). Valores em percentual de fetos acometidos por grupo	60

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação da estrutura química do diazepam e maleato de midazolam.....	19
Figura 2. Períodos do desenvolvimento dos diferentes órgãos e sistemas do rato, segundo Bernardi (1999).....	27
Figura 3. Conseqüências da exposição materna aos agentes químicos durante a gestação.....	31
Figura 4. Desenvolvimento ponderal das ratas tratadas com diazepam 10 mg/kg (N=15), maleato de midazolam 5 mg/kg (N=14) e água destilada – grupo controle (N=13) durante os 21 dias de gestação. Os valores representam a média diária dos animais por grupo.....	51
Figura 5. Consumo percentual de ração em relação à massa corporal durante os 21 dias de gestação de ratas tratadas com diazepam 10 mg/kg (N=15), maleato de midazolam 5 mg/kg (N=14) e água destilada - grupo controle (N=13). Os valores representam a média diária dos animais por grupo....	53
Figura 6. Consumo percentual de água em relação à massa corporal durante os 21 dias de gestação, de ratas tratadas com diazepam 10 mg/kg (N=15), maleato de midazolam 5 mg/kg (N=14) e água destilada - grupo controle (N=13). Os valores representam as médias diárias dos animais por grupo.	54
Figura 7. Fetos de diferentes tamanhos corados com vermelho de alizarina , sendo o feto <u>a</u> do grupo controle, e o feto <u>b</u> de fêmea tratada com diazepam (10 mg/kg/dia) entre o 6º e o 15º dia de gestação.....	57
Figura 8. Fetos <u>a</u> e <u>b</u> corados com vermelho de alizarina do grupo controle, apresentando ossificação normal do crânio.....	58
Figura 9. Fetos de ratas do grupo controle, corados com vermelho de alizarina, apresentando costelas supranumerárias, sendo que o feto <u>a</u> apresenta 14ª costela mais desenvolvida que o feto <u>b</u>	61
Figura 10. Feto de rata tratada entre o 6º e o 15º dias de gestação, período de organogênese, com maleato de midazolam (5mg/kg/dia), corado com vermelho de alizarina, apresentando ossificação incompleta dos parietais, interparietais, supraoccipital.....	62
Figura 11. Fetos de ratas tratadas com diazepam (10 mg/kg/dia) entre o 6º e o 15º dia de gestação, corados com vermelho de alizarina, apresentando fontanela aumentada e ossificação incompleta dos interparietais.....	62

Figura 12. Feto de rata tratada entre o 6º e 15º dia de gestação com maleato de midazolam (5 mg/kg/dia), corado com vermelho de alizarina, apresentando supraoccipital bipartido.....	63
Figura 13. Feto de rata tratada entre o 6º e 15º dia de gestação com maleato de midazolam (5mg/kg/dia), corado com vermelho de alizarina, apresentando costelas onduladas, e ossificação incompleta dos ossos do crânio, em posição dorso-ventral e lateral.....	64
Figura 14. a) Feto de rata tratada entre o 6º e o 15º dia de gestação com diazepam (10mg/kg/dia), corado com vermelho de alizarina, apresentando rádio e ulna curvos. b) Feto do grupo controle sem alteração de rádio e ulna.....	65

LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA – análise de variância

BZD - benzodiazepínicos

COBEA – Colégio Brasileiro de Experimentação Animal

CREAL – Centro de Reprodução e Experimentação de Animais de Laboratório

DZ – diazepam

EAC - enzima conversora de angiotensina

EPA – *Environmental Protection Agency* – Agência de Proteção Ambiental

FDA – *Food and Drugs Administration* – Administração de drogas e alimentos

FFFCMPA – Fundação Faculdade Federal de Ciências Médicas de Porto Alegre

GABA – ácido gama -aminobutírico

ICBS – Instituto de Ciências Básicas da Saúde

IM – via intramuscular

IFTS – *International Federation of Teratology Societies* – Federação Internacional de Sociedades de Teratologia

IV – via intravenosa

KOH – hidróxido de potássio

LOEL – *lowest observed effect level* – menor dose, com efeito, observado.

MZ – midazolam

N – número de indivíduos na amostra

OECD – *Organization for Economic Cooperation and Development* – Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico

PEG – polietilenoglicol

SIAT – Sistema Nacional de Informações sobre Agentes Teratogênicos

SNC – sistema nervoso central

UFRGS – Universidade Federal do Rio Grande do Sul

VO - via oral

WHO – *World Health Organization* – Organização Mundial da Saúde

RESUMO

Benzodiazepínicos são amplamente utilizados em animais e humanos, inclusive durante a gestação. Benzodiazepínicos são utilizados como ansiolíticos, anticonvulsivantes, relaxantes musculares e sedativos.

Este trabalho investiga o potencial teratogênico dos benzodiazepínicos diazepam e maleato de midazolam em ratos Wistar. Os animais foram divididos em três grupos “experimentais”, um grupo controle que recebeu água destilada, um grupo que recebeu diazepam na dose de 10 mg/kg/dia, e um grupo que recebeu 5 mg/kg/dia de midazolam. Os animais receberam os tratamentos por administração via oral. As fêmeas gestantes foram tratadas durante o período de organogênese, que no rato é do 6° ao 15° dia da gestação. Durante a gestação as fêmeas foram monitoradas quanto ao desenvolvimento corporal, ingestão de água e ração. No 21° dia de gestação as progenitoras foram sacrificadas e avaliadas quanto à toxicidade materna sistêmica. Os fetos foram avaliados quanto a embriotoxicidade e alterações esqueléticas.

Os resultados demonstraram que as fêmeas dos três grupos tiveram ganho de peso, consumo de água e consumo de ração semelhante, assim como peso dos órgãos internos, sugerindo não haver toxicidade materna. Nos grupos diazepam e maleato de midazolam houve uma diminuição do número de fetos por ninhada ($9,2 \pm 3,17$ e $9,29 \pm 3,29$) comparado ao grupo controle ($10,76 \pm 2,62$), também houve diminuição no peso dos fetos nos grupos diazepam e midazolam ($4,73 \pm 0,59$ e $4,79 \pm 0,64$) em comparação ao grupo controle ($5,02 \pm 0,36$). Houve um aumento no número de abortos precoces nos grupos diazepam e midazolam. As perdas pós-implantação foram de 1,47% no grupo controle, 10,76% no grupo diazepam e 13,30% no grupo midazolam. A taxa de viabilidade fetal foi semelhante nos três grupos. As avaliações das anormalidades esqueléticas demonstraram um retardo de desenvolvimento assim como houve evidências de malformações nos grupos diazepam e midazolam, sendo que o grupo tratado com maleato de midazolam demonstrou um maior percentual de anormalidades esqueléticas que os fetos do grupo tratado com diazepam. Este estudo sugere efeitos teratogênicos dos medicamentos diazepam e midazolam quando utilizados nas doses testadas.

Palavras-chave: teratogenicidade - diazepam - midazolam

ABSTRACT

Benzodiazepines are commonly used for animals and humans, including during their pregnancy. Benzodiazepines are used as anxiolytic, anti-convulsants, muscle relaxants and sedatives.

This work presents the teratogenic potential evaluation of the benzodiazepines diazepam and midazolam in Wistar rats. The animals were divided in three experimental groups, one control group, that received distilled water, the diazepam group that was treated with 10 mg/kg/day, and the midazolam group with a dose of 5 mg/kg/day. The animals were treated by daily oral administration. The pregnant females were treated between 6^o and 15^o days of pregnancy, in organogenic period. During the pregnancy the water and food female intake was monitored, as their daily weight, and internal organs weight. In 21^o day of gestation, the females were killed and the maternal toxicity evaluated, their fetuses were evaluated according to the presence of skeletal abnormalities.

The results showed that the females of the three groups demonstrated weight gain, water and food intake similar as weight of their internal organs, suggesting no maternal toxicity. However, there was a decrease of fetus number for dams in diazepam ($9,2 \pm 3,17$) and midazolam group ($9,29 \pm 3,29$) in compare to control group ($10,76 \pm 2,62$), also was a decrease of fetus weight in diazepam and midazolam groups ($4,73 \pm 0,59$ and $4,79 \pm 0,64$) in compare to control group ($5,02 \pm 0,36$). There was an increase in early abortion number in diazepam and midazolam groups. The post-implantation loss were 1,47% in control group, 10,76% in diazepam group, and 13,3% in midazolam group. The rate of viability wasn't different between groups. The skeletal abnormalities evaluation demonstrated a retarded development of diazepam and midazolam groups, also was evidence of malformations in those groups. The midazolam group demonstrated a bigger percentage in skeletal abnormalities than diazepam group. This study suggests teratogenic effects of the medications diazepam and midazolam with the testing doses.

Key words: teratogenicity- diazepam- midazolam.

1 INTRODUÇÃO

A ampla utilização de fármacos durante a gestação faz com que aumente a consciência e preocupação quanto ao potencial de risco destas substâncias. Doenças neurológicas e psiquiátricas são muito comuns durante a fase reprodutiva em humanos. Os fármacos ansiolíticos normalmente são de uso crônico, sendo que gestantes que utilizam essas medicações antes de engravidarem normalmente não interrompem o uso na gestação. O estudo de seus efeitos sobre o feto é imprescindível nos centros de pesquisa laboratoriais assim como nos centros de ginecologia e neonatologia. Resultados de estudos e relatos de casos de malformações pelo uso de medicações nos leva ao fato de que gestantes devem ser medicadas com extrema cautela, muito criteriosamente.

Algumas medicações como o diazepam, utilizadas para tratar ou prevenir doenças da mãe podem ser tóxicas para fêmeas prenhes, podem ser teratogênicas, provocar a morte fetal e aborto (NELSON e COUTO, 2001b).

Os benzodiazepínicos pertencem ao grupo dos psicotrópicos mais utilizado em medicina veterinária, um grande número deste grupo foi sintetizado para o uso em medicina humana. Entre os mais utilizados estão o diazepam e o midazolam (BOOTH, 1992; FANTONI et al., 2002). Segundo Nelson e Couto (2001b) e Laegreid et al. (1992), os benzodiazepínicos são os ansiolíticos de maior uso na medicina. Este grupo de medicamentos não promove efeitos periféricos importantes, o que os torna agentes amplamente empregados (ANDRADE et al., 2002).

Os primeiros relatos experimentais correlacionando fatores externos (não genéticos) ao aparecimento de malformações em mamíferos foram na década de 1930, quando as escolas de Giroud, na França e Warkany, nos Estados Unidos realizaram experimentos em embriões de mamíferos, demonstrando que substâncias químicas exógenas administradas no período pré-natal podiam levar a importantes alterações no desenvolvimento embrionário. Na década de 1940, uma epidemia de rubéola na Áustria demonstrou um aumento na incidência de malformações congênitas associadas ao contato com o vírus. Após 1960 a ciência da teratologia teve muitos avanços, entrando em evidência após a tragédia da talidomida, medicação utilizada por gestantes para diminuir náuseas e vômitos, causando malformações severas nas crianças expostas durante a vida intra-uterina (LEMONICA, 1996).

A talidomida resultou em aproximadamente 10000 crianças malformadas na Alemanha, Japão e outras partes do mundo. A medicação não havia sido adequadamente testada, testes em roedores falharam em demonstrar o potencial teratogênico da substância. Esta tragédia desencadeou uma série de mudanças nas agências de regulamentação de medicamentos (WEBSTER e FREEMAN, 2001) A FDA em 1966 instituiu rígidos protocolos para o estudo de toxicidade reprodutiva (BECKER, 1975).

Howard e Hill (1979) relatam que os agentes teratogênicos causam de 5 a 10 % dos defeitos ao nascer. Sendo assim, estes defeitos ao nascer podem ser prevenidos se forem evitados agentes teratogênicos durante a gestação. Algumas substâncias são reconhecidas como teratogênicas. Para estas substâncias está bem estabelecido que, em condições adequadas e altas doses suficientes, são capazes de induzir efeitos teratogênicos em humanos (NEUBERT, 1992). Os benzodiazepínicos ultrapassam a barreira placentária e são excretados no leite materno, a segurança da sua utilização durante a gestação não está bem estabelecida, por isso não é indicado o uso. Alguns estudos sugerem um aumento do risco de malformações congênitas associadas com a utilização de benzodiazepínicos durante a gestação (SAFRA e OAKLEY, 1975; KELLOGG et al., 1980; MCEHATTON, 1994; PERES-LASO et al., 1994; ATHINARAYANAM et al., 1976 apud PRZYBYLSKI, 1995; PERAULT et al., 2000).

Nos pacientes veterinários, o uso de sedativos dentre outras medicações de uso crônico vem crescendo. Muitas vezes os proprietários desconhecem a prenhez ou a

possível indução de malformações durante este período pelo uso de medicações, medicando seus animais sem consultar um veterinário.

Considerando-se o elevado número de gestantes que utilizam medicações de uso crônico e pelo fato destas medicações poderem causar danos fetais e possível teratogenicidade, justifica-se a realização de ensaios biológicos para análises toxicológicas dos efeitos do uso de medicações durante o período pré-natal.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Benzodiazepínicos

O emprego de fármacos com a finalidade de reduzir a ansiedade é há muito tempo conhecido pela humanidade. Nas décadas de 1950 e 1960 surgiram os derivados benzodiazepínicos, que se tornaram bastante populares (HOLLISTER, 1983; REMENTERIA e BHATT, 1977 apud PRZYBYLSKI, 1995; SPINOSA e GÓRNIAK, 1999).

Agentes psicotrópicos são cada vez mais utilizados na medicina veterinária. Entende-se por tal designação, de maneira geral, todo fármaco capaz de causar uma ação ansiolítica, anticonvulsivante, miorelaxante e hipnótica, sem acentuada depressão do SNC (MASSONE,1994). A ação dos benzodiazepínicos é dose-dependente, à medida que se aumenta a dose a sedação progride para hipnose e, a seguir, estupor (HOBBS et al., 1996).

2.1.1 Histórico

Na metade da década de 1950, quando uma nova classe de agentes terapêuticos, os tranqüilizantes, mostrou ter uma considerável importância clínica, o laboratório Roche iniciou um programa de busca por tais substâncias. Químicos começaram a desenvolver substâncias sintéticas, após uma série de reações químicas surgiu o primeiro benzodiazepínico. Após testes de toxicidade, com resultados satisfatórios, a FDA aprovou nos Estados Unidos a substância, tendo como nome genérico clordiazepóxido e nome comercial Librium® (HOLLISTER, 1983). Os benzodiazepínicos foram

introduzidos na prática médica em 1961, tornando-se os medicamentos mais consumidos pela população dos países desenvolvidos. Nos Estados Unidos da América tornaram-se campeões de venda durante vários anos (REMENTERIA e BHATT, 1977 apud PRZYBYLSKI, 1995).

Em 1963 surgiu o diazepam, introduzido comercialmente com o nome de Valium®, tendo um espectro de ação mais amplo que o Librium®, particularmente por suas propriedades relaxantes musculares mais acentuadas e toxicidade extremamente baixa. Uma gama de derivados benzodiazepínicos foi surgindo com o passar dos anos, indicativo de uma grande valia clínica destes compostos (STERNBACH, 1983). O maleato de midazolam foi sintetizado em 1976 (BOOTH, 1992).

A eficácia dos benzodiazepínicos associada a sua segurança fez com que este grupo se tornasse o mais prescrito de todas as medicações no mundo ocidental, até a atualidade (ASHTON, 1987).

2.1.2 Estrutura química e classificação

O termo benzodiazepínico refere-se à porção da estrutura composta por um anel benzeno fundido a um anel diazepínico de sete átomos. Várias modificações na estrutura dos sistemas de anéis produziram compostos com atividades semelhantes (HOBBS et al., 1996).

Em função da meia vida de excreção ($t_{1/2}$) podem ser classificados em três grupos: a) compostos de ação ultracurta, com $t_{1/2}$ menor que 10 horas (p.ex. triazolam = 1,7 a 3 horas; **midazolam** = 2 a 5 horas e temazepam = 10 horas); b) compostos de ação curta, com $t_{1/2}$ de 10 a 24 horas (p.ex. oxazepam e lorazepam); c) compostos de ação longa, com $t_{1/2}$ maior que 24 horas (p.ex. **diazepam** = 24 a 50 horas; flurazepam = 50 a 100 horas; prazepam = 26 a 200 horas) (LARINE, 1997).

Atualmente são classificados como agentes da lista B₁, sendo utilizado para sua prescrição a Notificação de Receita tipo B, sendo que a numeração da notificação é concedida pela Autoridade Sanitária do Serviço de Vigilância local (ANDRADE, 2002). O diazepam solubiliza-se em propilenoglicol a 40%, álcool, benzoato de sódio ou

ácido benzóico. Quimicamente o diazepam denomina-se 7- cloro-1,3- diidro- 1- metil- 5- fenil- 2H- 1,4 benzodiazepina (Fig.1). O midazolam é um composto hidrossolúvel, sua estrutura química é 8-cloro-6-2-fluorofenil-1-metil-4H-imidazol [1,5 a][1,4] benzodiazepina (Fig.1) (SKARDA et al., 1997).

O diazepam e o midazolam ultrapassam rapidamente as barreiras hemato-encefálica e placentária (THURMON et al., 1996).

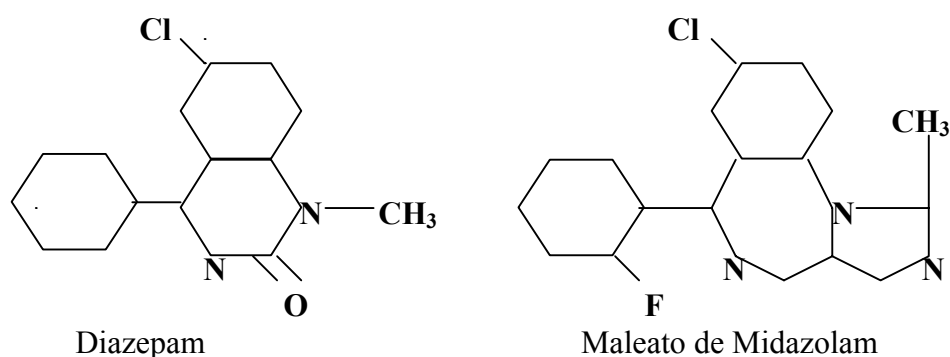


FIGURA 1. Representação da estrutura química do diazepam e maleato de midazolam.

2.1.3 Farmacocinética

Segundo Baldessarini (1996), alguns benzodiazepínicos são absorvidos de forma relativamente lenta após a administração oral, em contraste, o diazepam e o midazolam são rapidamente absorvidos. O diazepam é absorvido e liberado para os tecidos altamente vascularizados, incluindo o cérebro, onde um rápido efeito psicotrópico é produzido. Em seguida é redistribuído para tecidos menos perfundidos. Assim, o diazepam apresenta um rápido início de ação, com uma duração relativamente curta após dose única, ainda que a meia vida de eliminação seja longa.

A maioria dos benzodiazepínicos liga-se a proteína plasmática em grande extensão (85 a 95%). O diazepam é um derivado benzodiazepínico de longa ação, com meia-vida de distribuição de aproximadamente 1 hora e meia vida de eliminação de 43 ± 13 horas, podendo até mesmo prolongar com o uso contínuo (HOBBS et al., 1996).

Os mesmos autores afirmam que o maleato de midazolam inicia sua ação sedativa em aproximadamente 15 minutos após sua administração IM, com o pico de ação ocorrendo 30 a 60 minutos após a injeção. Após injeções IV, sua ação ocorre em 3 a 6 minutos. Sua meia vida de eliminação é de 3 a 3,9 horas, sendo a distribuição e eliminação linear de primeira ordem. O midazolam é um derivado benzodiazepínico de curta ação, tendo meia vida de eliminação de 1,3 a 2,2 horas (BROWN et al., 1979 apud MASSONE, 1994).

Os benzodiazepínicos são geralmente submetidos a processos complexos de biotransformação, sobretudo através de vários sistemas enzimáticos microsossomais diferentes no fígado, sendo os principais a N- desmetilação e hidroxilação (LARINE, 1997; PADDLEFORD, 2001). Os compostos hidroxilados são excretados sob a forma conjugada como glicorunídeos, enquanto os produtos N-desmetilados parecem ser excretados conjugado e não conjugado. Os principais metabólitos do diazepam são: o nordiazepam que é ativo e tem meia vida de eliminação de até 50 horas (FANTONI et al., 2002); e o oxazepam, conjugado a nível hepático é excretado pela bile sofrendo hidrólise no intestino com liberação do composto ativo que é reabsorvido, em indivíduos normais a meia-vida do oxazepam é calculada como sendo de 6 a 24 horas. A circulação êntero-hepática do diazepam e de seus metabólitos pode ser parcialmente responsável pelos efeitos prolongados do composto. Em indivíduos submetidos a tratamento contínuo com diazepam observa-se um aumento considerável da concentração plasmática de nordiazepam ou desmetildiazepam e acúmulo deste composto no cérebro. O diazepam atua como indutor enzimático a nível microsossomal, estimulando a sua própria biotransformação, o midazolam não produz indução enzimática (LARINE, 1997).

A maioria dos metabólitos são excretadas na urina. A curva de concentração plasmática pelo tempo do diazepam é bifásica: uma fase de distribuição inicial rápida e intensa e uma fase de eliminação terminal prolongada. A meia vida de eliminação pode ser prolongada no recém nascido, nos idosos e nos pacientes com doença hepática (LARINE, 1997; PADDLEFORD, 2001).

2.1.4 Mecanismos de ação

Os benzodiazepínicos têm um amplo espectro de atividades farmacológicas, sendo que um fator marcante é sua seletividade de ação no SNC. O diazepam atua em sítios de receptores específicos localizados nas terminações nervosas pós-sinápticas, sendo que a maior concentração destes receptores é localizada no córtex cerebral. Quando utilizado em doses farmacologicamente indicadas, não ocorre efeito direto nos órgãos periféricos e nos tecidos (HAEFELY, 1983).

Os benzodiazepínicos exercem muitos de seus efeitos farmacológicos potencializando a atividade dos neurotransmissores inibitórios do SNC (ácido gama aminobutírico - GABA e a glicina) e abrindo os canais de cloro, com hiperpolarização das membranas, impedindo a propagação do impulso nervoso. Também produzem seus efeitos combinando-se com receptores para as benzodiazepinas do SNC (BZ₁ e BZ₂) (SKARDA et al., 1997). Segundo Schatzberg e Cole (1993), os receptores específicos são encontrados em várias regiões do cérebro, estando acoplados aos receptores do GABA, mediando ações ansiolíticas, sedativas e anticonvulsivantes.

O ácido gama-aminobutírico (GABA) é o principal neurotransmissor inibitório, existindo em 60-70% de todas as sinapses do cérebro, embora em concentrações variáveis (SWINYARD et al., 1988; FANTONI et al., 2002). Como a maioria dos neurotransmissores, GABA é armazenado em vesículas sinápticas e liberado de uma maneira dependente de cálcio, logo após a despolarização da membrana pré-sináptica. Após a liberação de GABA na fenda sináptica, este se liga a receptores GABA na superfície do neurônio pós-sináptico. A ação do GABA termina quando é recaptado para os terminais pré-sinápticos ou para o interior das células gliais, podendo ser rearmazenado ou metabolizado. O desenvolvimento de substâncias com propriedades específicas antagonistas e agonistas específicas permitiu a descoberta de dois tipos de receptores GABA, sendo chamados de GABA_A e GABA_B. Os benzodiazepínicos ligam-se ao receptor GABA_A, aumentando a resposta inibitória mediada pelo GABA, por aumento da afinidade do receptor por GABA (MacDONALD e TWYMAN, 1991; CORTOPASSI et al., 2002). O receptor GABA_A possui regiões de reconhecimento para diversas substâncias, incluindo BZD, barbitúricos, esteróides, picrotoxina, zinco e avermectina (FANTONI et al., 2002).

2.1.5 Efeitos farmacológicos e indicações

Os benzodiazepínicos apresentam perfil farmacológico semelhante, mas há diferenças quanto à seletividade pelos receptores, explicando os diferentes efeitos farmacológicos.

O diazepam tem efeito calmante, relaxante muscular e anticonvulsivante. Sendo utilizado para o alívio da ansiedade, tensão, insônia, doenças neuromusculares com espasticidade muscular, estados epiléticos, como medicamento pré-anestésico para promover sedação e relaxamento muscular (SALIM, 1987; MASSONE, 1994; PADDLEFORD, 2001; FANTONI et al., 2002; ANDRADE et al., 2002). O diazepam é utilizado como ansiolítico no cão e no gato, bem como para fins sedativos, estados convulsivos e como estimulante do apetite (KITCHELL, 1992). Em humanos o diazepam também é utilizado no tratamento de desintoxicação na dependência física de outros sedativos incluindo o álcool, controlando e prevenindo delírios e alucinações (BAN, 1969; MADALENA, 1975; SMITH, 1983; GILMAN et al., 1990).

Em obstetrícia o uso dos benzodiazepínicos cresceu muito: sedação no trabalho de parto, ameaça de feto prematuro, hipertensão arterial, crises convulsivas, depressão puerperal (GILMAN et al., 1990).

O midazolam é considerado como uma substância que, apesar de ter as características das benzodiazepinas, exerce ainda uma ação hipnoindutora anestésica, indução do sono (MASSONE, 1994), além de uma ação ansiolítica e miorelaxante (CORDIOLI, 2000). No homem, o midazolam parece ser um agente satisfatório na indução anestésica, porém não pode ser usado isolado para manter uma anestesia (BOOTH, 1992). Nas dosagens habituais para medicação pré-anestésicas nos humanos (0,07 mg/kg IM) produz amnésia e poucos efeitos colaterais. A função mental retorna ao normal em 4 horas, tornando-o uma escolha para cirurgia ambulatorial ou anestesia regional. (KENNEDY e LONGNECKER, 1996). Segundo Thurmon et al. (1996), os efeitos de hipnose e sedação que são intensos em humanos não se evidenciam tanto em cães e gatos, mas baixas doses de midazolam associados a opióides ou agentes dissociativos previnem hipertonicidade muscular e aumentam a sedação (CORDIOLI, 2000).

O diazepam e o midazolam podem ser administrados por via oral, intramuscular ou intravenosa. A injeção IV de diazepam deve ser lenta, evitando a formação de trombo venoso (PADDLEFORD, 2001).

2.1.6 Doses sugeridas

No cão, o diazepam é rapidamente biotransformado e a tolerância a seu efeito antiepiléptico se desenvolve rapidamente (BOOTH, 1992). Para humanos, a dose recomendada de diazepam é muito variada, dependendo de diversos fatores, tais como o objetivo do uso, a resposta individual à medicação e o critério médico (SALIM, 1987). As doses indicadas, conforme a indicação e a espécie estão na Tabela 1.

TABELA 1 - Dosagens e vias de administração indicadas do diazepam e midazolam em cães, gatos, homens e ratos, conforme indicação

Fármaco	Indicações	Espécie animal	Dosagem	Vias de administração
diazepam	- convulsões	cão e gato	5-20 mg ou 0,5-1 mg/kg ¹	IV
		homem	até 60 mg ou mais ²	IV
	- pré-anestésico	cão e gato rato	0,4 mg/kg, máximo 10mg ³ 3-5 mg/kg ⁴	IM, IV IP
diazepam	- relaxante musc. e ansiolítico	cão	0,5-1 mg/kg ⁵	VO
		gato	0,3-0,8 mg/kg ⁵	VO
		homem	5 a 30 mg/dia ²	VO
midazolam	- pré-anestésico	cão e gato	0,1-0,2 mg/kg ³	IM, IV
		homem	0,07 mg/kg ²	IM, IV
		rato	1-2 mg/kg ⁶	IM, SC
	- indutor do sono	homem	15-30 mg	VO

¹ BOOTH, 1992; ² SALIM, 1987; ³ PADDLEFORD, 2001; ⁴ ALLEN et al., 1993; ⁵ NELSON e COUTO, 2001a.; ⁶ MASON, 1997.

2.1.7 Reações tóxicas e efeitos colaterais

Os efeitos cardiovasculares dos benzodiazepínicos são brandos, e isto encoraja seu uso freqüente em pacientes cardiopatas. O diazepam, no homem, em dose intravenosa de 5 a 10 mg, provoca discreta diminuição da freqüência respiratória, na pressão arterial e no trabalho sistólico ventricular esquerdo. O aumento da freqüência cardíaca e a diminuição no débito cardíaco também podem acontecer. Os efeitos são ínfimos, e é improvável que os benzodiazepínicos fornecidos em doses terapêuticas usuais, por via oral, deprimam significativamente a função cardiovascular (BALDESSARINI, 1996). O midazolam tem efeitos colaterais hemodinâmicos mínimos, fornece amnésia confiável e reduz a dose necessária de narcóticos durante a cirurgia (KENNEDY e LONGNECKER, 1996). Ocasiona ligeira queda de pressão arterial, decorrente da redução da resistência vascular periférica (PADDLEFORD, 2001; FANTONI et al., 2002).

Diazepam e midazolam podem causar amnésia anterógrada, ocorrendo mais freqüentemente nas primeiras horas após a administração dos fármacos (PADDLEFORD, 2001; FANTONI et al., 2002).

Os efeitos colaterais esperados dos depressores do SNC, constituídos de sonolência e ataxia, representam extensões das ações farmacológicas destas medicações. Segundo McNamara (1996), os efeitos colaterais principais do tratamento oral prolongado com clonazepam são sonolência e letargia. Estes efeitos ocorrem em 50% dos pacientes no início, mas tendem a ceder com a administração continuada. A incoordenação muscular e a ataxia são menos freqüentes, embora estes sintomas possam ser mantidos em níveis toleráveis reduzindo-se a dose ou à medida que esta é aumentada. Um aumento na hostilidade e na irritabilidade, além dos pesadelos vívidos ou conturbadores, estão algumas vezes associados aos benzodiazepínicos. O ganho de peso, que pode ser consequência do aumento do apetite, pode ocorrer em alguns pacientes.

A superdose com benzodiazepínicos é freqüente, mas as seqüelas graves são raras, a menos que o etanol ou outras drogas também sejam consumidas. O tratamento para a dosagem excessiva é de suporte das funções respiratória e cardiovascular. A descoberta de que certos imidazol-benzodiazepínicos (flumazenila) apresentam efeitos antagonistas

seletivos contra os benzodiazepínicos, fornece o desenvolvimento de um antagonista clinicamente útil para pacientes que receberam doses excessivas de benzodiazepínicos ou para reverter seus efeitos quando os mesmos não são mais necessários (BALDESSARINI, 1996). A dose do flumazenila é de 0,02 a 0,1 mg/kg IV, seu efeito tem duração de aproximadamente 1 hora (PADDLEFORD, 2001).

A dependência química em relação aos benzodiazepínicos pode se desenvolver se o paciente ingerir dez a vinte vezes a dose normal por uns dois meses, ou ingerir a dose indicada por um ano ou mais. Além da dependência química, os efeitos mentais agradáveis e os aspectos hipnotizantes podem resultar em dependência mental ou psicológica. A abstinência dos benzodiazepínicos causa um desejo forte da substância, seguindo de mais ansiedade, distúrbios do sono, nervosismo e agitação, movimentos trêmulos e até alucinações. Algumas pessoas ficam com perda temporária da visão, da audição ou do olfato. Os sintomas da abstinência evoluem e chegam ao auge na primeira até a terceira semana. Isso pode incluir muitos acessos e convulsões (INABA e COHEN, 1991). Segundo O'Brien (1996), pode ser difícil distinguir os sinais e sintomas de abstinência da medicação do reaparecimento dos sintomas de ansiedade que provocaram a prescrição inicial.

Os sintomas de superdosagem abrangem sonolência, perda de consciência, depressão respiratória, coma e morte, para isto são necessários 50 a 100 comprimidos de diazepam para causar uma superdosagem. A relativa segurança dos benzodiazepínicos não persiste quando eles são misturados com álcool ou outros depressores. Mortes podem ser provocadas por alguns comprimidos e pequena quantidade de álcool (INABA & COHEN, 1991).

2.2 Uso de medicações durante a gestação

Há vários cenários envolvendo a segurança do uso de medicações durante a gestação. Pode-se fazer o uso de medicações em qualquer mulher ou animal em idade reprodutiva, estas podem estar no início da gestação ou ter o início da gestação durante o tratamento. Nestes casos, a exposição ao fármaco ocorre durante a fase mais vulnerável do desenvolvimento embrionário. Também pode ser feita uma prescrição quando há conhecimento da gestação, esta devendo ser criteriosa. Também pode ocorrer

automedicação, onde não há orientação profissional, muitas vezes havendo desconhecimento de possíveis danos fetais (WEBSTER e FREEMAN, 2001).

Conforme Bernardi (1999), o período de desenvolvimento embriológico e fetal consiste em diversas mudanças, sendo estas marcadas por fases. O desenvolvimento de mamíferos pode ser dividido em quatro fases: implantação, organogênese, desenvolvimento fetal e período neonatal. Os medicamentos, quando utilizados no período de organogênese, podem levar a teratogênese, se a lesão for compatível com a vida do animal, ou a embriofetalidade, caso não seja. Cada um dos sistemas em formação apresenta um período crítico, no qual ele é mais suscetível ao agente. No rato, por exemplo, o ácido acetilsalicílico só é capaz de produzir fenda palatina se o feto for exposto entre o 10º e 16º dias de gestação, período em que se forma o palato. Quanto maior for o período de formação de um determinado sistema maior será o risco de seu desenvolvimento ser afetado por um determinado agente. Por isso, nos testes de teratogenicidade são estudadas as possíveis anomalias ósseas dos animais, pois o período de organogênese do esqueleto é bastante longo. Na Fig. 2 estão ilustrados os períodos críticos do desenvolvimento do rato.

Dias de gestação		Dias de lactação	
1-5	6 7 8 9 10 11 12 13 14	15 16 17 18 19 20 21	1 a 21 pós-natal
Período de Implante	Período de organogênese	Período de Desenvolvimento	Período Neonatal
Morte Pré-natal	anormalidades maiores	anormalidades menores e funcionais	Maturação de receptores, diferenciação sexual do cérebro, formação de sistemas enzimáticos.

FIGURA 2. Períodos do desenvolvimento dos diferentes órgãos e sistemas do rato, segundo Bernardi (1999).

O período de implantação, assim como o período de organogênese e de desenvolvimento fetal, ocorre em tempos diferentes nas diferentes espécies animais, como exemplificado na Tabela 2 (BERNARDI, 1999).

Segundo o mesmo autor, os medicamentos que atravessam a placenta atingem o feto. As substâncias endógenas ou exógenas que atravessarem a placenta vão penetrar na circulação fetal através da via umbilical e passar pelo fígado do feto antes de atingir o coração e a circulação sistêmica. O líquido amniótico é o mais importante reservatório de substâncias exógenas do feto, e a principal via de excreção.

TABELA 2. Período de desenvolvimento embriofetal de várias espécies animais, segundo Bernardi (1999).

Período do desenvolvimento fetal após a fecundação (dias)			
Espécie	Implantação	Organogênese	Desenvolvimento Fetal
Camundongo	4-5	6-15	16-21
Rato	5-6	6-15	16-21
Coelho	7-8	6-18	19-33
Ovelha	16-17	14-36	37-150
Bovinos	22	15-45	45-290
Eqüinos	37	12-60	60-336
Macaco	9-11	20-45	46-164
Homem	5-8	21-56	57-267

Estudos realizados na Itália (Instituto Mário Negri) com 14421 gestantes de vinte países mostraram que 86% das pacientes gestantes utilizavam alguma medicação durante a gestação, variando de 1 a 34 tipos de medicações (COOPERATIVE, 1991 apud PRZYBYLSKI, 1995). Przybylski (1995) relatou que em um estudo realizado com 661 gestantes em Porto Alegre 75% (497) usaram medicamentos durante a gravidez, sendo que 7,6% (50) apresentavam patologias crônicas, sendo as medicações prescritas antes e mantidas durante a gravidez. Dentre as medicações de uso crônico mais utilizadas estavam os benzodiazepínicos diazepam (3,4%) e bromazepam (3,4%).

Os efeitos gerados pela exposição pré e perinatal podem levar a distúrbios irreversíveis, pois as alterações são produzidas durante a formação ou diferenciação dos órgãos (NEUBERT et al., 1977; LO e FRIEDMAN, 2002). Estudos na área da toxicologia reprodutiva avaliam os efeitos das substâncias químicas utilizadas durante o período pré-natal sobre o desenvolvimento fetal e possível efeitos teratogênicos, utilizando animais de laboratório como modelos experimentais (NEUBERT et al., 1977).

Existe uma classificação das medicações quanto ao seu fator de risco ao feto. Em 1979 a FDA propôs uma classificação para os fatores de risco :

- Categoria A - Estudos controlados não encontraram riscos para o feto, sendo a possibilidade de dano fetal remota.

- Categoria B - Não há estudos controlados em mulheres grávidas. Os estudos em animais não demonstraram dano fetal, mas efeitos adversos podem ocorrer.
- Categoria C - Não há estudos controlados em mulheres grávidas, estudos em animais demonstraram dano fetal. Usadas na gravidez somente se os benefícios justificarem os riscos.
- Categoria D - Há evidências de risco fetal humano. Usadas somente se o benefício materno compensar o risco fetal.
- Categoria X - O dano fetal observado supera qualquer benefício materno. São medicações contra-indicadas em gestantes ou futuras gestantes (BRIGGS et al. apud PRZYBYLSKI, 1995).

2.3 Teratologia

A palavra teratologia, derivado do grego *teras* significa monstro, é o estudo do desenvolvimento anormal ou produção de defeitos no feto. Esses defeitos podem ser deformidades, rupturas, displasia ou malformações (HANSEN e YANKOWITZ, 2002). Deformidade é forma ou posição anormal de uma parte do corpo. Ruptura é um defeito morfológico de um órgão, parte do corpo, ou região maior do corpo resultante do desarranjo de um desenvolvimento originalmente normal ou de uma interferência sobre ele. Displasia é uma anormalidade da organização das células ao formarem tecidos, é um processo de desistogênese. Malformações são defeitos morfológicos de um órgão ou parte de um corpo resultante de um processo de desenvolvimento intrinsecamente anormal (BRUNONI, 2002). Conforme Bernardi (1999) malformação não significa apenas formação anormal de tecidos, mas também anormalidades bioquímicas. Estas podem ser causadas pela ação direta de um agente tóxico sobre o feto ou através de ação sobre o organismo materno.

Segundo o mesmo autor, as principais categorias de defeitos são as malformações. Estas podem ser *malformações menores*, freqüentes na população geral e não acarretarem maiores problemas aos portadores, sendo muitas delas variantes normais do fenótipo. As *malformações maiores* são as que trazem conseqüência médica ou cosmética ao portador, exigem tratamento cirúrgico ou deixam seqüelas funcionais importantes.

As principais anormalidades estruturais congênitas estão presentes no nascimento em aproximadamente 1 a 3 % dos humanos recém nascidos. Sendo que este número dobra até o primeiro ano de vida, por causa das anormalidades não diagnosticadas no nascimento, como alguns defeitos cardíacos como exemplo. A incidência de disfunções congênitas (ex. retardo mental) é difícil de mensurar como uma taxa para os humanos, devendo estar em torno de 10% dos recém nascidos. As causas destas anormalidades podem ser genéticas, como mutações espontâneas ou tóxicas (efeitos teratogênicos) (NEUBERT et al., 1992).

Teratogenicidade é uma indução exógena de anormalidades de desenvolvimento estrutural ocorrida durante a fase de organogênese (NEUBERT et al., 1992; BERNARDI, 1999). Segundo Osweiler (1998), teratogenia é o desenvolvimento de defeitos funcionais ou estruturais não letais no feto. A suscetibilidade a **alterações morfológicas** aumenta à medida que as camadas germinativas começam a diferenciar, ocorrendo com maior probabilidade no início da organogênese (fim do primeiro terço da gestação) do que quando os órgãos estão diferenciados, durante os estágios de clivagem, os toxicantes usualmente causam morte do conceito. As **alterações funcionais** afetam processos homeostáticos ou metabólicos (p.ex., o desenvolvimento e a ativação de uma enzima específica) e ocorrem após o final da organogênese. As alterações funcionais podem ocorrer sem alterações morfológicas detectáveis. Durante o período de gestação, a exposição materna a um agente químico tóxico pode levar a diversas respostas e seu efeito final pode variar desde a morte até o nascimento de um indivíduo normal (Fig.3).

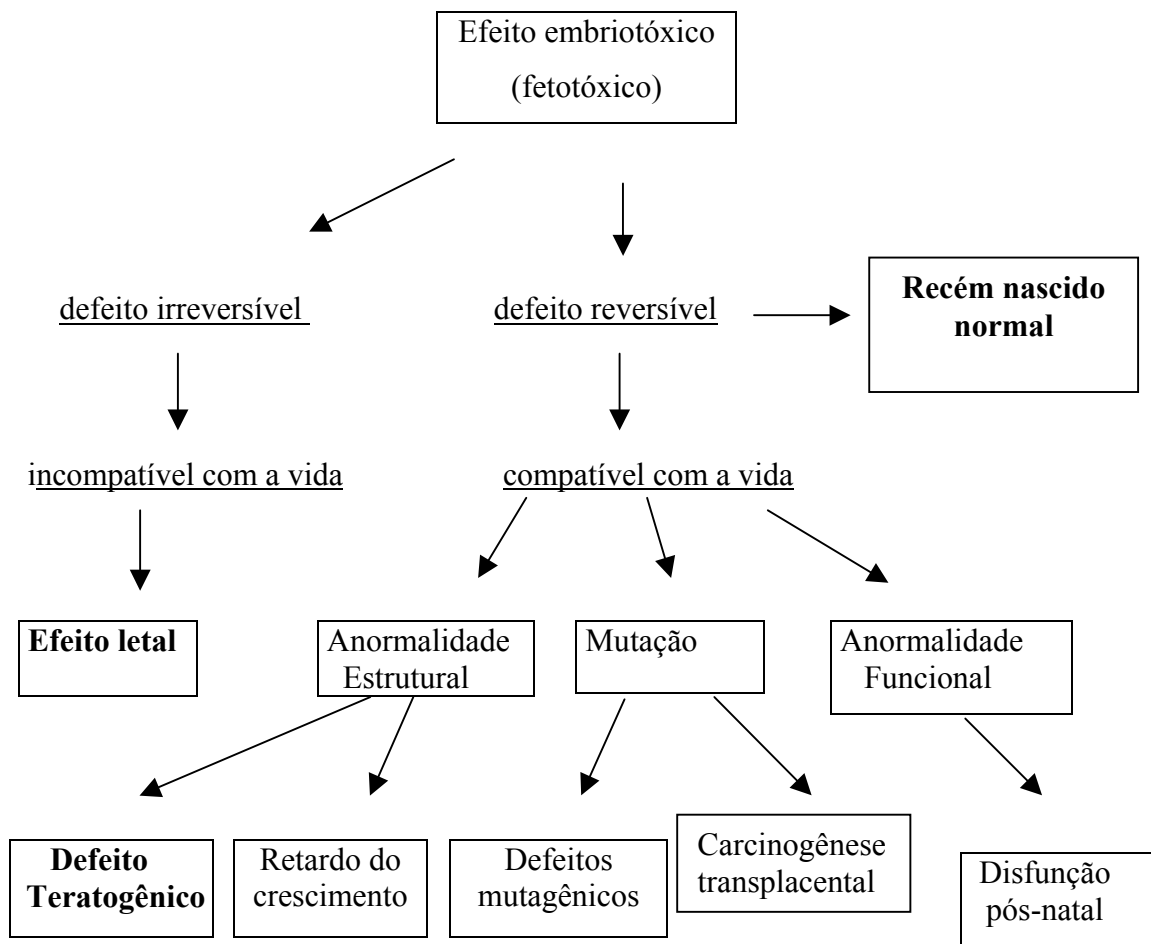


FIGURA 3. Conseqüências da exposição materna aos agentes químicos durante a gestação. Segundo Lemonica (1996) modificado.

Como todos os efeitos tóxicos, os efeitos teratogênicos são dose-dependentes. A redução da dose e da exposição, são os métodos mais eficazes de reduzir o risco (NEUBERT,1992).

A resposta ao teratôgeno é amplamente dependente do genótipo do embrião, a talidomida, por exemplo, é teratogênica a humanos, coelhos e macacos e não ao rato. A resposta ao teratôgeno também varia dependendo do estágio de desenvolvimento atingido pelo conceito, como na exposição da espécie humana ao vírus da rubéola, onde temos anormalidades ópticas e cardíacas quando a exposição ocorre no primeiro bimestre de gestação, enquanto que na exposição no terceiro mês, leva à gênese de

malformações óticas. Outro fator diferenciador dos efeitos é o estágio de desenvolvimento do conceito no momento da exposição (OSWEILER, 1998).

Como causadores de teratogenia pode-se citar como agentes físicos como a exposição a radiações e o aumento da temperatura; agentes biológicos, como o vírus da rubéola, o citomegalovírus e os protozoários do gênero *Toxoplasma*; agentes químicos como os fármacos, agroquímicos, contaminantes ambientais e aditivos alimentares (MORON, 2002; LEMONICA, 1996).

A maioria das medicações suspeitas de causar dano fetal produz pequeno aumento de incidência de anomalias sendo estas também encontradas em populações não expostas, porém é importante considerar o risco relativo para se avaliar a incidência de malformações - relação entre a incidência de fetos expostos e não expostos a uma determinada substância. Uma medicação de risco relativo 2, por exemplo, dobraria as chances de malformações entre os usuários desta medicação (RAYBURN e MARSDEN, 1993).

De todas as medicações avaliadas para prescrição, apenas em torno de 20 medicações ou grupos de medicações (Tabela 3) são reconhecidas como sendo teratogênicas para humanos (JONES, 1999 apud WEBSTER e FREEMAN, 2001). Nos últimos anos houve considerável evidência que duas outras drogas também são teratogênicas para o homem: a prostaglandina misoprostol quando utilizada em doses abortivas (GONZALEZ et al., 1998 apud WEBSTER e FREEMAN, 2001) e talvez o agente antifúngico fluconazol (PURSLEY et al., 1996 apud WEBSTER e FREEMAN, 2001).

Além das medicações comprovadamente teratogênicas, existem mais de 175 substâncias químicas listados como tendo potencial toxicante reprodutivo segundo Proposta 65 na Califórnia. Nessa lista, porém são citados outros químicos que não medicações. A Proposta 65 foi decretada na Califórnia por perceberem que não estavam sendo protegidos pelas agências regulamentadoras locais, estaduais ou federais, sendo publicado uma lista de substâncias químicas toxicantes reprodutivas e de desenvolvimento (MATTISON, 1992).

TABELA 3 – Grupos e substâncias reconhecidas como teratogênicas para humanos, segundo Webster e Freeman, 2001, modificado

anticonvulsivantes:

hidantoína (p.ex., fenitoína)
primidona
dionas (p.ex., trimetadiona)
ácido valpróico
carbamazepina

agente antineoplásicos

agentes alquilantes
bussulfano
ciclofosfamida
clorambucil
mecloretamina
antimetabólitos
aminoterina
metotrexato

citarabina

hormônios androgênicos

(p.ex., danazol)

drogas antitireóideas

(p.ex., propiltiouracil)

antibióticos aminoglicosídeos

(estreptomicina)

anticoagulantes cumarínicos

(p.ex., varfarina)

ácidos retinóicos

(p.ex., isotretinoína)

inibidores EAC (enzima conversora de angiotensina)

(p. ex., captoprila)

tetraciclina

(p.ex., tetraciclina)

outras medicações

dietilestilbestrol
talidomida
penicilamina
lítio

Apesar de apenas aproximadamente 20 a 30 medicamentos serem reconhecidas como teratogênicas, 7% dos mais de 1000 medicamentos listadas no Guia de Referências Médicas da FDA são classificadas na categoria X. Esta é uma das razões pela qual a Sociedade de Teratologia sugere o abandono da classificação da FDA. Uma opção para se obter informações atualizadas é a utilização de banco de dados como *REPROX* e *TERIS*. Estes podem ser adquiridos para o uso em computadores pessoais.

Outros bancos de dados direcionados a médicos e ao público podem ser achados *on line* (HANSEN e YANKOWITZ, 2002).

A Tabela 4 resume os efeitos de alguns medicamentos que produzem malformações e outros efeitos na reprodução de animais, quando empregados nos diferentes períodos de desenvolvimento (BERNARDI, 1999).

TABELA 4. Medicamentos que produzem teratogênese, anomalias fetais ou efeitos tóxicos no desenvolvimento de animais, segundo Bernardi (1999)

Medicamento	Anomalia
Hormônios	
Andrógenos	Virilização de fêmeas, defeitos genitais
Estrógenos	Feminiza os fetos machos
Progesterona	Defeitos genitais, masculinização de fêmeas
Dietilestilbestrol	Virilizante, embriofetividade, criptorquidia
Glicocorticóides	Fenda palatina
Anticonvulsivantes	
Fenitoína e trimetadiona	Fenda palatina, defeitos cardiovasculares, hipoplasia de dedos, baixo peso ao nascer, morte fetal
Difenil-hidantoína	Microcefalia, anormalidades craniofaciais e cardíacas, hipoplasia digital
Ácido valpróico	Defeitos no tubo neural, lesões espinhais, hidrocefalia
Antibióticos e quimioterápicos	
Aminoglicosídeos	Dano no VIII nervo (ototoxicidade, surdez, desequilíbrio)
Cloranfenicol	Morte fetal
Cloroquina	Retinopatia
Griseofulvina, miconazol e cetoconazol	Malformações do crânio, face, coração, palato e vértebras
Tetraciclina	Descoloração dos dentes, incorporação no tecido ósseo
Sulfonamidas	Icterícia neonatal
Anticoagulantes	
Varfarina e heparina	Malformações no SNC, olhos e coração, abortos, natimortos, baixo peso ao nascer, retardo crescimento

(Cont.) TABELA 4. Medicamentos que produzem teratogênese, anomalias fetais ou efeitos tóxicos no desenvolvimento de animais, segundo Bernardi (1999)

Medicamento	Anomalia
Antiparasitários	
Parbendazol, hicantone e cambendazol	Teratogênese generalizada e embriofetividade
Tiabendazol	Fenda palatina, fusão de vértebras, malformação dos membros
Triclorfeno	Anormalidades esqueléticas, lesões no SNC
Vitaminas e metais	
Vitamina A	Exoftalmia, microftalmia, anomalias faciais e de membros
Vitamina D	Anomalias ósseas
Arsênico	Malformação genitourinária, anormalidades ósseas
Cádmio	Fenda palatina, malformação mandibular
Chumbo	Hemorragias cerebrais, hidrocefalia, anormalidades SNC
Manganês	Alterações esqueléticas e ataxia
Mercúrio	Malformações do SNC, olhos e corpo
Zinco	A deficiência leva vários defeitos, hidrocefalia
Analgésicos	
Salicilatos	Abortos ou reabsorções, malformações esqueléticas, espinha bífida, anormalidades cardíacas, hemorragias
Anti-histamínicos	
Clorciclizina, ciclizina	Fenda palatina, microstomia, cataratas, braquignatia, abortos

Recentemente, no Brasil, foi criado um Sistema Nacional de Informações sobre Agentes Teratogênicos na Gestação conhecidos como SIATs ou Disque-Gestante. Os SIATs têm a finalidade de esclarecer dúvidas de gestantes, médicos e pesquisadores a respeito dos efeitos teratogênicos de medicamentos, radiações e doenças incidentes durante a gestação (BRUNONI, 2002; UFRJ, 2002).

2.4 Avaliação de toxicidade reprodutiva

Toda substância, segundo a toxicologia, pode ser considerada um agente tóxico, dependendo das condições de exposição. A toxicidade de uma substância a um organismo vivo pode ser considerada como a capacidade de causar dano grave ou morte. Em virtude do embrião e o feto serem particularmente sensíveis, as gestantes devem tomar cuidados especiais, evitando a exposição às substâncias tóxicas (BARROS e SOLANGE, 1996).

A toxicologia do desenvolvimento estuda os efeitos adversos que ocorrem nos organismos em desenvolvimento decorrentes da exposição a substâncias químicas antes da concepção, durante o desenvolvimento pré-natal ou pós-natal até a puberdade. A toxicologia do desenvolvimento engloba a teratologia e a toxicologia da reprodução (BARROS e SOLANGE, 1996).

Toxicidade reprodutiva é a ocorrência de qualquer interferência causada por alguma substância na capacidade reprodutiva de machos e fêmeas, incluindo o desenvolvimento pré-natal (NEUBERT et al. 1992).

Quando se inicia um estudo toxicológico reprodutivo, deve-se aproximar as condições em que as intoxicações ocorrem com as condições propostas em ambiente laboratorial, sem que se interfira no processo fisiológico completo dos animais em estudo (EPA, 1996).

Nos estudos de toxicidade, animais são utilizados no lugar do homem. A escolha dos animais de laboratório nos testes toxicológicos está baseada na sua fácil manutenção e observação, na possibilidade da utilização de um grande número de indivíduos, com ciclos vitais curtos, alta prolificidade, padronização genética e do ambiente de laboratório. As espécies de laboratório convencionais são o *Mus domesticus domesticus* (camundongo) e o *Rattus norvegicus* (rato). As ratas são poliétricas anuais, manifestam vários ciclos estrais de 4 a 5 dias, ao longo de um ano (COBEA, 1996).

Os ratos são os modelos preferenciais para avaliação dos efeitos de xenobióticos sobre a reprodução e fertilidade animal e humana, porém são exigidas duas espécies, sendo uma não roedora, como os coelhos (NEUBERT et al., 1977).

Freqüentemente a linhagem de rato utilizada é a Wistar. A maturidade sexual é atingida entre 60 e 75 dias. A fertilidade máxima dos machos está entre 100 e 300 dias e nas fêmeas entre 90 e 120 dias. A senescência reprodutiva se dá aproximadamente a partir de 360 dias de idade (COBEA,1996; CHAHOUD e KWASIGROCH,1977).

Os ciclos estrais estão divididos em quatro fases, segundo Chahoud e Kwasrigroch (1977):

- a) proestro – duração de 12 horas, fase caracterizada pelo grande número de células nucleadas e células proliferativas do epitélio vaginal ;
- b) estro – duração de 14 horas, fase caracterizada pela presença de células cornificadas e anucleadas, a ovulação ocorre nesta fase, durante o período escuro;
- c) metaestro – duração de 21 horas, fase com inúmeros leucócitos, filamentos de muco e células poligonais nucleadas;
- d) diestro – fase com duração de 57 horas, sendo o período de repouso entre os períodos de acasalamento, estando a mucosa vaginal fina, com muitas células do tipo epitelial, muco e leucócitos. O tempo de gestação das ratas é de 20 a 23 dias, sendo 21 dias o tempo mais freqüente.

Conforme Bernardi (1999), a gestação é dividida em fases, nos ratos essas fases são:

- a) pré-implantação – dia da concepção (dia zero) até o 5º dia ;
- b) implantação – 5º e 6º dias;
- c) organogênese – do 6º ao 15º dia;
- d) desenvolvimento fetal – 16º ao 21º dia.

No final da organogênese inicia-se o período de maturação e de diferenciação cerebral, que só irá terminar no período neonatal.

Nos estudos de teratogenicidade a rata, apesar de inúmeras vantagens, possui a desvantagem de ter baixa sensibilidade a efeitos teratogênicos em relação a algumas

substâncias (cortisona e talidomida), recomendando-se a utilização de uma segunda espécie, preferencialmente uma não roedora. A talidomida, por exemplo, é uma substância que não apresenta toxicidade para o rato, mas possui alto grau de efeito teratogênico para o homem. Outro exemplo é o metotrexato, sendo este teratogênico para ratos e não para macacos e humanos (NEUBERT e CHAHOUD,1995).

Nos estudos de toxicidade reprodutiva, são avaliados efeitos sobre a fertilidade, transporte e implantação do zigoto, desenvolvimento embrionário, potencial teratogênico, parto, lactação, desmame e desenvolvimento de anomalias pós-natal. Com relação às dosagens, três dosagens devem ser testadas: a maior dosagem que causa o menor efeito tóxico (como a redução do ganho de massa corporal em relação ao grupo controle), a menor dosagem que, abaixo da dosagem tóxica, manifesta atividade farmacológica para a espécie em estudo (LOEL – dose) e outra dosagem intermediária (FROHBERG, 1977).

As agências normativas internacionais, EPA (1996), FDA (*Food and Drug Administration*) e OECD (*Organization for Economic Cooperation and Development*), estabelecem, de acordo com o produto a ser testado, protocolos a serem elaborados que resumem os testes chamados de 3 segmentos e que abrangem todos os períodos do ciclo evolutivo (LEMONICA,1996).

Segmento I – Avalia efeitos tóxicos na fertilidade de machos e fêmeas. Os animais são tratados com a substância teste por um período de tempo que antecede o acasalamento, por no mínimo 60 dias no caso dos machos, para que se possa abranger um ciclo espermático completo, e 15 dias para as fêmeas, para abranger pelo menos três ciclos estrais. Após o acasalamento as fêmeas são tratadas durante todo o período de gestação e lactação com a substância. Ao final da gestação, metade das fêmeas é sacrificada, seu conteúdo uterino examinado para determinação de perdas pré e pós-implantação e os fetos examinados quanto à presença de malformações. A outra metade das fêmeas é deixada parir naturalmente e os recém nascidos observados durante todo o período de aleitamento, durante o qual as mães continuam recebendo a substância em estudo e, após são sacrificados e observados quanto à presença de malformações internas. Este estudo nos informa sobre a capacidade reprodutiva materna, a fertilidade,

a taxa de gestação e a viabilidade dos fetos, do nascimento até o período de desmame (LEMONICA, 1996; NEUBERT et al., 1992).

Segmento 2 – Avalia a toxicidade pré-natal, são os testes de teratogenicidade propriamente ditos. O teste é usado para avaliar substâncias usadas para tratamento médico, e menos freqüentemente para substâncias ambientais. Rotineiramente os ratos e coelhos são as espécies selecionadas para estes testes. Também se pode utilizar camundongos, cães e gatos, e menos freqüentemente utiliza-se hamsters e, em situações especiais primatas não humanos. O agente em estudo é administrado durante o período de organogênese, ratos e camundongos do dia 5 ao dia 15 da gestação, em coelhos do dia 6 ao dia 18 da gestação. É realizada cesariana no último dia de gestação, momento em que os fetos são eutanasiados para avaliação. O tempo de gestação médio das ratas é de 21 dias, 18 dias do camundongo e 29 dias do coelho. Os fetos podem ser avaliados quanto a alterações esqueléticas e viscerais. Além das alterações fetais, também são avaliadas toxicidades maternas (ganho de peso etc.), embriomortalidade e peso fetal. Como alternativa pode-se separar uma parte dos neonatos e observar seu desenvolvimento pós-natal (NEUBERT et al., 1992).

Segmento 3 – Avalia os possíveis efeitos no desenvolvimento peri e pós-natal. Apesar de ser similar ao segmento 1 em alguns aspectos, diferencia-se quanto ao período de tratamento, no final da gestação apenas. Por esta razão, em geral é possível investigar os efeitos de doses mais altas em relação ao segmento 1 (NEUBERT et al., 1992). O agente em estudo é administrado à mãe durante o período fetal e de aleitamento, em ratos do dia 15 da gestação, até o dia 21 no pós-parto, quando ocorre o desmame. São analisados os cuidados maternos com a prole, e os recém nascidos estudados quanto ao seu desenvolvimento físico e neurocomportamental. De acordo com o produto a ser testado, os testes solicitados podem requerer o estudo de uma segunda geração (LEMONICA, 1996).

2.5 Efeito dos benzodiazepínicos durante a gestação

A segurança do uso de benzodiazepínicos durante a gestação ainda não está estabelecida. Os benzodiazepínicos deprimem a função do SNC no neonato e, em especial, no prematuro. As concentrações destas medicações no sangue do cordão umbilical podem superar as da circulação materna, o feto e o neonato são menos capazes de biotransformar os benzodiazepínicos que os adultos. Assim, a exposição intra-uterina aos benzodiazepínicos pode levar a necessidade de suporte respiratório após o nascimento (BALDESSARINI, 1996). As referências na literatura são embasadas na maioria das vezes no relato de casos isolados. Muitos estudos indicam que o risco de malformações associadas à exposição pré-natal aos benzodiazepínicos é pequeno. Porém, podem ser observadas hipotonicidade neonatal e síndrome de abstinência nos fetos expostos a benzodiazepínicos de longa duração (ASHTON, 1987).

Estudos com tratamento pré-natal com doses diárias de diazepam em ratas constataam alterações na maturação da atividade motora espontânea e reflexos acústicos de ameaça, porém não foi identificado um mecanismo neuronal responsável por tais alterações funcionais, que podem persistir no rato adulto (KELLOGG et al., 1980; KELLOGG et al., 1983 apud SHIBUYA et al., 1986).

Existem relatos em humanos e estudos em animais de laboratório sobre os efeitos deletérios do diazepam utilizado no período pré-natal em relação a alterações comportamentais (SHIBUYA et al., 1986). Constatou-se mudança comportamental com a utilização de agentes GABAérgicos (dentre os quais os benzodiazepínicos midazolam e clonazepam), através de estudo verificando a emissão de vocalização ultrassônica em ratas, sendo esse teste útil para a verificação precoce na detecção de teratogenia comportamental (TANNHAUSER, 2002).

Relataram-se distúrbios da regulação termogênica nos recém nascidos, diminuição dos movimentos intra-uterinos fetais (BIRGER et al. , 1980 apud PRZYBYLSKI, 1995) e perda da variabilidade nos traçados cardiográficos durante a gravidez e o parto (SCHER et al. 1972; VANGEIJN et al., 1980 apud PRZYBYLSKI, 1995).

A sugestão mais evidente de alteração morfológica, mas ainda não comprovada , foi que pode haver um pequeno aumento no risco de deformidade de fenda na linha média do palato ou do lábio, embora este permaneça bem abaixo do risco total de defeitos congênitos (cerca de 2 a 5% na população geral) e seja passível de correção cirúrgica (BALDESSARINI, 1996). Em 1975, Saxen e Saxen associaram a fenda palatina à ingestão materna de diazepam (BOOTH,1992; SAFRA et al.,1975).

Segundo Schalappi, (1983) o midazolam não é embriotóxico em animais de laboratório ou mutagênico em teste in vitro.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar os efeitos teratogênicos dos benzodiazepínicos diazepam e maleato de midazolam na administração pré-natal em ratos Wistar.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar os efeitos do diazepam nas progenitoras tratadas do 6º ao 15º dia de gestação, referente as variáveis de toxicidade sistêmica.
- Avaliar os efeitos do diazepam nas progênes expostas durante a organogênese sobre o seu desenvolvimento, evidenciando as malformações esqueléticas.
- Avaliar os efeitos do maleato de midazolam nas progenitoras tratadas do 6º ao 15º dia de gestação, referente as variáveis de toxicidade sistêmica.
- Avaliar os efeitos do maleato de midazolam nas progênes expostas durante a organogênese sobre o seu desenvolvimento, evidenciando as malformações esqueléticas.
- Comparar os efeitos teratogênicos do diazepam e maleato de midazolam em progênes expostas no período de organogênese.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Medicações

Foram utilizados neste trabalho os seguintes benzodiazepínicos:

- produto comercial **Valium®** 10 mg, comprimidos, nome genérico Diazepam, produzido pelo laboratório Roche (Rio de Janeiro/RJ). Composto de 10 mg diazepam (7-cloro - 1,3- diidro-1- metil-5-fenil-2H-1,4-benzodiazepina), tendo como excipientes: lactose, amido de milho, óxido de ferro amarelo e estearato de magnésio.

- produto comercial **Dormonid®** 15 mg, comprimidos, nome genérico Maleato de midazolam, produzido pelo laboratório Roche (Rio de Janeiro/RJ). Composto de 20,40 mg de maleato de midazolam, que corresponde a 15 mg de midazolam (8-cloro-6-(2-fluorofenil)-1-metil-4H-imidazo [1,5 a] [1,4] benzodiazepina), tendo como excipientes lactose, celulose microcristalina, amido de milho, estearato de magnésio, hidroxipropilmetilcelulose, copolímero do ácido metacrílico, polietilenoglicol 6000, polietilenoglicol 400, talco, dióxido de titânio, carboximetilcelulose e indigocarmin.

O diazepam foi diluído em polietilenoglicol (PEG) 40 %, fornecido pela farmácia de manipulação Bellfarma (Farmácia Gehlen & Cia). O maleato de midazolam foi solubilizado em água destilada. As doses foram calculadas em mg/kg, e o volume final para as medicações foi de 10 ml/kg de peso.

4.2 Animais

Foram utilizados ratos albinos Wistar, provenientes do Centro de Reprodução e Experimentação de Animais de Laboratório (CREAL) do Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. As fêmeas utilizadas eram adultas, com idade entre 120 e 140 dias, virgens, sua massa corporal inicial foi de $220\text{g} \pm 35,2$. Os machos tinham idade de 120 a 140 dias. Os animais foram mantidos no Biotério Setorial do Departamento de Farmacologia do ICBS com condições de temperatura de 20 a 24° C, tendo um ciclo de luz com 12 horas de claridade (9 - 21h) e 12 de escuridão (21h – 9h). Foram alimentados com ração comercial Nuvilab CR 1 (Nuvital, Colombo/PR) e água *ad libitum* durante todo o período experimental. Os animais foram adaptados às condições do biotério durante 30 dias antes de iniciar o experimento.

Foram utilizadas no ensaio prévio 9 ratas fêmeas, 3 por grupo e 3 machos. No estudo principal utilizou-se cerca de 55 fêmeas e 15 machos, até que se obteve o número de ratas gestantes desejado. Os machos foram mantidos em caixas individuais de polipropileno (45cm x 30cm x 14 cm) e as fêmeas agrupadas em cinco em caixas de mesmo tamanho.

4.3 Acasalamento

O acasalamento ocorreu entre 7 e 9h, durante as duas últimas horas do período de escuridão. Na caixa de cada macho, foram introduzidas 3 fêmeas. Após este período as fêmeas eram retiradas das caixas dos machos e realizava-se lavado vaginal com solução fisiológica para esfregaço vaginal. O esfregaço vaginal era analisado em microscópio óptico com aumento de 10 vezes, para a detecção de espermatozóides.

As fêmeas que apresentavam esfregaço positivo para a presença de espermatozóides eram consideradas prenhes, sendo então separadas em caixas individuais (30cm x 19cm x 11cm). O dia do diagnóstico de esfregaço positivo era considerado como dia 0 (zero) da gestação. As fêmeas que apresentavam esfregaço vaginal negativo continuavam em acasalamento.

4.4 Tratamento dos animais

Para a avaliação dos fármacos foi utilizado o segmento II de avaliação de toxicidade pré-natal, conforme normatização da *Environmental Protection Agency* (EPA, 1996) e recomendações da FDA (*Food and Drug Administration*) e da OECD (*Organization for Economic Cooperation and Development*).

Para a determinação das dosagens utilizadas neste experimento realizou-se um ensaio prévio no qual utilizou-se um grupo piloto. O objetivo foi de determinar uma alta dose que não resultasse em alteração no consumo de alimento ou água.

Os três grupos de tratamento foram formados por fêmeas a partir do dia zero da gestação. Foram constituídos três grupos:

- 1) DZ (diazepam) com N final = 15.
- 2) MZ (midazolam) com N final = 14.
- 3) Controle com N final = 13.

O grupo DZ recebeu 10 mg/kg de diazepam (Valium®), o grupo MZ recebeu 5 mg/kg de midazolam (Dormonid®), o grupo controle recebeu água destilada.

As fêmeas foram tratadas do 6º ao 15º dia de gestação, a administração foi feita por via oral, com o auxílio de sonda flexível oro-gástrica nº 4.

4.5 Gestação

A massa corporal das fêmeas gestantes foi medida diariamente e relacionada à massa corporal do primeiro dia de gestação, que foi considerada 100% (massa corporal relativa). Os consumos de água e ração durante a gestação foram medidos diariamente e relacionados à massa corporal média do período (consumo relativo à massa corporal individual), conforme fórmulas a seguir:

$$\text{massa corporal relativa} = \frac{\text{massa corporal diária}}{\text{massa corporal do dia zero}} \times 100$$

$$\text{consumo relativo de ração} = \frac{\text{consumo de ração (g)}}{\text{massa corporal}} \times 100$$

$$\text{consumo relativo de água} = \frac{\text{consumo de água (ml)}}{\text{massa corporal}} \times 100$$

As fêmeas foram observadas durante o tratamento quanto a alterações sistêmicas e abortos durante a gestação.

4.6 Sacrifício das progenitoras e cesariana

As fêmeas gestantes foram sacrificadas no 21º dia de gestação. Depois de aferida a massa corporal das fêmeas gestantes, cada fêmea era decapitada com a utilização de guilhotina.

Realizava-se o procedimento de histerectomia através de incisão na linha média ventral do xifóide ao púbis da pele e parede abdominal com uma tesoura de Metzemaum. O útero era removido juntamente com os ovários através de incisão do ligamento suspensor do ovário, ligamento largo do útero e cérvix. Retirava-se os ovários. Era mensurada a massa corporal da fêmea sem o útero, assim como do útero com os fetos. O útero era incisado e os fetos removidos individualmente, conforme sua posição no útero, obedecendo à ordem da direita para a esquerda. Realizava-se secção do cordão umbilical, secagem com papel toalha, observação de sinais vitais, sexagem, identificação individual (numerados com caneta com tinta de marcador permanente), mensuração da massa corporal individual e avaliação macroscópica externa quanto a malformações. Das ratas progenitoras foram retirados e pesados fígado, rins pulmões, coração e baço, assim como se realizou a contagem de corpos lúteos e implantes uterinos. Os órgãos eram inspecionados quanto a alterações macroscópicas. A massa dos órgãos foi mensurada e relacionada à massa corporal sem o útero, conforme seguinte fórmula:

$$\text{massa relativa do órgão} = \frac{\text{massa do órgão}}{\text{massa corporal sem útero}} \times 100$$

Os fetos foram colocados em solução de formol tamponado a 10% por no mínimo 7 dias, até o início do processo de diafanização.

4.7 Método de coloração dos fetos

Os fetos foram analisados quanto a alterações esqueléticas, para isso foi realizado o processo de diafanização, conforme técnica modificada de Taylor e VanDyke (1985).

Os fetos fixados em solução de formol 10% tamponado por no mínimo 7 dias foram transferidos para cubas de vidro temperado, com divisão individual através de suporte metálico com pequenas aberturas para drenagem das soluções utilizadas e tampadas com placa de vidro transparente.

Primeiramente realizou-se a desidratação dos fetos com álcool etílico 70% durante 48 horas e em álcool etílico absoluto (96°GL) por mais 24 horas.

Os fetos foram eviscerados através de uma abertura próxima ao umbigo, com o auxílio de um bisturi. Por esta abertura foram removidas as vísceras abdominais e torácicas. Também foi retirada uma porção de tecido adiposo localizado na região cervical dorsal dos fetos.

Os fetos foram colocados em uma solução tamponada para a neutralização do pH durante dois dias. Esta solução constava de 70% de água destilada e 30% de solução aquosa saturada de borato de sódio.

Na fase seguinte de clarificação foi colocada solução clarificadora, esta constando de solução tampão adicionada de 1 grama de tripsina por litro (solução digestiva), a cuba era então colocada numa estufa com temperatura de 37 °C durante algumas horas no dia para a atuação da tripsina. A solução de digestão era substituída quando apresentava turbidez, até que os fetos apresentassem transparência.

Para a coloração dos ossos dos fetos, utilizou-se uma solução aquosa de KOH 1,5% adicionada do corante vermelho de alizarina (quantidade suficiente para tornar a solução lilás). Os fetos ficaram imersos nesta solução até a coloração total dos ossos, sem a coloração dos demais tecidos.

Os fetos então passaram por uma seqüência de imersões de 48 horas em cada uma das soluções de glicerina a 40% e 70% em hidróxido de potássio a 1% e em glicerina a 100%, onde foram conservados.

4.8 Diagnóstico das alterações ósseas

Os fetos foram avaliados individualmente quanto à presença de alterações esqueléticas por meio de microscópio estereoscópico. As alterações esqueléticas foram avaliadas de acordo com o Atlas de Anomalias Esqueléticas em Ratos (CHAHOUND, 1996) e denominadas conforme a terminologia estabelecida pela *International Federation of Terminology Societies* (WISE et al., 1997).

4.9 Variáveis avaliadas

4.9.1 Progenitoras

As variáveis avaliadas nas progenitoras foram massa corporal relativa, consumos relativos de água e ração, a massa relativa dos órgãos e os índices reprodutivos, incluindo o número de fetos por progenitora e as perdas pré e pós-implantação, conforme fórmulas a seguir (LEMONICA et al., 1996).

$$\text{Perdas pré-implantação} = \frac{\text{n}^\circ \text{ de corpos lúteos} - \text{n}^\circ \text{ de sítios de implantação}}{\text{n}^\circ \text{ de corpos lúteos}} \times 100$$

$$\text{Perdas pós-implantação} = \frac{\text{n}^\circ \text{ de sítios de implantação} - \text{n}^\circ \text{ de fetos}}{\text{n}^\circ \text{ de sítios de implantação}} \times 100$$

4.9.2 Taxas avaliadas nos fetos

Nos fetos avaliou-se massa corporal e os índices fetais, tais como taxa de natalidade, proporção de sexo, malformações macroscópicas externas e alterações esqueléticas, calculadas conforme fórmulas a seguir (EPA, 1996).

$$\text{Taxa de natalidade} = \frac{\text{n}^\circ \text{ de fetos removidos vivos}}{\text{n}^\circ \text{ total de fetos removidos}} \times 100$$

$$\text{Proporção de sexo} = \frac{\text{n}^\circ \text{ de fetos machos}}{\text{n}^\circ \text{ de fetos fêmeas}}$$

$$\text{Taxa de malformações externas} = \frac{\text{n}^\circ \text{ de fetos com malformações externas}}{\text{n}^\circ \text{ de fetos}} \times 100$$

$$\text{Taxa de alterações esqueléticas} = \frac{\text{n}^\circ \text{ de fetos com alterações esqueléticas}}{\text{n}^\circ \text{ de fetos}} \times 100$$

4.10 Análise estatística

As variáveis quantitativas referentes ao ganho relativo de massa corporal, consumo de água e ração diárias das fêmeas gestantes dos três grupos foram comparados por meio de análise de variância com medidas repetidas (ANOVA - MR), os índices reprodutivos, a massa relativa dos órgãos das fêmeas progenitoras, o número de feto e a massa corporal dos fetos foram comparados por meio de análise de variância (ANOVA). Como complementação utilizou-se teste de Dunnett. Sempre que se fez comparação entre as médias, utilizou-se o Teste de Tukey.

As variáveis qualitativas de índices fetais, como proporção de sexo, taxas de alterações esqueléticas, foram comparadas pelo teste qui-quadrado. O peso médio dos sexos nos diferentes grupos foi avaliado através do teste t-student estratificado por cada um dos grupos.

Todas as variáveis foram analisadas com uma confiança de 95%, nível de significância $\alpha = 0,05$.

Utilizou-se os programas software SAS versão 8.2, SPSS versão 8.0, EXCEL 4.0.

5 RESULTADOS

5.1 Desenvolvimento ponderal das ratas durante a gestação

A Figura 4 mostra o desenvolvimento corporal, onde o 1º dia =100%, durante os 21 dias de gestação, calculados a partir das mensurações diárias das massas corporais das fêmeas dos três grupos.

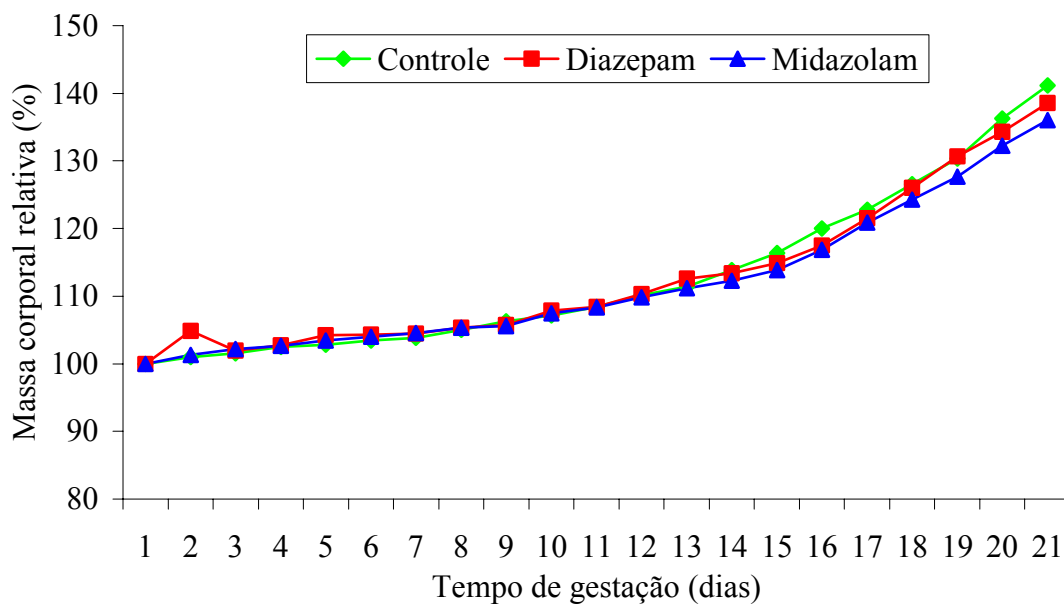


FIGURA 4. Desenvolvimento ponderal das ratas tratadas com diazepam na dose de 10 mg/kg (N=15), maleato de midazolam na dose de 5 mg/kg (N=14) e água destilada- controle (N=13) durante os 21 dias de gestação. Os valores representam a média diária dos animais por grupo.

Observou-se que as progenitoras dos diferentes grupos apresentaram um ganho relativo de massa corporal semelhantes durante o período de gestação sem diferença estatisticamente significante ($p = 0,470$, ANOVA de MR).

Conforme esperado para o período de gestação, houve um aumento do ganho de peso das progenitoras ao longo do tempo em todos os grupos.

5.2 Consumo de ração das ratas durante a gestação

A Figura 5 mostra o consumo percentual de ração durante os 21 dias de gestação, a partir do consumo diário de ração (g), relacionado à massa corporal diária (g) nos diferentes grupos de análise. O consumo percentual de ração foi calculado conforme o descrito no item 4.5. Observa-se flutuações no consumo de ração das progenitoras, sendo que o grupo MZ mostrou um consumo abaixo do grupo controle e DZ em praticamente toda a gestação, esta diferença não é estatisticamente significativa ($P = 0,124$, ANOVA de MR). Quando analisado o efeito do tempo em relação ao grupo observamos uma diferença significativa ($P < 0,01$, ANOVA de MR, seguida de teste de Wilk's Lambda). No período de tratamento, 6º ao 15º dia, o consumo de ração manteve-se semelhante entre os grupos.

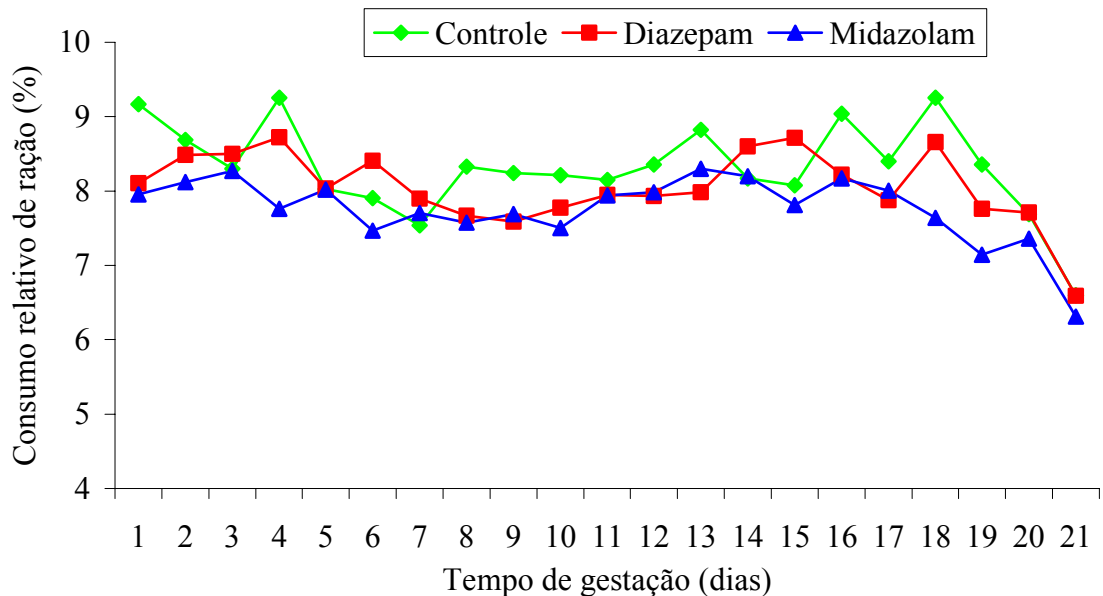


FIGURA 5. Consumo percentual de ração em relação à massa corporal durante os 21 dias de gestação de ratas tratadas com diazepam 10 mg/kg (N=15), maleato de midazolam 5 mg/kg (N=14) e água destilada- grupo controle (N=13). Os valores representam a média diária dos animais por grupo.

5.3 Consumo de água das ratas durante a gestação

A Figura 6 mostra o consumo percentual de água correlacionado à massa corporal, avaliado durante os 21 dias de gestação. O cálculo foi efetuado a partir do consumo diário de água (ml), relacionado à massa corporal diária (g), das ratas dos diferentes grupos: DZ, MZ e controle, conforme descrito no item 4.5.

Verifica-se flutuação nos valores de consumo de água, porém não sendo significativo ($P = 0,096$, ANOVA de MR). Quando analisado o efeito do tempo em relação ao grupo, nota-se uma diferença no consumo de água nos diferentes grupos ($P < 0,01$).

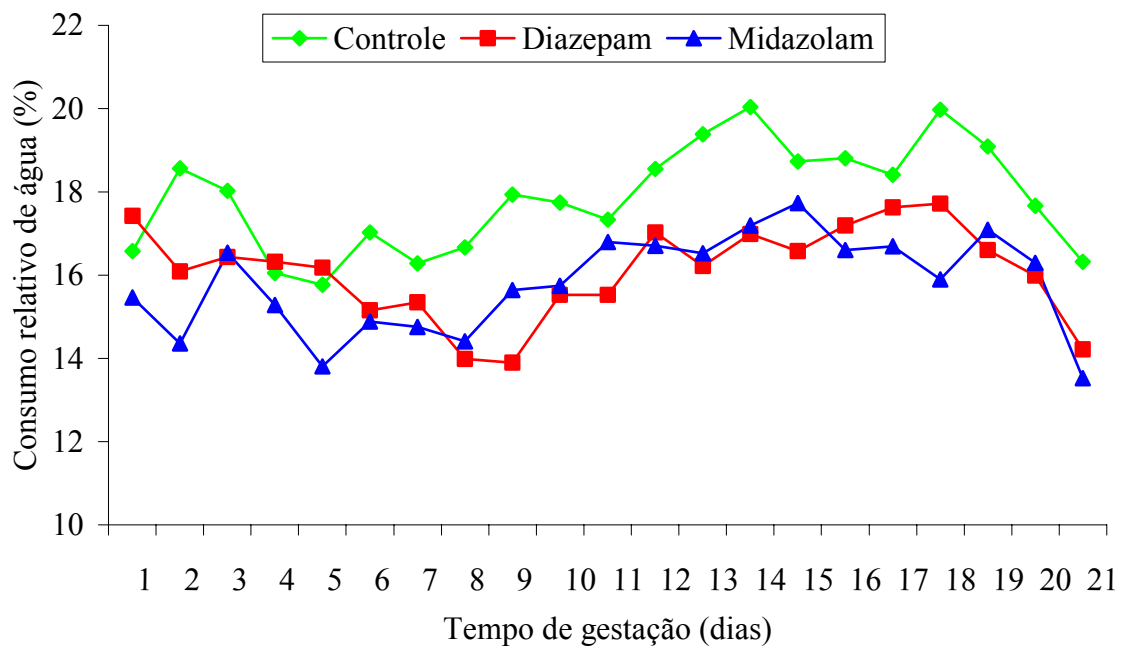


FIGURA 6. Consumo percentual de água em relação à massa corporal durante os 21 dias de gestação, de ratas tratadas com diazepam 10 mg/kg (N=15), maleato de midazolam 5 mg/kg (N=14) e água destilada- grupo controle (N=13). Os valores representam as médias diárias dos animais por grupo.

5.4 Massa relativa dos órgãos das ratas

A Tabela 5 mostra a massa relativa do coração, baço, fígado e rins das ratas tratadas com diazepam, maleato de midazolam e grupo controle, no dia da histerectomia, dia 21 da gestação.

Conforme os dados da Tabela 5, não houve diferença significativa na massa relativa do coração, baço, fígado e rins entre os grupos.

TABELA 5 . Massa relativa dos órgãos das progenitoras dos grupos de tratamento diazepam (10 mg/kg), maleato de midazolam (5 mg/kg) e controle com água destilada no 21º dia da gestação

Variáveis	Controle	Diazepam	Midazolam
Nº de progenitoras	13	15	14
Coração (%)	0,37 ± 0,03	0,37 ± 0,04	0,37 ± 0,03
Baço (%)	0,40 ± 0,15	0,42 ± 0,22	0,41 ± 0,11
Fígado (%)	4,69 ± 0,42	4,78 ± 0,42	4,63 ± 0,53
Rim direito (%)	0,35 ± 0,05	0,35 ± 0,04	0,34 ± 0,05
Rim esquerdo (%)	0,33 ± 0,03	0,34 ± 0,04	0,33 ± 0,03

Não houve diferença significativa em relação ao grupo controle (ANOVA, $\alpha = 0,05$)

5.5 Índices reprodutivos das ratas

A Tabela 6 apresenta os índices reprodutivos das ratas dos grupos DZ, MZ , comparados ao grupo controle.

Os três grupos não apresentaram diferença quanto ao número médio de filhotes por progenitora (teste ANOVA, $P= 0,334$).

Os grupos apresentaram a mesma proporção entre machos e fêmeas (teste Qui-quadrado, $P= 0,857$), sendo que o número de fêmeas foi superior.

Em relação às perdas pré-implantação, podemos observar um aumento das perdas nos dois grupos tratados (DZ e MZ) em relação ao grupo controle, sendo que houve um aumento significativo destas perdas no grupo MZ em relação ao controle (Qui-quadrado, $P = 0,0082$). Não havendo diferença significativa entre o grupo DZ e controle ($P = 0,14$), nem entre os grupos MZ e DZ ($P = 0,61$).

Houve um aumento significativo das perdas pós-implantação nos grupos diazepam e midazolam em relação ao controle (Qui-quadrado, $P < 0,01$), sendo que não houve diferença significativa entre os grupos DZ e MZ (Qui-quadrado, $P = 0,316$).

TABELA 6. Índices reprodutivos das progenitoras tratadas com diazepam (10 mg/kg), maleato de midazolam (5 mg/kg) e água destilada (controle) no período de organogênese. Valores expressos em número total, média \pm erro padrão da média ou percentual.

Índices Reprodutivos	Controle	Diazepam	Midazolam
Nº de progenitoras	13	15	14
Nº de fetos	140	138	130
Nº fetos fêmeas (%)	56,4%	53,6%	56,6%
Fetos/progenitora	10,76 \pm 2,62	9,2 \pm 3,17	9,29 \pm 3,29
Perdas pré-implantação (%)	10,6%	14,93%	18,25%*
Perdas pós-implantação (%)	1,47%	10,76%*	13,30%*

* Diferença estatística significativa (ANOVA e qui-quadrado, $\alpha = 0,05$)

5.6 Variáveis fetais

Conforme a Tabela 7, a análise estatística do peso médio dos filhotes ao nascimento não mostrou uma diferença entre os grupos.

A taxa de natalidade não teve diferença entre os grupos, sendo que apenas 1 feto do grupo diazepam e 1 feto do grupo midazolam nasceram mortos.

Conforme Tabela 7, os fetos de nenhum dos grupos apresentou malformações macroscópicas. As anormalidades esqueléticas foram de 49,21% no grupo MZ, sendo significativa a diferença em relação ao grupo controle, que apresentou uma taxa de 16,42% ($P < 0,01$, teste Qui-quadrado). O grupo DZ mostrou uma elevação a taxa de anormalidades esqueléticas em relação ao controle, porém não demonstrou diferença estatística.

TABELA 7. Índices dos fetos cujas progenitoras foram tratadas com diazepam, maleato de midazolam e água destilada (controle) durante a organogênese. Valores médios dos grupos expressos em média \pm erro padrão da média ou percentual.

Índices fetais	Controle	Diazepam	Midazolam
Nº de fetos	140	138	130
Massa corporal (g)	5,02 \pm 0,36	4,73 \pm 0,59	4,79 \pm 0,64
Taxa de natalidade (%)	100%	99,27%	99,23%
Anormalidades esqueléticas (%)	16,42%	22,46%	49,21%*
Malformações macroscópicas (%)	0	0	0

* Diferença estatística significativa (ANOVA e qui-quadrado, $\alpha = 0,05$)

Na Figura 7 pode ser observada a possível diferença no tamanho de um feto do grupo controle em relação a um feto do grupo diazepam, para esta foto foram selecionados o maior e menor fetos dos respectivos grupos.



FIGURA 7. Fetos de diferentes tamanhos corados com vermelho de alizarina, sendo o feto a do grupo controle, e o feto b de fêmea tratada com diazepam (10 mg/kg/dia) entre o 6º e o 15º dia de gestação.

Na Figura 8 estão ilustrados dois fetos do grupo controle com ossificação normal do crânio.

a)



b)



FIGURA 8. Fetos a e b corados com vermelho de alizarina do grupo controle, apresentando ossificação considerada normal no crânio.

A Tabela 8 resume as anormalidades esqueléticas diagnosticadas nos fetos examinados. As alterações ósseas que apresentaram uma taxa no grupo controle superior a 10% foram consideradas como variantes e não como anormalidades. Costelas supranumerárias ou 14ª costela foram constatadas em 40,71% dos fetos no grupo controle, 31,15% no grupo DZ e 34,61% no grupo MZ (Figura 9).

As alterações esqueléticas mais freqüentes foram ossificação incompleta dos ossos do crânio, sendo que o grupo MZ apresentou 30% de ossificação incompleta do crânio (Figura 10) e 8,46% de ossificação incompleta do osso parietal, sendo estas diferenças significativas em relação ao grupo controle ($P < 0,01$, teste Qui-quadrado). Outra alteração óssea que se apresentou elevada foi fontanela aumentada (Figura 11), observando-se 4,28% no grupo controle, 18,84% no grupo DZ e 33,1% no grupo MZ, sendo a diferença dos grupos tratados significativa em relação ao controle ($P < 0,01$, teste Qui-quadrado). A ossificação incompleta do esterno foi elevada no grupo MZ, com uma taxa de 3,85% ($P < 0,01$, teste Qui-quadrado). Ossificação incompleta dos metatarsos teve uma taxa elevada, sendo diagnosticada em 7,14% dos fetos do grupo controle, 18,84% dos fetos do grupo DZ e 33,1% dos fetos do grupo MZ, sendo esta diferença entre os grupos tratados e o controle significativo estatisticamente. Ossificação incompleta dos interparietais ocorreu nos três grupos (Figura 11). No grupo midazolam entre as anormalidades esqueléticas encontradas, interparietal fendido demonstrou ter uma incidência significativa, supraoccipital bipartido ocorreu apenas nos fetos deste grupo (Figura 12). Costelas onduladas apareceram nos três grupos, porém o grupo midazolam teve uma maior porcentagem (Figura 13). No grupo diazepam pôde ser observada a malformação de rádio e ulna curvos (Figura 14).

TABELA 8. Alterações esqueléticas dos fetos cujas progenitoras foram tratadas no período de organogênese com diazepam (10 mg/kg), maleato de midazolam (5 mg/kg) e água destilada (controle). Valores em percentual de fetos acometidos por grupo.

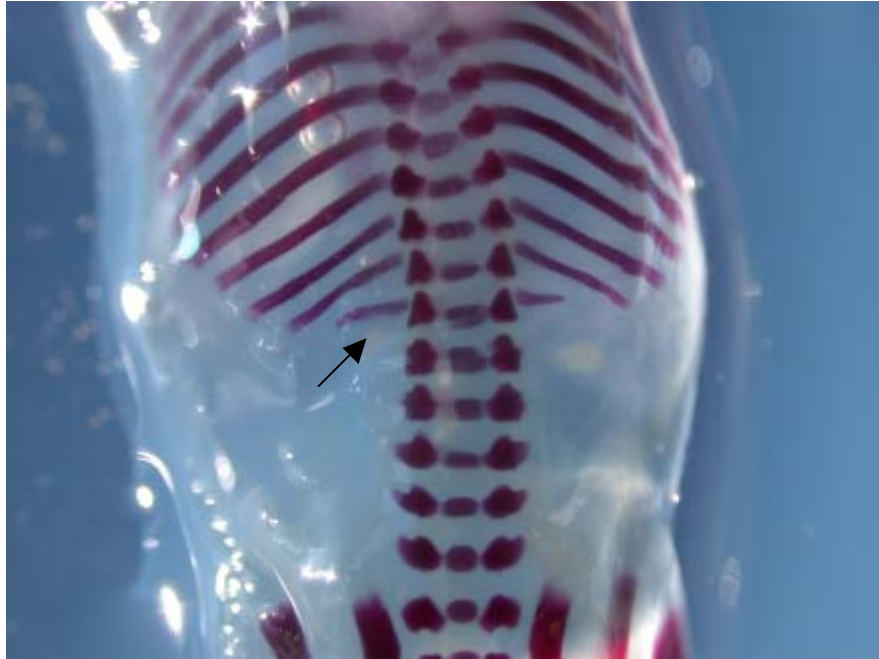
Tipo de anormalidade (%)	Região	Controle	Diazepam	Midazolam
Ossificação incompleta	geral	0,71	0,72	0
	crânio	3,57	5,1	30*
	parietal	0	0	8,46*
	interparietal	4,28	2,9	3,84
	supraoccipital	2,85	0,72	5,38
	zigomático	0	0,72	0
	escápula	0,71	0	0
	úmero	0,71	0	0
	esternébras	0	0,72	3,85*
	púbis	0,71	0	0
	costela	0	0	0,77
	metacarpos	0	0,72	0
	metatarsos	7,14	18,84*	33,1*
	Fontanela aumentada	crânio	4,28	18,84*
Interparietal fendido	crânio	1,43	0	6,15*
Supraoccipital bipartido	crânio	0	0	2,31
Basisfenóide aberto	crânio	0	0,72	0
Costela supranumerária ^V	costelas	40,71	31,15	34,61
Costela ondulada	costelas	1,43	1,45	3,07
Esternébra ossificação extra	esterno	1,43	0	0
Rádio e ulna curvos	membro torácico	0	2,17	0
Vértebra disforme	vértebra lombar	0	0	2,31

N = fetos (progenitoras) controle = 140 (13)
diazepam = 138 (15)
midazolam = 130 (14)

* Diferença significativa em relação ao grupo controle ($p < 0,05$; teste qui-quadrado)

^V Variante – não considerado anormalidade, pois tem alto percentual no grupo controle, segundo Ruckman et al. (1999).

a)



b)

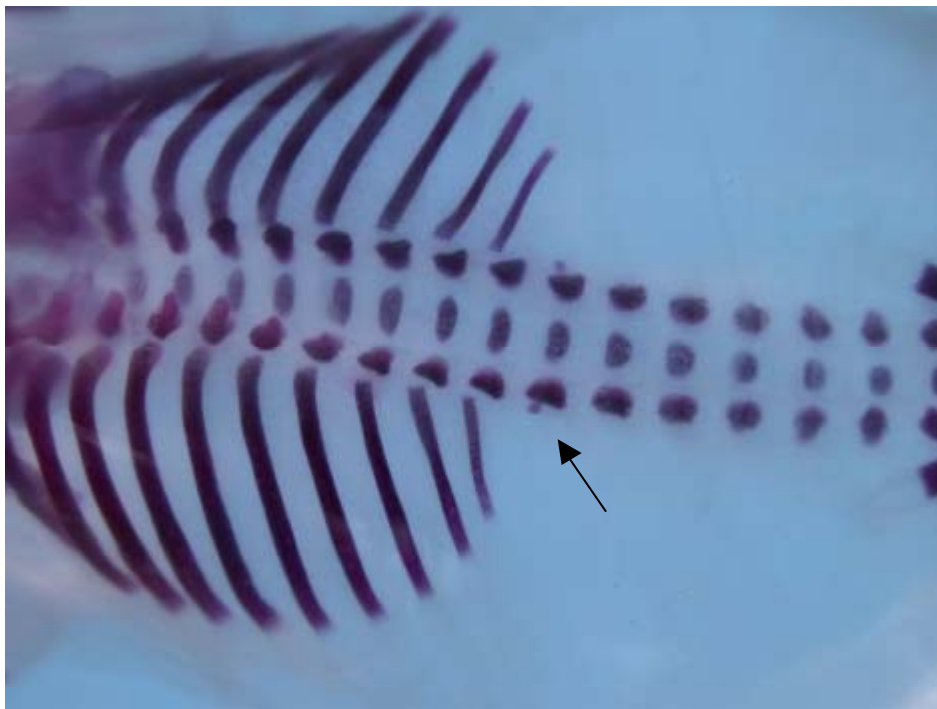


FIGURA 9. Fetos de ratas do grupo controle, corados com vermelho de alizarina, apresentando costelas supranumerárias, sendo que o feto a apresenta 14^a costela mais desenvolvida que o feto b.

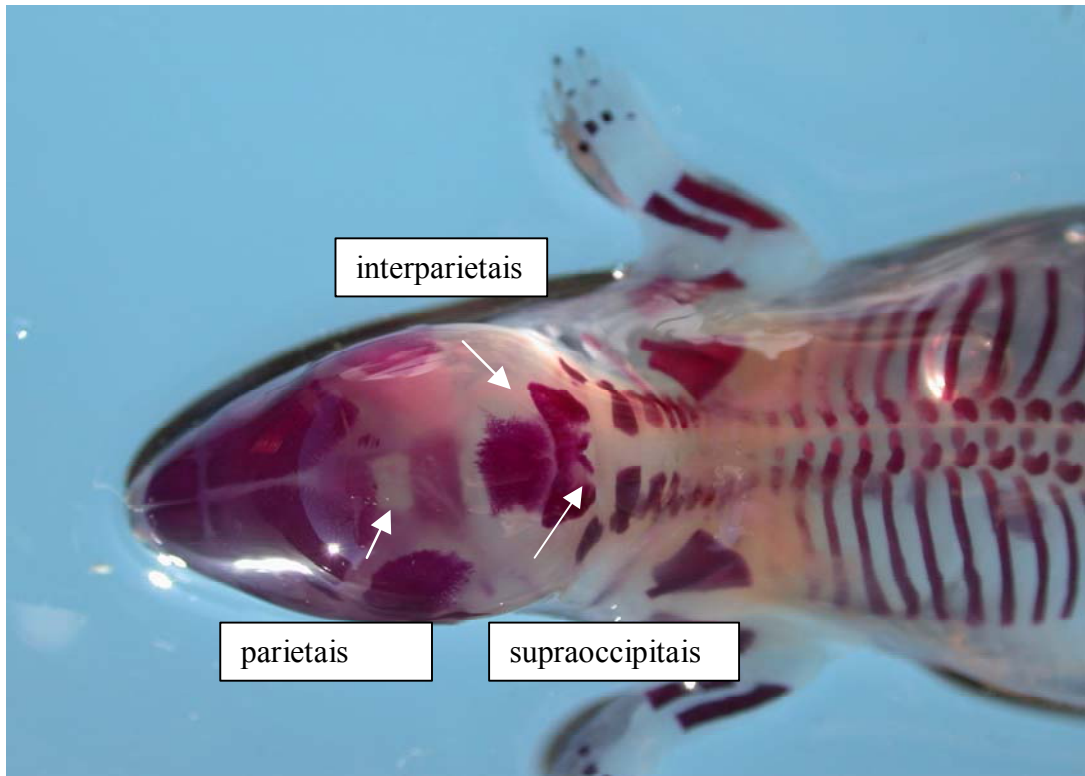


FIGURA 10. Feto de rata tratada entre o 6º e o 15º dias de gestação, período de organogênese, com maleato de midazolam (5mg/kg/dia), corado com vermelho de alizarina, apresentando ossificação incompleta dos parietais, interparietais, supraoccipital.

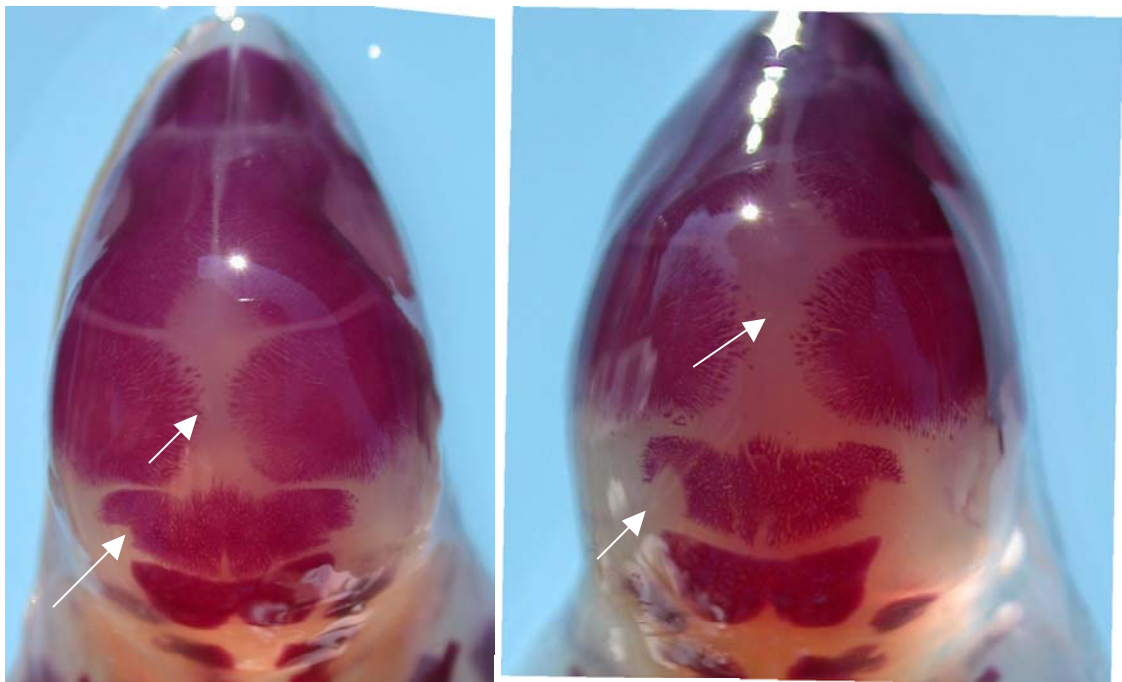


FIGURA 11. Fetos de ratas tratadas com diazepam (10 mg/kg/dia) entre o 6º e o 15º dia de gestação, corados com vermelho de alizarina, apresentando fontanela aumentada apontada pela seta superior e ossificação incompleta dos interparietais indicada pela seta inferior.

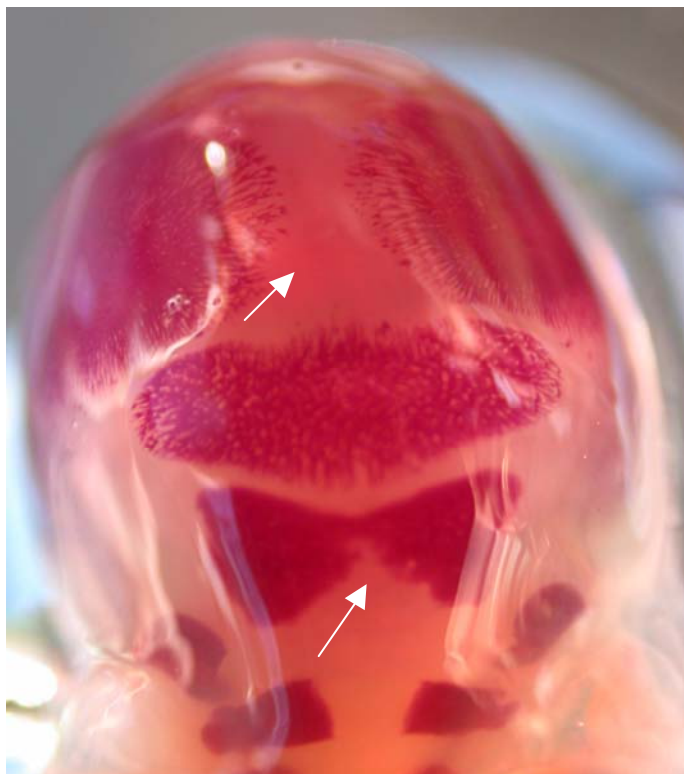


FIGURA 12. Feto de rata tratada entre o 6^o e 15^o dia de gestação com maleato de midazolam (5 mg/kg/dia), corado com vermelho de alizarina, apresentando fontanela aumentada, indicada pela seta superior e supraoccipital bipartido, indicado pela seta inferior.

a)



b)



FIGURA 13. Feto de rata tratada entre o 6º e 15º dia de gestação com maleato de midazolam (5mg/kg/dia), corado com vermelho de alizarina, apresentando costelas onduladas, e ossificação incompleta dos ossos do crânio, em posição dorso-ventral e lateral.

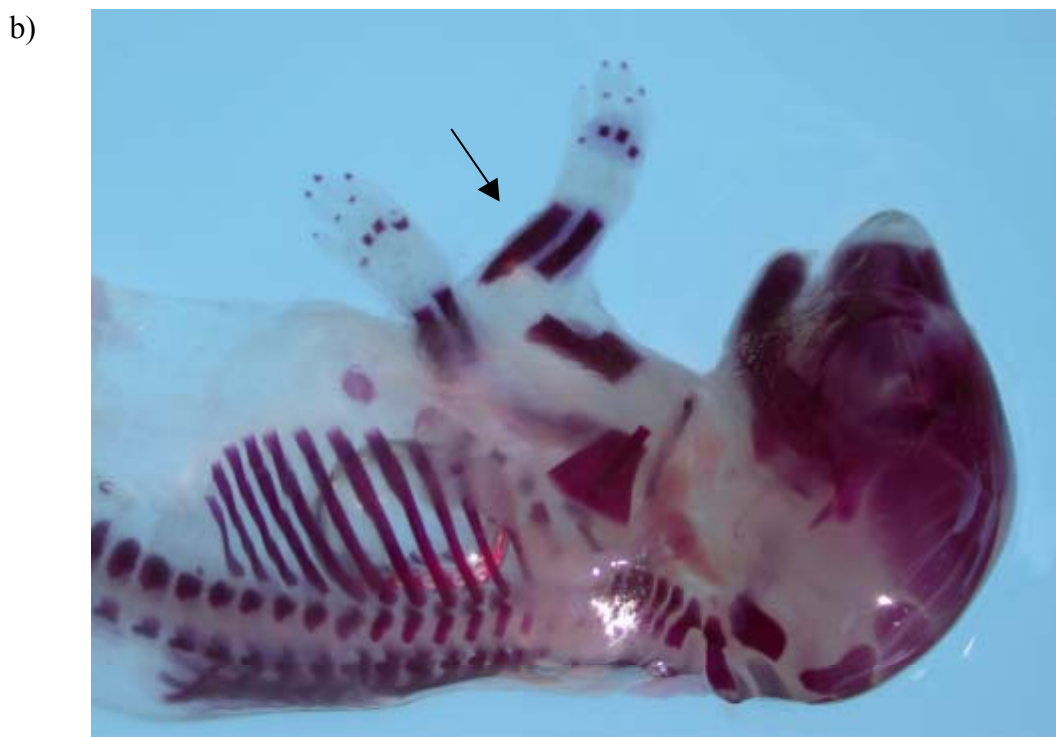
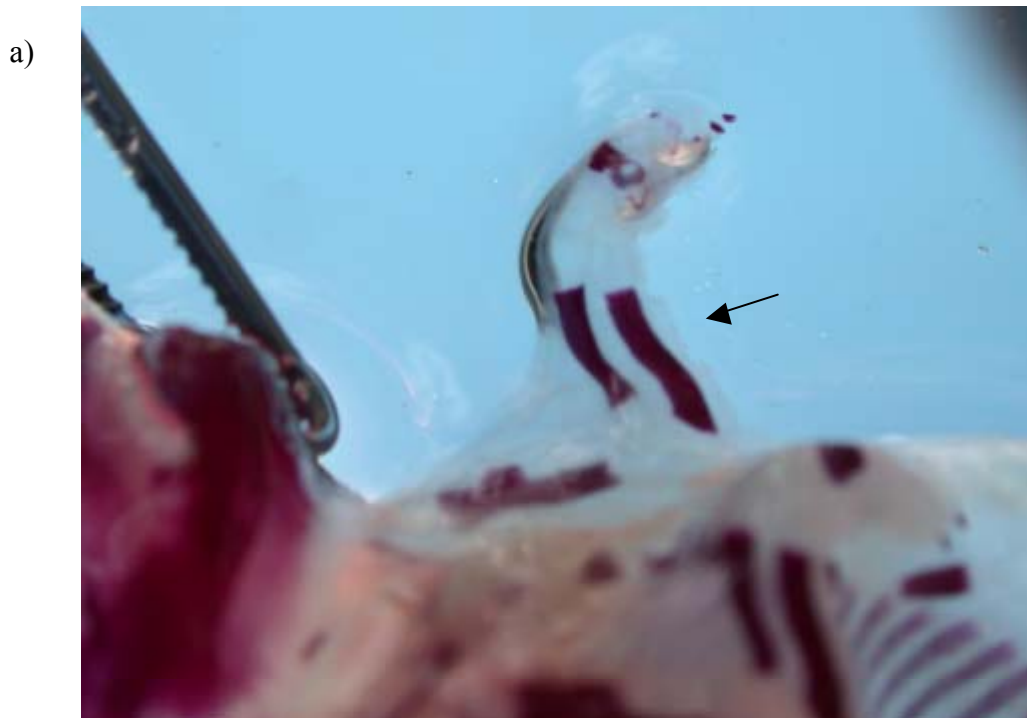


FIGURA 14. a) Feto de rata tratada entre o 6^o e o 15^o dia de gestação com diazepam (10mg/kg/dia), corado com vermelho de alizarina, apresentando rádio e ulna curvos. b) Feto do grupo controle sem alteração de rádio e ulna.

6 DISCUSSÃO

Testes de teratogenia em roedores e coelhos são normalmente requisitados para que uma nova medicação seja aprovada. Alguns testes pré-clínicos permitem um meio importante de estabelecer-se alguns tratamentos que podem ter algum potencial teratogênico. Contudo, estudos pré-clínicos nem sempre prevêm o que ocorrerá em humanos, podendo ocorrer “falso positivos” e “falso negativos”. Dados de toxicidade reprodutiva são limitados antes da aprovação de uma medicação, mas freqüentemente é possível obter esses dados após a liberação da substância (LO & FRIEDMAN, 2002). Sendo assim, vários estudos devem ser realizados antes e após a aprovação de uma substância. Apesar do diazepam e do maleato de midazolam terem sido aprovados pela *FDA* sem indícios de teratogenicidade, vários estudos e relatos de casos demonstram a possibilidade de teratogenicidade destas substâncias.

O presente trabalho revelou um aumento nas taxas de anormalidades esqueléticas de fetos expostos no período de organogênese ao maleato de midazolam na dose de 5 mg/kg e ao diazepam na dose de 10 mg/kg, sem a presença de toxicidade materna.

6.1 Toxicidade materna

A toxicidade sistêmica pode se manifestar como alterações no desenvolvimento ponderal dos animais, redução nos consumos de água e ração e alterações de comportamento (MELLO et al., 1997).

As fêmeas apresentaram sedação após administração dos fármacos diazepam e midazolam. Conforme propriedades farmacológicas, estes fármacos possuem ação

sedativa (SALIM, 1987; MASSONE,1994; PADDLEFORD, 2001; FANTONI et al., 2002).

Além dos efeitos farmacológicos esperados do diazepam e maleato de midazolam, não foram observadas alterações de comportamento das fêmeas tratadas com esses fármacos. Segundo Bernardi (1999), os agentes teratogênicos sempre produzem suas ações por interferirem nos mecanismos celulares, em doses que causam nenhuma ou mínima toxicidade materna, desde que se pretenda estudar os efeitos na prole e não aqueles ligados à toxicidade materna.

O ganho relativo de massa corporal das progenitoras tratadas com diazepam 10 mg/kg, maleato de midazolam 5 mg/kg e água destilada (controle) mostrou-se semelhante nos três grupos, com um aumento esperado da massa corporal ao longo da gestação, devido ao maior desenvolvimento fetal. Podendo ser observado a partir do dia 14 de gestação um pequeno aumento do ganho de peso do controle em relação ao grupo diazepam e do grupo diazepam em relação ao midazolam, porém não tendo significância estatística.

O consumo relativo de ração e água das progenitoras dos três grupos apresentou semelhança. Apesar das propriedades estimulantes de apetite citadas por Kitchell (1992), as fêmeas tratadas com diazepam não apresentaram maior consumo de ração durante o tratamento.

A massa relativa dos órgãos não foi afetada, sendo semelhante nos três grupos, sendo mais um fator que demonstra que não houve toxicidade materna.

Referente a toxicidade reprodutiva, o diazepam demonstrou acarretar um aumento nas perdas fetais pós-implantação (tardias) em relação ao grupo controle. O midazolam aumentou a incidência tanto das reabsorções precoces quanto às tardias em relação ao grupo controle.

Beal (1972) realizou estudo com administração pré-natal de diazepam em ratas durante o período de organogênese, nas doses de 20 e 80 mg/kg/dia, sendo que as progenitoras permaneceram saudáveis e aparentemente normais durante o experimento,

também não sendo observados efeitos do fármaco sobre o número de sítios de implantação ou reabsorção.

Maroof et al. (1998) demonstram que administração de midazolam em *bolus* pode resultar em níveis mensuráveis do agente no fluido folicular. Porém Swanson e Leavitt (1992) afirmam que a presença de midazolam não interfere na fertilização ou desenvolvimento embrionários em camundongos, sugerindo que esta medicação pode ser utilizada durante os procedimentos de coleta de óvulo e transferência de embrião em humanos.

Souza et al. (1997) sugerem que a elevação no número de reabsorções possa ser secundária a efeitos de toxicidade materna, e não necessariamente ao potencial teratogênico de qualquer substância.

6.2 Toxicidade fetal

Os fetos foram expostos aos tratamentos durante o período de organogênese, que na rata vai do 6º ao 15º dias de gestação. Segundo Lemonica e Alvarenga (1994) anomalias morfológicas nos fetos ocorrem na gestação no período de organogênese.

A exposição tanto ao diazepam quanto ao maleato de midazolam não determinou diminuição na taxa de natalidade, redução no peso, diferença na proporção de sexo ou malformações externas macroscópicas dos fetos ao nascer, quando comparados ao grupo controle. As malformações externas são referidas como as alterações detectadas macroscopicamente antes do processo de diafanização dos fetos.

Referentes às alterações esqueléticas diagnosticadas, o grupo diazepam apresentou um aumento geral de alterações esqueléticas observadas, porém estas não foram significativas estatisticamente. Mas, se analisarmos as alterações esqueléticas separadamente, houve um aumento significativo no aparecimento de fontanela aumentada, e ossificação incompleta dos metatarsos. Observou-se a malformação de rádio e ulna curvos, em três fetos da mesma ninhada exposta ao diazepam.

Os fetos expostos durante a organogênese ao maleato de midazolam apresentaram um aumento significativo de anormalidades esqueléticas, principalmente ossificação incompleta, sugerindo retardo de desenvolvimento esquelético dos fetos deste grupo, demonstrado na Tabela 7. Houve uma alta proporção de fetos com fontanela aumentada e calcificação incompleta de vários ossos do crânio, sendo esta falta de calcificação muito mais evidente que no grupo DZ, mostrando ser mais grave. Observou-se o surgimento de algumas malformações como interparietal fendido, costelas onduladas, supraoccipital bipartido e vértebras lombares disformes.

O retardo de crescimento fetal é de etiologia múltipla, existindo diversos fatores envolvidos em sua gênese, tais como: alterações genéticas, estatura materna, altitudes elevadas, nutrição materna, hábitos e vícios, uso de medicações, exposição à radiação ionizante, patologias maternas, gemelaridade, alterações placentárias e fatores paternos. Medicamentos diversos atuam negativamente no crescimento fetal, como: glicocorticóides, propranolol, difenil-hidantoína, dicumarínicos, tetraciclina, salicilatos e citostáticos. As conseqüências do retardo de crescimento fetal, em virtude das alterações biométricas e funcionais inerentes à mesma, determinam seqüelas variáveis, podendo ser até mesmo a morte do concepto (ROUCOURT & STANCATI, 2002).

Um estudo realizado por Laegreid et al. (1992) na Suíça entre 1984 e 1986 revelou que crianças expostas no período pré-natal a benzodiazepínicos apresentaram em média um menor peso ao nascer, eram menores e tinham menor circunferência de crânio que as crianças do grupo controle, nas quais as mães não tomavam medicações durante a gestação. De 17 crianças expostas a benzodiazepínicos, uma apresentou malformação de hidronefrose.

Os desvios da normalidade encontrados no esqueleto, segundo Lork (1977), são classificados como: variações do normal, retardos do desenvolvimento esquelético e malformações. As variações individuais do normal consistem na ausência dos centros de ossificação esperados para o momento da cesariana, como por exemplo, os das falanges terminais em ratos. Retardos do desenvolvimento ósseo são a ausência de centros de ossificação em estruturas bilaterais ou na presença de forma ou tamanho sugestivo de um estágio precoce de desenvolvimento, como ossificação esquelética dos ossos do crânio e fontanelas aumentadas. As malformações do esqueleto consistem na ausência

parcial ou total de ossos importantes, encurtamentos, arqueamentos, assimetrias, fusões, fendas ou duplicidade (*espina bífida*).

As definições a seguir foram utilizadas para categorizar as mudanças na estrutura fetal, segundo Ruckman et al. (1999): **variante**: estruturas que ocorrem no grupo controle com uma frequência maior que 10%; **anomalia**: anormalidade considerada não letal ou que não seja muito prejudicial; **malformação**: anormalidade considerada letal ou que prejudique severamente.

Tivemos como **variante** costelas supranumerárias ou 14^a costela nos três grupos. As **anomalias** foram às alterações esqueléticas de maior proporção, sendo as ossificações incompletas, principalmente dos ossos do crânio as mais diagnosticadas nos grupos DZ e MZ, o grupo MZ apresentou um maior número destas anomalias. As **malformações** encontradas no grupo DZ foram costelas onduladas, esta aparecendo também no grupo controle e MZ, sendo neste último em maior número. Interparietal fendido foi uma malformação evidenciada no grupo MZ, assim como supraoccipital bipartido e vértebra lombar disforme. O grupo DZ também teve a malformação de rádio e ulna curvos.

O termo ossificação incompleta engloba três diferentes tipos de deficiência de ossificação observadas com a coloração em vermelho de alizarina como: diferenças na homogeneidade da área corada, uma redução na densidade da coloração (coloração pálida), e redução do tamanho da área tingida. No rato, ossificação incompleta é normalmente assumida como retardo de crescimento, indiferente à estrutura afetada. Contudo, ossificação incompleta de uma estrutura isolada quando o resto do esqueleto está normal, é mais importante que quando é acompanhada de perda de peso ou outros sinais de imaturidade esquelética. As reais conseqüências da ossificação incompleta não são conhecidas (SOLECKI et al, 2001).

No estudo toxicológico de fármacos, os seus efeitos farmacológicos devem ser levados em consideração. Segundo Frohberg (1977) efeitos farmacológicos nas progenitoras como sedação pode influenciar no desenvolvimento fetal. Porém, as alterações de ossificação incompleta encontrada nos fetos expostos ao maleato de midazolam tiveram um número maior de observações, assim como uma intensidade muito maior do que os fetos expostos ao diazepam. Pelo fato do maleato de midazolam

ter um menor tempo de ação, assim como uma eliminação mais rápida que o diazepam (LARINE, 1997), podemos afirmar que o efeito de sedação não foi desencadeador do retardo de crescimento observado nos fetos.

Beal (1972) relata que altas doses de diazepam (20 e 80 mg/kg/dia) fornecido via oral a ratas durante o período de organogênese não foram associadas a efeitos teratogênicos. Os fetos foram corados com vermelho de alizarina para visualização do esqueleto. Variações do normal como costela extra ocorreu semelhantemente em todos os grupos de tratamento, incluindo o controle.

Segundo Miller (1975), camundongos demonstraram um aumento na incidência de fenda palatina e labial após administração pré-natal de diazepam. Neste estudo foi administrado diazepam nas doses de 50mg/kg, 100mg/kg, 140 mg/kg e 500 mg/kg, via oral, em diferentes dias da organogênese, demonstrando que o diazepam teve efeito teratogênico, sendo o principal efeito o palato fendido. Anormalidades esqueléticas como ossificação incompleta também foram observadas, sendo associado a retardo de crescimento.

Schalappi (1983) afirma que o midazolam não é embriotóxico em animais de laboratório. Pankaj e Brain (1991) relata que ninhadas de ratas prenhes tratadas com midazolam, com doses de 4 a 8 vezes a dose indicada para anestesia humana, apresentaram um decréscimo no ganho de peso e alterações comportamentais logo após o nascimento. Conforme Salim (1987) a dose indicada para anestesia humana é de 0,07 mg/kg.

Os resultados demonstraram um aumento significativo no risco ao desenvolvimento do sistema esquelético de ratos expostos aos benzodiazepínicos diazepam e maleato de midazolam durante o período pré-natal, na fase de organogênese. Sendo que o midazolam demonstrou ser mais nocivo que o diazepam no que se refere a alterações esqueléticas. A principal alteração encontrada referente à porcentagem foi retardo de crescimento. São necessários estudos complementares para a comprovação destes dados assim como a determinação de novas dosagens e testes em outras espécies.

Além das alterações esqueléticas e viscerais, podem ser avaliadas as alterações comportamentais dos fetos. Existem relatos em humanos e estudos em animais de laboratório sobre os efeitos deletérios do diazepam utilizado no período pré-natal em relação a alterações comportamentais (SHIBUYA et al., 1985). Estudos com tratamento pré-natal com doses diárias de diazepam em ratas constataam alterações na maturação da atividade motora espontânea e reflexos acústicos de ameaça, porém não foi identificado um mecanismo neuronal responsável por tais alterações funcionais, que podem persistir no rato adulto (KELLOGG et al., 1980; KELLOGG et al., 1983 apud SHIBUYA et al., 1985). Constatou-se mudança comportamental com a utilização de agentes GABAérgicos (dentre os quais os benzodiazepínicos midazolam e clonazepam), através de estudo verificando a emissão de vocalização ultrassônica em ratas, sendo esse teste útil para a verificação precoce na detecção de teratogenia comportamental (TANNHAUSER, 2002). Relataram-se distúrbios da regulação termogênica nos recém nascidos, diminuição dos movimentos intra-uterinos fetais (BIRGER et al. , 1980 apud PRZYBYLSKI, 1995) e perda da variabilidade nos traçados cardiográficos durante a gravidez e o parto (PRZYBYLSKI, 1995).

7 CONCLUSÕES

7.1. A administração de diazepam por via oral, na dose de 10 mg/kg/dia em ratas Wistar gestantes, durante o período de organogênese fetal, não induz toxicidade materna sistêmica, porém determina diminuição no número de fetos nascidos por ninhada e um aumento significativo nas perdas pós-implantação.

7.2. A exposição fetal ao diazepam na dose de 10 mg/kg/dia em ratos Wistar durante o período de organogênese, induz a diminuição do peso médio ao nascer, além de retardo no desenvolvimento esquelético dos fetos e aumento de malformações menores.

7.3. A administração de maleato de midazolam por via oral, na dose de 5 mg/kg/dia em ratas Wistar gestantes, durante o período de organogênese fetal, não induz toxicidade materna sistêmica, porém determina diminuição no número de fetos nascidos por ninhada, além de um aumento nas perdas pré-implantação, sugerindo reabsorção embrionária, e aumento das perdas pós-implantação.

7.4. A exposição fetal ao maleato de midazolam na dose de 5 mg/kg/dia em ratos Wistar durante o período de organogênese, desencadeia a diminuição do peso médio ao nascer, além de retardo no desenvolvimento esquelético dos fetos e aumento de malformações menores.

7.5. O maleato de midazolam demonstra ser mais teratogênico para ratos que o diazepam, considerando uma maior porcentagem de indução de retardo no desenvolvimento esquelético e de malformações menores.

REFERÊNCIAS

- ALLEN, D.G.; PRINGLE, J.K.; SMITH, D. **Handbook of Veterinary Drugs**. Philadelphia: J.B.Lippincott Co, 1993. 678p.
- ANDRADE, S.F. Prescrição de Receitas. In: _____ **Manual de Terapêutica Veterinária**. 2 ed. São Paulo: Roca, 2002. p.5-12.
- ANDRADE, S.F.; FANTONI, D.T.; CORTOPASSI, S.R.; ANDRADE, J.P. Terapêutica do Sistema Nervoso. In: ANDRADE, S.F. **Manual de Terapêutica Veterinária**. 2 ed. São Paulo: Roca, 2002. p.348-435.
- ASHTON, C. H. Dangers and medico-legal aspects of benzodiazepines. **Journal of the Medical Defence Union**. v.3, p. 6-8, 1987.
- BALDESSARINI, R.J. Fármacos e o tratamento dos distúrbios psiquiátricos. In: HARDMAN, J.G.; LIMBIRD, L.E. **Goodman & Gilman - As Bases Farmacológicas da Terapêutica**. 9 ed. México DF: McGraw-Hill, 1996. p. 290-313.
- BAN, T.A. **Psychopharmacology**. Baltimore: Williams & Wilkins Company, 1969. 485p.
- BARROS, S. B. M.; SOLANGE C. D. Avaliação da Toxicidade. In: SEIZI, O. **Fundamentos de Toxicologia**. São Paulo: Atheneu editora São Paulo LTDA, 1996. p.59-70.
- BEAL, J.R. Study of the teratogenic potential of diazepam and SCH 12041. **Can. Med. Assoc. Journal**. v. 106, p.1061, 1972.
- BECKER, B.A. Teratogens. In: CASARETH, L. J.; DOULL, J. **Toxicology - The Basic Science of Poisons**. New York: Macmillan, 1975. p. 313-331.
- BERNARDI, M.M. Exposição aos medicamentos durante o período perinatal. In: SPINOSA, H.S.; GÓRNIK, S.M. **Farmacologia Aplicada à Medicina Veterinária**. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999. p. 566-574.
- BOOTH, N. H. Agentes psicotrópicos. In: BOOTH, N. H.; McDONALD, L. E. **Farmacologia e Terapêutica em Veterinária** 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1992. p. 289-314.

BRUNONI, D. Epidemiologia e Etiologia das Anomalias Fetais. In: GUARIENTO, A.; MAMEDE, J.A.V. **Medicina Materno-Fetal**, v.2. São Paulo: Atheneu, 2002. p. 1157-1168.

CHAHOUND, I. **Atlas of External and Skeletal Anomalies in Rats**, CD-ROOM, PR & C GmbH, Leipzig, 1996.

CHAHOUND, I.; KWASIGROCH, T. E. Controlled breeding of laboratory animals. In: NEUBERT, D. ; MERKER, H.J.; KWASIGROCH, T.E. **Methods in Prenatal Toxicology**, Stuttgart: Spring Thieme Publishers. p.78-91, 1977.

COBEA – Colégio Brasileiro de Experimentação Animal. **Manual para técnicos em bioterismo**. 2.ed. São Paulo: H.A.Rothschild, 259p. 1996.

CORDIOLI, A. V. **Psicofármacos**. 2 ed. Porto Alegre: Artmed, 2000.

EPA - ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. Guidelines for Reproductive Toxicity Risk Assessment – EPA/630/R-96/009, Washington, Sept.1996.

FANTONI, D. T.; CORTOPASSI, S. R. Medicções pré-anestésicas. In: _____ **Anestesia em Cães e Gatos**. São Paulo: Roca, 2002. p.151- 158.

FROHBERG, H. An introduction to research in teratology. In: NEUBERT, D.; MERKER, J.; KWASIGROCH, T.E. **Methods in Prenatal Toxicology**. Berlin: Georg Thieme Publishers Stuttgart, 1977. p.1-13.

GILMAN, A.G.; RALL, T.W.; NIES, A.S.; TAYLOR, P. **The Pharmacological Basis of Therapeutics**. 8 ed., New York: Pergamon Press, 1990. 1811p.

HAEFELY, W. The biological basis of benzodiazepine actions. **Journal of Psychoactive Drugs**, v.15, n.1-2, p.19-39, 1983.

HANSEN, W.F.; YANKOWITZ, J. Pharmacologic Therapy for Medical Disorders During Pregnancy. **Clin Obstet Gynecol**, v.45, n.1, p.136-152, 2002.

HOBBS, W.R.; RALL, T.W.; VERDOORN, T.A. Hipnóticos e sedativos; etanol. In: HARDMAN, J.G.; LIMBIRD, L.E. **Goodman & Gilman - As Bases Farmacológicas da Terapêutica**. 9 ed. México DF: McGraw-Hill, 1996. p. 264-289.

HOLLISTER, L. E. The pre- benzodiazepine era. **Journal of Psychoactive Drugs**, v.15, n.1-2, p.9-13, 1983.

HOWARD, F. M. ; HILL, J. M. Drugs in pregnancy. **Obstet Gynecol**, 34: 643-653, 1979.

INABA, B. S. ; COHEN. **Drogas Estimulantes Depressoras Alucinógenos – Efeitos Físicos e Mentais das Drogas Psicoativas**. Rio de Janeiro: Jorge Zahar Editor, 1991.

KELLOGG, C.; TERVO, D.; ISON, J. et al. Prenatal Exposure to Diazepam Alters Behavioral-Developmental in Rats. **Science**, 207: (4427) 205-207, 1980.

KENNEDY, S.K.; LONGNECKER, D.E. História e Princípios da Anestesiologia. In: HARDMAN, J.G.; LIMBIRD, L.E. **Goodman & Gilman - As Bases Farmacológicas da Terapêutica**. 9 ed. México DF: McGraw-Hill, 1996. p. 217-225.

KITCHELL, B. E. Anorexia e polifagia. In: ETTINGER, S. J. **Tratado de Medicina Interna Veterinária**. 3 ed. São Paulo: Manole, 1992. p. 15-17.

LAEGREID, L.; HAGBERG, G.; LUNDBERG, A. The effects of benzodiazepines on the fetus and the newborn. **Neuropediatrics**. v.23, p.18-23, 1992.

LARINI, L. Compostos ansiolíticos. In: LARINI, L. **Toxicologia**. 3 ed. São Paulo: Manole, 1997. p.255-265.

LEMONICA, I. P. Embriofetotoxicidade. In: SEIZI, O. **Fundamentos de toxicologia**. São Paulo: Atheneu, 1996. p.86-94.

LEMONICA, I.P.; ALVARENGA, C.M.D. Abortive and teratogenic effects of *Acanthospermum hispidum* D.C. and *Cajanus cajan* L. Millip in pregnant rats. **J. Ethnopharmacology**, v.43, p.39-44, 1994.

LO, W.Y.; FRIEDMAN, M. Teratogenicity of Recently Induced Medications in Human Pregnancy. **Obstetrics & Gynecology**. v.100, n.3, p.465-473, sept. 2002.

MacDONALD, R.L.; TWYMAN, R.E. Biophysical properties and regulation of GABA_A receptor channels. **Semin Neurosci**, 3:219-230, 1991.

MADALENA, J. C. **Psicofarmacologia – Clínica Básica**. São Paulo: BYK, 1975.

MAROOOF, M.; KHAN, R.M.; AHMED G. Midazolam infusion is an effective alternative to diazepam infusion in management of eclampsia. **Anesthesiology**, v. 89, p.1058, sept. 1998.

MASON, D.E. Anesthesia, Analgesia, and Sedation for Small Mammals. In: HILLYER, E.V.; QUESENBERRY, K.E. **Ferrets, Rabbits, and Rodents - Clinical Medicine and Surgery**. Philadelphia: W.B.Saunders Company, 1997. p.378-391.

MASSONE, F. **Anestesiologia Veterinária Farmacologia e Técnicas**. 2.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1994. 252p.

MATTISON, D.R. Protecting reproductive, and developmental health under proposition 65 – public health approaches to knowledge, imperfect knowledge, and absence of knowledge. **Reproductive Toxicology**, v.6, p.1-7, 1992.

MCELHATTON, P.R. The effects of benzodiazepine use during pregnancy and lactation. **Reproductive Toxicology**, v.8, n.6, p.461-475, 1994.

McNAMARA, J.O. Fármacos eficazes no tratamento das epilepsias. In: HARDMAN, J.G.; LIMBIRD, L.E. **Goodman & Gilman - As Bases Farmacológicas da Terapêutica**. 9 ed. México DF: McGraw-Hill, 1996. p. 335-353.

MELLO, J.R.B.; LANGELOH, A.; HABERMEHL, G.; KREBS, H.C.; BATATINHA, M.J.M.; ALMEIDA, C.R.C.; BASTOS, F. C.; BASSANI, M.L.; BARUFALDI, C.M.; ALVARES, F.T.; FRANCISCO, D. Avaliação do extrato aquoso de *Crotalaria retusa* Leguminosae sobre a fertilidade de ratas. **Arq. Fac. Vet. UFRGS**. Porto Alegre: Faculdade de Veterinária da UFRGS, v. 25, n.2, p.34-42, 1997.

MILLER, R.P. Teratogenicity of Oral Diazepam and Diphenylhydantoin in Mice. **Toxicology and Applied Pharmacology**. v. 32, p.53-61, 1975.

MORON, A.F. Medicina Fetal: Conceitos e Generalidades. In: GUARIENTO,A.; MAMEDE, J.A.V. **Medicina Materno-Fetal**, v.2. São Paulo: Atheneu, 2002. p. 1125-1147.

NELSON, R.W.; COUTO, C.G. Convulsões. In: _____ **Medicina Interna de Pequenos Animais**. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001a, p.773-783.

NELSON, R.W.; COUTO, C.G. Falsa Gestação, Distúrbios da Gestação, Parto e Período pós-parto. In: _____ **Medicina Interna de Pequenos Animais**. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001b, p.689-700.

NEUBERT, D.; CHAHOUD, I. Possible consequences of pre- or early postnatal exposure to substances with estrogenic or androgenic properties. **Endocrine Chemical Environmental**, v.3, p.24-52, 1995.

NEUBERT, D; KAVLOCK, R.J.; MERKER,H.J.;KLEIN,J. **Risck Assessment of Prenatally-Induced adwers health effects**. Berlin: Springer – Verlag, 1992. 565p.

NEUBERT, D.; MERKER, H.J.; KWASIGROCH, T.E. **Methods in Prenatal Toxicology, Evaluation of Embryotoxic Effects in Experimental Animals**. Stuttgart: Georg Thieme Verlag, 1977. 474 p.

O'BRIEN,C.P. Dependência e uso abusivo das drogas. In: HARDMAN,J.G.; LIMBIRD, L.E. **Goodman & Gilman - As Bases Farmacológicas da Terapêutica**. 9 ed. México DF: McGraw-Hill, 1996. p. 405-420.

OSWEILER, G. D. **Toxicologia Veterinária**. Porto Alegre: Artes Médicas, 1998, 526 p.

PADDLEFORD, R.R. Drogas pré-anestésicas. In:_____ **Manual de Anestesia em Pequenos Animais**. 2 ed. São Paulo: Roca, 2001. p. 15 - 35.

PANKAJ, V.; BRAIN, P.F. Effects of prenatal exposure to benzodiazepine-related drugs on early development and adult social behavior in Swiss mice-I Agonists. **Gen. Pharmacol.**, v.22, n.1, p.33-41, 1991.

PERAULT, M.C.; FAVRELI, S.; MINET, P.; REMBLIER, C. Benzodiazepines et grossesse.. **Therapie**. v.55, n.5, p. 587-595, 2000 Sep-Oct.

PERES-LASO, C.; VALENCIA, A.; RODRIGUEZ-ZAFRA, M.; CALES, J.M.; GUILLAMON, A.; SEGOVIA, S. Perinatal administration of diazepam alters sexual

dimorphism in the rat accessory olfactory bulb. **Brain Research**. v.634, n.1, p.1-6, 1994.

PRZYBYLSKI, J. M. D. **Drogas Usadas na Gravidez**. Porto Alegre: FFFCMPA, 1995. Dissertação (Mestrado em Farmacologia), Faculdade de Medicina, Fundação Faculdade Federal de Ciências Médicas de Porto Alegre, 1995.

RAYBURN, W.; MARSDEN, D. Medication in Pregnancy. In: KNUPPEL, R.A ; DRUKKER, J. E. **High-Risk Pregnancy: a Team Approach**. 2 ed. Philadelphia: W.B.Sanders, 1993. p.149-162.

ROUCOURT, S.; STANCATI, E. Retardo de Crescimento Fetal. In: GUARIENTO, A.; MAMEDE, J.A.V. **Medicina Materno-Fetal**, v.2. São Paulo: Atheneu, 2002. p. 1189-1198.

RUCKMAN, S.A.; GREEN, O.P.; PALMER, A.K.; KLIMISCH, H.J. Tri-isobutylphosphate: a prenatal toxicity study in rats. **Toxicology Letters**. v.105, p.231-237, 1999.

SAFRA, M.J.; OAKLEY, G.P. Association between cleft-lip with or without cleft-palate and prenatal exposure to diazepam. **Lancet**. v. 2, n. 7933, p. 478-480, 1975.

SALIM, J. **Noções de Psicofarmacoterapia na Prática**. São Paulo: E.P.U, 1987. 132p.

SAXEN I.; SAXEN L. Association between maternal intake of diazepam and oral clefts. **Lancet**. v.2, p.498, 1975.

SCHALAPPI, B. Safety aspects of midazolam. **Br. J. Clin. Pharmacol**. v. 16 (suppl 1), p. 37-41, 1983.

SCHATZBERG, A.F.; COLE, J.O. **Manual de Psicofarmacologia Clínica**. 2 ed. Porto Alegre: Artes Médicas, 1993.

SHIBUYA, T.; WATANABE, Y. HILL, H.F.; SALAFSKY, B. Developmental Alterations in Maturing Rats Caused by Chronic Prenatal and Postnatal Diazepam Treatments. **Japanese Journal of Pharmacology**, v.40, n.1, p.21-29, 1986.

SKARDA; MUIR, H.; BEDNARSKI. **Manual de Anestesia Veterinária**. 2ed. Madri: Mosby, 1997.

SMITH, D.E. The benzodiazepines, two decades of research and clinical experience – Introduction. **Journal of Psychoactive Drugs**, v.15, n.1-2, p.1-7, 1983.

SOUZA, C.A.M.; CARVALHO, R.R.; KURIYAMA, S.N.; ARAUJO, R.P.; VOLLMER, R.S.; ALVES, E.N.; PAUMGARTTEN, F.J.R. Study of the embriofeto toxicity of crown of thorns (*Euphorbia milii*) latex, a natural molluscicide. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v.30, p.1325-1332, 1997.

SPINOSA, H. S.; GORNIK, S.L. Tranquilizantes e relaxantes musculares de ação central. In: SPINOSA, H.S.; GORNIK, S.L.; BERNARDI, M.M. **Farmacologia Aplicada à Medicina Veterinária**. 2ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan,1999. p. 140-149.

STERNBACH, L. H. The benzodiazepine Story. **Journal of Psychoactive Drugs**, v.15, n.1-2, 1983. p.15-17.

SWANSON, R.J.; LEAVITT, M.G. Fertilization and mouse embryo development in the presence of midazolam. **Anest. Analg.** N.75, p.549-554, 1992.

SWINYARD, E.A.; WHITE, H.S.; WOLF, H.H. Mechanisms of Anticonvulsant Drugs. **ISI Atlas of Science: Pharmacology**, 2:95-98, 1988.

TANNHAUSER, M.A.L. **Administração Pré-natal de Agentes GABAérgicos Modifica as Vocalizações Ultrassônicas Neonatais de Ratos**. Porto Alegre: FFFCMPA, 2002. Dissertação (Mestrado em Farmacologia), Faculdade de Medicina, Fundação Faculdade Federal de Ciências Médicas de Porto Alegre, 2002.

TAYLOR, W.; VAN DIKE, G.C. Revised procedures for staining and clearing small fishes and other vertebrates for bone and cartilage study. **Cybium**, v. 9, n.2, p.107-119, 1985.

THURMON, J.C.; TRANQUILLI, W.; BENSON, G.J. **Lumb & Jones Veterinary Anesthesia**. 3ed. Pensylvania: Williams & Wilkins, 1996. 928p.

UFRJ. SIAT. Disponível em : < [http:// www.nc.ufrj.br/disquegestante](http://www.nc.ufrj.br/disquegestante)> em 10 de novembro de 2002.

WEBSTER, W.S.; FREEMAN, J.A.D. Is this drug safe in pregnancy? **Reproductive Toxicology**, v.15, n.6, 2001. p.619-629.

WISE, L.D.; BECK, S.L.; BELTRAME,D. et al. Terminology of developmental abnormalities in commun laboratory mammals. **Teratology**, v.55, p.249-292, 1997.