

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA INTERINSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS

**Consequências da exposição intrauterina ao Diazepam: impacto
sobre os sistemas ventilatório e monoaminérgico de ratos neonatos
durante o desenvolvimento**

*Developmental consequences of intra-uterine exposure to Diazepam: impact
on the ventilatory and monoaminergic systems of newborns rats*

Carlos Aparecido da Silva Junior

Orientadora: Profa. Dra. Luciane Helena Gargaglioni Batalhão

Coorientadora: Dra. Vivian Biancardi Rossato

Jaboticabal

Agosto – 2020

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA INTERINSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS

CARLOS APARECIDO DA SILVA JUNIOR

**Consequências da exposição intrauterina ao Diazepam: impacto
sobre o os sistemas ventilatório e monoaminérgico de ratos neonatos
durante o desenvolvimento**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa Interinstitucional de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal de São Carlos / Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UFSCar/UNESP) para obtenção do título de mestre em Ciências Fisiológicas.

Área de concentração: Fisiologia

Orientadora: Profa. Dra. Luciane Helena Gargaglioni Batalhão

Coorientadora: Dra. Vivian Biancardi Rossato

Jaboticabal

Agosto – 2020

APOIO FINANCEIRO

Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP

(Processo nº 2017/26367-9)

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq

(Processo nº 131452/2018-5)

Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior - CAPES

AGRADECIMENTOS

Fazer uma pós-graduação não era o meu plano inicial. Desde os tempos de cursinho, eu tinha clara a imagem que um dia eu seria Professor de Ciências e Biologia. Mas a vida sempre mostra novos caminhos, novas oportunidades e novos meios para nos reinventarmos. E está tudo bem com isso. É parte do processo se redescobrir.

Assim, entrei no laboratório de Fisiologia no final do ano de 2013. Muitos acharam loucura, porque Fisiologia sempre foi uma das matérias que mais reprovavam ali na FCAV, e os alunos achavam que as professoras seriam igualmente difíceis no laboratório. E eles estavam enganados. Ali encontrei a minha segunda família, minha segunda casa.

A quem devo endereçar os agradecimentos dessa página? Neste momento, eu não sei. Enquanto escrevo [e o tento fazer sem apagar para que saia no fluxo das minhas ideias], uma história passa pela minha cabeça. História sobre a qual eu tenho muito orgulho de me lembrar de cada momento. Congressos, cursos, reuniões, disciplinas, viagens, churrascos e festas (claro, não poderiam faltar!). E pensar que eu conheci os “tops” da Fisiologia Respiratória nesse laboratório! Nossa! Quanta coisa!

Agradeço a Deus e Maria, minha mãe, por serem força e alimento espiritual.

Quero agradecer a Prof^a. Luciane. Que mulher! Lembro da primeira vez que entrei na sua sala com o Jaime e o Leonardo em busca de projetos. E o medo por estar falando com ela. “Imagina”, pensava eu, “vou entrar aqui e tomar pau na disciplina igual todo mundo”. Lu, agradeço a sua confiança em meu trabalho. Agradeço por cada momento que entrei na sua sala [chorando] com vontade de desistir, e a senhora não deixou, por sempre acreditar que eu era capaz. Obrigado por ser essa mulher de garra que me ensinou a lutar e persistir, mesmo quando as coisas pareciam difíceis. Eu viajei o mundo graças às portas que a senhora me abriu. Eu jamais imaginei que pudesse conhecer tudo o que conheci, e conquistar o que conquistei. Obrigado por cada porta que a senhora abriu. Não desista da ciência. Não desista dos seus alunos.

Baiana e Lango. Caramba! [pausa] Obrigado por serem meus irmãos mais velhos. Lembro que a primeira pessoa com quem eu fui trabalhar quando eu cheguei foi a Baiana. Assim, aprendi não só os procedimentos cirúrgicos, mas também as suas neuras.

Que são muitas! Sou grato por ter trabalhado ao seu lado, por ter me ensinado aquilo que sei. E obrigado por ter me ajudado em questões pessoais que eu achei que nem estivessem lá. Obrigado por me ajudar a enxergá-las. Lango, como eu disse na última vez que eu te vi ainda em Jaboticabal: obrigado por ser meu irmão mais velho. Eu agradeço por ter me ensinado cada experimento, com você aprendi muito. Mas além do ensinamento científico, aprendemos e descobrimos juntos as nossas particularidades. Brigamos muito! E como era chato ficar sem falar com você! Mas como era divertido ter você ali. Nossa, a gente conversava pelo olhar! Lembra disso?! Cada besteira que a gente compartilhava junto! Não me arrependo de nada. E lembro de tudo como se fosse ontem.

Do mesmo modo, quero agradecer a Vivian. Obrigado por cada ensinamento. Pelas reuniões à distância. Pelos áudios de 5 minutos que trocamos no WhatsApp. Com você aprendo, constantemente, sobre respiração. Não só aquela controlada e gerada no tronco [caramba, essa eu aprendi muito com você!]. Mas aquela que a gente tem que dar a cada momento que as coisas parecem mais difíceis do que a gente consegue suportar.

Elisa e Aline! Que alegria a minha por ter compartilhado um pedacinho da minha história com vocês. Eu trago as duas juntas aqui porque as duas foram o meu ponto de desabafo. Cada vez que eu me sentia cansado, era para as duas que eu corria para reclamar. Elisa, obrigado por me ceder a sua [aconchegante] casa. Aline, obrigado por fazer do seu coração a minha morada. Quero que a gente continue sempre conectados. E fofocando, claro! Até porque, quem somos nós para julgar?!

Danuzia! Quantos sentimentos sobre uma única pessoa! Agradeço demais a sua parceria. Lembro até hoje do dia que cheguei no laboratório chorando desesperado em um domingo de manhã porque eu tinha ralado o carro e ainda tinha que fazer experimento. Mas você estava lá. E me acolheu. Como sempre fez! Obrigado por fazer da sua família, a minha. Isso não tem preço. Tenho, e sempre terei, um grande carinho por você, seu pai e sua mãe.

Agradeço também à Kênia e ao Glauber. Obrigado por serem importantes instrutores nessa minha caminhada. E obrigado por cada puxão de orelha. À toda família Fisiologia, o meu muito obrigado. Camila, Leonardo, Carol Silva, Lara, Kássia, Lucas, Welex, Tiago, Victor! Obrigado pela convivência dentro e fora do laboratório. Vocês são incríveis!

Quero dedicar um breve espaço para a minha família. Eu sei que nem sempre fomos os melhores. Mas com certeza amo e me orgulho o lugar de onde venho. Agradeço à minha mãe pela força, ao meu pai pelo carinho e aos meus avós maternos e paternos pelo suporte sempre. Faço dedicatória especial aos meus avós Francisca, Roberto (Xexéu), Aparecida (Dona Cida) e José Oswaldo (Vadim). Quero deixá-los registrados nestas palavras. Eu sei que o tempo um dia cobra tudo isso. Mas aqui, também sei que vocês estarão eternizados para além da minha lembrança. O meu mais sincero obrigado a vocês.

Agradeço às agências de fomento FAPESP (Processo nº 2017/26367-9), CNPq (Processo nº 131452/2018-5) e CAPES. Agradeço ao PIPGCF, juntamente com o seu corpo docente. Esses me permitiram a realização deste projeto e foram base para meu conhecimento. Espero ter contribuído para a construção de uma ciência crítica. Estimo que o desenvolvimento científico e educacional seja sempre prioridade na sociedade.

Obrigado a todos!

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	9
ABREVIACÕES	12
RESUMO.....	14
ABSTRACT	15
INTRODUÇÃO.....	16
CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	19
1. REVISÃO DE LITERATURA.....	20
1.1. Ansiedade: definições e epidemiologia.....	20
1.2. Tratamentos da ansiedade e o uso de benzodiazepínicos na gestação	25
1.3. Desenvolvimento da rede respiratória.....	30
1.4. A maturação da neurotransmissão inibitória.....	32
1.5. O sistema GABAérgico e os núcleos catecolaminérgicos e da rafe .	35
2. Objetivos	41
3. Material e Métodos	42
3.1. Animais, drogas e procedimentos cirúrgicos	42
3.2. Determinação da ventilação em P0-1, P12-13 e P21-22.....	43
3.3. Determinação do metabolismo.....	44
3.4. Reflexo de mastigação e endireitamento.....	45
3.5. Imunofluorescência para Tirosina-hidroxilase (TH) e 5- hidroxitriptamina (5-HT) e contagem de células.....	45
3.6. Protocolos experimentais	46
3.6.1. <i>Efeito da exposição ao Diazepam durante o período pré-natal sobre a ventilação e o metabolismo durante a normocapnia/normóxia.</i>	46

3.6.2. Efeito da exposição ao Diazepam durante o período pré-natal sobre a ventilação e o metabolismo de ratos neonatos (P0-1 e P12-13) e jovens (P21-22) submetidos à hipercapnia e hipóxia.....	46
3.6.3. Efeito da exposição ao Diazepam durante o período pré-natal sobre a contagem do número de neurônios positivos para TH e 5-HT em neonatos de idade P12-13.....	47
3.7. Análise de dados.....	47
4. Síntese dos resultados e breve discussão	49
5. Conclusão.....	56
6. Referências.....	57
CAPÍTULO 2 – MANUSCRITO	72

Figuras do Capítulo 1:

FIGURA 1: Exemplo do procedimento cirúrgico para implantação da bomba osmótica para administração contínua do Diazepam. **A:** bomba osmótica em preparação. **B:** procedimento cirúrgico sendo executado. **C:** rata grávida saudável após procedimento.

FIGURA 2 - Esquema de um sistema de pletismografia de pressão utilizado para neonatos de mamíferos P0 e P12. P: transdutor de pressão dos movimentos da caixa torácica; T: dispositivo para medir a temperatura da câmara; F: fluxômetro de entrada; F-S: fluxo de saída (adaptado de Mortola; Frappell, 2013).

FIGURA 3 - Esquema de um sistema de pletismografia de corpo inteiro utilizado para animais P21. Em vermelho, sinal barométrico. P: transdutor de pressão; T: dispositivo para medir a temperatura da câmara; F: fluxômetro; C: seringa para calibração do sinal; MFS: “mass flow system” – bomba de sucção para manutenção do fluxo.

FIGURA 4 – Traçado representativo de pletismografia de pressão utilizado para avaliar a ventilação em P0-1, evidenciando uma pausa na respiração por mais de dois ciclos respiratórios, caracterizando um evento de apneia espontânea nesta idade.

Figuras do Capítulo 2

FIGURE 1- Diazepam affects the variability of chewing reflex at P0-1. Effects of a prenatal Diazepam exposure (DZP) or vehicle (CTRL) on chewing (A) and righting (B) reflexes in female (red) and male (blue) newborn rats (P0). Values are expressed as the mean \pm SEM. The dots represent the values of each animal.

FIGURE 2 – Diazepam decreases the ventilation due to a reduction on V_T of females (P0-1 and P12-13), decreases the respiratory frequency of males (P0-1 and P12-13) and their metabolism (P12-13) under hypercapnia. Ventilation (\dot{V}_E), tidal volume (V_T), respiratory frequency (f_R), metabolic rate ($\dot{V}O_2$) and air convection requirements ($\dot{V}_E/\dot{V}O_2$) of control (CTRL, full bars) and Diazepam-treated (DZP, empty bars) of female (red, 2A – E) and males (blue, 2F – J) rats, during hypercapnic (7% CO_2) condition, at P0-1, P12-13 and P21-22. Values are expressed as the mean \pm SEM and as a % from baseline. The dots represent the values of each animal. *Means statistical difference between CTRL and DZP groups.

FIGURE 3 – DZP-treated females had a lower V_T at P0-1 during hypoxic challenge, as well P12-13 males had an attenuation of the hypoxic ventilatory response. Ventilation (\dot{V}_E), tidal volume (V_T), respiratory frequency (f_R), metabolic rate ($\dot{V}O_2$) and air convection requirements ($\dot{V}_E/\dot{V}O_2$) of control (CTRL, full bars) and Diazepam-treated (DZP, empty bars) of female (red, 2A – E) and males (blue, 2F – J) rats, during hypoxia (10% O_2) condition, at P0-1, P12-13 and P21-22. Values are expressed as the mean \pm SEM and as a % from baseline. The dots represent the values of each animal. *Means statistical difference between CTRL and DZP groups.

FIGURE 4 – Diazepam in-utero exposure decreases the number of catecholaminergic neurons in the brainstem of females and males. TH-immunoreactive cells in the catecholaminergic nuclei are stained in green. In the first column are the photomicrography of the regions analyzed for control animals (CTRL), as well the second column shows the same for DZP-treated animals (DZP). In these charts, the dotted lines mark the limits of the analyzed catecholaminergic nuclei. The solid lines represent the edges of the tissues. Both lines are used representatively inform the spatial positioning of the cells in the real tissue. In the third column there are coronal diagrams from Paxinos and Watson (1998). The green circles indicate where that nuclei are located respective to the other surrounding areas, as the number on top of each diagram indicates the coordinate of that region from bregma suture. Photomicrograph taken at a 10-X magnification. A 100 μm scale bar are shown in the lower right corner of each image. The fourth column shows the total number (A – D) of TH-immunoreactive cells in the catecholaminergic nuclei (A1/C1, A2/C2, C3, A5) and the number of TH-

immunoreactive cells per area in mm² (cells density – cells/mm²) of A6 nucleus of in the brainstem of females (red) and males (blue) at P12-13. Values are expressed as the mean ± SEM. *Means statistical difference between CTRL and DZP groups. Full bars represent control (CTRL) group and empty bars represent Diazepam-treated group (DZP). **A:** A1/C1; **B:** A2/C2; **C:** C3; **D:** A5; **E:** A6.

FIGURE 5 – Diazepam in-utero exposure decrease the number of serotonergic neurons in the medullary *raphe* of male rats. 5-HT-immunoreactive cells in the serotonergic nuclei are stained in red. In the first row (A) there are coronal diagram from Paxinos and Watson (1998), for ROB and RPA (A, left) and RMAG (A, right). The red circles indicate where that nuclei are located respective to the other surrounding areas, as the number on top of the diagram indicates the coordinate of that region from bregma suture. The following red colored images (B – D) are the photomicrographs of the regions analyzed, for control animals (CTRL, B – D left) and DZP-treated animals (DZP, B – D right). In these charts, solid lines represent the edges of the tissues and were representatively used inform the spatial positioning of the cells in the real tissue. Photomicrograph taken at a 10-X magnification. A 100 µm scale bar are shown in the lower right corner of each image. The bottom row shows the graphs with the total number of 5-HT-immunoreactive cells in the three different *raphe* nuclei of females (E, red) and males (F, blue) at P12-13. ROB: *raphe obscurus*, RPA: *raph pallidus*, RMAG: *raphe magnus*. Values are expressed as the mean ± SEM. The dots represent the values of each animal. *Means statistical difference between CTRL and DZP groups. Full bars represent control (CTRL) group and empty bars represent Diazepam-treated group (DZP).

ABREVIACOES

5-HT: 5-hidroxitriptamina; serotonina

8-OH-DPAT: 8-hydroxy-2-(Di-n-propylamino) Tetralin

BötC: Complexo Bötzinger

BZ: Benzodiazepínico – benzodiazepínicos (BZs)

CA: Catecolaminérgico

Cl: Cloreto

cVRG: grupo respiratório ventral caudal

Dbx1: Developing brain homeobox 1

DSM-5: Manual diagnóstico e estatístico de transtornos mentais - 5ª versão

DZP: Diazepam

E: Dia embrionário

GABA: Ácido gama-aminobutírico

GABA_A – Receptor A do ácido gama-aminobutírico

GABA_B – Receptor B do ácido gama-aminobutírico

Hoxb: Gene B Homeobox

ISRS: Inibidores Seletivos da Recaptação de Serotonina

KCC2: Co-transportador de cloreto-potássio

Krox20: proteína 2 de resposta ao crescimento precoce

LC: *Locus coeruleus*

Lmx1b: Fator de transcrio 1-beta do LIM homeobox

Mafb: Homólogo B do oncogene fibrosarcoma musculoaponeurótico V-maf

NKCC1: Co-transportador de so-cloreto-potássio

NOR: Noradrenérgico

NTS: Núcleo do trato solitrio

P: Dia de vida pós-natal

pF: Grupo Parafacial

Phox2b: Homeobox 2b do tipo pareado

PiCo: Complexo pós-inspiratório

pré-BötC: Complexo Pré-Bötzinger

rVRG: grupo respiratório ventral rostral

SIDS: Sudden Infant Death Syndrome - Síndrome da Morte Súbita Infantil (SMSI)

SNC: Sistema Nervoso Central

TAG: Transtorno de Ansiedade Generalizada

A ansiedade é um problema que atinge a população atual, sendo que as mulheres são duas vezes mais propensas a desenvolverem tais transtornos, principalmente em idade reprodutiva. O Diazepam (DZP) é um dos medicamentos utilizados para o tratamento destes transtornos, mas seu uso durante a gestação tem sido associado a problemas para o feto. Esse medicamento exerce sua função interagindo com o sistema GABAérgico, que participa do controle respiratório, assim como nas respostas ventilatórias à hipercapnia e hipóxia por atuação em áreas quimiossensíveis. Desta forma, buscou-se avaliar os efeitos da exposição intrauterina ao DZP (1 mg/Kg/dia) na ventilação e metabolismo, no número de neurônios catecolaminérgicos e serotoninérgicos e nos reflexos mastigação e endireitamento em ratos machos e fêmeas em diferentes fases do desenvolvimento (P0-1, P12-13, P21-22). Utilizou-se pletismografia de pressão e de corpo inteiro, e calorimetria indireta para avaliação da ventilação e do metabolismo em P0-1, P12-13, P21-22. Imunofluorescência por *free-floating* foi utilizada para análise dos neurônios catecolaminérgicos e serotoninérgicos em P12-13. Reflexo de mastigação e endireitamento foram usados para avaliar o comportamento em P0-1. Nós observamos que fêmeas tratadas com DZP apresentaram aumento de frequência respiratória e metabolismo em normóxia/normocapnia (P0-1), assim como queda da ventilação em hipercapnia (P0-1 e P12-13). Por sua vez, ratos tratados com DZP apresentaram queda na ventilação em normóxia/normocapnia (P12-13 e P21-22), queda de frequência respiratória em hipercapnia e queda da ventilação em hipóxia (P12-13). Em P21-22, ambos machos e fêmeas do grupo DZP apresentaram ganho de massa corporal. Fêmeas e machos que receberam DZP apresentaram menor número de neurônios catecolaminérgicos em P12-13, assim como machos nessa idade possuem redução do número de neurônios serotoninérgicos. Esses resultados mostram que a exposição ao DZP promove efeitos duradouros no controle ventilatório e no Sistema Nervoso Central, de maneira sexo-específica, e contribui para o entendimento sobre intervenções medicamentosas na gestação e a ocorrência de eventos adversos para o recém-nascido.

Palavras-chaves: respiração, desenvolvimento, GABA, catecolaminas, serotonina.

ABSTRACT

Anxiety is a problem that affects the general population, and women are twice as likely to develop such disorders, especially at reproductive age. Diazepam (DZP) is one of the drugs used to treat these disorders, but its use during pregnancy has been associated with problems for the fetus. This medication interacts with the GABAergic system, which participates in the respiratory control of mammals, as well as in the ventilatory responses to hypercapnia and hypoxia, acting in chemosensitive regions. Thus, we sought to evaluate the effects of intrauterine exposure to DZP (1 mg/Kg/day) on ventilation and metabolism, chewing and righting reflexes on the number of neurons in the catecholaminergic and serotonergic system of rats in different ages in the development (P0-1, P12-13, P21-22). Pressure and whole-body plethysmography and indirect calorimetry were used to assess ventilation and metabolism at P0-1, P12-13, P21-22. Free-floating immunofluorescence was used for the analysis of catecholaminergic and serotonergic neurons in P12-13. Chewing and righting reflexes were used to assess the behavior at P0-1. We observed that DZP-treated females showed increased respiratory frequency and metabolism in normoxia/normocapnia (P0-1), as well as decreased ventilation in hypercapnia (P0-1 and P12-13). Males treated with DZP showed a decrease in ventilation in normoxia/normocapnia (P12-13 and P21-22), a decrease in respiratory frequency in hypercapnia and a decrease in ventilation in hypoxia (P12-13). In P21-22, both males and females of DZP group showed body mass gain. Females and males treated with DZP in P12-13 have a lower number of catecholaminergic neurons, as well as males at this age have a reduction in the number of serotonergic neurons. These results show that DZP exposure during pregnancy promotes sex-specific long-lasting effects on ventilatory control and Central Nervous System and contributes to the understanding of drug interventions during the gestational period and the occurrence of adverse events for the newborn.

Keywords: breathing, development, GABA, catecholamine, serotonin.

INTRODUÇÃO

Os transtornos de ansiedade são um problema recorrente na população atual. Estudos sobre a sua epidemiologia convergem ao apontar que as mulheres são até duas vezes mais afetadas dos que os homens por estes transtornos, e que a gravidez é onde são relatadas as maiores taxas de ocorrência. Assim, medicamentos como os benzodiazepínicos são administrados a estes pacientes, sobre os quais observa-se uma tendência no aumento da sua prescrição a médio e longo prazo. Esses medicamentos atuam como moduladores alostéricos nos receptores GABAérgicos, facilitando a ligação do GABA aos seus receptores, aumentando o influxo de cloreto para a célula, promovendo uma hiperpolarização. Seu uso durante a gestação tem sido relacionado com problemas ao nascimento como más-formações e complicações neonatais que requerem internação em unidades intensivas de tratamento neonatal. No entanto, pouco se sabe sobre o impacto dessa administração na gravidez para o controle respiratório do indivíduo na vida pós-natal.

A respiração é um processo rítmico que é controlado por áreas bulbares e pontinas. A geração do ritmo respiratório está associada à neurotransmissão excitatória glutamatérgica, embora saiba-se que a neurotransmissão inibitória rápida, mediada pelo GABA pode modular o padrão respiratório, assim como é importante para o correto desenvolvimento e maturação da rede respiratória. Adicionalmente, o efeito do GABA sobre no Sistema Nervoso Central muda ao longo do desenvolvimento, de modo que no fim da vida fetal e início da vida pós-natal ele promove a despolarização das células (isto é, efeito excitatório), mas gradualmente passa a promover uma hiperpolarização das células (isto é, efeito inibitório), persistindo até a vida adulta. Isso acontece devido à diferença na expressão de co-transportadores para cloreto, sódio e potássio, como o NKCC1, cujo é mais expresso no início da vida pós-natal, e KCC2, que passa a ser expresso tardiamente no desenvolvimento. A transição de um co-transportador para o outro é gradual ao longo dos primeiros dias vida pós-natal, mas parece ser acentuada entre o 10º ao 14º dia de vida. Da mesma forma, o GABA atua em neurônios catecolaminérgicos e serotoninérgicos, conhecidos por participarem do controle ventilatório em situações de hipercapnia e hipóxia, controlando a liberação de serotonina e noradrenalina por essas regiões.

O feto pode enfrentar problemas muito precoces durante o seu desenvolvimento embrionário, como hipóxia/hipoglicemia crônica, exposição à nicotina ou outras toxinas,

exposição a diferentes tipos de medicamentos e uma variedade de outros fatores com potencial para alterar a maturação do sistema respiratório. Assim, a administração de benzodiazepínicos durante o período gestacional, tais como o Diazepam, pode influenciar o desenvolvimento da rede respiratória, afetando a ventilação no basal e em situações de desafios gasosos, de indivíduos em idade pós-natal.

Dessa forma, o presente projeto avaliou a ventilação e o metabolismo em normocapnia normóxia, hipercapnia e hipóxia de ratos neonatos (P01- e P12-13) e juvenis (P21-22) que foram expostos ao Diazepam durante os 21 dias de gestação. Buscou-se também avaliar as alterações no sistema catecolaminérgico, por meio da contagem do número de neurônios positivos para imunofluorescência para Tirosina-hidroxilase, assim como alterações no sistema serotoninérgico, por meio da contagem do número de neurônios positivos para imunofluorescência para serotonina, ambas realizadas em animais P12-13. Adicionalmente, avaliou-se as alterações comportamentais destes animais logo após o nascimento.

Nossos resultados mostram que o Diazepam promoveu efeitos sexo-específicos. Em fêmeas, foi observado um aumento da frequência respiratória e taxa metabólica em P0-1, redução da ventilação em hipercapnia nas idades P0-1 e P12-13, e redução do número de neurônios catecolaminérgicos P12-13. Em machos, o Diazepam promoveu redução da ventilação em normocapnia normóxia, nas idades P12-13 e P21-22, uma redução da frequência respiratória de animais P12-13 em hipercapnia, uma redução da ventilação de animais P12-13 em hipóxia, assim como uma diminuição do número de neurônios catecolaminérgicos e serotoninérgicos. O tratamento farmacológico também resultou em ganho de massa corporal em machos e fêmeas na idade P21-22.

As alterações observadas na ventilação dos machos e fêmeas sugerem a participação do sistema GABAérgico no controle do padrão respiratório, dado que em ambos os sexos a redução da ventilação ocorreu, principalmente, por uma redução do volume corrente. As alterações observadas nos machos sugerem que o sistema GABAérgico deprime o controle das vias aéreas, enquanto as alterações da ventilação das fêmeas ao CO₂ sugerem uma inibição dos núcleos sexualmente dimórficos que participam da resposta ventilatória à hipercapnia, tais como o *Locus coeruleus*. A redução no número de neurônios do sistema monoaminérgico dos animais em P12-13 estão relacionadas com

as alterações respiratórias aqui observadas, sugerindo que o correto desenvolvimento dessas áreas pode impactar sobre o controle da ventilação.

Esses resultados abrem caminhos para uma reflexão sobre como o tratamento de mulheres grávidas com medicamentos pode interferir no desenvolvimento feto, gerando impactos na vida pós-natal dos recém-nascidos e levando à ocorrência de eventos tal como a Síndrome da Morte Súbita Infantil.

Dessa forma, essa dissertação foi dividida em dois capítulos. O primeiro capítulo, intitulado como “Considerações Gerais”, consiste em um levantamento teórico sobre os principais pontos que deram origem ao trabalho, avaliando a ocorrência e o tratamento dos transtornos de ansiedade em grávidas, assim como sobre o controle respiratório e o desenvolvimento e maturação da rede respiratória, discutindo o papel do sistema GABAérgico nestes processos. Ainda neste capítulo são apresentados os materiais e métodos utilizados no desenvolvimento desta pesquisa, de forma sintética, assim como uma breve descrição dos principais resultados encontrados e sua discussão. Por sua vez, o segundo capítulo apresenta os resultados colhidos na forma de um manuscrito em inglês intitulado “*Prenatal diazepam exposure effects on ventilation, metabolism, and catecholaminergic and serotonergic neurons of neonate and young rats*” que será submetido para publicação.

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS

1. REVISÃO DE LITERATURA

1.1. Ansiedade: definições e epidemiologia.

O termo ansiedade descreve uma condição psicológica que, atualmente, é circunscrita por sintomas específicos que são qualificados como não prazerosos e são acompanhados por sentimentos de apreensão e insegurança, assim como alterações de ordem psicofisiológicas. O “Manual diagnóstico e estatístico de transtornos mentais” - 5ª versão (DSM-5), propõe que a ansiedade é uma resposta de antecipação à uma ameaça futura, desencadeada por situações e estímulos nos quais o perigo é potencial e incerto, sendo associada à tensão muscular e vigilância, manifestada por um comportamento característico de cautela e esquivada. O medo, por sua vez, é considerado uma resposta à uma ameaça que é real ou percebida, associada com uma excitabilidade autonômica aumentada, e é caracterizado por comportamentos de luta e fuga. Os dois processos emocionais possuem certo valor adaptativo à medida que garantem um estado de alerta às situações que oferecem risco à sobrevivência do indivíduo. No entanto, quando esses estados comprometem o desempenho das pessoas nas suas atividades diárias, ou são exacerbados de maneira incontrolada, esses comportamentos passam a ser identificados como patológicos (Associação Americana de Psiquiatria, 2014; Bandelow; Michaelis; Wedekind, 2017; Carvalho-Netto, 2009; Roy-Byrne, 2015).

Roy-Byrne (2015) propõe que a ansiedade seja um dos sintomas psiquiátricos mais prevalentes na população em geral. Bandelow; Michaelis (2015) relatam que a prevalência deste transtorno aumentou em decorrência de mudanças experimentadas nos âmbitos políticos, sociais, econômicos e até mesmo ambientais. De fato, uma meta-análise realizada por Steel et al. (2014) mostrou que 1 em cada 5 indivíduos apresentaram algum critério para um transtorno mental quando analisadas as taxas de prevalência para os 12 meses precedentes, assim como há uma maior taxa de ocorrência dos transtornos mentais em mulheres. Isso acontece porque os transtornos mentais não são uma prioridade global (Vos et al., 2017).

Estudos apontam para as altas taxas de prevalências dos transtornos de ansiedade na população americana e europeia. Ao avaliar a ocorrência das doenças psiquiátricas na população norte-americana acima dos 13 anos de idade, foi encontrado que 33,7% dos indivíduos apresentaram, pelo menos uma vez na vida, algum transtorno de ansiedade, de modo que fobias e a ansiedade por separação se iniciam mais cedo (15 a 17 anos), e os

ataques de pânico e a ansiedade generalizada iniciam mais tardes na vida adulta (23 a 30 anos) (Kessler et al., 2012). Em relação à população europeia, Alonso; Lépine (2007) mostraram que 14,5% das pessoas apresentaram algum transtorno de ansiedade pelo menos uma vez ao longo da vida. Ambos os estudos epidemiológicos convergem quanto à diferença entre os sexos, apontando que as mulheres apresentam uma maior prevalência ao longo da vida de qualquer transtorno de ansiedade em relação aos homens, e que jovens, solteiros e desempregados compõem um maior grupo de risco para a ocorrência destes transtornos.

O conhecimento sobre a ocorrência e prevalência dos transtornos de ansiedade, para a população brasileira é escasso. Um levantamento realizado por Marinho et al. (2018) buscou avaliar o impacto de algumas doenças na população brasileira sobre dados referentes à expectativa de vida nos anos de 1990 a 2016. O estudo mostrou que os transtornos de depressão (5º lugar) e ansiedade (6º lugar) fazem parte das 10 principais doenças que mais contribuem para a categoria dos “anos vividos com enfermidade” (*years lived with disability*).

Dados de 2005 levantados na América Latina e no Caribe apontou que 5,5% da população apresentou transtorno de ansiedade generalizada (TAG) ao menos uma vez ao longo da vida, sendo 7,1% das mulheres contra 3,8% dos homens os apresentaram esse distúrbio ao longo de toda a vida. Para os ataques de pânico, as taxas de prevalência ao longo da vida são de 1,6%, com as mulheres liderando com maiores taxas. No Brasil, o estudo reporta que as taxas de prevalência ao longo da vida do indivíduo para o TAG variam de acordo com a região analisada, sendo de 17,6% em Brasília, 9,6% em Porto Alegre, 10,6% em São Paulo. Da mesma forma como observado para a América Latina e Caribe, as mulheres brasileiras apresentam as maiores taxas de prevalência para o TAG, assim como para os ataques de pânico (Kohn et al., 2005).

Orellana et al. (2020) realizaram um estudo avaliando as taxas de prevalência dos transtornos mentais em uma amostra de 12.350 indivíduos jovens e adultos, em 3 cidades brasileiras (Ribeirão Preto – SP; Pelotas – RS e São Luís – MA). As mulheres adultas das cidades de Ribeirão Preto e Pelotas apresentaram maiores taxas de ocorrência da fobia social, enquanto para São Luís as maiores taxas foram para mulheres jovens. Em relação aos dados de transtorno de ansiedade generalizada, a população adulta de Ribeirão Preto apresenta uma taxa de 9,3%, e os autores chamam atenção para esse grupo uma vez ele possui as maiores taxas de suicídio (13,7%) em comparação com à mesma faixa etária

das demais cidades avaliadas. Em conjunto com os dados levantados para os outros transtornos mentais, os autores relatam que estes foram mais prevalentes nas mulheres, principalmente entre aquelas com o menor nível socioeconômico.

Em geral, os estudos mostram que as mulheres são mais propensas para o desenvolvimento dos transtornos de ansiedade. De fato, o DSM-5 reconhece que elas são até duas vezes mais propensas em relação aos homens. Os riscos para a ocorrência desses transtornos são ainda maiores quando as mulheres entram na idade reprodutiva e passam pela gravidez.

A gravidez é uma das experiências humanas mais complexas, pois é um momento que traz consigo mudanças físicas e psicológicas, assim como pressupõe o desempenho de novos papéis. Embora para algumas mulheres a experiência possa ser significativa e gratificante, para outras o pré-parto e o pós-parto são momentos desafiadores. Dentro de uma cultura patriarcal, a gravidez é vista por muitas mulheres como a reafirmação de sua feminilidade, assim como um indicador social de autorrealização. No entanto, muitas delas enxergam esse momento de forma negativa em decorrência das responsabilidades futuras, de sua própria vulnerabilidade, assim como da insegurança e inadequação para exercer o papel de mãe. (Ali, 2018; Bhat et al., 2015; Brockington; Macdonald; Wainscott, 2006; Ghaffar et al., 2017; Teixeira et al., 2009; Viswasam; Eslick; Starcevic, 2019).

Assim, os transtornos de ansiedade são comuns nesta fase, sendo que 5% das mulheres grávidas tem transtornos de pânico e 10% tem TAG (Goodman; Chenausky; Freeman, 2014). De forma similar, o trabalho de Yonkers et al. (2017) relata que 3,7% e 9,5% das mulheres apresentaram transtorno de pânico e TAG, respectivamente. Adicionalmente, a recente meta-análise de Viswasam; Eslick; Starcevic (2019) aponta que a prevalência do transtorno de pânico na gravidez varia entre 0,4% a 7,5% e para o TAG, as prevalências variam entre 0,9% a 22,7%. Esses trabalhos convergem ao afirmarem que o transtorno mais recorrente seja o TAG, seguido pelo transtorno de pânico, com menores prevalências para os demais.

Um estudo conduzido por Brockington; Macdonald; Wainscott (2006) com 129 mães, identificou que os transtornos de ansiedade foram mais frequentes que os transtornos depressivos durante a gravidez e foram igualmente frequentes depois do parto. No pré-parto, o medo mais relatado pelas pacientes foi o “medo de anormalidade fetal”

(43%), seguido por “medo de morte fetal” (40%), “medo de inadequação como mãe” (32%), “tocofobia” (medo da maternidade, 28%), “medo de serem pouco amparadas” (21%), entre outros relatos. Os autores encontram que o “medo de morte fetal”, por exemplo, estava associado às mulheres com histórico de perdas reprodutivas ou infertilidade. Por sua vez, no pós-parto, a categoria que teve maior foco foi “ansiedade mórbida sobre a saúde e segurança da criança” (32%), seguido por “morte no berço” (29%), “medo de críticas” (19%), “medo de falta de apoio” (16%), entre outros temas. De acordo com os autores, o “medo de morte no berço” estava associado com exaustiva vigilância noturna, com privação de sono severa e prolongada, assim como o “medo de críticas” foi relatado por mães que já passaram por situações com os serviços sociais e uma mãe que teve o filho levado pelo pai.

Parece que não há acordo quanto ao surgimento e estabelecimento dos transtornos de ansiedade em mulheres grávidas. Enquanto os dados relatam o primeiro trimestre como um dos mais ocorrentes (Bhat et al., 2015; Güler et al., 2015; Yonkers et al., 2017), outro estudo relatou maior prevalência no primeiro e terceiro trimestres (Teixeira et al., 2009). A literatura também ressalta que o TAG assim como o transtorno de pânico são comuns no período do pós-parto (Wenzel et al., 2001, 2005). No entanto, é mais provável que os transtornos de ansiedade afetem mais as mulheres grávidas do que as mulheres pós-parto (Fawcett et al., 2019).

No Brasil, um estudo realizado por Silva et al. (2017) com 209 mulheres grávidas de Minas Gerais mostrou que 26,8% foram afetadas pela ansiedade, de modo que as maiores taxas foram no terceiro trimestre (42,9%). O estudo ainda mostrou que a maior ocorrência de ansiedade estava presente em mulheres que passaram por alguma situação de aborto ou risco de bebê prematuro, que tiveram complicações em gravidez prévias, que fumavam altas quantidades de cigarros e que desejavam aquela gravidez. Na cidade de São Paulo, a partir de uma amostra de 831 gestantes, entre a 20^a e 30^a semana de gestação, identificou-se que a prevalência de algum transtorno mental foi de 20,2%. Dentre os sintomas psiquiátricos mais comuns relatados pelas pacientes foram “preocupação” (34,3%), irritabilidade (33,3%), ansiedade (33,3%). Sintomas como “pensamentos depressivos” foram observados em 9,6%, “fobias” em 7,8%, e similarmente o “pânico”, com 7,8%. Os autores ainda observaram uma alta ocorrência de sintomas depressivos e de ansiedade concomitantemente, assim como uma frequência maior no uso de álcool e tabaco entre aquelas que possuíam algum transtorno. Fatores

como “idade na gravidez atual e no primeiro parto”, “complicações obstétricas”, “morar em uma casa lotada”, “histórico de tratamento psiquiátrico prévio”, “histórico de aborto”, e o “estado ocupacional, estavam todos associados ao aumento da prevalência dos transtornos mentais (Faisal-Cury et al., 2009).

A partir dos dados que foram aqui levantados, é possível observar que as taxas de prevalência da ansiedade durante a gestação, ou no pós-parto, variam entre os estudos, dependendo do número de mulheres amostradas, regiões avaliadas, diferentes ferramentas de avaliação e o período em que esses dados foram coletados, o que dificulta o entendimento sobre sua prevalência e ocorrência, a fim de planejar esforços de saúde pública. No entanto, é importante ressaltar que todos eles confirmam que os transtornos de ansiedade são comuns nestas etapas, sendo que os de maior incidência são os TAG e transtorno de pânico. Adicionalmente, fatores como perdas passadas, frustrações e culpa, histórico obstétrico negativo, falta de suporte familiar, abuso de substâncias e baixos níveis socioeconômicos mostram-se fortemente relacionados com os transtornos de ansiedade neste grupo.

1.2. Tratamentos da ansiedade e o uso de benzodiazepínicos na gestação

A ansiedade é um dos problemas psiquiátricos mais difíceis de lidar e que causa muitas divergências para o psiquiatra em exercício, uma vez que o paciente ansioso requer o alívio imediato do seu quadro clínico, o que estreita o tempo de diagnóstico realizado pelo médico (Roy-Byrne, 2015). Bandelow; Michaelis; Wedekind (2017) ainda alertam para a agilidade em casos onde os pacientes sofrem com transtornos secundários, como sofrimento, depressão, pensamentos suicidas e abuso de substâncias (álcool e droga). Como consequência, isso resulta na prescrição de um agente ansiolítico de ação rápida, em geral, um benzodiazepínico (BZ), embora os inibidores seletivos da recaptção de serotonina (ISRS), antes resguardados ao tratamento dos transtornos depressivos, também têm sido utilizados atualmente. Thibaut (2017) ressalta que tanto a farmacoterapia e a psicoterapia são importantes e efetivas para o tratamento dos transtornos de ansiedade.

Dentre os tratamentos psicoterápicos, a terapia comportamental-cognitiva é amplamente utilizada. Contudo, o tratamento com medicamentos ainda é amplamente empregado devido à sua facilidade, podendo sendo utilizado na atenção primária, assim como no rápido alívio dos sintomas (El-Guebaly; Sareen; Stein, 2010; Roy-Byrne, 2015). Uma das classes de medicamentos utilizadas para o tratamento dos transtornos de ansiedade são os benzodiazepínicos (Bateson, 2004). O Diazepam (DZP) foi um dos primeiros benzodiazepínicos a surgir no mercado, em 1963, com um potente efeito sedativo e ansiolítico, mostrando-se promissor para o tratamento de epilepsia, espasmos musculares e até abstinência de álcool (Calcaterra; Barrow, 2014).

Os BZs atuam como moduladores alostéricos (não possuem uma resposta sozinhos, mas aumentam a resposta de um ligante endógeno) nos receptores ionotrópicos do ácido gama-aminobutírico (GABA) do tipo A ($GABA_A$), facilitando a ligação do neurotransmissor GABA nestes locais, os quais, por sua vez promovem a abertura do canal de cloreto (Cl^-). Nesse sentido, o Diazepam promove um influxo de cloreto para a célula, através da ligação do GABA nos seus sítios de ação, causando uma hiperpolarização das membranas neuronais pós-sinápticas, resultando em uma depressão do Sistema Nervoso Central (SNC). Ainda, o GABA é o principal neurotransmissor inibitório do SNC. Devido à sua natureza lipossolúvel, o Diazepam penetra facilmente o SNC (Bateson, 2004; Calcaterra; Barrow, 2014; Herlenius; Lagercrantz, 2001; Shyken et al., 2019).

Ainda que o Diazepam, assim como outros BZs mostraram-se promissores quando foram lançados no mercado (Calcaterra; Barrow, 2014) e ainda são altamente prescritos (El-Guebaly; Sareen; Stein, 2010; Starcevic, 2014), Starcevic (2014) relata que as concepções acerca do uso desses medicamentos têm mudado ao longo do tempo. Atualmente, os ISRS também têm sido utilizados para o tratamento dos transtornos de ansiedade, e em alguns casos são usados em associação com os BZs. O autor relata que enquanto há aqueles que apontam para os efeitos deletérios dos BZs, há também aqueles que advogam favoravelmente pelos efeitos benéficos deles. A alta popularidade desses medicamentos se dá pela sua eficácia consistente para aliviar os sintomas severos de ansiedade, rápida ação, assim como a baixa eficácia dos antidepressivos de nova geração para ansiedade, uma vez que esses últimos podem causar efeitos ansiogênicos em alguns pacientes (Starcevic, 2014).

Nos Estados Unidos, dados mostraram que a utilização de BZs aumentou de 2% (1999 – 2000) a 4,2% (2013 – 2014). Essa tendência foi acompanhada também por um aumento na prescrição de BZs a médio e longo prazo (Kaufmann et al., 2018). Um estudo que avaliou as tendências de prescrição de medicamentos na Inglaterra para os transtornos mentais nos anos de 1998 a 2010, também apontou que houve um aumento significativo na prescrição de Diazepam (Ilyas; Moncrieff, 2012). Por sua vez, um estudo realizado de forma similar com a população Canadense também reportou aumento no uso de BZs, sendo as mulheres as maiores usuárias (Neutel, 2005). Estudos europeus também apontam para altas taxas de utilização dos BZs a longo prazo (Starcevic, 2014).

Em relação ao Brasil, um estudo conduzido por Alcantara; Coutinho; Faerstein (2020), na cidade do Rio de Janeiro, de 1999 a 2012, mostrou que o uso dos BZs aumentou de 4,7% para 6,8%, com maior taxa de prevalência para as mulheres entre 45 a 54 anos. Um estudo epidemiológico que avaliou a utilização de psicotrópicos na cidade de São Paulo, mostrou que os medicamentos mais comumente utilizados foram os antidepressivos (3,15%) e os ansiolíticos (2,67%), e o maior consumo se deu entre as mulheres, em relação aos homens (Quintana et al., 2015).

De modo similar, as taxas de utilização de psicotrópicos, especialmente BZs durante o período gestacional e o pós parto são relativamente altas, apesar do desconhecimento dos resultados que o seu uso pode trazer para a gestante e a criança. O conjunto de dados levantados por Bais et al. (2020) a partir de uma meta-análise, mostrou que há um aumento do uso dos BZs entre a concepção e a gravidez, mas que há uma

redução do seu uso no pós-parto. Um levantamento realizado por Hanley; Mintzes (2014) com mulheres norte-americanas, mostrou que das 343.299 mulheres, 10,3% receberam um ou mais medicamentos psicotrópicos durante a gravidez, sendo que os mais utilizados foram os ISRS (5,1%) e os BZs (3,9%). Os transtornos psiquiátricos mais comumente associados às usuárias foi depressão, seguido por transtornos de ansiedade. Também foi observado que 1,6% das mulheres usaram mais de uma categoria de psicotrópico na gravidez. Ainda, um estudo norueguês realizado por Sundbakk et al. (2019) que de 36.401 gestações avaliadas, 140 mães fizeram uso de algum BZ durante o período gestacional, para o tratamento de transtornos mentais e problemas relacionados ao sono, sendo que o Oxazepam e o Diazepam foram os mais utilizados. O trabalho de Yonkers et al. (2017), previamente citado, apontou que das 2.654 mulheres grávidas, 67 faziam uso de algum BZ. Freeman et al. (2018), baseados em uma amostra de 794 mães, observaram que 144 faziam uso de BZs, sendo que o Clonazepam foi o mais utilizado (48,6%) e 11 mães utilizam mais de um tipo de BZ.

Dado que o Diazepam possui uma natureza lipofílica, o seu uso durante a gestação é preocupante uma vez que ele atravessa facilmente a barreira placentária (Cree; Meyer; Hailey, 1973; Jauniaux; Gulbis, 2000; Sheehy; Zhao; Bérard, 2019; Shyken et al., 2019). Iqbal; Sobhan; Ryals (2002) alertam que os BZs possuem uma maior afinidade às proteínas plasmáticas fetais em comparação com as maternas, fazendo com que os níveis séricos sejam maiores no feto. Adicionalmente, Carvalho et al. (2009) sugerem que os níveis séricos de Diazepam do recém-nascido são três vezes maiores do que na circulação materna. Utilizando placentas de mães saudáveis sem exposição anterior a qualquer medicamento, Myllynen; Vähäkangas (2002) mostraram que o Diazepam foi detectado na circulação fetal com 15 minutos de perfusão com o medicamento, indicando uma rápida transferência deste através da placenta.

Embora antigo, um estudo de Cree; Meyer; Hailey (1973) mostrou que altas doses de Diazepam administradas à mães 15 horas antes do trabalho de parto, foram acompanhadas por baixos escores de Apgar ao nascimento, crises de apneia, hipotonia, relutância em se alimentar e uma resposta metabólica ao frio prejudicada. Alguns dados mais recentes também parecem indicar impactos negativos na utilização de BZs durante a gestação. Sheehy; Zhao; Bérard (2019), em um estudo avaliando 442.066 gestações, observaram que a exposição aos BZs no início da gestação estava associada a um aumento no risco de aborto espontâneo, tanto para aquelas mães expostas a curto ou longo prazo.

O estudo de Ogawa; Takeshima; Furukawa (2018), que avaliou 42.058 nascimentos entre os anos de 2005 e 2014, mostrou que 273 mães foram prescritas com BZs e que seu uso estava associado a um maior risco de nascimento prematuro, mas não a um baixo peso corporal ao nascimento. Crianças expostas aos BZs também foram mais propensas a terem maiores pontuações em testes para o transtorno opositivo desafiador e comportamento agressivo (Radojčić et al., 2017). Ainda em relação aos transtornos comportamentais observados em crianças expostas aos BZs em idade gestacional, o estudo norueguês de Sundbakk et al. (2019) citado anteriormente mostrou que o uso de BZs estava associado ao aumento do risco de comportamentos internalizantes (emocionalmente reativo; ansioso/deprimido; queixas somáticas) e externalizantes (problemas de atenção; comportamento agressivo) nas crianças aos 5 anos de idade.

Dentre seus dados, Freeman et al. (2018) relatam que o fato que chama atenção é que bebês expostos aos BZs durante a gravidez tiveram um maior risco de internações em unidades de tratamento intensivo neonatal e cabeça com pequena circunferência. Os dados de Yonkers et al. (2017) também corroboram com esses achados, ao observarem que o uso de materno de BZs estava associado com a ocorrência de parto cesariano, com encurtamento de aproximadamente 4 dias do período gestacional total, baixo peso ao nascimento e uso de suporte ventilatório para o neonato. O estudo de Tinker et al. (2019) também aponta para uma alta associação entre a utilização de BZs durante o período gestacional e a ocorrência de más-formações fetais. Os autores encontraram que, embora a utilização desses medicamentos foi rara durante a gravidez entre as mulheres avaliadas, foi possível observar que o seu uso estava associado à Síndrome de Dandy-Walker, anoftalmia e microfthalmia, estenose e atresia esofágica e estenose da válvula pulmonar.

Embora alguns estudos apontem para o risco de más-formações fetais e complicações para o feto após o nascimento, há aqueles que não encontram relações entre a utilização de BZs e seus efeitos deletérios ao recém-nascido. Em uma recente meta-análise de Grigoriadis et al. (2019), os autores apontam que o uso pré-natal de BZs não estava associado ao aumento do risco de más-formações congênitas, apenas quando estes eram utilizados em associação com antidepressivos. Lupattelli et al. (2019) ao avaliarem crianças em idade escolar, observaram que embora há crianças que apresentaram déficits motores e de comunicação, o uso de BZs na gestação não estava relacionado ao aumento no risco de déficits de atenção e transtorno de hiperatividade.

Assim, através dos dados apresentados aqui, observa-se que os transtornos de ansiedade ocorrem durante o período gestacional. Uma forma rápida para o alívio dos sintomas urgentes é a utilização da terapia medicamentosa. No entanto, o uso de medicamentos BZs durante a gravidez parece estar associado às complicações fetais deletérias, que vão desde a presença de malformações congênitas, até problemas comportamentais em crianças em idade escolar. Nesse sentido, o tratamento dessas psicopatologias baseado em uso de medicamento deve ser cuidadosamente avaliado pela equipe médica que acompanha aquela gestante, a fim de estabelecer a melhor terapia, ou mesmo recomendar pela suspensão de tal tratamento em decorrência dos resultados deletérios que este pode causar.

1.3. Desenvolvimento da rede respiratória

A respiração é um comportamento importante cuja principal função é promover as trocas gasosas. Nos mamíferos, as trocas gasosas durante a vida uterina são realizadas via placenta, assim como a mãe fornece nutrientes e oxigênio através do cordão umbilical até o nascimento. No entanto, os componentes neurais e musculares do sistema respiratório devem estar funcionais ao nascimento, permitindo a geração de um ritmo que garanta uma ventilação pulmonar adequada, integrando a deglutição e outros comportamentos relacionados à respiração (Anju et al., 2013; Greer; Funk; Ballanyi, 2006; Greer; Smith; Feldman, 1992; Van der Heijden; Zoghbi, 2020).

Os movimentos respiratórios em embriões humanos podem ser detectados aproximadamente na 10^a – 12^a semana de gestação e se tornam mais fortes e regulares entre a 28^a e 36^a semana, o que prepara o feto para gerar uma ventilação adequada após o nascimento (Greer, 2012). Estudos utilizando registros eletrofisiológicos *in vitro*, em preparações tronco encefálico-medula espinhal de fetos de ratos, demonstraram que este evento se inicia já na fase embrionária, especificamente no 17^o dia embrionário (E17) (Di Pasquale et al., 1992; Greer; Smith; Feldman, 1992). Registros ultrassônicos de movimentos respiratórios intermitentes de fetos em ratas grávidas anestesiadas e registros eletrofisiológicos de neurônios do Complexo Pré-Bötzinger (pré-BötC) em fatias do bulbo de fetos de ratos corroboram com esses dados (Jansen; Chernick, 1991; Kobayashi; Lemke; Greer, 2001; Pagliardini; Ren; Greer, 2003).

Uma rede neural no tronco cerebral gera o ritmo respiratório e modula o padrão motor de cada respiração para atender às demandas metabólicas, biomecânicas e comportamentais. No sentido rostro-caudal, os principais núcleos são o Complexo Bötzinger (BötC), pré-BötC, grupo respiratório ventral rostral (rVRG) e caudal (cVRG), os quais formam a coluna respiratória ventral. Outros núcleos como o complexo pós-inspiratório (PiCo) e o parafacial (pF) se encontram adjacentes à coluna respiratória ventral e participam do processo respiratório, sendo importantes para geração da fase de pós-inspiração e expiração ativa (Anderson et al., 2016; Del Negro; Funk; Feldman, 2018; Leirão et al., 2018; Wang et al., 2014). Estudos anteriores documentaram o surgimento embrionário do núcleo gerador de ritmo respiratório, o pré-BötC (Bouvier et al., 2010; Pagliardini; Ren; Greer, 2003; Smith et al., 1991, 2007) ao redor do dia embrionário 17, e identificaram a região pF como um segundo gerador de ritmo intercalado com o pré-BötC (Thoby-Brisson et al., 2009), a qual também é considerada uma região importante

na quimiorrecepção ao CO₂ (Goridis; Brunet, 2010). Esses dois osciladores emergem independentemente e são acoplados. Assim, a sincronicidade entre os geradores do ritmo respiratório é estabelecida no início do momento respiração fetal. Curiosamente, a ontogenia anatômica do pré-BötC coincide com a primeira atividade respiratória semelhante à respiração fetal, indicando que essa área já é funcional no E15 em camundongos e no E17 em ratos (Greer, 2012; Suzue, 1994; Thoby-Brisson et al., 2005).

O circuito respiratório no tronco encefálico se desenvolve a partir do rombencéfalo, o qual é dividido em rombômeros. O desenvolvimento, maturação e a compartimentalização dessa região estão intrinsecamente relacionadas com a presença de genes e fatores de transcrição. Camundongos mutantes para o *Krox20* apresentam alterações no ritmo respiratório, as quais parecem estar relacionadas com o desenvolvimento anormal da região parafacial. Camundongos *Mafb*-null e *Hoxb1*-null não respiram (Van der Heijden; Zoghbi, 2020). Por sua vez, a deleção do fator de transcrição “Developing brain homeobox 1” (*Dbx1*), um regulador transcricional importante para o desenvolvimento de interneurônios V0, leva à uma completa ausência de ritmo respiratório (Gray et al., 2010; Wu et al., 2017). Adicionalmente, camundongos com deleção homozigota do “Paired like homeobox 2B” (*Phox2b*) não se desenvolvem, assim como aqueles heterozigotos *Phox2b*-null possuem um ritmo respiratório e quimiossensibilidade alterados (Dauger et al., 2003; Pattyn et al., 1999).

Dessa forma, a desenvolvimento incorreto dessa rede leva à ocorrência de problemas respiratórios, tais como a Síndrome de Prader-Willi (Cassidy et al., 2012; Nixon; Brouillette, 2002), Síndrome da hipoventilação congênita central (Amiel et al., 2003), apneias do prematuro (Abu-Shaweesh; Martin, 2008; Zhao; Gonzalez; Mu, 2011) e a Síndrome da Morte Súbita Infantil (SIDS) (Goldstein Et Al., 2016; Moon; Horne; Hauck, 2007), sendo as duas últimas as mais prevalentes, e em especial a SIDS sendo a terceira principal causa de morte de crianças.

1.4. A maturação da neurotransmissão inibitória

A rede respiratória no tronco encefálico consiste em circuitos inibitórios e excitatórios conectados. Embora a neurotransmissão glutamatérgica, a principal excitatória do Sistema Nervoso Central (SNC), esteja envolvida na geração do ritmo respiratório (Cui et al., 2016; Del Negro; Funk; Feldman, 2018; Feldman; Kam, 2015; Janczewski; Feldman, 2006; Smith et al., 2007), acredita-se que a neurotransmissão inibitória rápida, mediada por íons cloreto, possa modular esse mecanismo, participando do padrão respiratório (Ghali; Beshay, 2019; Marchenko et al., 2016). A presença de neurônios GABAérgicos e glicinérgicos no tronco encefálico sugere a participação dessas células nesses processos (Ezure; Tanaka; Kondo, 2003; Kuwana et al., 2006; Morgado-Valle; Baca; Feldman, 2010; Schreihöfer; Stornetta; Guyenet, 1999). Adicionalmente, camundongos desprovidos de GAD67, enzima que catalisa a síntese de GABA, apresentam um ritmo respiratório irregular e uma baixa atividade de neurônios inspiratórios no P0 (Kuwana et al., 2003, 2006). Dados coletados por Marchenko et al. (2016) mostraram a ocorrência de distúrbios na atividade de nervos que se projetam para músculos respiratórios após a administração de gabazina e estriçnina no BötC e pré-BötC. O ritmo respiratório foi mantido, devido à presença da atividade do nervo frênico após a administração de ambos os fármacos em combinação, tanto nos experimentos *in vitro* quanto *in situ* realizados pelos autores, no entanto houve uma diminuição da amplitude de disparo deste nervo.

Assim como o circuito respiratório do tronco encefálico passa por um processo de amadurecimento, a ação do neurotransmissor GABA também sofre alterações em decorrência das mudanças nas concentrações iônicas dentro e fora dos neurônios. O GABA pode ligar-se a dois tipos de receptores, sendo GABA_A e GABA_B. O receptor GABA_A é um receptor ionotrópico heteropentamérico, formado por subunidades α , β e γ , localizados nos terminais pós-sinápticos. O receptor GABA_B é um receptor metabotrópico heterodimérico associado à proteína G, possuindo assim ativação lenta mediada por segundo mensageiro, estando localizado nos terminais pré e pós-sinápticos (Ghali, 2019; Ghali; Beshay, 2019; Kilb, 2012).

Sabe-se que no final da vida uterina, assim como início da vida pós natal, o GABA possui um papel excitatório. Até o momento, sabe-se que essa mudança na sua função está relacionada às alterações que acontecem junto ao receptor GABA_A, de modo que o GABA_B parece ser inibitório durante toda a vida do indivíduo. É descrito que

durante estes estágios iniciais do desenvolvimento, a concentração de Cl^- é maior no interior dos neurônios, mantendo o meio interno eletricamente negativo e o meio externo eletricamente positivo. Nesta situação, ao se ligar aos receptores ionotrópicos, o GABA abre os canais Cl^- , promovendo assim uma despolarização (isto é, excitação), uma vez que há carga negativa saindo da célula favorecida pelo gradiente eletroquímico. Porém, durante a maturação do SNC, a concentração de Cl^- no interior das células diminui, resultando em um efeito oposto, ou seja, neste caso os íons Cl^- entram na célula a qual se torna hiperpolarizada. Assim, de forma gradual, a ação do GABA muda de excitatória para inibitória. Essas alterações parecem estar envolvidas com o co-transportador de sódio-cloreto-potássio (NKCC1) e o co-transportador de cloreto-potássio (KCC2) existentes no receptor GABA_A . O NKCC1 possui uma alta expressão em diferentes regiões durante o final da vida fetal e o início da vida neonatal, mas há uma queda da sua expressão por volta do dia de vida pós-natal (P) 12. Esse co-transportador é responsável por promover o influxo de Cl^- para a célula, tornando-a eletricamente negativa. Dessa forma, quando o GABA se liga ao receptor, o Cl^- sai, esta despolariza-se, promovendo o efeito excitatório descrito. Por sua vez, o KCC2 possui uma baixa expressão durante o final da vida fetal e início da vida neonatal, havendo um aumento de sua expressão após P12. Ele promove a saída de íons cloreto da célula, aumentando a concentração de Cl^- fora da célula. Assim, quando o GABA se liga ao GABA_A , o gradiente eletroquímico favorece a entrada de Cl^- , causando uma hiperpolarização. É importante ressaltar que a mudança na expressão de ambos os co-transportadores é gradual e ocorre em diferentes áreas respiratórias, tais como o pré-BötC e o pF, e o seu resultado é a mudança no potencial de Nernst para o cloreto (Ghali, 2019; Herlenius; Lagercrantz, 2004; Liu; Wong-Riley, 2012; Miles, 1999; Rivera et al., 1999; Rivera; Voipio; Kaila, 2005).

Assim, ao longo do desenvolvimento, e já estabilizado na vida adulta, a atuação do GABA no receptor GABA_A , juntamente com a glicina através da sua ligação nos receptores glicinérgicos, compõem o principal mecanismo de neurotransmissão inibitória rápida mediada pelo Cl^- . Por sua vez, a ligação do GABA nos receptores GABA_B forma um mecanismo de ativação lenta mediada por segundo mensageiro, promovendo mudanças na condutância do K^+ , causando seu extravasamento, assim como do Ca^{2+} , inibindo correntes dependentes do mesmo (Bateson, 2004; Ghali, 2019; Ghali; Beshay, 2019; Nutt; Malizia, 2001).

Alterações no sistema GABAérgico ao longo do desenvolvimento também ocorrem na expressão das subunidades dos seus receptores, entre elas a $\alpha 1$ e $\alpha 3$. Há um aumento na expressão da subunidade GABAérgica $\alpha 1$ por volta do P12, que persiste até a idade adulta, em regiões como o núcleo do trato solitário, o núcleo cuneado e o pré-BötC, além da ventilação desses animais nesta idade ser menor em relação à idade precedente. Essa subunidade também parece estar associada à função inibitória desempenhada pelo GABA. Adicionalmente, durante o desenvolvimento pós-natal, há um desequilíbrio acentuado e transitório entre aumento da inibição e redução da excitação em áreas respiratórias. Essas alterações citadas ocorrem principalmente em torno de P12, onde há uma repentina redução na expressão de neurotransmissores excitatórios, como glutamato e seus receptores, e um aumento na neurotransmissão inibitória via GABA e glicina, bem como em seus receptores (Liu et al., 2009; Liu; Wong-Riley, 2005, 2006, 2012; Wong-Riley; Liu, 2008).

Assim, compreende-se que a respiração é gerada e controlada por uma rede localizada no tronco encefálico. O correto desenvolvimento destes núcleos é importante para garantir uma adequada ventilação ao indivíduo na vida pós-natal. A maturação da neurotransmissão GABAérgica durante a vida intrauterina e pós-natal está associada ao desenvolvimento da rede respiratória e alterações nessa neurotransmissão ainda durante a vida gestacional pode levar à problemas respiratórios a longo prazo. Isso acontece pois a função sináptica inibitória tem sido associada ao desenvolvimento e regulação do ritmo respiratório (Feldman; Kam, 2015; Ghali; Beshay, 2019).

1.5. O sistema GABAérgico e os núcleos catecolaminérgicos e serotoninérgicos

O sistema GABAérgico também atua em áreas pontinas e bulbares que estão envolvidas no controle respiratório, como as regiões catecolaminérgicas e os núcleos da rafe (Corcoran et al., 2009; Gargaglioni; Hartzler; Putnam, 2010; Nattie; Li, 2012). De fato, tanto a noradrenalina quanto a serotonina estão envolvidas no controle respiratório (Di Pasquale et al., 1992; Errchidi; Monteau; Hilaire, 1991).

Os neurônios catecolaminérgicos encontram-se amplamente distribuídos pelo SNC, em grupos celulares, os quais usam como neurotransmissores a noradrenalina, adrenalina e dopamina. A principal enzima envolvida na biossíntese dessas moléculas é a Tirosina-hidroxilase. De forma geral, os neurônios que utilizam a noradrenalina são classificados em “A” e aqueles que utilizam a adrenalina são classificados em “C”. Assim, no tronco encefálico foram identificados diversos grupamentos celulares noradenérgico (A1 – A7) e grupamentos adrenérgicos (C1 – C3), havendo uma sobreposição entre os dois tipos celulares dentro de alguns destes grupos. Dessa forma, as principais regiões catecolaminérgicas no tronco encefálico são: A1/C1, A2/C2, C3, A5, A6 e A7. Os neurônios da A1/C1 e A5, por exemplo, fazem parte do bulbo ventro-lateral caudal (CVLM) e do bulbo ventrolateral rostral (RVLM). Por sua vez, os neurônios da A2, por exemplo, estão localizados no território do núcleo do trato solitário (NTS), assim como os neurônios da A6 compõe o núcleo identificado como *Locus coeruleus*. De forma geral, os neurônios catecolaminérgicos mandam projeções ascendentes e descendentes para todo o SNC, assim como recebem projeções e possuem receptores GABAérgicos, participando do controle de diversas funções tais como nocicepção, estresse, além de modularem o sistema cardiorrespiratório (Kvetnansky; Sabban; Palkovits, 2009).

O sistema catecolaminérgico está envolvido com o desenvolvimento e a maturação do SNC, principalmente da rede respiratória, uma vez que animais mutantes para fatores de transcrição como *Rnx*, *Phox2a*, *Ret*, envolvidos com a produção de noradrenalina, não sobrevivem e apresentam problemas respiratórios (Hilaire, 2006). Adicionalmente, é reconhecido que a noradrenalina possa exercer um efeito sobre a respiração, em específico sobre o ritmo respiratório de ratos. Preparações bulbares de ratos de 0 a 4 dias de vida, contendo o gerador do ritmo respiratório, apontam que a aplicação exógena de noradrenalina reduz a frequência de disparo do nervo frênico. Os autores ainda mostraram que o efeito inibitório da adrenalina no ritmo respiratório foi parcialmente bloqueado pela

bicuculina, sugerindo que o GABA possa estar envolvido nesse processo (Arata; Onimaru; Homma, 1998).

Trabalhos anteriores já mostraram que a região A1/C1 está envolvida com o controle respiratório, uma vez que o bloqueio dos seus receptores α -2 diminui a atividade rítmica do grupo respiratório ventral. Também é sugerido que os neurônios A2/C2 possam participar do controle respiratório, uma vez que essa região integra inúmeras entradas periféricas de natureza respiratória vinda de aferentes como os corpos carotídeos e pulmão. A região A5 parece deprimir o ritmo respiratório por uma atividade inibitória da noradrenalina sobre os receptores α -2, uma vez que o bloqueio desses receptores nessa região aumenta a frequência de disparo do nervo frênico. Na contramão, é sugerido que a região A6 parece exercer um efeito facilitador excitatório sobre a atividade do gerador do ritmo respiratório por atuação da noradrenalina nos receptores α -1, uma vez que o bloqueio desses receptores reduz a frequência de disparo do nervo frênico. Ambas as regiões são necessárias para o desenvolvimento e maturação da rede respiratória, assim como para o desenvolvimento do ritmo respiratório normal, uma vez que animais com deleções nos genes envolvidos na formação das regiões A5 e A6 apresentam irregularidades respiratórias, assim como sobrevivem por cerca de 48 horas (Hilaire et al., 2004; Viemari et al., 2004, 2005; Zanella et al., 2006).

Recentemente, nosso laboratório mostrou que os neurônios noradrenérgicos do tronco encefálico exercem uma inibição tônica na ventilação basal de ratos neonatos P7–8 e uma importante modulação inibitória da resposta ventilatória ao CO₂ e à hipóxia em ambos os sexos nos animais P7–8 e P14–15 (Patrone et al., 2018, 2020). Adicionalmente, um estudo de Li; Nattie (2006) demonstrou que lesões dos neurônios catecolaminérgicos do tronco encefálico em ratos adultos resultaram em redução frequência respiratória e da resposta ventilatória ao CO₂, seja em estado de sono ou vigília. Em conjunto, esses dados mostram que os neurônios catecolaminérgicos participam da hiperventilação ao CO₂ e O₂.

Em especial sobre o grupamento A6, que contém o *Locus coeruleus*, já foi demonstrado que a lesão de 80% dos seus neurônios noradrenérgicos (NOR) promoveu uma redução de 64% na resposta respiratória ao CO₂ (Biancardi et al., 2008), contudo a resposta à hipóxia não foi afetada (Biancardi et al., 2010). Os neurônios noradrenérgicos localizados no LC enviam projeções para diferentes regiões do encéfalo, controlando os níveis de excitação e desempenho cognitivo, assim como afetando os estados de atenção

e induzindo ansiedade (Breton-Provencher; Sur, 2019; Mccall et al., 2015). Adicionalmente, um estudo recente demonstrou que os neurônios do pré-BötC se projetam diretamente para o LC, e através deste núcleo para várias áreas do encéfalo (Yackle et al., 2017). De acordo com os autores, este circuito ascendente permite que os neurônios geradores do ritmo respiratório se comuniquem diretamente com e controlem estruturas encefálicas rostrais associadas com o comportamento de fuga e o estado de vigília como o LC. Dessa forma, é sugerido que a ativação dos neurônios catecolaminérgicos esteja envolvida com os transtornos de ansiedade, principalmente pela alteração na atividade dos neurônios do LC (Redmond; Huang, 1979; Shekhar et al., 2002).

O sistema GABAérgico parece estar envolvido no controle do sistema catecolaminérgico, principalmente por controlar a liberação de noradrenalina destes núcleos. Trabalhos recentes mostram que há uma população de neurônios GABAérgicos que estão colocalizados ou se encontram posicionados dorso-medialmente aos neurônios noradrenérgicos do LC. Adicionalmente, o LC recebe *inputs* GABAérgico de outras regiões como o núcleo amigdalár e hipotálamo. A ativação GABAérgica promove uma diminuição da taxa de disparo dos neurônios noradrenérgicos do LC, assim como produzem potenciais pós-sinápticos inibitórios. Esses efeitos são revertidos com a aplicação de bicuculina, um antagonista GABAérgico (Aston-Jones; Zhu; Card, 2004; Breton-Provencher; Sur, 2019; Dimitrov; Yanagawa; Usdin, 2013; Jin et al., 2013, 2016). Ainda sobre o grupamento A6, Fuxe et al. (1975) sugeriram que a redução da noradrenalina após a administração de benzodiazepínicos está envolvida com o aumento da atividade dos receptores GABA nos neurônios do LC. Segundo os autores, a função GABAérgica nesta região pode ser responsável pela sedação após o uso dos benzodiazepínicos. De fato, o Diazepam diminui a taxa de disparo dos neurônios do LC e o metabolismo de noradrenalina em doses dentro do intervalo efetivo para ações ansiolíticas clínicas em seres humanos (Grant; Huang; Redmond, 1980; Sanghera; German, 1983), assim como a aplicação de benzodiazepínicos nesta região diminui a sua atividade (Laurent et al., 1983). Dessa forma, a população de neurônios GABAérgicos no LC, assim como as projeções vindas de outras áreas para esta região, constituem uma fonte de inibição para os seus neurônios noradrenérgicos, controlando assim os estados de excitação do encéfalo.

Da mesma forma, também foi mostrado que os neurônios catecolaminérgicos presentes nas regiões A1/C1 e A2/C2, além de possuírem receptores GABAérgicos (Kvetnansky; Sabban; Palkovits, 2009), recebem inervação GABAérgica de áreas como a amígdala central (Jia; Rao; Shi, 1997). A neurotransmissão inibitória GABAérgica sobre os neurônios catecolaminérgicos do NTS diminui a liberação de noradrenalina em encefálicas superiores (Tanaka et al., 2002), assim como diminui a liberação de dopamina no próprio NTS (Misu; Yue; Goshima, 1995).

Além das catecolaminas, o GABA também parece estar envolvido com o controle da serotonina.

A serotonina é uma monoamina amplamente distribuída no encéfalo, envolvida no controle de funções como: ritmos circadianos, alimentação, estado emocional, controle do sono e controle respiratório. Os neurônios serotoninérgicos se encontram localizados, principalmente, na rafe enviando projeções para diferentes áreas do encéfalo e da medula espinhal (de Carvalho et al., 2014; Steinbusch; Nieuwenhuys, 1981), e estão sinapticamente conectados com os geradores do ritmo respiratório (Hodges et al., 2009; Zanella et al., 2008), participando do controle respiratório ao modularem a excitabilidade dos motoneurônios respiratórios (Hilaire; Duron, 1999).

De fato, já foi demonstrado que os neurônios serotoninérgicos da rafe *obscurus* se projetam para o pré-BötC e para os motoneurônios do hipoglosso, de modo que o aumento da atividade desses neurônios promove um aumento do *output* motor inspiratório tanto por ativação dos neurônios do pré-BötC quanto dos neurônios motores (Ptak et al., 2009). Além disso, já foi visto que os neurônios serotoninérgicos estão envolvidos na regulação da atividade colinérgica nas vias aéreas, assim como a sua estimulação leva a um aumento da atividade do nervo frênico, sugerindo que alterações nas vias serotoninérgicas podem levar à disfunção das vias aéreas superiores (Haxhiu et al., 1998).

Adicionalmente, camundongos transgênicos que não possuem neurônios serotoninérgicos (*Lmx1b^{fl/fl}*) apresentam anormalidades respiratórias. Esses animais apresentaram frequentes crises de apneia, assim como uma redução da sua ventilação na vida pós-natal, além de terem sido observadas altas taxas de mortalidades e menores taxas de crescimento. Os autores desse trabalho concluem que a ventilação no período pré-natal é dependente dos neurônios serotoninérgicos e que estes fornecem um drive excitatório para a rede respiratória (Hodges et al., 2009).

Os neurônios serotoninérgicos da rafe bulbar também estão envolvidos com os ajustes respiratórios durante a hipercapnia, pois são intrinsicamente quimiossensíveis ao CO₂/pH, tanto *in vitro* quando *in vivo*. (Corcoran et al., 2009; Hodges; Richerson, 2008; Kinney; Thach, 2009; Nattie et al., 2004; Penatti et al., 2006; Richerson, 2004). Sabe-se que os neurônios serotoninérgicos deste grupamento exercem uma modulação excitatória na resposta ventilatória à hipercapnia (da Silva et al., 2011; Dias et al., 2007), inibitória em relação à hipóxia (Gargaglioni; Coimbra; Branco, 2003; Penatti et al., 2006), assim como parecem estimular a respiração (Teran; Massey; Richerson, 2014). Já foi demonstrado que a destruição dos neurônios serotoninérgicos na rafe promove uma redução da resposta ventilatória à hipercapnia, a qual é dependente dos estados de alerta dos animais (Nattie et al., 2004). É importante ressaltar que cerca de 75% a 90% dos neurônios da rafe são quimiossensíveis ao CO₂, e já foi descrito que há neurônios nesta região que são estimulados pelo CO₂/pH, enquanto há aqueles que são inibidos por esses mesmos estímulos. No entanto, todos aqueles que são estimulados são serotoninérgicos (Richerson, 2004), e mais recentemente, foi descrito que aqueles neurônios que são inibidos são GABAérgicos (Iceman et al., 2014).

De forma interessante, estudo de Millhorn et al. (1988) demonstrou que o GABA está relacionado com a liberação de serotonina (5-hidroxitriptamina, 5-HT) na rafe *magnus* e esta apresenta um grande número de corpos neuronais e terminais GABAérgicos e receptores GABA_A e GABA_B (Bowery; Hudson; Price, 1987). Também foi observado que a administração de muscimol (agonista GABAérgico) na rafe dorsal diminuiu significativamente os níveis de serotonina extracelular. Essa diminuição foi dose-dependente. O contrário foi demonstrado pelos autores ao administrarem bicuculina, observando-se assim um aumento, também dose-dependente, dos níveis de serotonina extracelular (Tao; Ma; Auerbach, 1996). Recentemente também foi demonstrado que a aplicação de muscimol na rafe promove uma queda na resposta ventilatória à hipercapnia (Messier; Li; Nattie, 2002), assim como esse mesmo agonista diminui a taxa de disparo dos neurônios serotoninérgicos (Judge; Young; Gartside, 2006). Adicionalmente, já foi mostrado que os benzodiazepínicos promovem uma redução da atividade da rafe dorsal (Gallager, 1978; Laurent et al., 1983). Esses resultados mostram os efeitos inibitórios exercidos pelo GABA sobre a neurotransmissão serotoninérgica.

Os estudos supracitados apontam para a correlação das catecolaminas e serotonina com o controle respiratório, em especial para a participação destes na

quimiossensibilidade central, dado que disfunções em ambos os sistemas levam à problemas respiratórios na vida pós-natal. Da mesma forma, ambos sistemas são necessários para o desenvolvimento e maturação do SNC, em especial da rede respiratória. Adicionalmente, a neurotransmissão GABAérgica parece modular a atividade dessas regiões, potencialmente modulando a respiração. No entanto, pouco se conhece sobre como intervenções que afetem diretamente com o sistema GABAérgico, tal como o tratamento com benzodiazepínicos, podem influenciar as monoaminas citadas, o desenvolvimento da rede respiratória, e quais suas consequências para a ventilação do recém-nascido na vida pós natal. Desta forma, o presente projeto buscou ampliar os conhecimentos sobre alterações no controle respiratório e no sistema monoaminérgico durante o desenvolvimento, causados pela exposição intrauterina ao Diazepam, uma vez que estas alterações, causados pelas substâncias utilizadas pelas mães durante a gestação, podem estar envolvidas com a ocorrência da Síndrome da Morte Súbita Infantil.

2. OBJETIVOS

Com base nos pressupostos teóricos levantados anteriormente, o presente projeto de mestrado avaliou:

- ✓ A ventilação e o metabolismo durante normóxia/normocapnia de neonatos, em idades P0-1, P12-13, P21-22, que foram expostos ao Diazepam durante a gestação;
- ✓ As respostas ventilatória e metabólica induzidas por hipercapnia e hipóxia de neonatos, em idades P0-1, P12-13, P21-22, que foram expostos ao Diazepam durante a gestação;
- ✓ Alterações no sistema catecolaminérgico na idade P12-13, através de imunofluorescência para Tirosina-hidroxilase (TH);
- ✓ Alterações no sistema serotoninérgico na idade P12-13, através de imunofluorescência para serotonina (5-HT);
- ✓ Alterações comportamentais em neonatos logo após o nascimento;
- ✓ Alterações nas gestações de ratas submetidas ao tratamento com Diazepam.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Esta seção traz, de forma resumida, os materiais e métodos que foram utilizados para o desenvolvimento e análise deste projeto. A descrição completa e detalhada encontra-se no manuscrito, no Capítulo 2.

3.1. Animais, drogas e procedimentos cirúrgicos

Foram utilizadas ratas grávidas e seus filhotes Wistar, dentre eles os que acabaram de nascer até o primeiro dia de vida pós-natal (P0-1), aqueles que completaram 12 a 13 (P12-13) e 21 a 22 (P21-22) dias de vida pós-natal (P). As ratas grávidas foram randomicamente divididas em dois grupos: (i) as que receberam veículo (ii) e as que receberam Diazepam na concentração 1 mg/Kg/dia (Picard et al., 2008; Saito; Brandão, 2016), assim como os seus filhotes (grupo controle, CTRL - os quais as mães receberam veículo; grupo tratado, DPZ - os quais as mães receberam o Diazepam). O medicamento DZP ou o seu veículo foi ministrado às ratas grávidas durante seus 21 dias de gestação utilizando uma bomba osmótica (Alzet Osmotic Pumps, Cupertino, CA, EUA modelo 2ML4), implantada subcutânea no dorso das ratas grávidas após a constatação de espermatozoide via esfregaço vaginal, no dia embrionário (E) 0 (FIGURA 1). A bomba osmótica foi retirada no dia E21.

Os animais tiveram livre acesso à água e ração e os experimentos foram realizados entre as 8:00h e 17:00h, durante a fase clara. A sexagem de cada neonato foi realizada no dia em que nasceram e confirmada no dia de cada experimento. Os experimentos foram conduzidos e aprovados de acordo com o comitê de ética local, sob o número de Protocolo CEUA nº 2164/17.



FIGURA 1: Exemplo do procedimento cirúrgico para implantação da bomba osmótica para administração contínua do Diazepam ou seu veículo. **A:** bomba osmótica em preparação. **B:** realização de uma pequena incisão do dorso do animal e implantação subcutânea da bomba osmótica. **C:** rata grávida saudável após procedimento.

3.2. Determinação da ventilação em P0-1, P12-13 e P21-22

A ventilação pulmonar (\dot{V}_E) dos animais nas idades P0-1 e 12-13 foi determinada utilizando-se o método de pletismografia de pressão (Cummings et al., 2011; Mortola, 1984; Mortola; Frappell, 2013). O sinal de pressão gerado pelos movimentos da caixa torácica dentro da câmara com o corpo do animal foi considerado diretamente proporcional ao volume corrente (V_T). Neste caso, a temperatura da câmara do animal foi controlada utilizando uma incubadora (Premium Ecologica – IP 70A) determinada para a realização dos experimentos a 34°C para P0-1 e 30°C para P12-13.

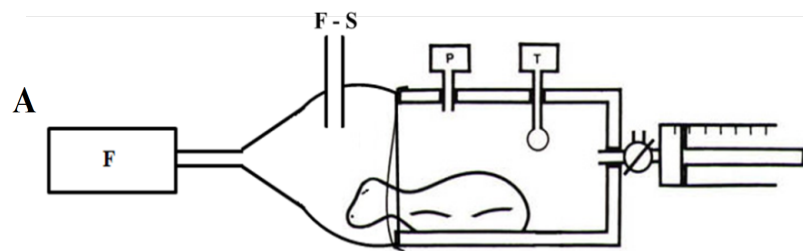


FIGURA 2 - Esquema de um sistema de pletismografia de pressão utilizado para neonatos de mamíferos P0-1 e P12-13. P: transdutor de pressão dos movimentos da caixa torácica; T: sensor de temperatura da câmara; F: fluxo de entrada; F-S: fluxo de saída (adaptado de Mortola; Frappell, 2013).

A ventilação dos animais jovens (P21-22) foi determinada por pletismografia de corpo inteiro em sistema fechado (Bartlett; Tenney, 1970; Drorbaugh; Fenn, 1955). As oscilações da temperatura do ar da câmara causadas pela respiração foram medidas como oscilações de pressão, pelo fato do volume de ar corrente inspirado ser aquecido da temperatura da câmara à temperatura corporal e saturado com vapor de água, enquanto o volume de ar corrente expirado ser novamente esfriado até a temperatura da câmara. Nessa idade, o volume corrente foi calculado por meio da fórmula de Drorbaugh; Fenn (1955). Neste método, a cada registro de ventilação, o fluxo de ar pela câmara foi interrompido por aproximadamente 2 minutos.

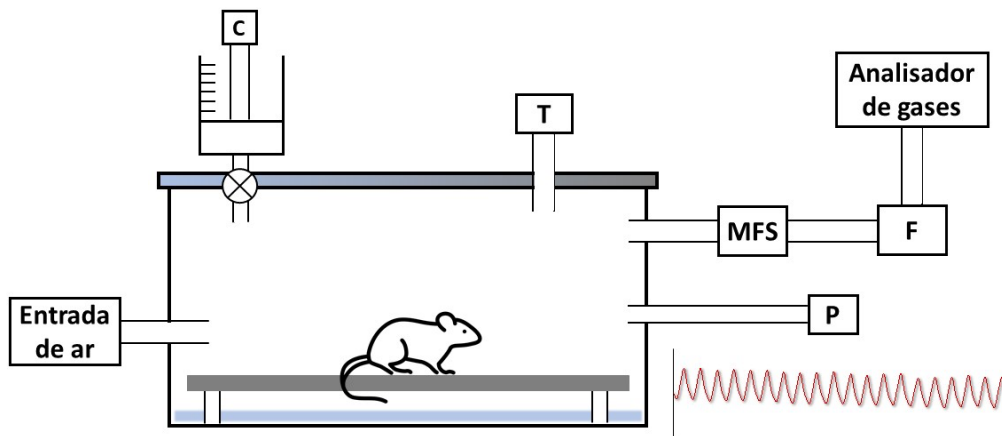


FIGURA 3 - Esquema de um sistema de pleüstimografia de corpo inteiro utilizado para animais P21-22. Em vermelho, sinal barométrico de ventilação. P: transdutor de pressão; T: sensor de temperatura da câmara; F: fluxômetro; C: seringa para calibração do sinal; MFS: “mass flow system” – bomba de sucção para manutenção do fluxo.

Assim, duas variáveis respiratórias foram medidas sendo elas a frequência respiratória (f_R) e o volume corrente (V_T). A \dot{V}_E foi calculada pelo produto da f_R pelo V_T . A \dot{V}_E e o V_T serão apresentados nas condições de pressão barométrica ambiente, à temperatura e saturados com vapor d’água (BTPS), ambos corrigidos pela massa corporal em quilograma (Kg). Para este método, a temperatura corporal foi medida através de um sensor de temperatura retal.

Foram utilizadas as misturas gasosas: 7% CO_2 , 21% O_2 (hipercapnia) em N_2 balanço e 10% de O_2 em N_2 balanço (hipóxia). Elas foram adquiridas da White Martins Gases Industriais Ltda (Osasco, SP).

3.3. Determinação do metabolismo

O método de calorimetria indireta (consumo de oxigênio, $\dot{V}O_2$) pela configuração *Pull mode* foi utilizado para a determinação do metabolismo através do sistema aberto de respirometria (Cummings et al., 2011; Mortola, 1984). O consumo de oxigênio foi calculado utilizando a fórmula apropriada de Depocas; Hart (1957).

3.4. Determinação e análise dos eventos de apneia

A duração dos eventos de apneia, bem como a ocorrência de apneias pelo tempo, foi avaliada em animais com idade P0-1, durante as condições de normocapnia

normóxica, hipercapnia e hipóxia. Um evento de apneia foi considerado como uma pausa na respiração por um tempo equivalente a duas respirações, calculado para cada animal, de acordo com sua própria frequência respiratória média durante aquela determinada condição gasosa. Para calcular a duração das apneias, foi realizada uma média de todas as apneias. Para calcular a ocorrência de apneias por tempo (apneia/tempo, em horas), o número total de apneias foi dividido pelo tempo total em que o animal foi exposto a essa condição gasosa.

3.5. Reflexo de mastigação e endireitamento

Os reflexos de mastigação e endireitamento foram testados nos neonatos (P0-1) após 4 horas do nascimento. Para avaliar o reflexo de mastigação, foi contado o número de aberturas de mandíbula através da introdução de um tubo de polietileno (PE-50) na boca do recém-nascido, durante 30s (Chatonnet et al., 2007; Jacquin et al., 1996). Em relação ao reflexo de endireitamento, os neonatos foram colocados na posição supina e foi registrado o tempo para o animal voltar para a posição prona (Lubics et al., 2005). A fim de obter dados comparáveis, a contagem foi feita pela mesma pessoa em todo o estudo.

3.6. Imunofluorescência para Tirosina-hidroxilase (TH) e 5-hidroxitriptamina (5-HT) e contagem de células

Ao final dos experimentos, os animais foram profundamente anestesiados com uma overdose de Ketamina (100 mg/kg) e perfundidos com tampão fosfato (PBS, 0,01 M com pH de 7,4), seguido por paraformaldeído 4 % (PFA diluído em solução de fosfato tamponado PB – 0,1M e pH 7,4). Os encéfalos foram removidos, armazenados e posteriormente foram congelados e cortados em triplicata no criostato com seções de 35 μm .

Foi realizado imunofluorescência *free-floating* para tirosina-hidroxilase (TH) e serotonina (5-HT) para a marcação dos neurônios catecolaminérgicos (CA) e serotoninérgicos respectivamente. Para isso, os cortes foram incubados em uma solução de recuperação antigênica, lavados com PBS, seguido por incubação em solução de bloqueio para o bloqueio de antígenos inespecíficos. Em seguida, os cortes foram

incubados *overnight* com anticorpo primário, sendo o monoclonal anti-TH feito em camundongo (1:1000, Sigma Aldrich) para TH e o monoclonal anti-5-HT feito em coelho (1:1000, Sigma Aldrich), em temperatura ambiente. Após, os cortes foram incubados com anticorpo secundário fluorescente 488 anti-camundongo IgG (1:500, Jackson Immuno Research) e 595 anti-coelho IgG (1500, Jacscon Immuno Research) em temperatura ambiente. Finalmente os cortes foram colocados no sentido rostro-caudal em lâminas gelatinizadas, cobertos com lamínula e solução anti-desbotante. A marcação de cada molécula se deu em cortes diferentes.

As células imunorreativas para TH e 5-HT foram analisadas por microscopia fluorescência. Foram identificados os núcleos A1/C1, A2/C2, C3, A5 e A6 sendo TH-positivos, assim como núcleos da rafe bulbar (*magnus, pallidus e obscurus*) sendo 5-HT positivos. As contagens foram feitas utilizando o programa Image J (disponibilizado via: <http://www.rsbl.info.nih.gov/nih-image>). Com exceção do núcleo A6, em todos os demais foram contabilizados o número total de neurônios. No A6, foi calculada a quantidade de células por mm².

3.7. Protocolos experimentais

3.7.1. Efeito da exposição ao Diazepam durante o período pré-natal sobre a ventilação e o metabolismo durante a normocapnia/normóxia.

Os animais foram previamente colocados em uma câmara pletismográfica, a qual foi ventilada com ar atmosférico (21% O₂) por um período de aclimação de no mínimo 30 min. Após a aclimação, foram realizadas medidas de ventilação e metabolismo durante 20 minutos dos animais expostos à normocapnia/normóxia (21% O₂, 0,03% CO₂ e N₂ balanço). A ventilação foi medida continuamente para P0-1 e P12-13 e durante 2 minutos para P21-22 após a exposição.

3.7.2. Efeito da exposição ao Diazepam durante o período pré-natal sobre a ventilação e o metabolismo de ratos neonatos (P0-1 e P12-13) e jovens (P21-22) submetidos à hipercapnia e hipóxia.

Após a realização das medidas de ventilação basal durante a normocapnia/normóxia os animais foram submetidos à hipercapnia por 20 min, onde a câmara foi ventilada com uma mistura gasosa contendo 7% CO₂, 21% O₂ e equilibrada com N₂ (White Martins Gases Industriais Ltda, Osasco, SP). Após a hipercapnia, a câmara foi ventilada com ar atmosférico novamente para recuperação dos valores basais de ventilação por 40 min e,

posteriormente, os animais foram submetidos à hipóxia por 20 min, onde a câmara foi ventilada com uma mistura gasosa contendo 10% O₂ e equilibrada com N₂ (White Martins Gases Industriais Ltda, Osasco, SP). A ordem de exposição à hipercapnia e hipóxia foi invertida randomicamente. As medidas de ventilação e metabolismo foram realizadas em todas as exposições, sendo contínua para P0-1 e P12-13 e a cada 5 minutos para P21-22.

3.7.3. Efeito da exposição ao Diazepam durante o período pré-natal sobre a contagem do número de neurônios positivos para TH e 5-HT em neonatos de idade P12-13.

Após a conclusão do protocolo experimental de ventilação, os animais P12-13 foram sacrificados, perfundidos com PBS + PFA 4% e tiveram seus encéfalos removidos e conservados em sacarose 30% até o dia da imunofluorescência descrita acima.

3.8. Análise de dados

Para os dados referentes ao número de filhotes foi utilizado o teste ANOVA de uma via e para reflexo de mastigação e endireitamento foi utilizado o Teste T. Para avaliar a relação entre o atraso no nascimento (para aquelas mães que tiveram seus filhotes após o E-21) e a exposição ao Diazepam, foram calculadas as razões de chances (Odds Ratio) para um intervalo de confiança de 95%. O peso corporal foi analisado utilizando-se o teste ANOVA de duas vias, comparando-se “tratamento” (CTRL x DZP) e “idade” (P0-1, P12-13, P21-22). Os resultados de ventilação, metabolismo e apneia foram analisados usando o software de análise de dados LabChart. Os valores no basal serão apresentados em valores brutos, e o teste ANOVA de uma via foi realizado para avaliar as diferenças estatísticas. Os valores de hipercapnia e hipóxia serão apresentados como porcentagem (%) do basal após 10 minutos de exposição à condição e o teste ANOVA de duas vias de medidas repetidas, comparando-se “tratamento” (CTRL x DZP) e “tempo” (normocapnia/normóxia x hipercapnia; normocapnia/normóxia x hipóxia), com pós-teste de múltiplas comparações Tukey, foi realizado para avaliar as diferenças estatísticas. Em relação às apneia, também foi utilizado o teste ANOVA de duas vias de medidas repetidas, comparando-se “tratamento” (CTRL x DZP) e “tempo” (normocapnia/normóxia x hipercapnia; normocapnia/normóxia x hipóxia), com pós-teste de múltiplas comparações Tukey. A significância dos dados de imunofluorescência foi avaliada através do teste ANOVA de uma via, comparando-se o efeito do tratamento (CTRL x DZP). Para todas as análises estatísticas, utilizou-se o programa Sigma Stat

(Systat Software, Point Richmond - CA, EUA), e foram considerados significativos valores de $P < 0,05$.

4. SINTESE DOS RESULTADOS E BREVE DISCUSSÃO

Esta seção apresenta, de forma resumida, os resultados obtidos com o desenvolvimento deste projeto de pesquisa, assim como procura discuti-los brevemente. Uma leitura aprofundada sobre os dados aqui coletados, os gráficos, tabelas e imagens contendo os resultados, assim como a discussão sobre eles, pode ser encontrada no manuscrito disponível no Capítulo 2 desta dissertação.

No presente estudo, 50% das fêmeas tratadas com Diazepam apresentaram 22 dias de gestação, indicando um atraso de 1 dia no nascimento dos seus filhotes. Dentre as fêmeas que receberam o medicamento, uma delas pariu apenas 1 filhote vivo e constatou-se que 6 filhotes não haviam nascido, mas estavam formados dado pela presença de cabeça, cauda, e membros intactos. Além disso, uma das ratas tratadas deu à luz a 5 fêmeas, sendo que uma delas estava morta.

De fato, a literatura reporta que o uso materno de benzodiazepínicos, traz complicações para a gestação, afetando tanto a gestante quanto o feto. A utilização dessa classe de medicamentos está associada com a ocorrência de malformações fetais, com o risco de nascimento prematuro e com maiores taxas de aborto e morte pré-natal (Ban et al., 2012; Ogawa; Takeshima; Furukawa, 2018; Sheehy; Zhao; Bérard, 2019; Yonkers et al., 2017). Embora esses estudos foram conduzidos em humanos, ressaltamos que as ratas no presente estudo também tiveram complicações obstétricas e morte fetal, dados que se correlacionam. No entanto, os resultados da clínica humana mostram que há nascimento prematuro após a administração de benzodiazepínicos, enquanto os dados aqui coletados para ratas reportam nascimento tardio, fato este que pode estar relacionado com a atuação periférica do Diazepam, uma vez que este promove o relaxamento, dose dependente, da musculatura uterina de ratas fêmeas ovariectomizadas (Yiu; Kwan; Ngan, 1996). Adicionalmente, não foram observadas más-formações para os animais do presente estudo, enquanto este parece ser um relato comum para recém-nascidos humanos. De fato, um trabalho que também administrou DZP durante a gestação de fêmeas, não relatou qualquer efeito teratogênico nos neonatos de ratos avaliados (Picard et al., 2008). Acredita-se que apenas doses maiores do que as empregadas aqui poderiam causar problemas físicos em ratos (Nicosia et al., 2003). De forma geral, chamamos atenção para o risco potencial da utilização materna de Diazepam e os seus possíveis efeitos obstétricos deletérios para o parto e o feto.

O tratamento não afetou a média do número de filhotes machos e fêmeas, assim como não afetou o número total de filhotes por ninhada. O tempo médio que os animais levam para retornar à posição prona, assim como o número médio de mastigações não foram afetados pelo Diazepam. Tais comportamentos foram avaliados uma vez que este medicamento possui um forte poder sedativo e promove o relaxamento muscular em humanos (Calcaterra; Barrow, 2014). De fato, já foi mostrado que esse medicamento promoveu uma redução da atividade locomotora de ratos adultos (Elliot; White, 2001) e neonatos (Nicosia et al., 2003). Adicionalmente, o uso materno de Diazepam parece estar associado com a ocorrência de lábio leporino e fendas palatinas, que poderiam levar a problemas no reflexo de mastigação, ou mesmo sobre a amamentação e alimentação dos indivíduos (Iqbal; Sobhan; Ryals, 2002).

Embora nenhum comprometimento motor foi encontrado nos animais machos e fêmeas tratados com o Diazepam, foi possível observar que eles possuem uma menor variabilidade do reflexo de mastigação em relação ao grupo controle. Sobre isso, a literatura aponta que os reflexos de um indivíduo são um forte indicativo sobre o correto desenvolvimento do Sistema Nervoso Central, que pode ser influenciado pelo Diazepam. Da mesma forma, a variabilidade de um comportamento é característica do desenvolvimento motor, assim como é o substrato evolutivo para qualquer espécie. Assim, esses animais possuem um menor repertório comportamental dada a menor variabilidade desses dados, o que impacta negativamente sobre sua adaptação à novos ambientes (Finan; Smith, 2005; Nicosia et al., 2003; Piek, 2002; Smith; Goffman, 1998; Thelen, 1995; Thelen; Smith, 1994; Touwen, 1990; Turvey; Fitzpatrick, 1993; Walsh; Smith, 2002).

Também observamos que os animais tratados com o Diazepam possuem maior massa corporal em relação ao seu grupo controle no dia pós-natal 21-22. Sobre isso, também já foi relatado que ratos juvenis na idade de desmame P21 apresentaram ganho de massa corporal após a exposição intrauterina a este fármaco (Segovia et al., 1991). Adicionalmente, foi mostrado que a microinjeção central de Diazepam, assim como a de muscimol, no *Núcleo Accumbens*, promoveram um aumento da ingestão de comida em ratos adultos (Meena et al., 2009). Ainda, estudos em primatas não-humanos mostrou que o Diazepam não só aumentou a ingestão de comida, assim como também aumentou a procura por alimentos destes animais (Foltin, 2001). Portanto, esses resultados sugerem a participação do Diazepam na hiperfagia e ganho de peso nos animais aqui avaliados,

assim como sugerem que esse medicamento possa promover efeitos de longa duração sobre os animais, uma vez que já não há droga circulante nessa idade de desmame.

Em relação às respostas ventilatórias e metabólicas, os nossos dados sugerem que o Diazepam promove mudanças sexo-específicas sobre o controle respiratório ao longo do desenvolvimento. Embora outros efeitos foram observados e serão discutidos abaixo, os principais achados que levam ao delineamento desta afirmativa estão relacionados à atenuação da ventilação ao CO_2 de fêmeas nas idades P0-1 e P12-13, enquanto para os machos foi observado uma hipoventilação em normocapnia/normóxia nas idades P12-13 e P21-22.

Os dados de ventilação e metabolismo em normóxia/normocápia apontam para mínimos efeitos nas fêmeas na idade P0-1, as quais apresentaram apenas um aumento na f_R assim como no $\dot{V}O_2$, sem afetar nenhuma outra variável respiratória em outra idade nesta condição gasosa. Embora realizado em camundongos machos adultos, um estudo também mostrou que a administração intraperitoneal de Diazepam promoveu um aumento da frequência respiratória (Masneuf et al., 2012), enquanto outro trabalho registrou queda na frequência de animais P0-2 após exposição intrauterina ao mesmo fármaco (Picard et al., 2008). No entanto, os efeitos mais relevantes nas respostas basais foram observados em machos P12-13 e P21-22. Estes apresentam uma redução da sua ventilação, por uma redução do volume corrente, o que promoveu uma hipoventilação, dada pela atenuação na relação entre $\dot{V}_E/\dot{V}O_2$. A redução do volume corrente desses animais sugere a participação do sistema GABAérgico no controle do padrão respiratório, uma vez que já foi mostrado que o Diazepam promove uma redução da atividade do nervo hipoglosso de coelhos, condição que leva à uma redução do tônus muscular das vias aéreas. Adicionalmente, a depressão respiratória promovida pelos benzodiazepínicos já foi caracterizada por estar relacionada com uma redução do volume corrente (Boon et al., 2020; Takataro et al., 2003).

Os dados colhidos para este sexo, nesta idade, indicam que eles ventilam abaixo de suas demandas metabólicas, resultando em uma perda no suprimento de oxigênio para o organismo, uma situação clínica que pode estar relacionados com a Síndrome da Morte Súbita Infantil (Pasquale-Styles; Tackitt; Schmidt, 2007). Alterações respiratórias também foram encontradas em recém-nascidos de mães que foram prescritas com benzodiazepínicos, os quais precisaram de suporte ventilatório para suprir suas demandas

metabólicas (Yonkers et al., 2017). Além disso, o uso de benzodiazepínicos por gestantes também levou a um aumento na admissão de seus recém-nascidos em unidade de terapia intensiva neonatal (Freeman et al., 2018).

De modo interessante e convergente, os ratos P12-13 apresentaram um menor número de neurônios serotoninérgicos na rafe bulbar, em especial na rafe *obscurus* e *magnus*. De fato, sabe-se que a serotonina é um importante neurotransmissor que participa do controle da ventilação, uma vez que os neurônios serotoninérgicos se projetam para várias áreas do tronco encefálico envolvidas com a geração do ritmo e do padrão respiratório. Animais mutantes que não produzem estes neurônios apresentam falhas respiratórias que comprometem a sobrevivência desses indivíduos. Também já foi reportado que recém-nascidos do sexo masculino que foram acometidos pela Síndrome da Morte Súbita Infantil possuem uma menor densidade de receptores serotoninérgicos, assim há uma diminuição da ligação do receptor GABA_A nos neurônios serotoninérgicos. Além disso, essa síndrome afeta desproporcionalmente mais bebês do sexo masculino do que feminino, em uma taxa de 60:40, e ocorre entre o segundo e quarto mês de vida pós-natal, idade equivalente à janela de desenvolvimento P12-13 de ratos, proposta como um período crítico para o desenvolvimento do sistema respiratório e a mesma na qual as alterações foram observadas (Cummings et al., 2009, 2011; Duncan et al., 2010; Duncan; Byard, 2018; Goldberg et al., 1986; Hodges et al., 2009; Kinney et al., 2007; Kinney; Thach, 2009; Ptak et al., 2009; Wong-Riley; Liu; Gao, 2013).

Adicionalmente, os ratos em idade P12-13 submetidos ao tratamento com benzodiazepínicos apresentam menor quantidade de neurônios catecolaminérgicos em diferentes áreas do tronco encefálicos. Esses neurônios também participam do controle da ventilação, pois animais mutantes para a produção de noradrenalinas em determinados núcleos catecolaminérgicos também possuem irregularidades respiratórias e sobrevivência comprometida, sugerindo que esses neurônios são fundamentais para o desenvolvimento correto da rede respiratória (Hilaire, 2006; Viemari et al., 2004; Zanella et al., 2006).

Em relação às respostas ventilatórias e metabólicas durante a hipercapnia, observamos que as fêmeas, em idade P0-1 e P12-13, tratadas com o Diazepam, apresentaram uma redução da sua ventilação, por uma redução do volume corrente. Ainda na idade P12-13, essas fêmeas também apresentaram uma hipoventilação, indicada pela queda na relação entre $\dot{V}_E/\dot{V}O_2$, sugerindo alteração na quimiossensibilidade central ao

CO₂, dado que elas não possuem alteração do equivalente respiratório à hipóxia. Dados em camundongos, primatas humanos e não humanos, também mostram que a administração de Diazepam promove redução da resposta ventilatória à hipercapnia, principalmente por alteração de volume corrente (Borkowski et al., 2011; Rudolf et al., 1978; Wettstein; Teeple; Morse, 1990).

Além disso, atribuímos que a diminuição na resposta ao CO₂ esteja associada ao papel do sistema GABAérgico em regiões que participam da resposta ao CO₂, tal como o *Locus coeruleus* (LC). Essa região, além de possuir neurônios GABAérgicos, adjacentes aos neurônios noradrenérgicos, também recebem projeções inibitórias de diferentes áreas encefálicas rostrais. Trabalhos anteriores demonstraram que a sinalização GABAérgica no LC promove uma diminuição da taxa de disparo dos seus neurônios noradrenérgicos, produzindo potenciais pós-sinápticos inibitórios. Estes estudos anatômicos e eletrofisiológicos sugerem que a atividade dos neurônios noradrenérgicos do LC é modulada pelo GABA liberado nessa região, o que pode impactar diretamente sobre a ventilação dos animais (Aston-Jones; Zhu; Card, 2004; Breton-Provencher; Sur, 2019; De Carvalho et al., 2010; Dimitrov; Yanagawa; Usdin, 2013).

Corroborando com os dados de ventilação, essas fêmeas ainda apresentam uma redução na densidade do número de neurônios catecolaminérgicos nessa região. Trabalhos anteriores também já demonstraram que a exposição intrauterina ao Diazepam promove uma redução no número de neurônios do LC de fêmeas, assim como diminui o volume celular dos mesmos (Rodriguez-Zafra et al., 1993). Os autores deste trabalho sugerem que o Diazepam contribuiu para a perda neuronal dessa estrutura sexualmente dimórfica. Ainda o trabalho de Grant et al. (1980), demonstrou que a administração de Diazepam diminuiu a atividade espontânea de neurônios noradrenérgicos do LC. Assim, a redução do número de neurônios noradrenérgicos nessa região pode estar envolvida com as alterações da resposta ventilatória observadas para as fêmeas tratadas, uma vez que o LC participa do *drive* respiratório ao CO₂ (Biancardi et al., 2008). Ainda, acreditamos que a atenuação da resposta ao CO₂ para as fêmeas, mas não para os machos, deve-se ao dimorfismo sexual dessa região (Bangasser; Wiersielis; Khantsis, 2016).

Embora atenção especial seja dada para as alterações ocorridas junto ao LC, ressaltamos que essas mesmas fêmeas P12-13 expostas ao Diazepam, apresentaram uma redução do número de neurônios catecolaminérgicos nas regiões A1/C1, A2/C2 e C3. Trabalhos prévios já demonstraram que o sistema catecolaminérgico é importante para a

hiperventilação à hipercapnia, uma vez que a lesão de tais neurônios promove queda na ventilação ao CO₂ (Li; Nattie, 2006), bem como alterações deste sistema podem prejudicar as respostas ventilatórias à hipercapnia ao longo do desenvolvimento (Patrone et al., 2018). Portanto, esses efeitos sugerem que o excesso de GABA durante a gravidez, proporcionado através do uso de DZP, promoveu mudanças sexo-específicas no controle respiratório, em áreas que desempenham um papel no *drive* respiratório para o CO₂, tornando essas fêmeas menos sensíveis à hipercapnia.

Os machos tratados com Diazepam, por sua vez, apresentaram apenas atenuação do aumento da sua frequência respiratória nas idades P0-1 e P12-13, sem alteração de ventilação. Sobre isso, sabe-se que os neurônios do núcleo retrotrapezóide (RTN), participam na quimiossensibilidade ao pH/CO₂, e comunicam-se com o pré-BötC, aumentando a frequência respiratória em situações de alta demanda metabólica. Os inputs GABAérgicos no RTN inibem essa região, uma vez que já foi demonstrado que administração aguda de muscimol no RTN inibe seus neurônios, promovendo uma atenuação da frequência respiratória em ratos adultos durante situações de hipercapnia. Dessa forma, sugerimos que a sinalização GABAérgica, através do tratamento intrauterino com o Diazepam, pode promover alterações na atividade do RTN, que por sua vez diminui as informações para o pré-BötC, diminuindo a frequência respiratória (Li; Zhou; Nattie, 2006; Takakura et al., 2013).

Em relação às respostas ventilatórias e metabólicas à hipóxia, apenas os machos tratados com Diazepam, na idade P12-13, apresentaram uma atenuação do aumento da sua ventilação, mas sem alterações de volume corrente ou de frequência respiratória. Em relação a esse achado, estudos anteriores demonstraram que o corpo carotídeo, proposto como o principal quimiorreceptor periférico para o O₂, possui receptores GABAérgicos. Portanto, essa redução da resposta ventilatória à hipóxia pode estar relacionada à atuação do DZP sobre o corpo carotídeo, uma vez que já foi demonstrado que benzodiazepínicos reduzem a taxa de disparo do nervo do seio carotídeo em condições de baixos níveis de O₂ (Igarashi; Zadzilka; Shirahata, 2009; Kim et al., 2006; Oomori et al., 1994).

Assim, a presente pesquisa mostrou que o tratamento pré-natal com DZP tem importantes impactos sexo-dependentes no controle respiratório e no sistema monoaminérgico de ratos. As intervenções medicamentosas, que ocorrem ainda durante a vida uterina, são fundamentais para se pensar sobre o uso de medicamentos na área obstétrica, e como as mudanças em um período tão delicado e sensível para mulheres e

bebês podem afetar ambos. Chamamos a atenção para este fato porque a ocorrência Síndrome da Morte Súbita Infantil está relacionada a três fatores principais como ter um bebê vulnerável, exposto a um estressor exógeno (como DZP ou desafios de CO₂ e O₂, ou todos em combinação) e um período crítico para desenvolvimento (Filiano; Kinney, 1994).

5. CONCLUSÃO

Os dados aqui reportados sugerem a ocorrência de efeitos obstétricos deletérios após a administração de DZP, assim como alterações sobre controle respiratório e sobre o sistema catecolaminérgico e serotoninérgico de neonatos durante o desenvolvimento. Alterações da ventilação de machos nas condições de repouso, sugerem o papel do sistema GABAérgico no padrão respiratório e no controle das vias aéreas superiores. A diminuição da ventilação em fêmeas aponta para o papel da função inibitória em áreas bulbares e pontinas envolvidas na quimiossensibilidade, e em uma alteração sexo-específica desse mecanismo. Reduções nos neurônios catecolaminérgicos e serotoninérgicos podem estar relacionadas às alterações nas respostas ventilatórias observadas aqui. Ainda, esses dados sugerem a participação do sistema GABAérgico nas áreas respiratórias. Por fim, esses resultados, em conjunto, contribuem para o entendimento sobre como intervenções medicamentosas, ainda no período gestacional, podem modular o controle respiratório na vida pós-natal, assim como promover efeitos a longo prazo sobre o desenvolvimento do Sistema Nervoso Central e Respiratório, e como tais complicações podem levar à ocorrência de eventos catastróficos para o recém-nascido, como a Síndrome da Morte Súbita Infantil.

6. REFERÊNCIAS

- ABU-SHAWEESH, J. M.; MARTIN, R. J. **Neonatal apnea: What's new?** *Pediatric Pulmonology* *Pediatr Pulmonol*, out. 2008. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18780339/>>. Acesso em: 13 jul. 2020
- ALCANTARA, G. DE C.; COUTINHO, E. S. F.; FAERSTEIN, E. Pattern evolution of antidepressants and benzodiazepines use in a cohort. **Revista de saude publica**, v. 54, p. 40, 2020.
- ALI, E. Women's experiences with postpartum anxiety disorders: a narrative literature review. **International journal of women's health**, v. 10, p. 237–249, 2018.
- ALONSO, J.; LÉPINE, J. P. **Overview of key data from the European Study of the Epidemiology of Mental Disorders (ESEMeD)** *Journal of Clinical Psychiatry*, 2007.
- AMIEL, J. et al. Exclusion of RNX as a major gene in congenital central hypoventilation syndrome (CCHS, Ondine's curse). **American Journal of Medical Genetics**, v. 117A, n. 1, p. 18–20, 15 fev. 2003.
- ANDERSON, T. M. et al. A novel excitatory network for the control of breathing. **Nature**, v. 536, n. 7614, p. 76–80, 2016.
- ANJU, T. R. et al. Neonatal hypoxic insult-mediated cholinergic disturbances in the brain stem: effect of glucose, oxygen and epinephrine resuscitation. **Neurological sciences : official journal of the Italian Neurological Society and of the Italian Society of Clinical Neurophysiology**, v. 34, n. 3, p. 287–96, 7 mar. 2013.
- ARATA, A.; ONIMARU, H.; HOMMA, I. The adrenergic modulation of firings of respiratory rhythm-generating neurons in medulla-spinal cord preparation from newborn rat. **Experimental Brain Research**, v. 119, n. 4, p. 399–408, 1998.
- ASSOCIAÇÃO AMERICANA DE PSIQUIATRIA. **Manual diagnóstico e estatístico de transtornos mentais [recurso eletrônico]: DSM-5**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2014.
- ASTON-JONES, G.; ZHU, Y.; CARD, J. P. Numerous GABAergic Afferents to Locus Ceruleus in the Pericerulear Dendritic Zone: Possible Interneuronal Pool. **Journal of Neuroscience**, v. 24, n. 9, p. 2313–2321, 3 jun. 2004.
- BAIS, B. et al. Prevalence of benzodiazepines and benzodiazepine-related drugs exposure before, during and after pregnancy: A systematic review and meta-analysis. **Journal of Affective Disorders**, v. 269, n. March, p. 18–27, 2020.
- BAN, L. et al. Live and non-live pregnancy outcomes among women with depression and anxiety: A population-based study. **PLoS ONE**, v. 7, n. 8, 2012.
- BANDELOW, B.; MICHAELIS, S. Epidemiology of anxiety disorders in the 21st century. **Dialogues in clinical neuroscience**, v. 17, n. 3, p. 327–35, set. 2015.
- BANDELOW, B.; MICHAELIS, S.; WEDEKIND, D. Treatment of anxiety disorders. **Dialogues in Clinical Neuroscience**, v. 19, n. 2, p. 93–106, 2017a.
- BANDELOW, B.; MICHAELIS, S.; WEDEKIND, D. Treatment of anxiety disorders. **Dialogues in Clinical Neuroscience**, v. 19, n. 2, p. 93, 2017b.
- BANGASSER, D. A.; WIERSIELIS, K. R.; KHANTSIS, S. **Sex differences in the locus coeruleus-norepinephrine system and its regulation by stress** *Brain*

ResearchElsevier B.V., , 15 jun. 2016.

BARTLETT, D.; TENNEY, S. M. Control of breathing in experimental anemia. **Respiration physiology**, v. 10, n. 3, p. 384–95, out. 1970.

BATESON, A. N. The benzodiazepine site of the GABAA receptor: an old target with new potential? **Sleep medicine**, v. 5 Suppl 1, p. S9-15, jun. 2004.

BHAT, N. A. et al. Sociodemographic factors: A major predictor of anxiety and depression among pregnant women. **Delhi Psychiatry Journal**, v. 18, n. 1, p. 86–94, 2015.

BIANCARDI, V. et al. Locus coeruleus noradrenergic neurons and CO2 drive to breathing. **Pflügers Archiv - European Journal of Physiology**, v. 455, n. 6, p. 1119–1128, 2008.

BIANCARDI, V. et al. Role of locus coeruleus noradrenergic neurons in cardiorespiratory and thermal control during hypoxia. **Respiratory physiology & neurobiology**, v. 170, n. 2, p. 150–6, 28 fev. 2010.

BOON, M. et al. Combining opioids and benzodiazepines: Effects on mortality and severe adverse respiratory events. **Annals of Cardiothoracic Surgery**, v. 9, n. 2, p. 542–557, 2020.

BORKOWSKI, A. H. et al. Interaction between delta opioid receptors and benzodiazepines in CO₂-induced respiratory responses in mice. **Brain Research**, v. 1396, p. 54–59, 17 jun. 2011.

BOUVIER, J. et al. Hindbrain interneurons and axon guidance signaling critical for breathing. **Nature neuroscience**, v. 13, n. 9, p. 1066–74, 2 set. 2010.

BOWERY, N. G.; HUDSON, A. L.; PRICE, G. W. GABAA and GABAB receptor site distribution in the rat central nervous system. **Neuroscience**, v. 20, n. 2, p. 365–83, fev. 1987.

BRETON-PROVENCHER, V.; SUR, M. Active control of arousal by a locus coeruleus GABAergic circuit. **Nature Neuroscience**, v. 22, n. 2, p. 218–228, 14 fev. 2019.

BROCKINGTON, I. F.; MACDONALD, E.; WAINSCOTT, G. Anxiety, obsessions and morbid preoccupations in pregnancy and the puerperium. **Archives of Women's Mental Health**, v. 9, n. 5, p. 253–263, 8 set. 2006.

CALCATERRA, N. E.; BARROW, J. C. Classics in chemical neuroscience: Diazepam (valium). **ACS Chemical Neuroscience**, v. 5, n. 4, p. 253–260, 2014.

CARVALHO-NETTO, E. F. DE. Medo e ansiedade: Aspectos comportamentais e neuroanatômicos. **Arquivos Médicos dos Hospitais e da Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo**, v. 54, n. 2, p. 62–65, 2009.

CARVALHO, A. DE C. A. et al. O uso de drogas psicotrópicas na gestação. **FEMININA**, v. 37, p. 331–338, 2009.

CARVALHO, D. DE et al. Role of neurokinin-1 expressing neurons in the locus coeruleus on ventilatory and cardiovascular responses to hypercapnia. **Respiratory Physiology & Neurobiology**, v. 172, p. 24–31, 2010.

CASSIDY, S. B. et al. **Prader-Willi syndrome** *Genetics in Medicine* Nature Publishing Group, , 2012. Disponível em:

<<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22237428/>>. Acesso em: 13 jul. 2020

CHATONNET, F. et al. Distinct roles of Hoxa2 and Krox20 in the development of rhythmic neural networks controlling inspiratory depth, respiratory frequency, and jaw opening. **Neural development**, v. 2, n. 1, p. 19, 26 set. 2007.

CORCORAN, A. E. et al. Medullary serotonin neurons and central CO₂ chemoreception. **Respir Physiol Neurobiol**, v. 168, n. 1–2, p. 49–58, 31 ago. 2009.

CREE, J. E.; MEYER, J.; HAILEY, D. M. Diazepam in Labour: Its Metabolism and Effect on the Clinical Condition and Thermogenesis of the Newborn. **British Medical Journal**, v. 4, n. 5887, p. 251–255, 3 nov. 1973.

CUI, Y. et al. Defining preBötzinger Complex Rhythm- and Pattern-Generating Neural Microcircuits In Vivo. **Neuron**, v. 91, n. 3, p. 602–614, 3 ago. 2016.

CUMMINGS, K. J. et al. Severe spontaneous bradycardia associated with respiratory disruptions in rat pups with fewer brain stem 5-HT neurons. **American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology**, v. 296, n. 6, jun. 2009.

CUMMINGS, K. J. et al. Postnatal loss of brainstem serotonin neurones compromises the ability of neonatal rats to survive episodic severe hypoxia. **The Journal of physiology**, v. 589, n. Pt 21, p. 5247–56, 1 nov. 2011.

DA SILVA, G. S. F. et al. Serotonergic neurons in the nucleus raphe obscurus contribute to interaction between central and peripheral ventilatory responses to hypercapnia. **Pflugers Archiv : European journal of physiology**, v. 462, n. 3, p. 407–18, 8 set. 2011.

DAUGER, S. et al. Phox2b controls the development of peripheral chemoreceptors and afferent visceral pathways. **Development**, v. 130, n. 26, p. 6635–6642, dez. 2003.

DE CARVALHO, D. et al. Neurochemical and electrical modulation of the Locus coeruleus: Contribution to CO₂ drive to breathe. **Frontiers in Physiology**, v. 5 JUL, 2014.

DEL NEGRO, C. A.; FUNK, G. D.; FELDMAN, J. L. Breathing matters. **Neuroscience**, v. 19, n. 6, p. 351–367, 2018.

DEPOCAS, F.; HART, J. S. Use of the Pauling oxygen analyzer for measurement of oxygen consumption of animals in open-circuit systems and in a short-lag, closed-circuit apparatus. **Journal of applied physiology**, v. 10, n. 3, p. 388–92, maio 1957.

DI PASQUALE, E. et al. Serotonergic modulation of the respiratory rhythm generator at birth: an in vitro study in the rat. **Neuroscience letters**, v. 143, n. 1–2, p. 91–5, 31 ago. 1992a.

DI PASQUALE, E. et al. Serotonergic modulation of the respiratory rhythm generator at birth: An in vitro study in the rat. **Neuroscience Letters**, v. 143, n. 1–2, p. 91–95, 31 ago. 1992b.

DIAS, M. B. et al. Raphe magnus nucleus is involved in ventilatory but not hypothermic response to CO₂. **Journal of Applied Physiology**, v. 103, n. 5, p. 1780–1788, nov. 2007.

DIMITROV, E. L.; YANAGAWA, Y.; USDIN, T. B. Forebrain GABAergic projections to locus coeruleus in mouse. **The Journal of comparative neurology**, v. 521, n. 10, p. 2373–97, 1 jul. 2013.

DRORBAUGH, J. E.; FENN, W. O. A barometric method for measuring ventilation in newborn infants. **Pediatrics**, v. 16, n. 1, p. 81–7, jul. 1955.

DUNCAN, J. R. et al. Brainstem serotonergic deficiency in Sudden Infant Death Syndrome. **JAMA**, v. 303, n. 5, p. 430–437, 2010.

DUNCAN, J. R.; BYARD, R. W. Sudden Infant Death Syndrome: Definitions. In: **SIDS Sudden infant and early childhood death: The past, the present and the future**. [s.l.] University of Adelaide Press, 2018. p. 1–14.

EL-GUEBALY, N.; SAREEN, J.; STEIN, M. B. Are there guidelines for the responsible prescription of benzodiazepines? **Can J Psychiatry**, v. 55, n. 11, 2010.

ELLIOT, E. E.; WHITE, J. M. The acute effects of zolpidem compared to diazepam and lorazepam using radiotelemetry. **Neuropharmacology**, v. 40, n. 5, p. 717–721, 2001.

ERRCHIDI, S.; MONTEAU, R.; HILAIRE, G. Noradrenergic modulation of the medullary respiratory rhythm generator in the newborn rat: an in vitro study. **The Journal of Physiology**, v. 443, n. 1, p. 477–498, 1 nov. 1991.

EZURE, K.; TANAKA, I.; KONDO, M. Glycine is used as a transmitter by decrementing expiratory neurons of the ventrolateral medulla in the rat. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 23, n. 26, p. 8941–8, 1 out. 2003.

FAISAL-CURY, A. et al. Common mental disorders during pregnancy: Prevalence and associated factors among low-income women in São Paulo, Brazil : Dand Anxiety during Pregnancy. **Archives of Women's Mental Health**, v. 12, n. 5, p. 335–343, 2009.

FAWCETT, E. J. et al. The prevalence of anxiety disorders during pregnancy and the postpartum period: A multivariate Bayesian meta-analysis. **Journal of Clinical Psychiatry**, v. 80, n. 4, 2019.

FELDMAN, J. L.; KAM, K. Facing the challenge of mammalian neural microcircuits: Taking a few breaths may help. **Journal of Physiology**, v. 593, n. 1, p. 3–23, 2015.

FILIANO, J. J.; KINNEY, H. C. A perspective on neuropathologic findings in victims of the sudden infant death syndrome: The triple-risk model. **Neonatology**, v. 65, n. 3–4, p. 194–197, 1994.

FINAN, D. S.; SMITH, A. Jaw stretch reflexes in children. **Experimental Brain Research**, v. 164, n. 1, p. 58–66, 2005.

FOLTIN, R. W. Effects of amphetamine, dexfenfluramine, diazepam, and other pharmacological and dietary manipulations on food “seeking” and “taking” behavior in non-human primates. **Psychopharmacology**, v. 158, n. 1, p. 28–38, 2001.

FREEMAN, M. P. et al. Obstetrical and neonatal outcomes after benzodiazepine exposure during pregnancy: Results from a prospective registry of women with psychiatric disorders. **General Hospital Psychiatry**, v. 53, p. 73–79, 1 jul. 2018.

FUXE, K. et al. The possible involvement of GABA mechanisms in the action of benzodiazepines on central catecholamine neurons. **Advances in biochemical psychopharmacology**, n. 14, p. 45–61, 1975.

GALLAGER, D. W. Benzodiazepines: potentiation of a GABA inhibitory response in the dorsal raphe nucleus. **European journal of pharmacology**, v. 49, n. 2, p. 133–43, 15 maio 1978.

GARGAGLIONI, L. H.; COIMBRA, N. C.; BRANCO, L. G. S. The nucleus raphe magnus modulates hypoxia-induced hyperventilation but not anapnoea in rats. **Neuroscience letters**, v. 347, n. 2, p. 121–5, 21 ago. 2003.

GARGAGLIONI, L. H.; HARTZLER, L. K.; PUTNAM, R. W. The locus coeruleus and central chemosensitivity. **Respiratory Physiology and Neurobiology**, v. 173, n. 3, p. 264–273, 2010.

GHAFFAR, R. et al. Frequency and predictors of anxiety and depression among pregnant women attending tertiary healthcare institutes of Quetta City, Pakistan. **BMC women's health**, v. 17, n. 1, p. 51, 2017.

GHALI, M. G. Z. Respiratory rhythm generation and pattern formation: Oscillators and network mechanisms. **Journal of Integrative Neuroscience**, v. 18, n. 4, p. 481–517, 2019.

GHALI, M. G. Z.; BESHAY, S. Role of fast inhibitory synaptic transmission in neonatal respiratory rhythmogenesis and pattern formation. **Molecular and Cellular Neuroscience**, v. 100, n. July, p. 103400, 2019.

GOLDBERG, J. et al. Age at death and risk factors in sudden infant death syndrome. **Australian paediatric journal**, v. 22 Suppl 1, p. 21–28, 1986.

GOLDSTEIN, R. D. et al. Overall postneonatal mortality and rates of SIDS. **Pediatrics**, v. 137, n. 1, 1 jan. 2016.

GOODMAN, J. H.; CHENAUSKY, K. L.; FREEMAN, M. P. Anxiety Disorders During Pregnancy. **The Journal of Clinical Psychiatry**, v. 75, n. 10, p. e1153–e1184, 28 out. 2014.

GORIDIS, C.; BRUNET, J.-F. Central chemoreception: Lessons from mouse and human genetics. **Respiratory Physiology & Neurobiology**, v. 173, n. 3, p. 312–321, 31 out. 2010.

GRANT, S. J.; HUANG, Y. H.; REDMOND, D. E. Benzodiazepines attenuate single unit activity in the locus coeruleus. **Life sciences**, v. 27, n. 23, p. 2231–6, 8 dez. 1980.

GRAY, P. A. et al. Developmental origin of preBötzinger complex respiratory neurons. **The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 30, n. 44, p. 14883–95, 3 nov. 2010.

GREER, J. J. Control of Breathing Activity in the Fetus and Newborn. v. 2, n. July, p. 1873–1888, 2012.

GREER, J. J.; FUNK, G. D.; BALLANYI, K. Preparing for the first breath: prenatal maturation of respiratory neural control. **The Journal of physiology**, v. 570, n. Pt 3, p. 437–44, 1 fev. 2006.

GREER, J. J.; SMITH, J. C.; FELDMAN, J. L. Respiratory and locomotor

patterns generated in the fetal rat brain stem-spinal cord in vitro. **Journal of neurophysiology**, v. 67, n. 4, p. 996–9, abr. 1992.

GRIGORIADIS, S. et al. Benzodiazepine Use During Pregnancy Alone or in Combination With an Antidepressant and Congenital Malformations. **The Journal of Clinical Psychiatry**, v. 80, n. 4, 9 jul. 2019.

GÜLER, Ö. et al. Pregnancy-onset panic disorder: Incidence, comorbidity and associated factors. **Noropsikiyatri Arsivi**, v. 52, n. 3, p. 216–220, 1 set. 2015.

HANLEY, G. E.; MINTZES, B. Patterns of psychotropic medicine use in pregnancy in the United States from 2006 to 2011 among women with private insurance. **BMC Pregnancy and Childbirth**, v. 14, p. 242, 22 jul. 2014.

HAXHIU, M. A. et al. The role of the medullary raphe nuclei in regulation of cholinergic outflow to the airways. **Journal of the Autonomic Nervous System**, v. 69, n. 1, p. 64–71, 3 mar. 1998.

HERLENIUS, E.; LAGERCRANTZ, H. Neurotransmitters and neuromodulators during early human development. **Early human development**, v. 65, n. 1, p. 21–37, out. 2001.

HERLENIUS, E.; LAGERCRANTZ, H. Development of neurotransmitter systems during critical periods. **Experimental Neurology**, v. 190, n. SUPPL. 1, p. 8, 2004.

HILAIRE, G. et al. Modulation of the respiratory rhythm generator by the pontine noradrenergic A5 and A6 groups in rodents. **Respiratory Physiology and Neurobiology**, v. 143, n. 2–3, p. 187–197, 2004.

HILAIRE, G. Endogenous noradrenaline affects the maturation and function of the respiratory network: Possible implication for SIDS. **Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical**, v. 126–127, p. 320–331, 2006.

HILAIRE, G.; DURON, B. Maturation of the mammalian respiratory system. **Physiological Reviews**, v. 79, n. 2, p. 325–360, 1999.

HODGES, M. R. et al. Transgenic Mice Lacking Serotonin Neurons Have Severe Apnea and High Mortality during Development. **Journal of Neuroscience**, v. 29, n. 33, p. 10341–10349, 2009.

HODGES, M. R.; RICHERSON, G. B. Contributions of 5-HT Neurons to Respiratory Control: Neuromodulatory and Trophic Effects. **Respiratory Physiology and Neurobiology**, v. 164, n. 1–2, p. 222–232, 10 dez. 2008.

ICEMAN, K. E. et al. CO₂-inhibited neurons in the medullary raphe are GABAergic. **Respiratory Physiology and Neurobiology**, v. 203, p. 28–34, 1 nov. 2014.

IGARASHI, A.; ZADZILKA, N.; SHIRAHATA, M. Benzodiazepines and GABA-GABAA receptor system in the cat carotid body. Arterial Chemoreceptors. **Adv Exp Med Biol**, v. 648, p. 169–175, 2009.

ILYAS, S.; MONCRIEFF, J. Trends in prescriptions and costs of drugs for mental disorders in England, 1998-2010. **British Journal of Psychiatry**, v. 200, n. 5, p. 393–398, maio 2012.

IQBAL, M. M.; SOBHAN, T.; RYALS, T. Effects of Commonly Used Benzodiazepines on the Fetus, the Neonate, and the Nursing Infant. **Psychiatric Services**,

v. 53, n. 1, p. 39–49, 2002.

JACQUIN, T. D. et al. Reorganization of pontine rhythmogenic neuronal networks in Krox-20 knockout mice. **Neuron**, v. 17, n. 4, p. 747–58, out. 1996.

JANCZEWSKI, W. A.; FELDMAN, J. L. Distinct rhythm generators for inspiration and expiration in the juvenile rat. **The Journal of physiology**, v. 570, n. Pt 2, p. 407–20, 15 jan. 2006.

JANSEN, A. H.; CHERNICK, V. Fetal breathing and development of control of breathing. **Journal of Applied Physiology**, v. 70, n. 4, p. 1431–1446, abr. 1991.

JAUNIAUX, E.; GULBIS, B. In vivo investigation of placental transfer early in human pregnancy. **European journal of obstetrics, gynecology, and reproductive biology**, v. 92, n. 1, p. 45–9, set. 2000.

JIA, H.; RAO, Z.; SHI, J. Evidence of gamma-aminobutyric acidergic control over the catecholaminergic projection from the medulla oblongata to the central nucleus of the amygdala. **The Journal of comparative neurology**, v. 381, n. 3, 1997.

JIN, X. et al. GABAergic synaptic inputs of locus coeruleus neurons in wild-type and Mecp2-null mice. **American journal of physiology. Cell physiology**, v. 304, n. 9, p. C844–57, 1 maio 2013.

JIN, X. et al. Identification of a group of GABAergic neurons in the dorsomedial area of the locus coeruleus. **PLoS ONE**, v. 11, n. 1, p. 1–13, 2016.

JUDGE, S. J.; YOUNG, R. L.; GARTSIDE, S. E. GABAA receptor modulation of 5-HT neuronal firing in the median raphe nucleus: Implications for the action of anxiolytics. **European Neuropsychopharmacology**, v. 16, n. 8, p. 612–619, dez. 2006.

KAUFMANN, C. N. et al. Long-Term Use of Benzodiazepines and Nonbenzodiazepine Hypnotics, 1999–2014. **Psychiatric Services**, v. 69, n. 2, p. 235–238, 1 fev. 2018.

KESSLER, R. C. et al. Twelve-month and lifetime prevalence and lifetime morbid risk of anxiety and mood disorders in the United States. **International Journal of Methods in Psychiatric Research**, v. 21, n. 3, p. 169–184, set. 2012.

KILB, W. Neuroscientist Development of the GABAergic System from Birth to Adolescence Development of the GABAergic System from Birth to Adolescence. **The Neuroscientist**, v. 18, p. 613–630, 2012.

KIM, C. et al. Midazolam depresses carotid body chemoreceptor activity. **Acta Anaesthesiologica Scandinavica**, v. 50, n. 2, p. 144–149, fev. 2006.

KINNEY, H. C. et al. The development of the medullary serotonergic system in early human life. **Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical**, v. 132, n. 1–2, p. 81–102, 30 mar. 2007.

KINNEY, H. C.; THACH, B. T. **Medical progress: The sudden infant death syndrome** **New England Journal of Medicine** Massachusetts Medical Society, , 20 ago. 2009.

KOBAYASHI, K.; LEMKE, R. P.; GREER, J. J. Ultrasound measurements of fetal breathing movements in the rat. **Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)**, v. 91, n. 1, p. 316–20, jul. 2001.

KOHN, R. et al. Los trastornos mentales en América Latina y el Caribe: asunto

prioritario para la salud pública. **Revista Panamericana de Salud Pública**, v. 18, n. 4–5, p. 229–240, nov. 2005.

KUWANA, S. et al. Disturbance of neural respiratory control in neonatal mice lacking GABA synthesizing enzyme 67-kDa isoform of glutamic acid decarboxylase. **Neuroscience**, v. 120, n. 3, p. 861–870, 1 set. 2003.

KUWANA, S. et al. Electrophysiological and morphological characteristics of GABAergic respiratory neurons in the mouse pre-Bötzinger complex. **The European journal of neuroscience**, v. 23, n. 3, p. 667–74, fev. 2006.

KVETNANSKY, R.; SABBAN, E. L.; PALKOVITS, M. Catecholaminergic systems in stress: Structural and molecular genetic approaches. **Physiological Reviews**, v. 89, n. 2, p. 535–606, 2009.

LAURENT, J. P. et al. Reduction by two benzodiazepines and pentobarbitone of the multiunit activity in substantia nigra, hippocampus, nucleus locus coeruleus and nucleus raphé dorsalis of encéphale isolé rats. **Neuropharmacology**, v. 22, n. 4, p. 501–511, 1983.

LEIRÃO, I. P. et al. Hypercapnia-induced active expiration increases in sleep and enhances ventilation in unanaesthetized rats. **Journal of Physiology**, v. 596, n. 15, p. 3271–3283, 2018.

LI, A.; NATTIE, E. Catecholamine neurones in rats modulate sleep, breathing, central chemoreception and breathing variability. **Journal of Physiology**, v. 570, n. 2, p. 385–396, 2006.

LI, A.; ZHOU, S.; NATTIE, E. Simultaneous inhibition of caudal medullary raphe and retrotrapezoid nucleus decreases breathing and the CO₂ response in conscious rats. **Journal of Physiology**, v. 577, n. 1, p. 307–318, 2006.

LIU, Q. et al. Postnatal development of metabolic rate during normoxia and acute hypoxia in rats: Implication for a sensitive period. **Journal of Applied Physiology**, v. 106, n. 4, p. 1212–1222, abr. 2009.

LIU, Q.; WONG-RILEY, M. T. T. Postnatal developmental expressions of neurotransmitters and receptors in various brain stem nuclei of rats. **Journal of Applied Physiology**, v. 98, n. 4, p. 1442–1457, abr. 2005.

LIU, Q.; WONG-RILEY, M. T. T. Developmental changes in the expression of GABAA receptor subunits $\alpha 1$, $\alpha 2$, and $\alpha 3$ in brain stem nuclei of rats. **Brain Research**, v. 1098, n. 1, p. 129–138, 2006.

LIU, Q.; WONG-RILEY, M. T. T. Postnatal development of Na⁺-K⁺-2Cl⁻ co-transporter 1 and K⁺-Cl⁻ co-transporter 2 immunoreactivity in multiple brain stem respiratory nuclei of the rat. **Neuroscience**, v. 210, n. 1, p. 1–20, 2012.

LUBICS, A. et al. Neurological reflexes and early motor behavior in rats subjected to neonatal hypoxic-ischemic injury. **Behavioural brain research**, v. 157, n. 1, p. 157–65, 10 fev. 2005.

LUPATTELLI, A. et al. Association of Maternal Use of Benzodiazepines and Z-Hypnotics During Pregnancy With Motor and Communication Skills and Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder Symptoms in Preschoolers. **JAMA network open**, v. 2, n. 4, p. e191435, 5 abr. 2019.

MARCHENKO, V. et al. Perturbations of respiratory rhythm and pattern by

disrupting synaptic inhibition within pre-Bötzing and Bötzing complexes. **eNeuro**, v. 3, n. 2, p. 3033–3046, 2016.

MARINHO, F. et al. Burden of disease in Brazil, 1990–2016: a systematic subnational analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. **The Lancet**, v. 392, n. 10149, p. 760–775, 2018.

MASNEUF, S. et al. Role of α 1- and α 2-GABA receptors in mediating the respiratory changes associated with benzodiazepine sedation. **British Journal of Pharmacology**, v. 166, n. 1, p. 339–348, 2012.

MCCALL, J. G. et al. CRH Engagement of the Locus Coeruleus Noradrenergic System Mediates Stress-Induced Anxiety. **Neuron**, v. 87, n. 3, p. 605–20, 5 ago. 2015.

MEENA, H. et al. GABA receptors in nucleus accumbens shell mediate the hyperphagia and weight gain following haloperidol treatment in rats. **Life Sciences**, v. 84, n. 5–6, p. 156–163, 2009.

MESSIER, M. L.; LI, A.; NATTIE, E. E. Muscimol inhibition of medullary raphé neurons decreases the CO₂ response and alters sleep in newborn piglets. **Respiratory Physiology and Neurobiology**, v. 133, n. 3, p. 197–214, 19 nov. 2002.

MILES, R. Neurobiology. A homeostatic switch. **Nature**, v. 397, n. 6716, p. 215–6, 21 jan. 1999.

MILLHORN, D. E. et al. Extent of colocalization of serotonin and GABA in neurons of the ventral medulla oblongata in rat. **Brain research**, v. 461, n. 1, p. 169–74, 27 set. 1988.

MISU, Y.; YUE, J. L.; GOSHIMA, Y. 1-DOPA systems for blood pressure regulation in the lower brainstem. **Neuroscience Research**, v. 23, n. 2, p. 147–158, 1995.

MOON, R. Y.; HORNE, R. S.; HAUCK, F. R. Sudden infant death syndrome. **The Lancet**, v. 370, n. 9598, p. 1578–1587, 3 nov. 2007.

MORGADO-VALLE, C.; BACA, S. M.; FELDMAN, J. L. Glycinergic pacemaker neurons in preBötzing complex of neonatal mouse. **The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 30, n. 10, p. 3634–9, 10 mar. 2010.

MORTOLA, J. P. Breathing pattern in newborns. **Journal of Applied Physiology**, v. 56, n. 6, p. 1533–1540, jun. 1984.

MORTOLA, J. P.; FRAPPELL, P. B. Measurements of air ventilation in small vertebrates. **Respiratory physiology & neurobiology**, v. 186, n. 2, p. 197–205, 1 abr. 2013.

MYLLYNEN, P.; VÄHÄKANGAS, K. An examination of whether human placental perfusion allows accurate prediction of placental drug transport: studies with diazepam. **Journal of pharmacological and toxicological methods**, v. 48, n. 3, p. 131–8, 2002.

NATTIE, E. E. et al. Medullary serotonergic neurones and adjacent neurones that express neurokinin-1 receptors are both involved in chemoreception in vivo. **Journal of Physiology**, v. 556, n. 1, p. 235–253, 1 abr. 2004.

NATTIE, E.; LI, A. Central chemoreceptors: locations and functions. **Comprehensive Physiology**, v. 2, n. 1, p. 221–54, jan. 2012.

NEUTEL, C. I. **The epidemiology of long-term benzodiazepine use***International Review of Psychiatry*, jun. 2005.

NICOSIA, A. et al. Long-lasting behavioral changes induced by pre- or neonatal exposure to diazepam in rats. **European Journal of Pharmacology**, v. 469, n. 1–3, p. 103–109, 2003.

NIXON, G. M.; BROUILLETTE, R. T. Sleep and breathing in Prader-Willi syndrome. **Pediatric Pulmonology**, v. 34, n. 3, p. 209–217, set. 2002.

NUTT, D. J.; MALIZIA, A. L. New insights into the role of the GABA A α benzodiazepine receptor in psychiatric disorder. **British Journal of Psychiatry**, v. 179, p. 390–396, 2001.

OGAWA, Y.; TAKESHIMA, N.; FURUKAWA, T. A. Maternal exposure to benzodiazepine and risk of preterm birth and low birth weight: A case-control study using a claims database in Japan. **Asia-Pacific Psychiatry**, v. 10, n. 3, p. e12309, 1 set. 2018.

OOMORI, Y. et al. Immunohistochemical and histochemical evidence for the presence of noradrenaline, serotonin and gamma-aminobutyric acid in chief cells of the mouse carotid body. **Cell and Tissue Research**, v. 278, n. 2, p. 249–254, nov. 1994.

ORELLANA, J. D. Y. et al. Transtornos mentais em adolescentes, jovens e adultos do Consórcio de Coortes de Nascimento brasileiras RPS (Ribeirão Preto, Pelotas e São Luís). **Cadernos de saude publica**, v. 36, n. 2, p. e00154319, 2020.

PAGLIARDINI, S.; REN, J.; GREER, J. J. Ontogeny of the pre-Bötzing complex in perinatal rats. **The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 23, n. 29, p. 9575–84, 22 out. 2003.

PASQUALE-STYLES, M. A.; TACKITT, P. L.; SCHMIDT, C. J. Infant death scene investigation and the assessment of potential risk factors for asphyxia: a review of 209 sudden unexpected infant deaths. **Journal of forensic sciences**, v. 52, n. 4, p. 924–929, jul. 2007.

PATRONE, L. G. A. et al. Brainstem catecholaminergic neurones and breathing control during postnatal development in male and female rats. **The Journal of Physiology**, v. 596, n. 15, p. 3299–3325, ago. 2018.

PATRONE, L. G. A. et al. An age- and sex-dependent role of catecholaminergic neurons in the control of breathing and hypoxic chemoreflex during postnatal development. **Brain Research**, v. 1726, 1 jan. 2020.

PATTYN, A. et al. The homeobox gene Phox2b is essential for the development of autonomic neural crest derivatives. **Nature**, v. 399, n. 6734, p. 366–370, 27 maio 1999.

PENATTI, E. M. et al. Ventilatory response to hypercapnia and hypoxia after extensive lesion of medullary serotonergic neurons in newborn conscious piglets. **Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)**, v. 101, n. 4, p. 1177–88, out. 2006.

PICARD, N. et al. Prenatal Diazepam Exposure Alters Respiratory Control System and GABA A and Adenosine Receptor Gene Expression in Newborn Rats. **Pediatr Res**, v. 64, n. 1, p. 44–49, 2008a.

PICARD, N. et al. Prenatal diazepam exposure alters respiratory control system and GABA and adenosine receptor gene expression in newborn rats. **Pediatric Research**, v. 64, n. 1, p. 44–49, 2008b.

PIEK, J. P. The role of variability in early motor development. **Infant Behavior and Development**, v. 25, n. 4, p. 452–465, 2002.

PTAK, K. et al. Raphe neurons stimulate respiratory circuit activity by multiple mechanisms via endogenously released serotonin and substance p. **Journal of Neuroscience**, v. 29, n. 12, p. 3720–3737, 25 mar. 2009.

QUINTANA, M. I. et al. Psychotropic drug use in São Paulo, Brazil—an epidemiological survey. **PLoS ONE**, v. 10, n. 8, 7 ago. 2015.

RADOJČIĆ, M. R. et al. Prenatal exposure to anxiolytic and hypnotic medication in relation to behavioral problems in childhood: A population-based cohort study. **Neurotoxicology and Teratology**, v. 61, p. 58–65, 1 maio 2017.

REDMOND, D. E.; HUANG, Y. H. Current concepts. II. New evidence for a locus coeruleus-norepinephrine connection with anxiety. **Life sciences**, v. 25, n. 26, p. 2149–62, 24 dez. 1979.

RICHERSON, G. B. **Serotonergic neurons as carbon dioxide sensors that maintain pH homeostasis** *Nature Reviews Neuroscience* Nature Publishing Group, , 2004.

RIVERA, C. et al. The K⁺/Cl⁻ co-transporter KCC2 renders GABA hyperpolarizing during neuronal maturation. **Nature**, v. 397, n. 6716, p. 251–255, 21 jan. 1999.

RIVERA, C.; VOIPIO, J.; KAILA, K. Two developmental switches in GABAergic signalling: The K⁺-Cl⁻ cotransporter KCC2 and carbonic anhydrase CAVII. **Journal of Physiology**, v. 562, n. 1, p. 27–36, 2005.

RODRIGUEZ-ZAFRA, M. et al. Effects of perinatal diazepam exposure on the sexually dimorphic rat locus coeruleus. **Neurotoxicology and Teratology**, v. 15, n. 2, p. 139–144, 1993.

ROY-BYRNE, P. Treatment-refractory anxiety; definition, risk factors, and treatment challenges. **Dialogues in Clinical Neuroscience**, v. 17, n. 2, p. 191–206, 2015.

RUDOLF, M. et al. Depression of central respiratory drive by nitrazepam. **Thorax**, v. 33, n. 1, p. 97–100, 1978.

SAITO, V. M.; BRANDÃO, M. L. The light switch-off response as a putative rodent test of innate fear. **Neuroscience**, v. 334, p. 160–165, 2016.

SANGHERA, M. K.; GERMAN, D. C. The effects of benzodiazepine and non-benzodiazepine anxiolytics on locus coeruleus unit activity. **Journal of Neural Transmission**, v. 57, n. 4, p. 267–279, dez. 1983.

SCHREIHOFFER, A. M.; STORNETTA, R. L.; GUYENET, P. G. Evidence for glycinergic respiratory neurons: Bötzing neurons express mRNA for glycinergic transporter 2. **The Journal of comparative neurology**, v. 407, n. 4, p. 583–97, 17 maio 1999.

SEGOVIA, S. et al. Early postnatal diazepam exposure alters sex differences in the rat brain. **Brain Research Bulletin**, v. 26, n. 6, p. 899–907, 1991.

SHEEHY, O.; ZHAO, J.-P.; BÉRARD, A. Association Between Incident Exposure to Benzodiazepines in Early Pregnancy and Risk of Spontaneous Abortion. **JAMA Psychiatry**, 15 maio 2019.

SHEKHAR, A. et al. Role of norepinephrine in the dorsomedial hypothalamic panic response: an in vivo microdialysis study. **Pharmacology, biochemistry, and behavior**, v. 71, n. 3, p. 493–500, mar. 2002.

SHYKEN, J. M. et al. Benzodiazepines in Pregnancy. **Clinical Obstetrics and Gynecology**, v. 62, n. 1, p. 156–167, 2019.

SILVA, M. M. DE J. et al. Anxiety in pregnancy: Prevalence and associated factors. **Revista da Escola de Enfermagem**, v. 51, 2017.

SMITH, A.; GOFFMAN, L. Stability and patterning of speech movement sequences in children and adults. **Journal of Speech, Language, and Hearing Research**, v. 41, n. 1, p. 18–30, 1998.

SMITH, J. C. et al. Pre-Bötzinger complex: a brainstem region that may generate respiratory rhythm in mammals. **Science (New York, N.Y.)**, v. 254, n. 5032, p. 726–9, 1 nov. 1991.

SMITH, J. C. et al. Spatial and Functional Architecture of the Mammalian Brain Stem Respiratory Network: A Hierarchy of Three Oscillatory Mechanisms. **Journal of Neurophysiology**, v. 98, n. 6, p. 3370–3387, 2007.

STARCEVIC, V. The reappraisal of benzodiazepines in the treatment of anxiety and related disorders. **Expert Review of Neurotherapeutics**, v. 14, n. 11, p. 1275–1286, 22 nov. 2014.

STEEL, Z. et al. The global prevalence of common mental disorders: A systematic review and meta-analysis 1980-2013. **International Journal of Epidemiology**, v. 43, n. 2, p. 476–493, 2014.

STEINBUSCH, H. W.; NIEUWENHUYNS, R. **Localization of serotonin-like immunoreactivity in the central nervous system and pituitary of the rat, with special references to the innervation of the hypothalamus.** *Advances in Experimental Medicine and Biology* Adv Exp Med Biol, , 1981. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7032251/>>. Acesso em: 31 jul. 2020

SUNDBAKK, L. M. et al. Impact of prenatal exposure to benzodiazepines and z-hypnotics on behavioral problems at 5 years of age: A study from the Norwegian Mother and Child Cohort Study. **PLoS ONE**, v. 14, n. 6, 1 jun. 2019.

SUZUE, T. Mouse fetuses in late gestation maintained in vitro by a transplacental perfusion method and their physiological activities. **Neuroscience research**, v. 21, n. 2, p. 173–6, dez. 1994.

TAKAKURA, A. C. et al. Control of breathing and blood pressure by parafacial neurons in conscious rats. **Experimental Physiology**, v. 98, n. 1, p. 304–315, 2013.

TAKATARO, H. et al. [How do diazepam and flumazenil influence respiratory control by the activities of both hypoglossal and phrenic nerves in rabbits?]. **Masui. The Japanese Journal of Anesthesiology**, v. 52, n. 12, p. 1286–1292, 1 dez. 2003.

TANAKA, J. et al. GABAergic systems in the nucleus tractus solitarius regulate noradrenaline release in the subfornical organ area in the rat. **Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical**, v. 100, n. 1–2, p. 58–65, 30 set. 2002.

TAO, R.; MA, Z.; AUERBACH, S. B. Differential regulation of 5-hydroxytryptamine release by GABA(A) and GABA(B) receptors in midbrain raphe nuclei and forebrain of rats. **British Journal of Pharmacology**, v. 119, n. 7, p. 1375–

1384, 1996.

TEIXEIRA, C. et al. Anxiety and depression during pregnancy in women and men. **Journal of Affective Disorders**, v. 119, n. 1–3, p. 142–148, 1 dez. 2009.

TERAN, F. A.; MASSEY, C. A.; RICHERSON, G. B. Serotonin neurons and central respiratory chemoreception: where are we now? **Progress in brain research**, v. 209, p. 207–33, 2014.

THELEN, E. Motor development. A new synthesis. **The American psychologist**, v. 50, n. 2, p. 79–95, fev. 1995.

THELEN, E.; SMITH, L. B. **A dynamic systems approach to the development of cognition and action, 1994** Cambridge, MA: MIT Press, , 1994.

THIBAUT, F. **Anxiety disorders: A review of current literature** *Dialogues in Clinical Neuroscience* Les Laboratoires Seriver, , 2017.

THOBY-BRISSON, M. et al. Emergence of the Pre-Botzinger Respiratory Rhythm Generator in the Mouse Embryo. **Journal of Neuroscience**, v. 25, n. 17, p. 4307–4318, 27 abr. 2005.

THOBY-BRISSON, M. et al. Genetic identification of an embryonic parafacial oscillator coupling to the preBötzing complex. **Nature Neuroscience**, v. 12, n. 8, p. 1028–1035, 5 ago. 2009.

TINKER, S. C. et al. Use of benzodiazepine medications during pregnancy and potential risk for birth defects, National Birth Defects Prevention Study, 1997–2011. **Birth Defects Research**, v. 111, n. 10, p. 613–620, 19 jun. 2019.

TOUWEN, B. C. L. VARIABILITY AND STEREOTYPY OF SPONTANEOUS MOTILITY AS A PREDICTOR OF NEUROLOGICAL DEVELOPMENT OF PRETERM INFANTS. **Developmental Medicine & Child Neurology**, v. 32, n. 6, p. 501–508, 1990.

TURVEY, M. T.; FITZPATRICK, P. **Commentary: Development of Perception-Action Systems and General Principles of Pattern Formation** *Child Development* Child Dev, , 1993. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8404263/>>. Acesso em: 4 ago. 2020

VAN DER HEIJDEN, M. E.; ZOGHBI, H. Y. Development of the brainstem respiratory circuit. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Developmental Biology**, v. 9, n. 3, p. 1–15, 2020.

VIEMARI, J. C. et al. Phox2a Gene, A6 Neurons, and Noradrenaline Are Essential for Development of Normal Respiratory Rhythm in Mice. **Journal of Neuroscience**, v. 24, n. 4, p. 928–937, 2004.

VIEMARI, J. C. et al. Ret deficiency in mice impairs the development of A5 and A6 neurons and the functional maturation of the respiratory rhythm. **European Journal of Neuroscience**, v. 22, n. 10, p. 2403–2412, 2005.

VISWASAM, K.; ESLICK, G. D.; STARCEVIC, V. Prevalence, onset and course of anxiety disorders during pregnancy: A systematic review and meta analysis. **Journal of Affective Disorders**, v. 255, p. 27–40, 1 ago. 2019.

VOS, T. et al. Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 328 diseases and injuries for 195 countries, 1990-2016: A

systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. **The Lancet**, v. 390, n. 10100, p. 1211–1259, 16 set. 2017.

WALSH, B.; SMITH, A. Articulatory movements in adolescents: evidence for protracted development of speech motor control processes. **Journal of speech, language, and hearing research : JSLHR**, v. 45, n. 6, p. 1119–33, 2002.

WANG, X. et al. Laser ablation of Dbx1 neurons in the pre-Bötzinger complex stops inspiratory rhythm and impairs output in neonatal mice. **eLife**, v. 3, p. e03427, 15 jul. 2014.

WENZEL, A. et al. The occurrence of panic and obsessive compulsive symptoms in women with postpartum dysphoria: A prospective study. **Archives of Women's Mental Health**, v. 4, n. 1, p. 5–12, 2001.

WENZEL, A. et al. Anxiety symptoms and disorders at eight weeks postpartum. **Journal of Anxiety Disorders**, v. 19, n. 3, p. 295–311, 2005.

WETTSTEIN, J. G.; TEEPLE, E. S.; MORSE, W. H. Respiratory effects of benzodiazepine-related drugs in awake rhesus monkeys. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 255, n. 3, p. 1328 LP – 1334, 1 dez. 1990.

WONG-RILEY, M. T. T.; LIU, Q. Neurochemical and physiological correlates of a critical period of respiratory development in the rat. **Respir Physiol Neurobiol**, v. 164, n. 414, p. 28–37, 2008.

WONG-RILEY, M. T. T.; LIU, Q.; GAO, X. Peripheral-central chemoreceptor interaction and the significance of a critical period in the development of respiratory control. **Respiratory physiology & neurobiology**, v. 185, n. 1, p. 156–69, 1 jan. 2013.

WU, J. et al. A V0 core neuronal circuit for inspiration. **Nature Communications**, v. 8, n. 1, p. 544, 15 dez. 2017.

YACKLE, K. et al. Breathing control center neurons that promote arousal in mice. **Science (New York, N.Y.)**, v. 355, n. 6332, p. 1411–1415, 2017.

YIU, M. K.; KWAN, Y. W.; NGAN, M. P. Hormonal modulation of benzodiazepines' actions on rat isolated uterus. **European Journal of Pharmacology**, v. 302, n. 1–3, p. 99–108, 1996.

YONKERS, K. A. et al. Association of Panic Disorder, Generalized Anxiety Disorder, and Benzodiazepine Treatment During Pregnancy With Risk of Adverse Birth Outcomes. **JAMA psychiatry**, v. 74, n. 11, p. 1145–1152, 2017a.

YONKERS, K. A. et al. Association of Panic Disorder, Generalized Anxiety Disorder, and Benzodiazepine Treatment During Pregnancy With Risk of Adverse Birth Outcomes. **JAMA psychiatry**, v. 74, n. 11, p. 1145–1152, 2017b.

ZANELLA, S. et al. Possible modulation of the mouse respiratory rhythm generator by A1/C1 neurones. **Respiratory Physiology and Neurobiology**, v. 153, n. 2, p. 126–138, 2006.

ZANELLA, S. et al. Necdin plays a role in the serotonergic modulation of the mouse respiratory network: Implication for Prader-Willi syndrome. **Journal of Neuroscience**, v. 28, n. 7, p. 1745–1755, 13 fev. 2008.

ZHAO, J.; GONZALEZ, F.; MU, D. **Apnea of prematurity: From cause to treatment** **European Journal of Pediatrics** Eur J Pediatr, , set. 2011. Disponível em:

<<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21301866/>>. Acesso em: 13 jul. 2020

CAPÍTULO 2 – MANUSCRITO

Prenatal diazepam exposure effects on ventilation, metabolism, and monoaminergic system of neonate and young rats

Carlos Aparecido da Silva Junior¹, Vivian Biancardi², Luís Gustavo A. Patrone¹, Kênia C. Bícigo¹, Luciane H. Gargaglioni^{1*}

¹Department of Animal Morphology and Physiology, FCAV – UNESP – São Paulo State University

²Department of Physiology, Faculty of Medicine and Dentistry, University of Alberta

*Corresponding Author: Via de acesso Paulo Donato Castellane s/n, 14870-000, Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Jaboticabal, SP, Brasil. Telephone: 55 16 32095347 E-mail: luciane.gargaglioni@unesp.br

Keywords: development, benzodiazepine, chemosensitivity, GABA, breathing

Running Title: Prenatal diazepam and breathing control

ABSTRACT

Anxiety disorders occur in general population, with the highest prevalence rates for women. Pregnancy, as one of the important periods in a woman's life, is affected by these disorders, with panic disorder and generalized anxiety as the most common. Benzodiazepines, especially Diazepam (DZP), have been used for maternal therapy, and cross the placental barrier and can interact with the fetus' GABAergic system, promoting postnatal changes in the respiratory control system. Here, we evaluated ventilation (\dot{V}_E), oxygen consumption ($\dot{V}O_2$) and air convection requirement ($\dot{V}_E/\dot{V}O_2$) in resting conditions and under exposure to hypercapnia (7% CO₂) and hypoxia (10% O₂) of newborn (P0-1 and P12-13) and young (P21-22) rats from mothers submitted to DZP (1 mg/Kg/day) during pregnancy. We also analyzed the number of 5-HT and tyrosine hydroxylase (TH) immunoreactive neurons in the brainstem of P12-13 animals. Deleterious effects were observed in the mothers exposed to DZP, such as delayed delivery, delivery of a dead pup, dead pups inside the abdominal cavity. Diazepam exposure has minimal effects on room air breathing variables in females but caused a remarkable hypoventilation (drop in $\dot{V}_E/\dot{V}O_2$) in P12-13 males, that lasted until P21-22. Hypercapnic ventilatory response was attenuated in DZP P0-1 and P12-13 treated females mainly by a decrease in tidal volume, whereas males had reduction in respiratory frequency at P12-13. There were minimal effects of DZP exposure on hypoxic ventilatory response, observed as an attenuation in \dot{V}_E in P12-13 males. No difference in ventilatory and metabolic responses to hypoxia and hypercapnia were observed in juvenile rats in both sexes; however, both males and females presented a higher body mass. At P12-13, both DZP-treated females and males presented lower number of catecholaminergic neurons, particularly in A6 nuclei, as well males had fewer neurons in *raphe obscurus* and *magnus*. Our results suggest that prenatal

DZP exposure may have harmful effects on birth outcomes, impacts breathing control throughout development, and increases body mass at juvenile age.

INTRODUCTION

Women are more susceptible to the development of anxiety disorders than men, and it becomes more prevalent during the pregnancy period, as they go under a psychophysiological transition (Freeman et al., 2018; Ghaffar et al., 2017). Literature data reports that generalized anxiety disorder is the most prevalent disorder, followed by panic attacks, with phobias less prevalent in pregnant women (Goodman; Chenausky; Freeman, 2014; Viswasam; Eslick; Starcevic, 2019; Yonkers et al., 2017).

Anxiety disorders treatment may vary according to the disorder that affects the patient, and they are mainly based on pharmacological treatment (El-Guebaly; Sareen; Stein, 2010; Roy-Byrne, 2015), cognitive behavioral therapy (Olatunji; Cisler; Deacon, 2010), or both in combination. Benzodiazepines are one of the class of drugs used because of their consistent efficacy and rapid mechanism of action in alleviating anxiety symptoms compared to other medications (Bandelow; Michaelis; Wedekind, 2017; Bateson, 2004; Shyken et al., 2019; Starcevic, 2014), although selective serotonin reuptake inhibitors are also prescribed to treat anxiety disorders, or sometimes both in association (Birkett et al., 2011).

As a benzodiazepine, Diazepam (DZP) acts as an allosteric modulator, increasing the GABA (gamma-aminobutyric acid) binding on GABA_A receptors which increases the frequency of chloride channel opening causing cell hyperpolarization (Calcaterra; Barrow, 2014). DZP easily crosses the placenta (Freeman et al., 2018; Sheehy; Zhao; Bérard, 2019) and reaches the fetus, where it substantially accumulates in the brain (Picard et al., 2008). The potential risk of benzodiazepines prescription to the fetus are related to malformations, cognitive and behavioral impairments and higher rates of admissions in neonatal intensive care unit, although the data are not conclusive (Freeman et al., 2018; Iqbal; Sobhan; Ryals, 2002; Ogawa; Takeshima; Furukawa, 2018; Radojčić

et al., 2017; Sheehy; Zhao; Bérard, 2019; Sundbakk et al., 2019; Yonkers et al., 2017). Gestation is an important period for the development of the respiratory control system (Greer; Funk; Ballanyi, 2006; Hilaire; Duron, 1999) and interventions, such as the use of DZP for treatment of anxiety disorders, at this stage, may compromise this system.

GABA plays an crucial trophic role in brain development, stimulating the migration of neuronal cell isolated from embryonic rat spinal cords (Behar et al., 1994), and it goes through changes in its activity since GABA action at GABA_A receptors in fetal brains results in depolarization, whereas hyperpolarization is characteristic of GABA action in mature brains (Ghali; Beshay, 2019; Rivera; Voipio; Kaila, 2005). This is associated with a gradual replacement between co-transporter channels for sodium, chloride, and potassium, such as NKCC1 (early development) to KCC2 (later in the development), in around the 10th and 14th days of postnatal life (Herlenius; Lagercrantz, 2004; Liu; Wong-Riley, 2005, 2006; Moon; Horne; Hauck, 2007; Rivera et al., 1999; Rivera; Voipio; Kaila, 2005; Wong-Riley; Liu, 2008; Wong-Riley; Liu; Gao, 2013).

It has been recognized that inhibitory neurotransmission plays an important role in shaping motor output, modulating respiration *in vivo* and *in vitro* (Feldman; Kam, 2015; Kuwana et al., 2003). Furthermore, GABAergic signaling is also important for CO₂ and O₂ ventilatory responses, as it acts on and modulates the peripheral (carotid body) and central (retrotrapezoid nucleus, *raphe*, and *Locus Coeruleus* – LC) chemoreceptors, decreasing the ventilatory responses this gaseous challenges (De Carvalho et al., 2010; De Carvalho et al., 2014; Guyenet, 2014; Iceman et al., 2014; Mosher; Taylor; Harris, 2014; Takakura et al., 2013). GABAergic system also modulates the catecholaminergic and serotonergic systems regulating the release of noradrenaline and serotonin from these brainstem nuclei and reduces their neuronal firing rates (Becquet et al., 1993; Bowery; Hudson; Price, 1987; Brambilla et al., 2003; Breton-Provencher; Sur, 2019;

Fuxe et al., 1975; Judge; Young; Gartside, 2006; Levine; Jacobs, 1992; Pan; Williams, 1989; Tanaka et al., 2002; Tao; Ma; Auerbach, 1996). Therefore, any disturbances in the GABA system during early development could lead to changes in cell excitability as well as in the respiratory network control.

Indeed, Picard et al. (2008) demonstrated that prenatal exposure to DZP (2mg/Kg/day) decreased the breathing frequency and increased the tidal volume in normoxic, and decreased the hypoxic ventilation in P0-2 rats *in vivo*. Moreover, the authors demonstrated changes in the expression of genes that code for the GABA_A receptor $\alpha 1$ and $\alpha 2$ subunits, which could impact maturation of respiratory related regions (Liu; Wong-Riley, 2006). They concluded that prenatal exposure to DZP influences the development of neural networks. However, the authors did not verify whether the effects observed persisted during the development and if the chemosensitivity to CO₂ and O₂ is altered. Further, they only used males and it has long been recognized that sex can affect breathing control and the susceptibility for some respiratory diseases. There is evidence of sex-related bias in many aspects, such as brain organization and neurotransmission in humans and animals (Gargaglioni; Marques; Patrone, 2019). Moreover, early DZP exposure affects sexual differentiation of the brain (Kellogg, 1999; Segovia et al., 1991). Therefore, our aim was to evaluate possible sex-specific changes in respiratory control after birth caused by intrauterine exposure to Diazepam, assessing the ventilatory and metabolic responses of neonate and juvenile female and male rats during resting, hypercapnia and hypoxia exposure conditions, as well as evaluate changes in neuronal populations from respiratory related regions.

Our results shows that rats undergoing DZP treatment had harmful obstetrical effects on labor, as well it promotes sex-specific differences on breathing control, marked by an attenuation of hypercapnic ventilatory responses in females in early stages and

hypoventilation at air breathing conditions in males at early and juvenile ages. Data on breathing control is suggested to be correlated to the reductions on catecholaminergic and serotonergic neurons of females and males, respectively. Results reported here broaden our knowledge to better understand the occurrence events like the Sudden Infant Death Syndrome (SIDS).

MATERIALS AND METHODS

Animals

Pregnant Wistar female rats (250g – 280g), experiencing their first pregnancy, and their litters were used, from postnatal day (P) 0 to 1 (P0-1), 12 to 13 (P12-13) and 21 to 22 (P21-22). All pups were born in the vivarium at the Faculty of Agricultural and Veterinary Sciences (FCAV-UNESP, Jaboticabal campus) and were housed in a temperature controlled chamber (ALE 9902001; Alesco Ltda, Monte Mor, SP, Brazil) maintained at $24 \pm 1^\circ\text{C}$ and subjected to a 12 / 12h light / dark cycle (lights on 6:30 am and off 6:30 pm). The rats had free access to water and food and the experiments were performed between 8:00 am and 6:00 pm during the light phase. The sex determination of each neonate was performed on the day of birth and confirmed on the day of each experiment. The study was conducted in compliance with the guidelines of the National Council of Control in Animal Experimentation (CONCEA-MCT-Brazil) with the approval of the Faculty of Agricultural and Veterinary Sciences Animal Care and Use Committee (CEUA-FCAV-UNESP-Jaboticabal campus; Protocol: 2164/17).

Drugs and surgical procedure

Pregnant rats and their pups were randomly divided into two groups: (i) those receiving vehicle (40% propylene glycol, 1.5% benzyl alcohol, 10% ethyl alcohol, 5% sodium benzoate, 5% benzoic acid and water for injection, CTRL group); (ii) and those

receiving DZP at a concentration of 1 mg/Kg/day (DZP group). This dose was chosen by its clinical relevance and the possible effects on breathing and neuronal development, while higher doses were avoided as they could cause considerable deleterious effects on pregnancy or birth defects, greater than those already observed in the present study, impairing the results outcome (Picard et al., 2008; Saito; Brandão, 2015).

Diazepam or its vehicle were administrated to pregnant rats from embryonic day 0 (E0) to the end of gestation (E21), using an osmotic pump (Alzet Osmotic Pumps, Cupertino, CA, USA model 2ML4) that delivered the drug at a rate of 2.5 μ L/hr. The osmotic pump was filled with the vehicle or DZP at least 6 hours before being implanted in the animal and was kept in a saline solution (0.9%), heated to 37 °C, to start its operation. The osmotic pump was implanted on the dorsum of pregnant rats after finding sperm via vaginal swab at the E0. To perform the osmotic pump implantation, the animals were kept under isoflurane anesthesia (3% for induction and 1.5% for maintenance, with oxygen) throughout the whole surgery. A trichotomy was performed on the back of the animal and a small incision (1.5 cm length) was made to place the pump subcutaneously. Alcohol (70%) and chlorhexidine were used for asepsis of the region. At the end, a sterile suture needle was used to close the cut. This procedure has a maximum duration of 10 minutes. The osmotic pump was removed at E21, 4 hours after litter delivery.

Chewing and righting reflexes

Chewing and righting reflexes were tested in neonates (P0) 4 hours after birth, to evaluate perinatal motor control. The number of jaw openings was counted by introducing a polyethylene tube (PE-50) into the newborn's mouth during 30s (Chatonnet et al., 2007; Jacquin et al., 1996) to assess the chewing reflex. Regarding the righting reflex, the pup was placed on its back and allowed to assume the normal upright position with all four

feet on the table (Lubics et al., 2005). To obtain comparable data, the reflexes analysis was performed by the same person throughout the study.

Measurements of ventilation

Ventilation (\dot{V}_E) of animals at ages P0-1 and P12-13 was determined using the pressure plethysmography method (“head-out” plethysmography) (Mortola; Frappell, 2013). P0-1 animals were placed in a 50 mL chamber, built from a syringe, and P12-13 animals were placed in an 80 mL chamber, built from a graduated cylinder. The head of the animals was placed in a second chamber of 15 ml and 30 ml, respectively. The two chambers were separated and sealed by a plastic film, which wraps around the neck region of the animal. The inlet and outlet flows were kept constant during the experiment (100 mL.min⁻¹ for P0-1 and 150 mL.min⁻¹ for P12-13) controlled by the gas analyzer pump (ADInstruments®, Sydney, Australia). The pressure signal generated by the movements of the rib cage inside the chamber with the animal's body was considered directly proportional to the tidal volume (V_T). Pressure oscillations caused by respiration was monitored by a pressure differential transducer (TSD 160A, Biopac Systems, Santa Barbara, CA - USA), the generated signal was sent to an amplifier (DA 100C, Biopac Systems) through a converter analog-digital data, and digitized on a computer equipped with data acquisition software (AqKnowledge MP 100, Biopac Systems, Inc., Santa Barbara, CA - USA). To convert the signal in volts to mL, air volumes of 0.2 mL for P0-1 and 0.4 mL for P12-13 were injected. The temperature inside the animal's chamber was controlled using an incubator (Premium Ecologica - IP 70A) determined to perform the experiments at 34 ° C for P0-1 and 30 ° C for P12-13 (Julien; Bairam; Joseph, 2008; Patrone et al., 2018). \dot{V}_E was calculated by the product of respiratory rate (f_R) by V_T and corrected by body mass in kilograms (Kg) of animals. This configuration allows us

measuring the ventilation in small vertebrates continuously without interrupting the air flow through the chamber.

Ventilation in juvenile animals (P21-22) was measured by whole-body plethysmography in a closed system (Drorbaugh; Fenn, 1955; Patrone et al., 2018). The animal was placed in a 1L Plexiglas experimental chamber and during each \dot{V}_E measurement, airflow was interrupted, and the animal's chamber was completely sealed for approximately 2 minutes. Outflow was maintained at $0.7 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$ measured by a flowmeter coupled to a suction pump (Mass Flow System - MFS, Sable Systems International, Inc., Las Vegas, USA). Chamber air temperature oscillations caused by respiration were measured as pressure oscillations because the inspired air volume is heated from the chamber temperature to body temperature and saturated with water vapor, while the exhaled tidal air volume is again cooled to chamber temperature. These pressure oscillations were collected by a pressure differential transducer (TSD 160A, Biopac Systems, Santa Barbara, CA - USA), connected to the animal chamber, amplified (DA 100C, Biopac Systems), passing through a converter analog-digital data, digitized on a computer equipped with a data acquisition and analysis program (AcqKnowledge MP 100, BioPac Systems, Inc., Santa Barbara, CA, USA). Two respiratory variables were measured: respiratory rate (f_R) and tidal volume (V_T), the latter being calculated using the Drorbaugh and Fenn (61) equation:

$$- V_T = V_K \times (P_T/P_K) \times T_C \times (P_B - P_C) / T_C \times (P_B - P_C) - T_A \times (P_B - P_R)$$

Where:

- V_T : tidal volume.
- V_K : Volume of air injected into the animal chamber for calibration.
- P_T : Pressure deflection associated with each volume of air flowing.
- P_K : Pressure deflection associated with the injected volume for calibration.

- T_C : Body temperature (in Kelvin).
- T_A : Air temperature inside the animal chamber.
- P_R : Water vapor pressure at T_C .
- P_B : Barometric pressure.
- P_C : Vapor pressure of water vapor in the animal chamber

\dot{V}_E was calculated by the product of respiratory frequency by tidal volume, corrected by animal's body mass in Kg. \dot{V}_E and V_T were presented at T_C , ambient barometric pressure, presuming air was fully saturated with water vapor (BTPS). P_K was obtained injecting a known volume of 1 mL using a syringe connected to the chamber. The P_C and P_R were calculated indirectly using an appropriate table (DEJOURS, 1981). The rectal temperature was measured as a body temperature inferences for P21-22 animals using a small straight ended temperature sensor (Thermistor Pod, ADi®).

Measurements of O₂ consumption

The indirect calorimetry method (oxygen consumption, $\dot{V}O_2$) by the Pull mode configuration was used to ascertain the metabolism through the open respirometry system (Cummings et al., 2011; Mortola, 1984; Patrone et al., 2018). An oxygen analyzer pump (ADInstruments®) was connected to the head chamber to control the outflow of the chamber (100 mL.min⁻¹ for P0-1; 150 mL.min⁻¹ for P12-13). For young animals (P21-22, 700 mL.min⁻¹) an MFS (Mass Flow System, Sable Systems International, USA) was coupled to the plethysmography chamber. The exhaled gas was dried through a short desiccant column (W.A. Hammond Drierite Co. Ltd, Xenia, OH, USA) before passing through the analyzer. Air was continuously sampled by the O₂ analyzer allowing the determination of the $\dot{V}O_2$ by the Power-Lab System data acquisition program (ADInstruments® / Chart Software, version 7.3, Sydney, Australia).

The oxygen consumption was calculated using the following formula (DEPOCAS; HART, 1957):

$$\dot{V}O_2 = [Fl*(FiO_2 - FeO_2)]/[(1 - FiO_2)*(1 - RQ)]$$

where: *Fl* is the input flow rate; *FiO₂* is the inspired O₂ fraction; *FeO₂* is the fraction of expired O₂. The respiratory quotient (RQ) is the ratio of carbon dioxide released to oxygen consumed ($\dot{V}CO_2/\dot{V}O_2$). The $\dot{V}O_2$ was normalized by body mass in Kg and the values were presented in mL of oxygen (min⁻¹/Kg⁻¹) in standard conditions of temperature, pressure, and dry air (STPD). $\dot{V}O_2$ was measured, and the ratio of carbon dioxide released to the oxygen consumed ($\dot{V}CO_2/\dot{V}O_2$), called the RQ, was assumed as 0.85, as with previous studies in literature (Raurich; Ibañez; Marse, 1989).

Determination and analysis of apnea events

Duration and number of apnea events were evaluated at P0-1, during normocapnic normoxic, hypercapnic and hypoxic conditions. An apnea event was defined as a pause in breathing for a time equivalent to two breaths, calculated for each animal, according to its own average respiratory rate during the gas challenges.

Immunofluorescence staining for tyrosine-hydroxylase (TH) and 5-hydroxytryptamine (5-HT)

P12-13 rats were deeply anaesthetized with ketamine (100 mg.Kg⁻¹ of ketamine, i.p.; União Química Farmacêutica Nacional S/A, São Paulo, Brazil) and perfused intracardially using a perfusion pump (Masterflex; Cole-Parmer Instrument Company, Vernon Hills, IL, USA) with phosphate buffer-saline solution (PBS) (0.01 M, pH 7.4), followed by 4% paraformaldehyde (PFA) diluted in 0.2 M phosphate buffer (PB), at the end of each ventilatory and metabolic measurements. The brain was removed from the

skullcap, post fixed with 4% PFA in 0.2 M PB, pH 7.4, at 4°C for 12 h, and then immersed in 30% sucrose solution for at least 48h at 4°C.

Serial sections measuring 35 μm were made using a cryostat microtome (CM1860 – Ag Protect; Leica, Wetzlar, Germany). The brain was immersed in 2-methylbutane (Sigma, St Louis, MO, USA), frozen (60s) and fixed in Tissue Tek OCT (Sakura Finetek, Torrance, CA, USA). The whole medulla and pons were sliced in triplicate, so that one of the triplicates was used to count the number neurons. The sections were kept in an antifreeze solution until the day they were used.

Immunofluorescence for tyrosine-hydroxylase (TH), and for 5-hydroxytryptamine (5-HT) were performed to locate and quantify the number of catecholaminergic (CA) and serotonergic (5-HT) neurons, respectively.

For this purpose, the sections were washed with PBS and then incubated during 30 min in a target retrieval solution (Dako, Glostrup, Denmark) at 70°C (in a water bath inside microtubes) for an antigenic recovery process. Next, the sections were washed in PBS again and then incubated in a solution of hydrogen peroxidase (H_2O_2) at 1.5% for at least 30 seconds. Subsequently, sections were incubated for 30 minutes in 1% bovine serum albumin, PBS, and 0.4% of triton, for preventing non-specific binding. These two last processes were repeated twice for the nonspecific blocking of antigens and were kept the same for the TH and 5-HT immunofluorescence.

For the TH immunofluorescence, the sections were incubated overnight in with a mouse monoclonal anti-TH antibody (dilution 1:500; Sigma Aldrich), followed by 3h of incubation with affinity-purified fluorescent dye-conjugated secondary antibody, goat anti-mouse IgG (Alexa Fluor 488; dilution 1:500, Jackson Immuno Research), at room temperature. For the 5-HT immunofluorescence, the sections were incubated overnight

with a rabbit monoclonal anti-5-HT antibody (dilution 1:500; Sigma Aldrich), followed by 3h of incubation with affinity-purified fluorescent dye-conjugated secondary antibody, goat anti-rabbit IgG (Alexa Fluor 594; dilution 1:500, Jackson Immuno Research), at room temperature. The sections were then washed with PBS and placed on a gelatin-coated microscope slides, following a caudal-rostral orientation, dried and sealed with an antifade solution (VECTASHIELD HardSet, antifade mounting medium, Vector Laboratories, USA).

Experimental protocols

Effect of prenatal exposure to Diazepam on ventilation and metabolism during normoxic normocapnia in neonatal (P0-1 and P12-13) and juvenile (P21-22) rats.

The animals were placed in a plethysmography chamber, initially ventilated with atmospheric air (21% O₂) for an acclimation period of at least 30 minutes and after that, ventilation and metabolism measurements were performed during 20 minutes for all ages. \dot{V}_E and $\dot{V}O_2$ were measured continuously for P0-1 and P12-13 and after closing the air flow for 2 minutes for P21-22.

Effect of prenatal exposure to Diazepam on ventilation during hypercapnia and hypoxia in neonatal (P0-1 and P12-13) and juvenile (P21-22) rats.

After basal ventilation measurements, the animals were exposed to hypercapnia for 20 minutes, where the chamber was ventilated with a gas mixture containing 7% CO₂, 21% O₂ and balanced with N₂ (White Martins Gases Industriais Ltda., Osasco, SP). Next, the chamber was ventilated with atmospheric air again to recover the baseline ventilation values for 40 min and, subsequently, the animals were subjected to hypoxia for 20 min, where the chamber was ventilated with a gas mixture containing 10% O₂ and balanced with N₂ (White Martins Gases Industriais Ltda., Osasco, SP). The order of gas exposure

was randomly chosen. Ventilation and metabolism measurements were performed continuously for P0-1 and P12-13 and every 5 minutes for P21.

Effect of Diazepam exposure during the prenatal period on the expression of tyrosine hydroxylase in catecholaminergic regions and serotonin medullary raphe

After measuring the ventilatory and metabolic responses, animals at P12-13 were perfused and the brains were removed to locate and quantify the number of catecholaminergic (CA) neurons using immunofluorescence staining for TH, as well to locate and quantify the number of 5-HT neurons using immunofluorescence staining for 5-HT.

CA neurons were evaluated in the following regions: A1/C1, A2/C2, C3, A5 and A6. 5-HT neurons were evaluated in the *raphe obscurus* (ROB), *raphe pallidus* (RPA), *raphe magnus* (RMAG).

Data analyses

The statistical difference of the number of pups, chewing and righting reflexes were assessed using T-test. The coefficient of variation (CV), and the Confidence Interval (CI) of 95% was calculated for chewing and righting reflexes. We calculated the Odds Ratio (OR) and the CI at 95% to estimate the association between exposure to DZP and the occurrence of delay on the day of birth. The statistical difference of body mass was calculated using Two-Way ANOVA method, comparing “treatment” versus “age” as compared factors, with Tukey post-test for multiple comparison.

Ventilatory and metabolic results were analyzed using LabChart data analysis software (PowerLab System, ADInstruments® / LabChart Software, version 7.3, Sydney, Australia). The values of the respiratory variables analyzed (V_T , f_R , \dot{V}_E , $\dot{V}O_2$, $\dot{V}_E/\dot{V}O_2$) are presented as mean and the standard error of the mean (\pm SEM). One-Way ANOVA

test was used to assess the statistical differences between the treatments (CTRL and DZP) during normoxic normocapnia. Data are reported as absolute values. The ventilatory and metabolic responses to hypercapnia and hypoxia are presented as percentage (%) of baseline after 10 minutes of exposure. Two-Way repeated measures ANOVA was used to calculate the statistical differences in these conditions, using “treatment” (CTRL x DZP) versus “time” (normoxia/normocapnia x hypercapnia or normoxia/normocapnia x hypoxia) as the compared factors between the groups. In this case, Tukey post-test was used for multiple comparisons. We have decided to present the ventilatory and metabolic responses only within 10 minutes because we did not find a treatment effect at 5, 10 and 20 minutes of gas exposure. Additionally, the absolute values for hypercapnic and hypoxic responses are presented in supplementary table 3 and 4, and One-Way ANOVA test was used to assess the statistical differences between treatments. To calculate the duration of apneas, we analyzed the duration of each apnea event and then we averaged them all. To calculate the occurrence of apneas by time (apnea/time, in seconds), the total number of apneas was divided by the total time the animal was exposed to that gaseous condition. They were analyzed using LabChart data analysis software and the graphs show the number of apneas, the duration, and the occurrence of apneas by time in seconds. Two-Way repeated measurements ANOVA method was also used, with “treatment” versus “gas” being the two compared factors between the groups, with Tukey post-test for multiple comparisons.

Images of TH and 5-HT -immunoreactive cells were acquired using epifluorescence microscopy (Axio Imager Z; Zeiss). The total number of CA neurons were quantified unilaterally from A1/C1, A2/C2, C3 and, A5 regions. Data is presented as mean of absolute values \pm SEM. For the A6 region, CA cell density (number of cells per area in mm²) was calculated unilaterally, and the values are as reported as mean \pm SEM. The

number of 5-HT-positive neurons were quantified in the medullary raphe (*raphe obscurus* - ROB; *raphe pallidus* – RPA; *raphe magnus* – RMAG). Data is also presented as the mean of absolute values \pm SEM. Images were captured, and analysis were performed using ImageJ (<http://www.rsbl.info.nih.gov/nih-image>). One-Way ANOVA test was used to compare the number of cells in each region between treatments (CTRL vs DZP). All statistical analyses were calculated using Sigma Stat program (Systat Software, Point Richmond, CA, USA) and P values <0.05 were considered significant.

RESULTS

Birth outcomes

We used 10 pregnant female rats for each treatment (CTRL and DZP). Table 1 reports the data for the length of each gestation, along with the total litter number as well as divided by sex. It also shows the qualitative observations for each pregnant. The expected gestation length in Wistar rats is 21 embryonic (E) days. We observed that 20% of CTRL-treated females had a delayed birth by one day (E22) (3-C and 6-C, Table 1, bold), whereas 50% of DZP-treated females delivered the pups at E22 (1-D, 3-D, 6-D, 8-D, 9-D, Table 1, bold). The OR for the late delay of DZP-treated female rats was equal to 4 (95% CI: 0.6 – 29.1), suggesting a higher chance of having a delay on delivering, although there was no statistical difference due to its 95% CI that crosses below 1. One of the DZP-treated females gave birth to only 1 living pup and 6 stillbirths were not expelled but apparently completely developed, given the presence of head, tail and the four limbs. Moreover, one of the DZP-treated females gave birth to one stillbirth among 5 pups. These deleterious effects were not observed for the CTRL group. DZP treatment did not affect the number of male (4.4 ± 0.8 for DZP and 4.8 ± 0.7 for CTRL) and females

pups (5.4 ± 0.7 for DZP and 5.7 ± 0.6 for CTRL) as well as did not affect the total number of pups per litter (9.3 ± 1.2 for DZP and 10.5 ± 0.9 for CTRL) (Table 1).

Motor behaviors

Diazepam treatment did not affect newborns' motor behaviors such as the chewing reflex (Figure 1A) and righting reflexes (Figure 1B) at P0-1, although it may have influenced their variability. The average number of chewing (in 30 s) was 13.3 ± 1.0 for DZP males ($n = 27$); 11.7 ± 1.5 for CTRL males ($n = 19$); 13.03 ± 0.9 for DZP females ($n = 29$) and 13.7 ± 1.6 for CTRL females ($n = 23$). The DZP group showed a lower variability in the chewing reflex, since the CV was 39.1% (95% CI = 11.2 - 15.3) for DZP males compared to 53.9% (95% CI = 8.7 - 14.8) for CTRL males. Regarding females, the same pattern was observed, CV for DZP females was 36.8% (95% CI = 11.2 - 14.9), whereas for CTRL group was 54.6% (95% CI = 10.5 - 17.0).

There is no significant difference between the groups regarding righting reflex, and the average time, in seconds, for the animals to return from the supine to the prone position was: 3.2 ± 0.6 for DZP males ($n = 35$; CV: 110.4%; 95% CI: 2.0 - 4.4), 2.2 ± 0.4 for CTRL males ($n = 18$; CV: 78.8%; 95% CI: 1.4 - 3.1), 2.7 ± 0.4 for DZP females ($n = 27$; CV: 83.1%; 95% CI: 1.8 - 3.6) and 3.4 ± 0.6 for CTRL females ($n = 23$; CV: 85.5%; 95% CI: 2.2 - 4.7).

Body mass

Values of body masses in grams are shown in Table 2, for all ages and sex groups. No differences in body mass were observed for females (CTRL: 6.8 ± 0.2 g; DZP: 7.1 ± 0.2 g) and males (CTRL: 7.1 ± 0.3 g; DZP: 7.0 ± 0.2 g) at P0-1. Similarly, we did not find differences at P12-13 for females (CTRL: 28.8 ± 0.9 g; DZP: 30.1 ± 1.4 g) and males

(CTRL: 29.6 ± 1.1 g; DZP: 29.6 ± 1.9 g). However, at P21-22, DZP groups presented a greater body mass compared to the CTRL groups for both sex (Females, CTRL: 54.4 ± 2.1 g; DZP: 62.4 ± 2.6 g, $P = 0.001$ and males, CTRL: 56.7 ± 2.0 g; DZP: 62.6 ± 5.2 g, $P = 0.049$).

Ventilation and oxygen consumption at resting conditions

Absolut values for ventilatory and metabolic variables during normoxic/normocapnic conditions are described in Table 2 for both groups (CTRL and DZP).

DZP female group at P0-1 showed a greater f_R ($P = 0.017$) and $\dot{V}O_2$ ($P = 0.014$) compared to CTRL females. No significant difference was observed at P12-13 and P21-22 between groups for any of the ventilatory and metabolic variables.

For males, the prenatal treatment with DZP did not promote significant differences in \dot{V}_E , V_T , f_R and $\dot{V}O_2$ at P0-1. P12-13 and P21-22 DZP groups had the same response compared to CTRL group, a lower \dot{V}_E ($P = 0.004$ for P12-13 and $P = 0.017$ for P21-22) due to a smaller V_T ($P = 0.001$ for P12-13 and $P = 0.024$ for P21-22). As a result, DZP-treated groups presented a lower $\dot{V}_E/\dot{V}O_2$ compared to CTRL animals ($P = 0.006$ for P12-13 and $P = 0.046$ for P21-11).

Ventilatory and metabolic response during hypercapnia

Figures 2 shows the relative values (in percentage of baseline) for \dot{V}_E , V_T , f_R , $\dot{V}O_2$ and $\dot{V}_E/\dot{V}O_2$ from CTRL and DZP groups during hypercapnia (7% CO_2) for P0-1, P12-13 and P21-22, for female (2A – E) and male (2F – J) rats respectively. The absolute

values for these same variables are presented in Table 3. Exposure to hypercapnia evoked an increase in \dot{V}_E ($P < 0.001$) due to increases in V_T ($P < 0.001$) and f_R ($P < 0.05$). CO_2 exposure also promoted a reduction in $\dot{V}O_2$ ($P < 0.05$) and an consequently an increase in $\dot{V}_E/\dot{V}O_2$ ($P < 0.001$), in both sexes, in all groups and ages (Figure 2), except for P21-22 female rats there was no reduction in $\dot{V}O_2$ in both groups.

Females. At P0-1, DZP rats presented a lower hypercapnic ventilatory response compared to CTRL females ($P = 0.040$, Figure 2A) due to a lower V_T ($P = 0.005$, Figure 2B), although no changes were observed in $\dot{V}O_2$ and $\dot{V}_E/\dot{V}O_2$ between groups (Figure 2D and E). At P12-13, DZP rats also presented a decreased hypercapnic ventilatory response compared to CTRL females ($P = 0.008$, Figure 2A), due to a lower V_T ($P = 0.011$, Figure 2B), and no changes in $\dot{V}O_2$, resulting in attenuation of $\dot{V}_E/\dot{V}O_2$ ($P = 0.021$, Figure 2E). No changes in the ventilatory response to hypercapnia was observed at P21-22.

Males. P0-1 and P12-13 DZP rats showed an attenuation of the tachypneic response induced by hypercapnia compared to CTRL males ($P = 0.027$ for P0-1 and $P = 0.016$ for P12-13, Figure 2H). The hypercapnia-induced hypometabolism at P12-13 was greater in DZP males compared to CTRL males ($P = 0.005$, Figure 2I), however, no difference was observed in $\dot{V}_E/\dot{V}O_2$. At P21-22, the ventilatory and metabolic responses to hypercapnia were not affected by the prenatal DZP exposure (Figure 2 F – J).

Ventilatory and metabolic response during hypoxia

Figures 3 show the relative values (in percentage of baseline) for \dot{V}_E , V_T , f_R , $\dot{V}O_2$ and $\dot{V}_E/\dot{V}O_2$ from CTRL and DZP groups during hypoxia (10% O_2) for P0-1, P12-13 and P21-22, for female (3A – E) and male (3F – J) rats respectively. The absolute values for these same variables are presented in Table 4. Exposure to hypoxia evoked an increase in

\dot{V}_E ($P < 0.001$) due to increases in V_T ($P < 0.001$) in all groups and ages, for both sexes. At P12-13 and P21-22, hypoxia also increased the f_R ($P < 0.05$) (Figure 3C and H). Moreover, this challenge induced a decrease in $\dot{V}O_2$ ($P < 0.05$) and an increase in $\dot{V}_E/\dot{V}O_2$ ($P < 0.001$) in all groups and ages, for both sexes (Figure 3D and I).

Females. At P0-1, DZP rats presented an attenuated V_T under hypoxic conditions compared to CTRL female rats ($P < 0.001$, Figure 3B); however, no change in \dot{V}_E , (Figure 3A), $\dot{V}O_2$ and $\dot{V}_E/\dot{V}O_2$ (Figure 3D and E) were observed. At P12-13, the hypoxic ventilatory and metabolic responses at P12-13 and P21-22 were similar between CTRL and DZP groups (Figures 3D and E).

Males. DZP prenatal exposure did not affect hypoxic ventilatory and metabolic responses of all ages and in both sexes, except for P12-13, where \dot{V}_E was attenuated in the DZP group compared with CTRL group ($P = 0.015$) (Figure 3F).

Apnea duration and occurrence of apnea by time, during normocapnic normoxic, hypercapnia and hypoxia, of CTRL and DZP groups at P0-1.

Table 5 shows the effect of exposure to DZP on apnea occurrence and apnea duration at P0-1. Considering the effect of gas, regardless of treatment, females had longer apneas in normoxic normocapnic ($P < 0.001$) in relation to hypercapnia and hypoxia, with no difference between these last two challenges. Males presented longer apnea events in normoxic normocapnic condition in relation to hypercapnia only ($P = 0.007$), with no differences between baseline and hypoxia, or between hypercapnia and hypoxia. Females had a higher occurrence of apneas in normoxic normocapnic ($P < 0.001$), as well as in hypoxia ($P = 0.026$), in relation to hypercapnia, with no differences between baseline and hypoxia. This pattern was not observed for males.

Considering the effect of treatment, CTRL females had longer apneas compared to DZP group ($P = 0.036$), during resting conditions, no significant difference between groups was observed during gas challenges. When exposed to hypoxia, DZP females had a lower occurrence of apneas compared to CTRL females ($P = 0.030$). No significant differences were observed for males from both groups in any of the gas challenge used.

Number of TH-immunoreactive neuros in catecholaminergic nuclei in the brainstem at P12-13

Figure 4 shows the number of TH-positive cells in catecholaminergic nuclei in the brainstem of females (red) and males (blue), as well it contains charts with representative images for CTRL (first column) and DZP (second column) animals, from A1/C1 (Figure 4A), A2/C2 (Figure 4B), C3 (Figure 4C), A5 (Figure 4D) and A6 (Figure 4E), at P12-13.

DZP females had fewer TH-positive neurons compared with CTRL group in A1/C1 (26.6 ± 1.9 for CTRL and 20.4 ± 1.0 for DZP; $P = 0.033$), A2/C2 (64.1 ± 5.1 for CTRL and 34.7 ± 4.0 for DZP; $P = 0.001$) and C3 (27.0 ± 1.9 for CTRL and 16.4 ± 2.1 for DZP; $P = 0.007$) (Figure 4A – C). These females also had a lower cell density (number of cells/mm²) in A6 region (1.2 ± 0.03 for CTRL and 0.8 ± 0.1 for DZP; $P = 0.016$) (Figure 4E). DZP males also exhibited less TH-positive neurons in A2/C2 (61.3 ± 12.1 for CTRL and 38.1 ± 6.1 for DZP; $P = 0.014$), C3 (27.5 ± 2.5 for CTRL and 19.3 ± 2.0 for DZP; $P = 0.013$) and A5 (21.0 ± 1.6 for CTRL and 13.0 ± 1.3 for DZP; $P = 0.008$) (Figure 4B – D). DZP males also had a lower cell density in A6 region (1.2 ± 0.1 for CTRL and 0.9 ± 0.03 for DZP; $P = 0.020$) (Figure 4E).

Number of 5-HT-immunoreactive neuros in medullary raphe at P12-13

Figure 5 shows the number of 5-HT-positive cells in serotonergic medullary regions (ROB, RPA and RMAG) of females (5E) and males (5F), as well it contains charts with representative images from ROB and RPA (Figure 5B and C, left – CTRL; right – DZP), and RMAG (Figure 5D, left – CTRL; right – DZP) at P12-13.

No differences were observed among the number of serotonergic neurons in ROB, RPA and RMAG between DZP and CTRL females (Figure 5E). However, DZP males had less 5-HT neurons than CTRL males in ROB (49.9 ± 2.6 for CTRL and 33.4 ± 2.2 for DZP; $P = 0.003$) and in RMAG (62.0 ± 4.1 for CTRL and 49.4 ± 2.1 for DZP; $P = 0.041$) (Figure 5F). No differences were found in RPA of these same animals.

DISCUSSION

Our study shows that fetal exposure to DZP influences birth outcomes, causes sex-specific alterations of respiratory functions and reduction in brainstem monoaminergic neurons. Specifically, we found that prenatal DZP use increases the length of gestation and the prevalence of harmful obstetric effects, reduces the variability of chewing reflex. In parallel, we found that prenatal exposure to this medication causes hypoventilation in early neonatal stage (P12-13) and young male rats during air breathing conditions but has minimal effects on females. Hypercapnic ventilatory response was attenuated in females at early stage, as well males had a decrease in the respiratory frequency. There were also minimal effects of DZP exposure on hypoxic responses in both sexes. We also identified that DZP exposure modified the number of catecholaminergic and serotonergic neurons in the brainstem at P12-13 age. DZP-exposed females had a lower number of catecholaminergic neurons in A1/C1, A2/C2, C3, as treated males had fewer neurons in A2/C2, C3, A5. Special attention is given to the lower density of cells in the A6 region,

known as *Locus Coeruleus*, of females and males exposed to DZP at P12-13. DZP-treated males also present fewer serotonergic neurons in ROB and RMAG.

Clinical studies show that the use of benzodiazepines during gestation in women causes an increase in the risk of spontaneous abortion and risk of preterm birth (Ogawa; Takeshima; Furukawa, 2018; Sheehy; Zhao; Bérard, 2019). Similarly, we also observed harmful obstetrical effects given the presence of stillborn pups after delivery, as well as dead animals that were not born but found completely formed with their placentas, and delay in birth. Although we do not exclude the random occurrence of these effects in rats in general, since other study did not observe these effects in DZP-treated rats (Picard et al., 2008), we suggest that DZP maternal use may impairs delivering this medication inhibits the spontaneous and rhythmic uterus activity of ovariectomized rat isolated uterus, probably either inhibiting the influx of Ca_2^+ or increasing inward Cl^- currents (Yiu; Kwan; Ngan, 1996), alluding the data reported here for females rats.

Additionally, studies also point to the association between the use of benzodiazepines and teratogenic effects like Dandy-Walker malformation (Tinker et al., 2019), behavioral and cognitive disorder (Radojčić et al., 2017; Sundbakk et al., 2019), small head circumference (Freeman et al., 2018), cleft palate and cleft lip (Iqbal; Sobhan; Ryals, 2002; Saxén, 1975) in humans newborns. We and others (Picard et al., 2008) did not observe malformations in DZP-treated rats, possibly due to the different doses administrated and to the use of different species, like humans compared to rats, since it is suggested that the physical development of rats could be impaired only by high doses of benzodiazepines (Nicosia et al., 2003). Thus, we suggest that benzodiazepines are related to complications on labor and birth since there are higher incidence of adverse outcomes for mothers undergoing psychotropic drug treatment, based on the data reported by the

literature, as well as on the findings observed in the pregnancies followed in the present study.

Regarding the reflexes evaluated, even though no differences were observed between groups, we noted a lower variability of chewing reflex in DZP-exposed neonates. In fact studies have argued that variability in motor behaviors is a critical feature of motor development (Finan; Smith, 2005; Piek, 2002; Smith; Goffman, 1998; Thelen, 1995; Thelen; Smith, 1994; Touwen, 1990; Turvey; Fitzpatrick, 1993; Walsh; Smith, 2002), as well neonatal reflexes are indicative of brain maturation and prenatal exposure to benzodiazepines may prejudices these reflexes (Nicosia et al., 2003). According to these authors variability might serve as an adaptive function throughout ontogeny by allowing new behavioral strategies to be achieved. Therefore, we suggest that DZP-treated rats possess a lower repertoire of chewing responses, which may harmfully impact adaptation of these animals to future environmental challenges.

A higher body mass was observed for P21-22 DZP-treated animals compared to control group. Our data resembles previous results that showed that males and females rats exposed to DZP during prenatal period had an increase on body mass gain at P21 age of weaning (Segovia et al., 1991). Results on body mass gain at P21-22 reported here may be related to what was previously demonstrated that early intrauterine DZP exposure induces long lasting effects on the central nervous system (Kellogg, 1999). Additionally, acute administration of DZP into the *nucleus accubens* stimulated the food intake as bicuculline suppressed it in rats, and the authors regarded this observation to the activation of GABA_A receptors in this region (Meena et al., 2009).

Ventilation data reveals that DZP promoted hypoventilation of males at P12-13 and P21-22. Unlike males, P0-1 DZP-treated females presented minimal effects on basal breathing, for instance, higher f_R , higher $\dot{V}O_2$, and a lower apnea duration. The

hypoventilation on resting conditions in DZP-exposed males, represented here by the decrease in air convection requirement ($\dot{V}_E/\dot{V}O_2$), was a result of a reduction in \dot{V}_E due to an attenuation of V_T , without changes in the f_R or $\dot{V}O_2$ of these animals. Therefore, this result shows that DZP-treated animals at these ages ventilate below their metabolic demands, which indicates a loss in the supply of oxygen to the organism of these animals, as well as in the removal of CO_2 as a result from their cellular metabolism, a clinical situation that may be related to Sudden Infant Death Syndrome (SIDS) (Pasquale-Styles; Tackitt; Schmidt, 2007). In fact, Triazolam, a benzodiazepine, has been reported to prolong the time to arousal following airway occlusion (Berry; Mahutte; Light, 1993), which is viewed as contribution to causing a hypoventilation (Vozoris, 2014). Study from Yonkers et al. (2017) on human babies observed that the maternal use of benzodiazepines was associated with an increased use of ventilatory support for the neonate, even though they did not discuss the average age that this occurs or the sex of these children. Additionally, Freeman et al (2018) showed that prenatal benzodiazepines exposure increased admissions in the neonatal intensive care unit. Those data in association with the hypoventilation results reported here for males, show that the use of these drugs during pregnancy can increase the risk of complications to the animals' respiratory system, resulting in adverse clinical conditions that may lead to hospitalization and additional support to maintain the newborn alive and well, since one of the effects of benzodiazepines on Central Nervous System is the respiratory depression (Bénaud-Larivière et al., 2016; Boon et al., 2020).

Our analyses show that the decrease on ventilation was caused by an attenuation of tidal volume. Similarly, Boon et al. (2020) noted that the respiratory depression triggered by benzodiazepines is characterized by a reduction of the tidal volume. This fact might be related to the reduction of the muscular tonus of the upper airways caused by

these drugs, since the obstruction of the upper airways is associated with the breathing pattern (here given by the tidal volume) instead of the respiratory rhythm (represented by the respiratory frequency). Finally, it is also important to note that the control of the upper airways is under the control of nerves such as the hypoglossal. A study by Takaturo et al. (2003) showed that DZP reduced the activity of the hypoglossal nerve in rabbits, suggesting that this medication has an inhibitory role in respiratory control, especially in maintaining upper airways opened. As it will be shown further, DZP-treated males had lower number of serotonergic neurons, and it has been suggested that alterations within serotonergic pathways may lead to disfunctions of the upper airways since these neurons control the cholinergic function in this place (Haxhiu et al., 1998).

These sex differences in DZP exposure on breathing control agree with previous reports showing a higher sensitivity of males to the anxiolytic-like effects of DZP (Fernández-Guasti et al., 2003; Fernández-Guasti; Picazo, 1997). Additionally, it is also important to notice that males at P12-13 had lower number of serotonergic neurons in *raphe* nuclei, as previously mentioned, which may be correlated to the alterations in the ventilations observed here. Interestingly, this was not observed in females. Studies have demonstrated that 5-HT neurons are synaptically connected to the respiratory rhythm generator and hypoglossal motoneurons, they are required for normal respiratory output *in vivo* during neonatal stage (Cummings et al., 2009, 2011; Hodges et al., 2009; Ptak et al., 2009). Furthermore, mice *Lmx1b^{f/f/p}* lacking the central 5-HT neurons displayed hypoventilation and these respiratory abnormalities were most severe during the postnatal period, markedly improving by the time the pups were 2–4 weeks old (Hodges et al., 2009). Abnormalities of the medullary 5-HT system are linked to SIDS incidence (Duncan et al., 2010; Kinney et al., 2007; Kinney; Thach, 2009) and there is higher SIDS prevalence in males than females (Duncan; Byard, 2018) with a ratio of 60 to 40

respectively (Fleming; Blair; Pease, 2015). Furthermore, a study by Broadbelt et al. (2011) reported widespread and substantial reductions in GABA_A receptor binding in the medullary 5-HT system in SIDS cases, which corroborates to the downregulation of GABA_A receptors in some brain area as well as decrease in benzodiazepine binding sites or reduced sensitivity of GABA_A receptors in the brain after prenatal DZP exposure (Koff; Miller, 1995; Picard et al., 2008). Moreover, the serotonergic function in the medullary raphe is under GABAergic control since muscimol decreases the firing rate of serotonergic neurons (Judge; Young; Gartside, 2006), and GABA controls the release of serotonin in *raphe magnus* (Millhorn et al., 1988). We also stress that the alterations in the number of serotonergic neurons occur at P12-13, which has been proposed to be a critical period for the development of respiratory system in rats and is correlated to the 2nd and 4th month after birth in human newborns, a time window regarded to the highest occurrence rates of SIDS (Goldberg et al., 1986; Wong-Riley; Liu; Gao, 2013). Therefore, prenatal exposure to drugs is a risk factor to SIDS, and it is possible that DZP use during pregnancy increase the susceptibility to this syndrome.

In addition to the changes observed in the serotonergic system, represented here by the decrease in the number of 5-HT neurons in the medullary *raphe*, a decrease in the number of catecholaminergic neurons in A2/C2, C3, A5 and A6 was also observed for male rats exposed to DZP treatment. In fact, it is recognized that these neurons are necessary for the normal development of respiratory network, as well they also participate in respiratory control, since mutant animals lacking catecholamines in the same catecholaminergic nuclei evaluated here, present disturbances in respiratory control. Changes in this system are also considered to be related to the occurrence of SIDS (Hilaire, 2006; Viemari et al., 2004; Zanella et al., 2006).

While our work clearly shows sexual divergence in basal respiratory drive because of fetal DZP, they also reveal sex differences in the CO₂-ventilatory response. Our findings demonstrated that DZP administered during pregnancy attenuates hypercapnic ventilatory response of females at age P0-1 and P12-13. Especially at age P12-13, DZP-exposed females have an attenuation in CO₂ chemosensitivity evidenced by the reduction in their $\dot{V}_E/\dot{V}O_2$. These effects suggest that the excess of GABA during pregnancy by using DZP promoted sex-specific changes in the respiratory control system, in areas that play a role on CO₂-drive to breath, becoming these females less sensitive to hypercapnia. This finding was unanticipated because of the demonstration of reduction of both serotonergic and catecholaminergic neurons in males, whereas females presented reduction only in catecholaminergic cell groups. Besides, it was already demonstrated that early DZP exposure during gestation alters the function of the GABA_A receptor of adult progeny in a sexually dimorphic manner influencing behavioral responses of animals (Kellogg, 1999; Nicosia et al., 2003).

GABAergic system plays an essential role in chemosensitivity, and it is known that benzodiazepines lead to a respiratory depression and attenuation of CO₂ (Bailey et al., 2009; Bailey; Nutt, 2008). Actually, data on male mice, aged 6 to 7 weeks, show that DZP significantly reduced CO₂-evoked increases in tidal volume (Borkowski et al., 2011). It has been also shown that awake rhesus monkeys had a decreased tidal volume and ventilation during 5% CO₂ after benzodiazepine administration, such as Alprazolam, Lorazepam and Quazepam, resembling our results (Wettstein; Teeple; Morse, 1990). A study by Rudolf et al. (1978) using nitrazepam (another type of benzodiazepine), also showed that this medication depresses the central respiratory drive, since humans patients presented an cumulative attenuation of their response to CO₂ after receiving it for five days, and also showed an increase in arterial partial pressure of CO₂, when compared to

the first day of administration. Since we observed no change in hypoxia-induced hyperventilation between CTRL and DZP-treated females at P0-1 and P12-13, we suggest that these changes in CO₂ chemosensitivity must involve brainstem areas, such as noradrenergic and serotonergic nuclei involved in hypercapnic ventilatory response. Indeed, our females had fewer catecholaminergic neurons in regions such as A1/C1, A2/C2, C3 and A6, and it is known that catecholaminergic neurons has an essential role in CO₂ responses since lesion of these neurons promoted a decrease in hypercapnic ventilation (Li; Nattie, 2006), as well alterations within this system may impairs the hypercapnic ventilatory responses throughout the development (Patrone et al., 2018).

One of the brain regions that could be sex-specifically affected by DZP is *Locus coeruleus* (LC), since this pontine region plays an important role in central chemosensitivity to CO₂ (Gargaglioni; Hartzler; Putnam, 2010) and is sexually dimorphic (Bangasser; Wiersielis; Khantsis, 2016). We found that DZP-treated males and females at P12-13 had a decrease in cells density in the A6 region. Since DZP-treated females presented a higher A6 cell density reduction (34%) compared to DZP-exposed males (20%), this may account to the attenuation in CO₂ chemosensitivity observed in females. Likewise, a previous study has demonstrated that female rat pups (P0-16) from mothers who received DZP (2.5 mg.Kg⁻¹) from embryonic day 14 up to 21, showed a reduction in LC volume and cell number, which resembles our data; however, LC of DZP-exposed males showed an increase in the volume and neuron number, different from our data. According to the authors, DZP administration might have altered ovarian steroidogenesis and induced neuronal loss in a sexually dimorphic structure, such as the LC, which is to be estrogen-dependent (Rodriguez-Zafra et al., 1993). Besides, it has been reported that GABAergic activation, through GABAergic neurons into the LC or dorso-medially located, promotes a decrease in the firing rate of noradrenergic neurons in LC, as well as

producing inhibitory postsynaptic potentials. These effects are reversed with the application of bicuculline, a GABAergic antagonist (Aston-Jones; Zhu; Card, 2004; Breton-Provencher; Sur, 2019; Dimitrov; Yanagawa; Usdin, 2013; Jin et al., 2013, 2016). Therefore, this sex-specific reduction in CO₂ ventilatory response might be related to alterations in females' catecholaminergic system, specially a decrease in LC neurons observed in these animals.

Regarding hypoxia, the only change that we observed was that P12-13 DZP-treated males presented a lower hypoxic ventilatory response; however, $\dot{V}_E/\dot{V}O_2$ was not affected, suggesting that the reduction in metabolism might compensated for this decrease. Previous studies have demonstrated that carotid body (CB) has GABA receptors (Fearon et al., 2003; Igarashi; Zadzilka; Shirahata, 2009; Oomori et al., 1994; Pokorski; Ohtani, 1999; Zhang et al., 2009). Therefore, this reduction in hypoxic ventilatory response might be related to DZP changing the activity of CB cells. In fact, early reports have demonstrated that benzodiazepines reduce the CB neural response to hypoxia and depress the hypoxic ventilatory response by inhibiting CB chemoreceptor afferent (Igarashi et al., 1997; Kim et al., 2006; Shiharata, 2002) activity.

In summary, our research showed that prenatal DZP treatment has important sex-dependent impacts on breathing control and in the monoaminergic system. Our main ventilatory, metabolic and neuronal changes occurred at P12-P13, and this is important because the occurrence of SIDS is regarded to three main factors like having a vulnerable infant, exposed to an exogenous stressor (like DZP or CO₂ and O₂ challenges, or all in combination), and a critical developmental period (Filiano; Kinney, 1994). The advantages and disadvantages of benzodiazepines use during pregnancy therefore need further investigation, and more studies should include a translational animal model of maternal anxiety disorders, to provide better insights into the effects in the offspring is

also important. Furthermore, the data provide new motivation for the urgent need to investigate the functional alterations in both sexes. The results of the present study call into question the conclusion that understanding the effects of DZP use during pregnancy can help women and clinicians to make more informed decisions about the initiation or continuation of anxiolytics treatment during pregnancy.

CONCLUSION

In conclusion, our data suggest the occurrence of deleterious effects after the administration of DZP during the gestational period on birth outcomes, respiratory control and catecholaminergic and serotonergic system of neonates throughout development. Changes of ventilation on resting conditions, due decrease of the tidal volume in DZP-treated males, might suggest the role of GABAergic system on breathing pattern and upper airways control. Decreased ventilation in DZP-treated females points to the role of inhibitory function on medullary and/or pontine areas involved on chemosensitivity to CO₂ and a sex-specific disturbance of this mechanism. Reductions on catecholaminergic and serotonergic neurons may be related to alterations in ventilatory responses observed here and are strongly suggested to be related to the occurrence of Sudden Infant Death Syndrome. Both data on male and females suggest the participation inhibitory GABAergic system on respiratory areas. These results contribute to the understanding of modulation of respiratory network after drug treatments on gestational period and the deleterious effects on ventilatory control of neonate and young animals, that may lead to the occurrence of catastrophic events such as Sudden Infant Death Syndrome.

Figures legends

FIGURE 1- Diazepam affects the variability of chewing reflex at P0-1. Effects of a prenatal Diazepam exposed (DZP) or vehicle (CTRL) on chewing (A) and righting (B) reflexes in female (red) and male (blue) newborn rats (P0-1). Values are expressed as the mean \pm SEM. The dots represent the values of each animal.

FIGURE 2 – Diazepam decreases the ventilation due to a reduction on V_T of females (P0-1 and P12-13), decreases the respiratory frequency of males (P0-1 and P12-13) and their metabolism (P12-13) under hypercapnia. Ventilation (\dot{V}_E), tidal volume (V_T), respiratory frequency (f_R), metabolic rate ($\dot{V}O_2$) and air convection requirements ($\dot{V}_E/\dot{V}O_2$) of control (CTRL, full bars) and Diazepam-treated (DZP, empty bars) of female (red, 2A – E) and males (blue, 2F – J) rats, during hypercapnic (7% CO_2) condition, at P0-1, P12-13 and P21-22. Values are expressed as the mean \pm SEM and as a % from baseline. The dots represent the values of each animal. *Means statistical difference between CTRL and DZP groups.

FIGURE 3 – DZP-treated females had a lower V_T at P0-1 during hypoxic challenge, as well P12-13 males had an attenuation of the hypoxic ventilatory response. Ventilation (\dot{V}_E), tidal volume (V_T), respiratory frequency (f_R), metabolic rate ($\dot{V}O_2$) and air convection requirements ($\dot{V}_E/\dot{V}O_2$) of control (CTRL, full bars) and Diazepam-treated (DZP, empty bars) of female (red, 2A – E) and males (blue, 2F – J) rats, during hypoxia (10% O_2) condition, at P0-1, P12-13 and P21-22. Values are expressed as the mean \pm SEM and as a % from baseline. The dots represent the values of each animal. *Means statistical difference between CTRL and DZP groups.

FIGURE 4 – Diazepam in-utero exposure decreases the number of catecholaminergic neurons in the brainstem of females and males. TH-immunoreactive cells in the catecholaminergic nuclei are stained in green. In the first column are the photomicrography of the regions analyzed for control animals (CTRL), as well the second column shows the same for DZP-treated animals (DZP). In these charts, the dotted lines mark the limits of the analyzed catecholaminergic nuclei. The solid lines

represent the edges of the tissues. Both lines are used representatively inform the spatial positioning of the cells in the real tissue. In the third column there are coronal diagrams from Paxinos and Watson (1998). The green circles indicate where that nuclei are located respective to the other surrounding areas, as the number on top of each diagram indicates the coordinate of that region from bregma suture. Photomicrograph taken at a 10-X magnification. A 100 μm scale bar are shown in the lower right corner of each image. The fourth column shows the total number (A – D) of TH-immunoreactive cells in the catecholaminergic nuclei (A1/C1, A2/C2, C3, A5) and the number of TH-immunoreactive cells per area in mm^2 (cells density – cells/ mm^2) of A6 nucleus of in the brainstem of females (red) and males (blue) at P12-13. Values are expressed as the mean \pm SEM. *Means statistical difference between CTRL and DZP groups. Full bars represent control (CTRL) group and empty bars represent Diazepam-treated group (DZP). **A:** A1/C1; **B:** A2/C2; **C:** C3; **D:** A5; **E:** A6.

FIGURE 5 – Diazepam in-utero exposure decrease the number of serotonergic neurons in the medullary *raphe* of male rats. 5-HT-immunoreactive cells in the serotonergic nuclei are stained in red. In the first row (A) there are coronal diagram from Paxinos and Watson (1998), for ROB and RPA (A, left) and RMAG (A, right). The red circles indicate where that nuclei are located respective to the other surrounding areas, as the number on top of the diagram indicates the coordinate of that region from bregma suture. The following red colored images (B – D) are the photomicrographs of the regions analyzed, for control animals (CTRL, B – D left) and DZP-treated animals (DZP, B – D right). In these charts, solid lines represent the edges of the tissues and were representatively used inform the spatial positioning of the cells in the real tissue. Photomicrograph taken at a 10-X magnification. A 100 μm scale bar are shown in the lower right corner of each image. The bottom row shows the graphs with the total number of 5-HT-immunoreactive cells in the three different *raphe* nuclei of females (E, red) and males (F, blue) at P12-13. ROB: *raphe obscurus*, RPA: *raph pallidus*, RMAG: *raphe magnus*. Values are expressed as the mean \pm SEM. The dots represent the values of each animal. *Means statistical difference between CTRL and DZP groups. Full bars represent control (CTRL) group and empty bars represent Diazepam-treated group (DZP).

References

ASTON-JONES, G.; ZHU, Y.; CARD, J. P. Numerous GABAergic Afferents to Locus Ceruleus in the Pericellular Dendritic Zone: Possible Interneuronal Pool. **Journal of Neuroscience**, v. 24, n. 9, p. 2313–2321, 3 jun. 2004.

BAILEY, J. E. et al. A comparison of the effects of a subtype selective and non-selective benzodiazepine receptor agonist in two CO₂ models of experimental human anxiety. **Journal of Psychopharmacology**, v. 23, n. 2, p. 117–122, mar. 2009.

BAILEY, J. E.; NUTT, D. J. GABA-A receptors and the response to CO₂ inhalation - A translational trans-species model of anxiety? **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 90, n. 1, p. 51–57, 2008.

BANDELOW, B.; MICHAELIS, S.; WEDEKIND, D. Treatment of anxiety disorders. **Dialogues in Clinical Neuroscience**, v. 19, n. 2, p. 93, 2017.

BANGASSER, D. A.; WIERSIELIS, K. R.; KHANTSIS, S. **Sex differences in the locus coeruleus-norepinephrine system and its regulation by stress** Brain Research Elsevier B.V., , 15 jun. 2016.

BATESON, A. N. The benzodiazepine site of the GABA_A receptor: an old target with new potential? **Sleep medicine**, v. 5 Suppl 1, p. S9-15, jun. 2004.

BECQUET, D. et al. Glutamate, GABA, glycine and taurine modulate serotonin synthesis and release in rostral and caudal rhombencephalic raphe cells in primary cultures. **Neurochemistry International**, v. 23, n. 3, p. 269–283, 1993.

BEHAR, T. N. et al. GABA-induced chemokinesis and NGF-induced chemotaxis of embryonic spinal cord neurons. **Journal of Neuroscience**, v. 14, n. 1, p. 29–38, 1994.

BÉNARD-LARIBIÈRE, A. et al. Comorbidities and concurrent medications increasing the risk of adverse drug reactions: prevalence in French benzodiazepine users. **European Journal of Clinical Pharmacology**, v. 72, n. 7, p. 869–876, 2016.

BERRY, R. B.; MAHUTTE, C. K.; LIGHT, R. W. Effect of hypercapnia on the arousal response to airway occlusion during sleep in normal subjects. **Journal of Applied Physiology**, v. 74, n. 5, p. 2269–2275, 1993.

BIRKETT, M. A. et al. Acute anxiogenic-like effects of selective serotonin reuptake inhibitors are attenuated by the benzodiazepine diazepam in BALB/c mice. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 98, n. 4, p. 544–551, 2011.

BOON, M. et al. Combining opioids and benzodiazepines: Effects on mortality and severe adverse respiratory events. **Annals of Cardiothoracic Surgery**, v. 9, n. 2, p. 542–557, 2020.

BORKOWSKI, A. H. et al. Interaction between delta opioid receptors and benzodiazepines in CO₂-induced respiratory responses in mice. **Brain Research**, v. 1396, p. 54–59, 17 jun. 2011.

BOWERY, N. G.; HUDSON, A. L.; PRICE, G. W. GABA_A and GABA_B receptor site distribution in the rat central nervous system. **Neuroscience**, v. 20, n. 2, p. 365–83, fev. 1987.

BRAMBILLA, P. et al. **GABAergic dysfunction in mood disorders** Molecular

PsychiatryMol Psychiatry, 2003. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12888801/>>. Acesso em: 4 ago. 2020

BRETON-PROVENCHER, V.; SUR, M. Active control of arousal by a locus coeruleus GABAergic circuit. **Nature Neuroscience**, v. 22, n. 2, p. 218–228, 14 fev. 2019.

BROADBELT, K. G. et al. Decreased GABAA receptor binding in the medullary serotonergic system in the sudden infant death syndrome. **Journal of Neuropathology and Experimental Neurology**, v. 70, n. 9, p. 799–810, set. 2011.

CALCATERRA, N. E.; BARROW, J. C. Classics in chemical neuroscience: Diazepam (valium). **ACS Chemical Neuroscience**, v. 5, n. 4, p. 253–260, 2014.

CARVALHO, D. DE et al. Role of neurokinin-1 expressing neurons in the locus coeruleus on ventilatory and cardiovascular responses to hypercapnia. **Respiratory Physiology & Neurobiology**, v. 172, p. 24–31, 2010.

CHATONNET, F. et al. Distinct roles of Hoxa2 and Krox20 in the development of rhythmic neural networks controlling inspiratory depth, respiratory frequency, and jaw opening. **Neural development**, v. 2, n. 1, p. 19, 26 set. 2007.

CUMMINGS, K. J. et al. Severe spontaneous bradycardia associated with respiratory disruptions in rat pups with fewer brain stem 5-HT neurons. **American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology**, v. 296, n. 6, jun. 2009.

CUMMINGS, K. J. et al. Postnatal loss of brainstem serotonin neurones compromises the ability of neonatal rats to survive episodic severe hypoxia. **The Journal of physiology**, v. 589, n. Pt 21, p. 5247–56, 1 nov. 2011.

DE CARVALHO, D. et al. Neurochemical and electrical modulation of the Locus coeruleus: Contribution to CO2 drive to breathe. **Frontiers in Physiology**, v. 5 JUL, 2014.

DEJOURS, P. **Principles of comparative respiratory physiology**. Amsterdam; New York; New York: Elsevier/North-Holland Biomedical Press ; Sole distributors for the U.S.A. and Canada, Elsevier North-Holland, 1981.

DEPOCAS, F.; HART, J. S. Use of the Pauling oxygen analyzer for measurement of oxygen consumption of animals in open-circuit systems and in a short-lag, closed-circuit apparatus. **Journal of applied physiology**, v. 10, n. 3, p. 388–92, maio 1957.

DIMITROV, E. L.; YANAGAWA, Y.; USDIN, T. B. Forebrain GABAergic projections to locus coeruleus in mouse. **The Journal of comparative neurology**, v. 521, n. 10, p. 2373–97, 1 jul. 2013.

DRORBAUGH, J. E.; FENN, W. O. A barometric method for measuring ventilation in newborn infants. **Pediatrics**, v. 16, n. 1, p. 81–7, jul. 1955.

DUNCAN, J. R. et al. Brainstem serotonergic deficiency in Sudden Infant Death Syndrome. **JAMA**, v. 303, n. 5, p. 430–437, 2010.

DUNCAN, J. R.; BYARD, R. W. Sudden Infant Death Syndrome: Definitions. In: **SIDS Sudden infant and early childhood death: The past, the present and the future**. [s.l.] University of Adelaide Press, 2018. p. 1–14.

EL-GUEBALY, N.; SAREEN, J.; STEIN, M. B. Are there guidelines for the responsible prescription of benzodiazepines? **Can J Psychiatry**, v. 55, n. 11, 2010.

FEARON, I. M. et al. GABA mediates autoreceptor feedback inhibition in the rat carotid body via presynaptic GABAB receptors and TASK-1. **Journal of Physiology**, v. 553, n. 1, p. 83–94, 15 nov. 2003.

FELDMAN, J. L.; KAM, K. Facing the challenge of mammalian neural microcircuits: Taking a few breaths may help. **Journal of Physiology**, v. 593, n. 1, p. 3–23, 2015.

FERNÁNDEZ-GUASTI, A. et al. Diazepam and progesterone produce sexually dimorphic actions on the rat EEG: Role of the neonatal sexual differentiation process. **Psychoneuroendocrinology**, v. 28, n. 1, p. 85–100, 2003.

FERNÁNDEZ-GUASTI, A.; PICAZO, O. Anxiolytic actions of diazepam, but not of buspirone, are influenced by gender and the endocrine stage. **Behavioural Brain Research**, v. 88, n. 2, p. 213–218, nov. 1997.

FILIANO, J. J.; KINNEY, H. C. A perspective on neuropathologic findings in victims of the sudden infant death syndrome: The triple-risk model. **Neonatology**, v. 65, n. 3–4, p. 194–197, 1994.

FINAN, D. S.; SMITH, A. Jaw stretch reflexes in children. **Experimental Brain Research**, v. 164, n. 1, p. 58–66, 2005.

FLEMING, P. J.; BLAIR, P. S.; PEASE, A. Sudden unexpected death in infancy: Aetiology, pathophysiology, epidemiology and prevention in 2015. **Archives of Disease in Childhood**, v. 100, n. 10, p. 984–988, 1 out. 2015.

FREEMAN, M. P. et al. Obstetrical and neonatal outcomes after benzodiazepine exposure during pregnancy: Results from a prospective registry of women with psychiatric disorders. **General Hospital Psychiatry**, v. 53, n. November 2017, p. 73–79, 2018.

FUXE, K. et al. The possible involvement of GABA mechanisms in the action of benzodiazepines on central catecholamine neurons. **Advances in biochemical psychopharmacology**, n. 14, p. 45–61, 1975.

GARGAGLIONI, L. H.; HARTZLER, L. K.; PUTNAM, R. W. The locus coeruleus and central chemosensitivity. **Respiratory Physiology and Neurobiology**, v. 173, n. 3, p. 264–273, 2010.

GARGAGLIONI, L. H.; MARQUES, D. A.; PATRONE, L. G. A. Sex differences in breathing. **Comparative Biochemistry and Physiology -Part A: Molecular and Integrative Physiology**, v. 238, n. January, 2019.

GHAFFAR, R. et al. Frequency and predictors of anxiety and depression among pregnant women attending tertiary healthcare institutes of Quetta City, Pakistan. **BMC women's health**, v. 17, n. 1, p. 51, 2017.

GHALI, M. G. Z.; BESHAY, S. Role of fast inhibitory synaptic transmission in neonatal respiratory rhythmogenesis and pattern formation. **Molecular and Cellular Neuroscience**, v. 100, n. July, p. 103400, 2019.

GOLDBERG, J. et al. Age at death and risk factors in sudden infant death syndrome. **Australian paediatric journal**, v. 22 Suppl 1, p. 21–28, 1986.

GOODMAN, J. H.; CHENAUSKY, K. L.; FREEMAN, M. P. Anxiety Disorders During Pregnancy. **The Journal of Clinical Psychiatry**, v. 75, n. 10, p. e1153–e1184, 28 out. 2014.

GREER, J. J.; FUNK, G. D.; BALLANYI, K. Preparing for the first breath: prenatal maturation of respiratory neural control. **The Journal of physiology**, v. 570, n. Pt 3, p. 437–44, 1 fev. 2006.

GUYENET, P. G. Regulation of breathing and autonomic outflows by chemoreceptors. **Comprehensive Physiology**, v. 4, n. 4, p. 1511–1562, 2014.

HAXHIU, M. A. et al. The role of the medullary raphe nuclei in regulation of cholinergic outflow to the airways. **Journal of the Autonomic Nervous System**, v. 69, n. 1, p. 64–71, 3 mar. 1998.

HERLENIUS, E.; LAGERCRANTZ, H. Development of neurotransmitter systems during critical periods. **Experimental Neurology**, v. 190, n. SUPPL. 1, p. 8, 2004.

HILAIRE, G. Endogenous noradrenaline affects the maturation and function of the respiratory network: Possible implication for SIDS. **Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical**, v. 126–127, p. 320–331, 2006.

HILAIRE, G.; DURON, B. Maturation of the mammalian respiratory system. **Physiological Reviews**, v. 79, n. 2, p. 325–360, 1999.

HODGES, M. R. et al. Transgenic Mice Lacking Serotonin Neurons Have Severe Apnea and High Mortality during Development. **Journal of Neuroscience**, v. 29, n. 33, p. 10341–10349, 2009.

ICEMAN, K. E. et al. CO₂-inhibited neurons in the medullary raphe are GABAergic. **Respiratory Physiology and Neurobiology**, v. 203, p. 28–34, 1 nov. 2014.

IGARASHI, A.; ZADZILKA, N.; SHIRAHATA, M. Benzodiazepines and GABA-GABAA receptor system in the cat carotid body. Arterial Chemoreceptors. **Adv Exp Med Biol**, v. 648, p. 169–175, 2009.

IGARASHI, K. et al. Benzyl-polyamines: novel, potent N-methyl-D-aspartate receptor antagonists. **The Journal of pharmacology and experimental therapeutics**, v. 283, n. 2, p. 533–540, nov. 1997.

IQBAL, M. M.; SOBHAN, T.; RYALS, T. Effects of Commonly Used Benzodiazepines on the Fetus, the Neonate, and the Nursing Infant. **Psychiatric Services**, v. 53, n. 1, p. 39–49, 2002.

JACQUIN, T. D. et al. Reorganization of pontine rhythmogenic neuronal networks in Krox-20 knockout mice. **Neuron**, v. 17, n. 4, p. 747–58, out. 1996.

JIN, X. et al. GABAergic synaptic inputs of locus coeruleus neurons in wild-type and Mecp2-null mice. **American journal of physiology. Cell physiology**, v. 304, n. 9, p. C844–57, 1 maio 2013.

JIN, X. et al. Identification of a group of GABAergic neurons in the dorsomedial area of the locus coeruleus. **PLoS ONE**, v. 11, n. 1, p. 1–13, 2016.

JUDGE, S. J.; YOUNG, R. L.; GARTSIDE, S. E. GABAA receptor modulation of 5-HT neuronal firing in the median raphe nucleus: Implications for the action of anxiolytics. **European Neuropsychopharmacology**, v. 16, n. 8, p. 612–619, dez. 2006.

JULIEN, C.; BAIRAM, A.; JOSEPH, V. Chronic intermittent hypoxia reduces ventilatory long-term facilitation and enhances apnea frequency in newborn rats. **American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology**, v. 294, n. 4, abr. 2008.

KELLOGG, C. K. Sex differences in long-term consequences of prenatal diazepam exposure: Possible underlying mechanisms. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 64, n. 4, p. 673–680, 1999.

KIM, C. et al. Midazolam depresses carotid body chemoreceptor activity. **Acta Anaesthesiologica Scandinavica**, v. 50, n. 2, p. 144–149, fev. 2006.

KINNEY, H. C. et al. The development of the medullary serotonergic system in early human life. **Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical**, v. 132, n. 1–2, p. 81–102, 30 mar. 2007.

KINNEY, H. C.; THACH, B. T. **Medical progress: The sudden infant death syndrome** *New England Journal of Medicine* Massachusetts Medical Society, , 20 ago. 2009.

KOFF, J. M.; MILLER, L. G. Prenatal lorazepam exposure: 4. Persistent alterations in pentylenetetrazole-induced seizure threshold and GABA-dependent chloride uptake after prenatal lorazepam exposure. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 51, n. 4, p. 721–724, 1995.

KUWANA, S. et al. Disturbance of neural respiratory control in neonatal mice lacking GABA synthesizing enzyme 67-kDa isoform of glutamic acid decarboxylase. **Neuroscience**, v. 120, n. 3, p. 861–70, 2003.

LEVINE, E. S.; JACOBS, B. L. Neurochemical afferents controlling the activity of serotonergic neurons in the dorsal raphe nucleus: Microiontophoretic studies in the awake cat. **Journal of Neuroscience**, v. 12, n. 10, p. 4037–4044, 1992.

LI, A.; NATTIE, E. Catecholamine neurones in rats modulate sleep, breathing, central chemoreception and breathing variability. **Journal of Physiology**, v. 570, n. 2, p. 385–396, 2006.

LIU, Q.; WONG-RILEY, M. T. T. Postnatal developmental expressions of neurotransmitters and receptors in various brain stem nuclei of rats. **Journal of Applied Physiology**, v. 98, n. 4, p. 1442–1457, abr. 2005.

LIU, Q.; WONG-RILEY, M. T. T. Developmental changes in the expression of GABAA receptor subunits $\alpha 1$, $\alpha 2$, and $\alpha 3$ in brain stem nuclei of rats. **Brain Research**, v. 1098, n. 1, p. 129–138, 2006.

LIVESEY, G.; ELIA, M. Estimation of energy expenditure, net carbohydrate utilization, and net fat oxidation and synthesis by indirect calorimetry: Evaluation of errors with special reference to the detailed composition of fuels. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 47, n. 4, p. 608–628, 1988.

LUBICS, A. et al. Neurological reflexes and early motor behavior in rats subjected to neonatal hypoxic-ischemic injury. **Behavioural brain research**, v. 157, n. 1, p. 157–65, 10 fev. 2005.

MEENA, H. et al. GABAA receptors in nucleus accumbens shell mediate the hyperphagia and weight gain following haloperidol treatment in rats. **Life Sciences**, v. 84, n. 5–6, p. 156–163, 2009.

MILLHORN, D. E. et al. Extent of colocalization of serotonin and GABA in neurons of the ventral medulla oblongata in rat. **Brain research**, v. 461, n. 1, p. 169–74, 27 set. 1988.

MOON, R. Y.; HORNE, R. S.; HAUCK, F. R. Sudden infant death syndrome. **The Lancet**, v. 370, n. 9598, p. 1578–1587, 3 nov. 2007.

MORTOLA, J. P. Breathing pattern in newborns. **Journal of applied physiology: respiratory, environmental and exercise physiology**, v. 56, n. 6, p. 1533–40, jun. 1984.

MORTOLA, J. P.; FRAPPELL, P. B. Measurements of air ventilation in small vertebrates. **Respiratory Physiology & Neurobiology**, v. 186, n. 2, p. 197–205, 1 abr. 2013.

MOSHER, B. P.; TAYLOR, B. E.; HARRIS, M. B. Intermittent hypercapnia enhances CO₂ responsiveness and overcomes serotonergic dysfunction. **Respiratory Physiology and Neurobiology**, v. 200, p. 33–39, 15 ago. 2014.

NICOSIA, A. et al. Long-lasting behavioral changes induced by pre- or neonatal exposure to diazepam in rats. **European journal of pharmacology**, v. 469, n. 1–3, p. 103–9, 23 maio 2003.

OGAWA, Y.; TAKESHIMA, N.; FURUKAWA, T. A. Maternal exposure to benzodiazepine and risk of preterm birth and low birth weight: A case-control study using a claims database in Japan. **Asia-Pacific Psychiatry**, v. 10, n. 3, p. e12309, 1 set. 2018.

OLATUNJI, B. O.; CISLER, J. M.; DEACON, B. J. **Efficacy of cognitive behavioral therapy for anxiety disorders: A review of meta-analytic findings** *Psychiatric Clinics of North America* W.B. Saunders, , 2010.

OOMORI, Y. et al. Immunohistochemical and histochemical evidence for the presence of noradrenaline, serotonin and gamma-aminobutyric acid in chief cells of the mouse carotid body. **Cell and Tissue Research**, v. 278, n. 2, p. 249–254, nov. 1994.

PAN, Z. Z.; WILLIAMS, J. T. GABA- and glutamate-mediated synaptic potentials in rat dorsal raphe neurons in vitro. **Journal of Neurophysiology**, v. 61, n. 4, p. 719–726, 1989.

PASQUALE-STYLES, M. A.; TACKITT, P. L.; SCHMIDT, C. J. Infant death scene investigation and the assessment of potential risk factors for asphyxia: a review of 209 sudden unexpected infant deaths. **Journal of forensic sciences**, v. 52, n. 4, p. 924–929, jul. 2007.

PATRONE, L. G. A. et al. Brainstem catecholaminergic neurones and breathing control during postnatal development in male and female rats. **The Journal of Physiology**, v. 596, n. 15, p. 3299–3325, ago. 2018.

PICARD, N. et al. Prenatal Diazepam Exposure Alters Respiratory Control System and GABA A and Adenosine Receptor Gene Expression in Newborn Rats. **Pediatr Res**, v. 64, n. 1, p. 44–49, 2008.

PIEK, J. P. The role of variability in early motor development. **Infant Behavior and Development**, v. 25, n. 4, p. 452–465, 2002.

POKORSKI, M.; OHTANI, S. GABA Immunoreactivity in Chemoreceptor Cells of the Cat Carotid Body. **Acta Histochemica et Cytochemica**, v. 32, n. 2, p. 179–182, 1999.

PTAK, K. et al. Raphe neurons stimulate respiratory circuit activity by multiple mechanisms via endogenously released serotonin and substance p. **Journal of Neuroscience**, v. 29, n. 12, p. 3720–3737, 25 mar. 2009.

RADOJČIĆ, M. R. et al. Prenatal exposure to anxiolytic and hypnotic medication in relation to behavioral problems in childhood: A population-based cohort study. **Neurotoxicology and Teratology**, v. 61, p. 58–65, 1 maio 2017.

RAURICH, J. M.; IBAÑEZ, J.; MARSE, P. Validation of a new closed circuit indirect calorimetry method compared with the open Douglas bag method. **Intensive Care Medicine**, v. 15, n. 4, p. 274–278, 1989.

RIVERA, C. et al. The K⁺/Cl⁻ co-transporter KCC2 renders GABA hyperpolarizing during neuronal maturation. **Nature**, v. 397, n. 6716, p. 251–255, 21 jan. 1999.

RIVERA, C.; VOIPIO, J.; KAILA, K. Two developmental switches in GABAergic signalling: The K⁺-Cl⁻ cotransporter KCC2 and carbonic anhydrase CAVII. **Journal of Physiology**, v. 562, n. 1, p. 27–36, 2005.

RODRIGUEZ-ZAFRA, M. et al. Effects of perinatal diazepam exposure on the sexually dimorphic rat locus coeruleus. **Neurotoxicology and Teratology**, v. 15, n. 2, p. 139–144, 1993.

ROY-BYRNE, P. Treatment-refractory anxiety; definition, risk factors, and treatment challenges. **Dialogues in Clinical Neuroscience**, v. 17, n. 2, p. 191–206, 2015.

RUDOLF, M. et al. Depression of central respiratory drive by nitrazepam. **Thorax**, v. 33, n. 1, p. 97–100, 1978.

SAITO, V. M.; BRANDÃO, M. L. The benzodiazepine midazolam acts on the expression of the defensive behavior, but not on the processing of aversive information, produced by exposure to the elevated plus maze and electrical stimulations applied to the inferior colliculus of rats. **Neuropharmacology**, v. 88, p. 180–186, 2015.

SAXÉN, I. Associations between oral clefts and drugs taken during pregnancy. **International Journal of Epidemiology**, v. 4, n. 1, p. 37–44, 1975.

SEGOVIA, S. et al. Early postnatal diazepam exposure alters sex differences in the rat brain. **Brain Research Bulletin**, v. 26, n. 6, p. 899–907, 1991.

SHEEHY, O.; ZHAO, J.-P.; BÉRARD, A. Association Between Incident Exposure to Benzodiazepines in Early Pregnancy and Risk of Spontaneous Abortion. **JAMA Psychiatry**, 15 maio 2019.

SHIHARATA, M. **Neurotransmission in the carotid body and anesthesia** *Journal of Anesthesia* *J Anesth*, , 2002.

SHYKEN, J. M. et al. Benzodiazepines in Pregnancy. **Clinical Obstetrics and Gynecology**, v. 62, n. 1, p. 156–167, 2019.

SMITH, A.; GOFFMAN, L. Stability and patterning of speech movement sequences in children and adults. **Journal of Speech, Language, and Hearing Research**, v. 41, n. 1, p. 18–30, 1998.

STARCEVIC, V. The reappraisal of benzodiazepines in the treatment of anxiety and related disorders. **Expert Review of Neurotherapeutics**, v. 14, n. 11, p. 1275–1286, 22 nov. 2014.

SUNDBAKK, L. M. et al. Impact of prenatal exposure to benzodiazepines and z-hypnotics on behavioral problems at 5 years of age: A study from the Norwegian Mother and Child Cohort Study. **PLoS ONE**, v. 14, n. 6, 1 jun. 2019.

TAKAKURA, A. C. et al. Control of breathing and blood pressure by parafacial neurons in conscious rats. **Experimental Physiology**, v. 98, n. 1, p. 304–315, 2013.

TAKATARO, H. et al. [How do diazepam and flumazenil influence respiratory control by the activities of both hypoglossal and phrenic nerves in rabbits?]. **Masui. The Japanese Journal of Anesthesiology**, v. 52, n. 12, p. 1286–1292, 1 dez. 2003.

TANAKA, J. et al. GABAergic systems in the nucleus tractus solitarius regulate noradrenaline release in the subfornical organ area in the rat. **Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical**, v. 100, n. 1–2, p. 58–65, 30 set. 2002.

TAO, R.; MA, Z.; AUERBACH, S. B. Differential regulation of 5-hydroxytryptamine release by GABA(A) and GABA(B) receptors in midbrain raphe nuclei and forebrain of rats. **British Journal of Pharmacology**, v. 119, n. 7, p. 1375–1384, 1996.

THELEN, E. Motor development. A new synthesis. **The American psychologist**, v. 50, n. 2, p. 79–95, fev. 1995.

THELEN, E.; SMITH, L. B. **A dynamic systems approach to the development of cognition and action, 1994** Cambridge, MA: MIT Press, , 1994.

TINKER, S. C. et al. Use of benzodiazepine medications during pregnancy and potential risk for birth defects, National Birth Defects Prevention Study, 1997–2011. **Birth Defects Research**, v. 111, n. 10, p. 613–620, 19 jun. 2019.

TOUWEN, B. C. L. VARIABILITY AND STEREOTYPY OF SPONTANEOUS MOTILITY AS A PREDICTOR OF NEUROLOGICAL DEVELOPMENT OF PRETERM INFANTS. **Developmental Medicine & Child Neurology**, v. 32, n. 6, p. 501–508, 1990.

TURVEY, M. T.; FITZPATRICK, P. **Commentary: Development of Perception-Action Systems and General Principles of Pattern Formation** *Child Development*, 1993. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8404263/>>. Acesso em: 4 ago. 2020

VIEMARI, J. C. et al. Phox2a Gene, A6 Neurons, and Noradrenaline Are Essential for Development of Normal Respiratory Rhythm in Mice. **Journal of Neuroscience**, v. 24, n. 4, p. 928–937, 2004.

VISWASAM, K.; ESLICK, G. D.; STARCEVIC, V. Prevalence, onset and course of anxiety disorders during pregnancy: A systematic review and meta analysis. **Journal of Affective Disorders**, v. 255, p. 27–40, 1 ago. 2019.

VOZORIS, N. T. Do benzodiazepines contribute to respiratory problems? **Expert Review of Respiratory Medicine**, v. 8, n. 6, p. 661–663, 2014.

WALSH, B.; SMITH, A. Articulatory movements in adolescents: evidence for protracted development of speech motor control processes. **Journal of speech, language, and hearing research : JSLHR**, v. 45, n. 6, p. 1119–33, 2002.

WETTSTEIN, J. G.; TEEPLE, E. S.; MORSE, W. H. Respiratory effects of benzodiazepine-related drugs in awake rhesus monkeys. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 255, n. 3, p. 1328 LP – 1334, 1 dez. 1990.

WONG-RILEY, M. T. T.; LIU, Q. Neurochemical and physiological correlates of a critical period of respiratory development in the rat. **Respir Physiol Neurobiol**, v. 164, n. 414, p. 28–37, 2008.

WONG-RILEY, M. T. T.; LIU, Q.; GAO, X. Peripheral-central chemoreceptor interaction and the significance of a critical period in the development of respiratory control. **Respiratory physiology & neurobiology**, v. 185, n. 1, p. 156–69, 1 jan. 2013.

YIU, M. K.; KWAN, Y. W.; NGAN, M. P. Hormonal modulation of benzodiazepines' actions on rat isolated uterus. **European Journal of Pharmacology**, v. 302, n. 1–3, p. 99–108, 1996.

YONKERS, K. A. et al. Association of Panic Disorder, Generalized Anxiety Disorder, and Benzodiazepine Treatment During Pregnancy With Risk of Adverse Birth Outcomes. **JAMA psychiatry**, v. 74, n. 11, p. 1145–1152, 2017.

ZANELLA, S. et al. Possible modulation of the mouse respiratory rhythm generator by A1/C1 neurones. **Respiratory Physiology and Neurobiology**, v. 153, n. 2, p. 126–138, 2006.

ZHANG, M. et al. Postsynaptic action of GABA in modulating sensory transmission in co-cultures of rat carotid body via GABA A receptors. **Journal of Physiology**, v. 587, n. 2, p. 329–344, 15 jan. 2009.

TABLE 1 - Qualitative data on the gestational period of the females used in the present experiment. From left to right, are described the identification (ID) of each mother, duration of pregnancy in embryonic days, the number of males (♂) and females (♀) as well the total number of pups, and additional observations (OBS) for each pregnancy. Bold was used to highlight those females that had any issue.

ID	Length of gestation (days)	♂	♀	Total number of pups	OBS
CONTROL (C)					
1-C	21	4	9	13	
2-C	21	2	6	8	
3-C	22	8	5	13	
4-C	21	7	7	14	
5-C	21	1	4	5	
6-C	22	4	4	8	
7-C	21	4	7	11	
8-C	21	7	2	9	
9-C	21	6	6	12	
10-C	21	5	7	12	
DIAZEPAM (D)					
1-D	22	4	4	8	-
2-D	21	4	9	13	-
3-D	22	1	-	1	6 pups were not born
4-D	21	9	3	12	-
5-D	21	8	5	13	1 female stillbirth
6-D	22	4	5	9	
7-D	21	5	5	10	
8-D	22	2	3	5	
9-D	22	2	8	10	
10-D	21	5	7	12	

TABLE 2 – Diazepam increases in f_R and $\dot{V}O_2$ of females at P0-1, decreases the ventilation of males at P12-13 and P21-22, and increases the body mass gain at P21-22 of both sexes. Absolute values for ventilation (\dot{V}_E), tidal volume (V_T), respiratory frequency (f_R), oxygen consumption ($\dot{V}O_2$), air convection requirement ($\dot{V}_E/\dot{V}O_2$) of vehicle (CTRL) and Diazepam-treated (DZP) animals at P0-1, P12-13 and P21-22, during the resting conditions (21% O_2 and 0% CO_2). Body mass (in grams) is also shown for all ages and sexes. *Means statistical difference between CTRL and DZP groups and “n” is the number of animals per group.

	FEMALE						MALE					
	P0-1		P12-13		P21-22		P0-1		P12-13		P21-22	
	CTRL (n=9)	DZP (n=8)	CTRL (n=9)	DZP (n=8)	CTRL (n=6)	DZP (n=10)	CTRL (n=7)	DZP (n=12)	CTRL (n=8)	DZP (n=7)	CTRL (n=10)	DZP (n=6)
\dot{V}_E (mL.Kg ⁻¹ .min ⁻¹)	1271.2 ± 96.8	1518.2 ± 109.7	1175.8 ± 68.6	1077.3 ± 87.3	2135.4 ± 150.7	1877.2 ± 50.3	1555.4 ± 151.9	1420.6 ± 146.3	1441.1 ± 115.1	916.9 ± 88.1*	2556.1 ± 211.8	1847.6 ± 86.8*
V_T (mL.Kg ⁻¹)	11.6 ± 0.9	12.2 ± 1.0	9.8 ± 0.7	8.6 ± 0.6	15.5 ± 1.1	13.4 ± 0.7	12.0 ± 1.0	11.9 ± 1.1	11.6 ± 0.9	7.3 ± 0.5*	18.5 ± 1.7	12.8 ± 0.6*
f_R (breaths.min ⁻¹)	110.1 ± 4.3	125.2 ± 3.5*	121.6 ± 4.6	125.6 ± 6.4	138.8 ± 7.9	142.9 ± 5.5	128.9 ± 5.5	118.8 ± 3.8	124.7 ± 3.7	124.8 ± 4.4	139.6 ± 5.6	145.3 ± 6.8
$\dot{V}O_2$ (mL.Kg ⁻¹ .min ⁻¹)	48.1 ± 6.3	67.3 ± 2.7*	47.5 ± 1.6	47.9 ± 1.5	51.5 ± 4.8	50.8 ± 2.4	66.7 ± 5.7	60.6 ± 5.3	46.8 ± 1.3	48.7 ± 1.8	37.6 ± 3.0	46.8 ± 4.36
$\dot{V}_E/\dot{V}O_2$	27.9 ± 2.9	22.8 ± 1.7	24.8 ± 1.4	22.5 ± 1.8	43.4 ± 5.4	37.6 ± 1.9	22.5 ± 2.6	24.2 ± 2.2	30.8 ± 2.1	19.0 ± 2.2*	75.4 ± 11.9	40.7 ± 3.0*
Body mass (g)	6.8 ± 0.2	7.1 ± 0.2	28.8 ± 0.9	30.1 ± 1.4	54.4 ± 2.1	62.4 ± 2.6*	7.1 ± 0.3	7.0 ± 0.2	29.6 ± 1.1	29.6 ± 1.9	56.7 ± 2.0	62.6 ± 5.2*

TABLE 3 – DZP-treated females have a decrease in tidal volume and in the air convection requirement at P0-1, as well an increase in f_R . DZP-treated females at P12-13 also had a decrease in tidal volume with a decrease in ventilation and in the air convection requirement. DZP-treated males present a decrease in respiratory frequency in P0-1. At P12-13, DZP-treated males show a reduction in all respiratory variables but air convection requirement.

Absolute values for for ventilation (\dot{V}_E), tidal volume (V_T), respiratory frequency (f_R), oxygen consumption ($\dot{V}O_2$), air convection requirement ($\dot{V}_E/\dot{V}O_2$) of control (CTRL) and Diazepam-treated (DZP) animals at P0-1, P12-13 and P21-22, during hypercapnia (7% CO₂). *Means statistical difference between CTRL and DZP groups and “n” is the number of animals per group.

	FEMALE						MALE					
	P0-1		P12-13		P21-22		P0-1		P12-13		P21-22	
	CTRL (n=9)	DZP (n=8)	CTRL (n=9)	DZP (n=8)	CTRL (n=6)	DZP (n=10)	CTRL (n=7)	DZP (n=11)	CTRL (n=8)	DZP (n=7)	CTRL (n=10)	DZP (n=6)
\dot{V}_E (mL.Kg ⁻¹ .min ⁻¹)	2838.8 ± 276.1	2709.1 ± 249.1	5152.8 ± 530.8	3724.6 ± 414.2*	6256.7 ± 426.3	5760.9 362.0	2626.9 ± 319.4	1947.5 ± 188.6	5650.5 ± 596.7	3324.4 ± 336.2*	7827.3 ± 692.8	6141.2 ± 736.3
V_T (mL.Kg ⁻¹)	24.4 ± 1.9	19.5 ± 1.3*	29.7 ± 2.7	21.4 ± 2.0*	30.9 ± 2.5	29.3 ± 1.6	18.3 ± 1.9	16.3 ± 1.5	32.0 ± 3.4	20.6 ± 1.5*	39.1 ± 4.6	30.4 ± 2.9
f_R (breaths.min ⁻¹)	116.1 ± 5.1	137.6 ± 6.5*	175.5 ± 11.6	173.4 ± 8.9	203.9 ± 5.2	196.8 ± 5.8	142.3 ± 5.3	120.2 ± 4.2*	177.2 ± 3.4	160.7 ± 7.7*	204.1 ± 4.8	200.2 ± 8.3
$\dot{V}O_2$ (mL.Kg ⁻¹ .min ⁻¹)	26.2 ± 3.2	35.1 ± 3.3	30.0 ± 1.3	30.2 ± 1.1	32.9 ± 3.1	29.6 ± 1.9	33.2 ± 1.5	28.8 ± 2.8	29.1 ± 2.2	23.9 ± 1.0*	23.3 ± 2.8	25.5 ± 2.1
$\dot{V}_E/\dot{V}O_2$	116.9 ± 20.9	78.5 ± 5.8*	175.1 ± 21.2	122.6 ± 12.2*	197.9 ± 20.2	205.3 ± 19.7	73.1 ± 11.6	75.4 ± 11.4	215.3 ± 45.4	140.0 ± 14.2	435.6 ± 122.0	237.7 ± 12.4

TABLE 4 – DZP-treated females show a reduction in respiratory frequency at P0-1 and in the air convection requirement at P12-13. DZP-treated males at P12-13 and P21-22 have a decrease in ventilation due to a reduction in the tidal volume, which promoted a decrease in the air convection requirement.

Absolute values for ventilation (\dot{V}_E), tidal volume (V_T), respiratory frequency (f_R), oxygen consumption ($\dot{V}O_2$), air convection requirement ($\dot{V}_E/\dot{V}O_2$) of vehicle (CTRL) and Diazepam-treated (DZP) animals at P0-1, P12-13 and P21-22, during hypoxia (10% O_2). *Means statistical difference between CTRL and DZP groups and “n” is the number of animals per group.

	FEMALE						MALE					
	P0-1		P12-13		P21-22		P0-1		P12-13		P21-22	
	CTRL (n=9)	DZP (n=8)	CTRL (n=9)	DZP (n=8)	CTRL (n=6)	DZP (n=10)	CTRL (n=7)	DZP (n=11)	CTRL (n=8)	DZP (n=7)	CTRL (n=10)	DZP (n=6)
\dot{V}_E (mL.Kg ⁻¹ .min ⁻¹)	1837.5 ± 131.7	2050.4 ± 150.9	3073.5 ± 396.6	2392.8 ± 91.4	5425.1 ± 703.6	4635.3 ± 545.8	1962.9 ± 259.0	1769.9 ± 217.3	3752.7 ± 369.4	2097.6 ± 144.1*	6500.7 ± 764.0	4797.5 ± 329.9
V_T (mL.Kg ⁻¹)	16.1 ± 0.5	13.9 ± 0.8*	19.1 ± 2.4	14.0 ± 1.2*	30.9 ± 2.6	25.6 ± 3.1	14.1 ± 1.4	13.2 ± 1.1	22.4 ± 2.5	13.2 ± 1.0*	36.1 ± 3.9	26.8 ± 1.5
f_R (breaths.min ⁻¹)	114.9 ± 8.5	149.7 ± 12.7*	161.7 ± 5.6	173.0 ± 7.9	173.1 ± 7.0	183.2 ± 10.9	136.4 ± 6.5	132.0 ± 7.9	170.7 ± 6.1	161.3 ± 10.3	180.0 ± 5.8	178.6 ± 5.8
$\dot{V}O_2$ (mL.Kg ⁻¹ .min ⁻¹)	19.1 ± 2.0	22.5 ± 2.1	20.9 ± 1.9	22.7 ± 1.5	23.0 ± 2.7	20.5 ± 1.4	23.0 ± 3.5	21.8 ± 3.3	20.4 ± 2.2	21.3 ± 1.6	18.8 ± 1.8	22.2 ± 1.7
$\dot{V}_E/\dot{V}O_2$	97.5 ± 8.8	94.4 ± 7.8	161.0 ± 25.4	106.8 ± 7.7	290.5 ± 101.2	228.5 ± 26.5	88.5 ± 20.0	92.4 ± 13.0	211.8 ± 44.4	99.5 ± 4.5*	410.1 ± 86.6	223.0 ± 26.7

TABLE 5 – Diazepam reduces de apnea duration as well apnea occurrence of females at P0-1, in resting conditions and hypoxia exposure, respectively.

Effect of exposure to Diazepam during pregnancy on duration of each apnea in seconds and the occurrence of apneas by time, in hours, for animals at P0-1. From left to right, results are presented in normoxic/normocapnic (21% O₂), hypercapnia (7% CO₂) and hypoxia (10% O₂), for each sex (females and males) and for control (CTRL) and DZP-treated (DZP) animals. Values are shown as mean and ± S.E.M. *Means statistical difference between CTRL and DZP groups and “n” is the number of animals per group.

	FEMALE (n = 9, 9)						MALE (n = 7, 12)					
	21% O ₂		7% CO ₂		10% O ₂		21% O ₂		7% CO ₂		10% O ₂	
	CTRL	DZP	CTRL	DZP	CTRL	DZP	CTRL	DZP	CTRL	DZP	CTRL	DZP
Apnea duration (s)	2.3 ± 0.2	1.9 ± 0.1*	1.4 ± 0.1	1.3 ± 0.1	1.7 ± 0.2	1.3 ± 0.1	1.6 ± 0.1	1.9 ± 0.3	1.2 ± 0.7	1.4 ± 0.1	1.5 ± 0.1	1.6 ± 0.1
Occurrence of apnea (apnea/hour)	117.5 ± 22.6	80.8 ± 19.0	17.7 ± 6.5	23.8 ± 6.9	97.4 ± 36.0	33.3 ± 12.1*	71.55 ± 27.9	92.3 ± 28.5	36.6 ± 13.4	38.3 ± 13.3	52.6 ± 17.2	54.8 ± 18.5

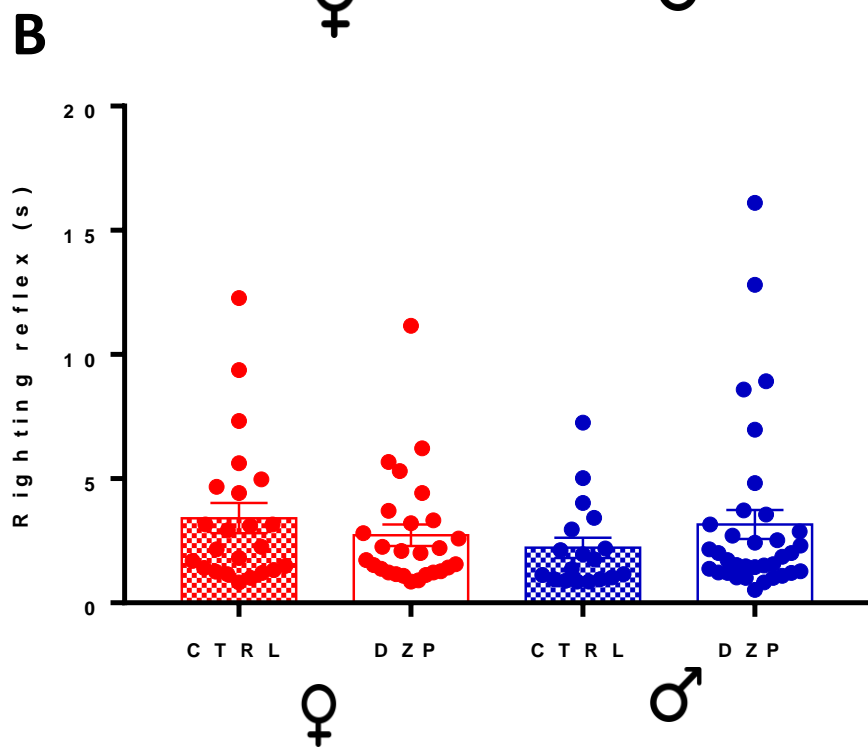
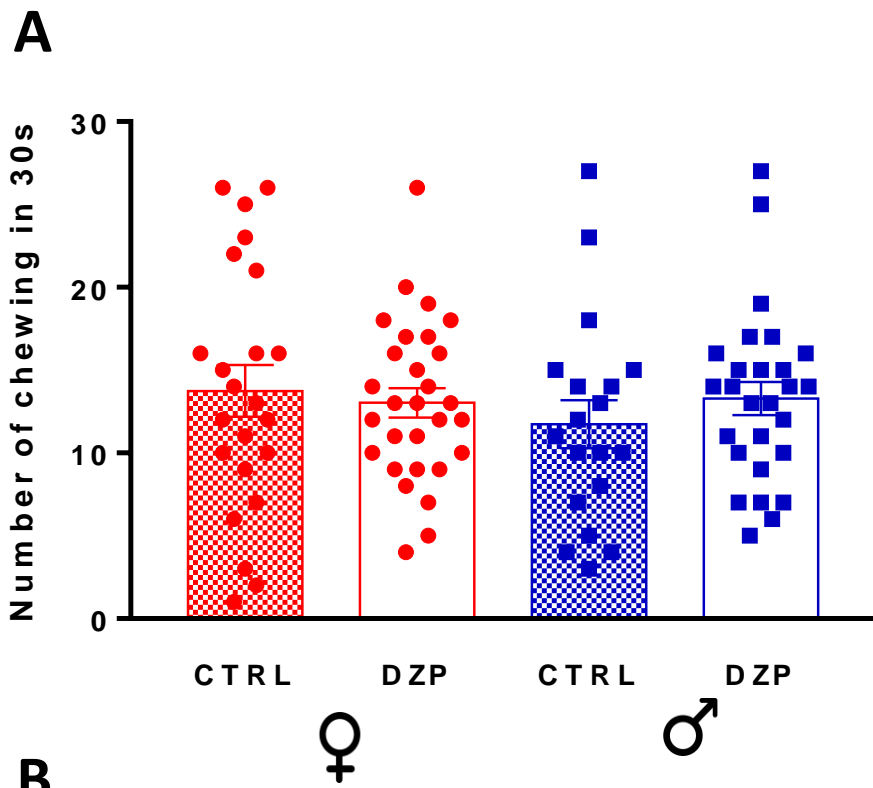


Figure 1

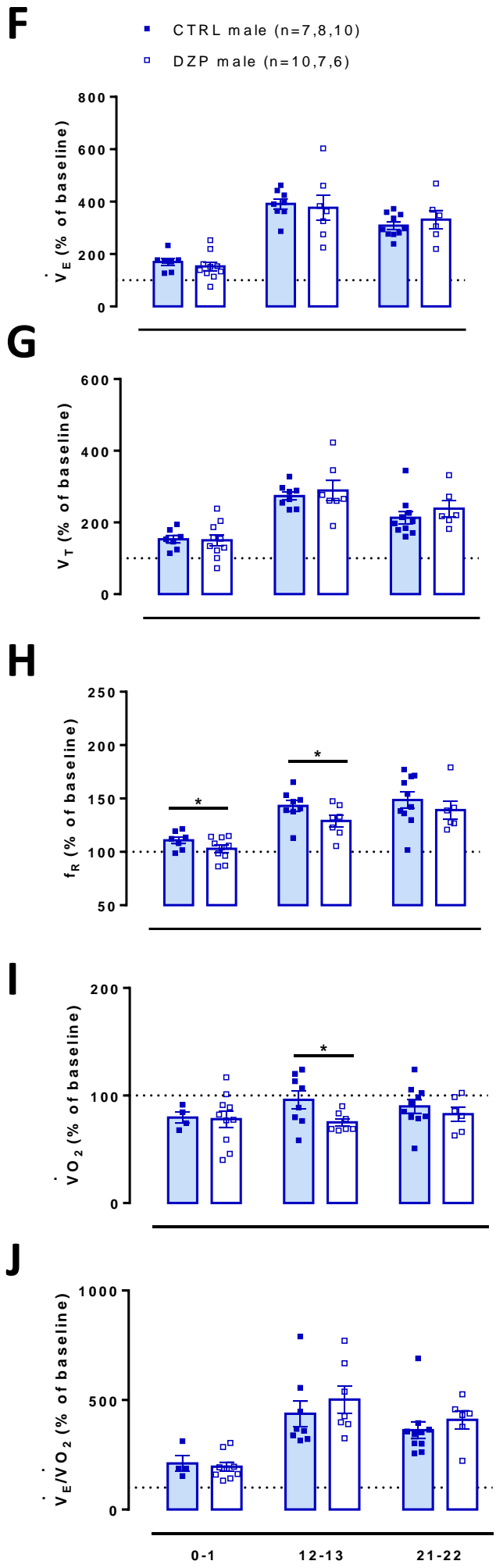
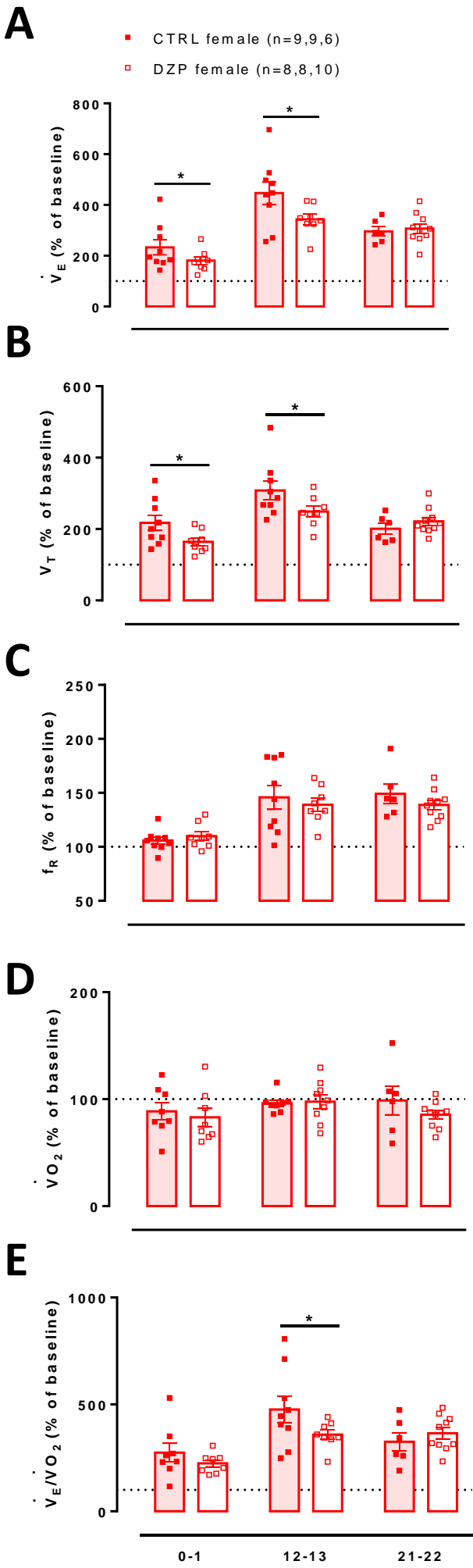


Figure 2

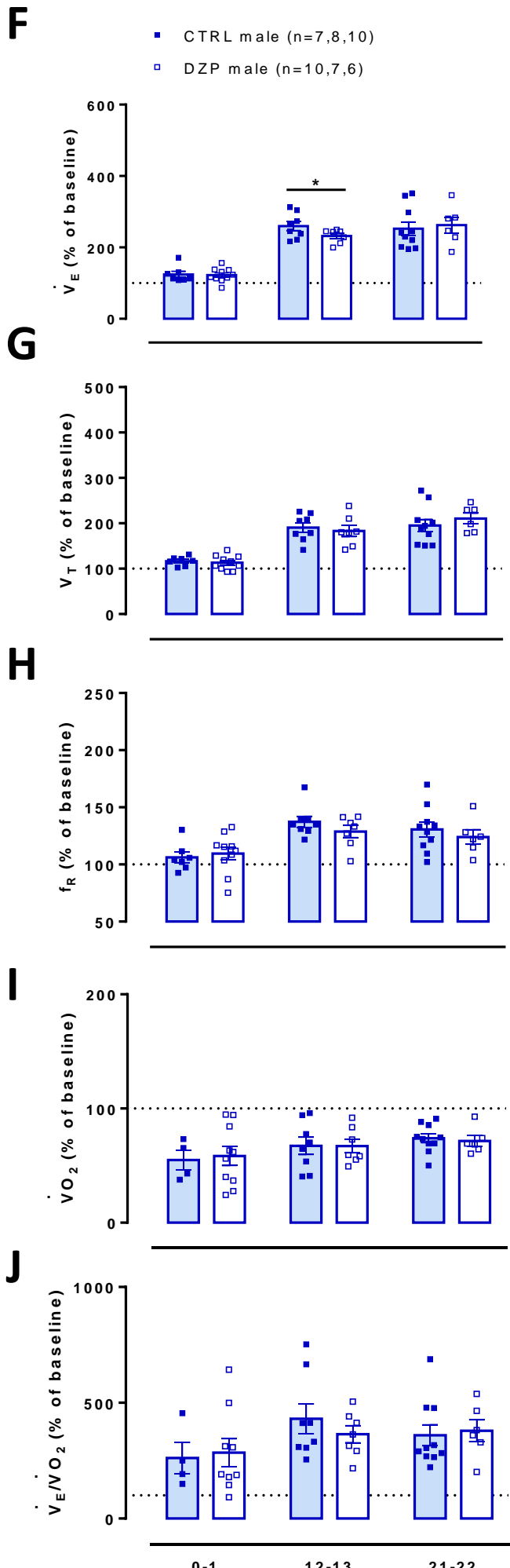
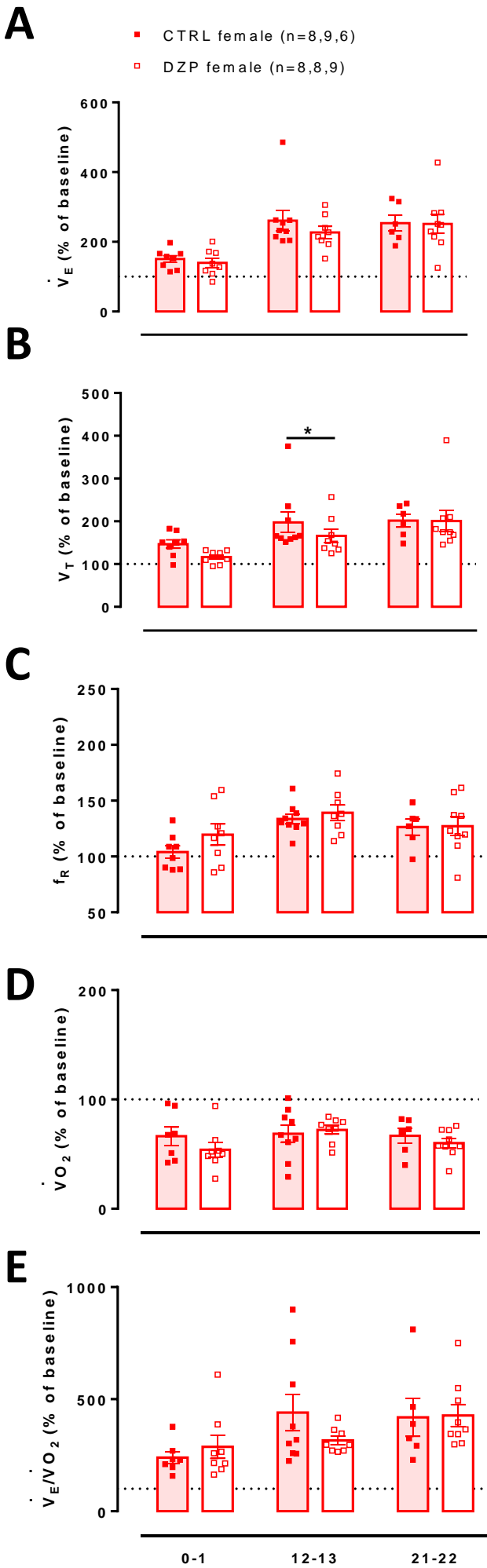


Figure 3

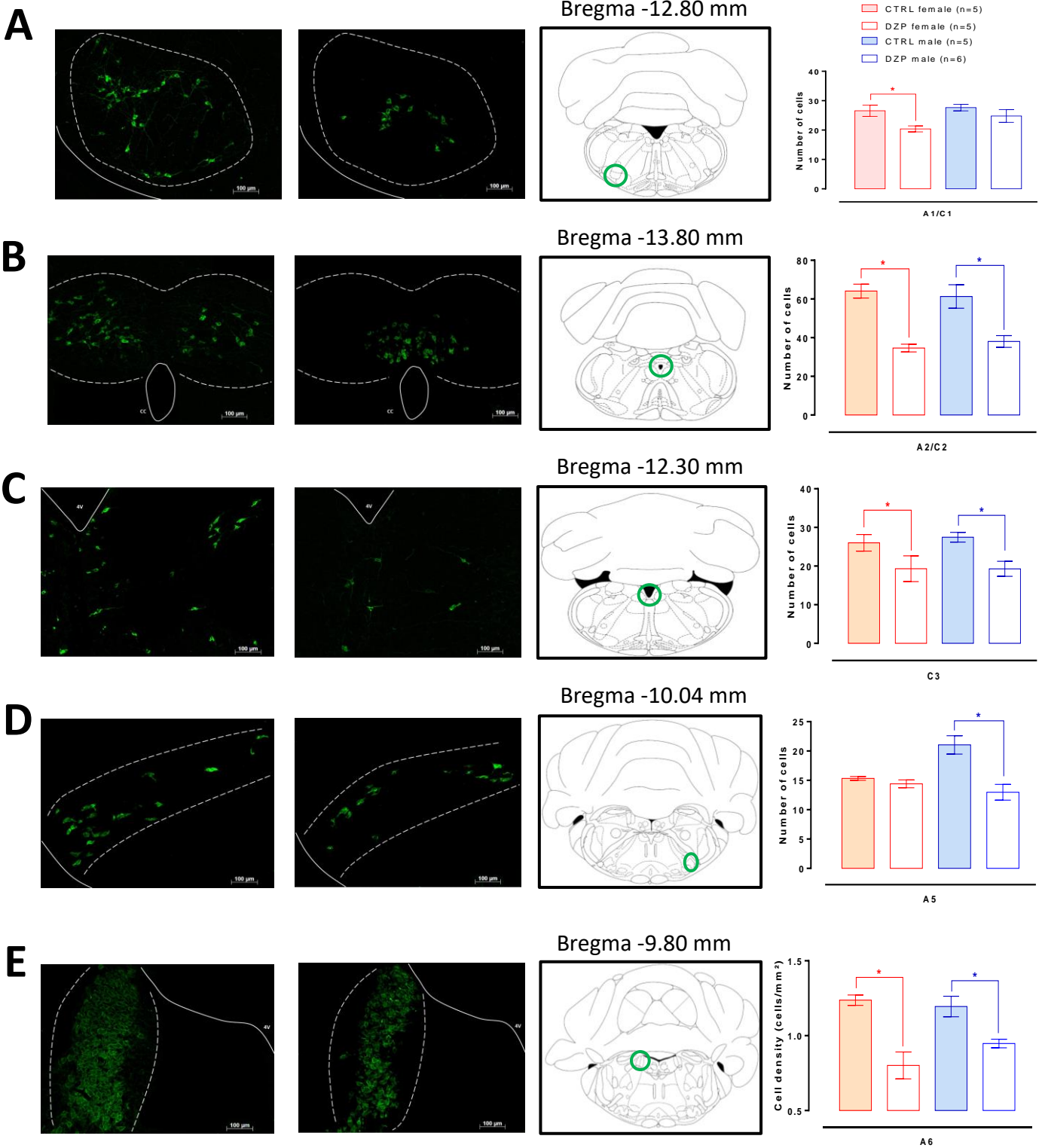
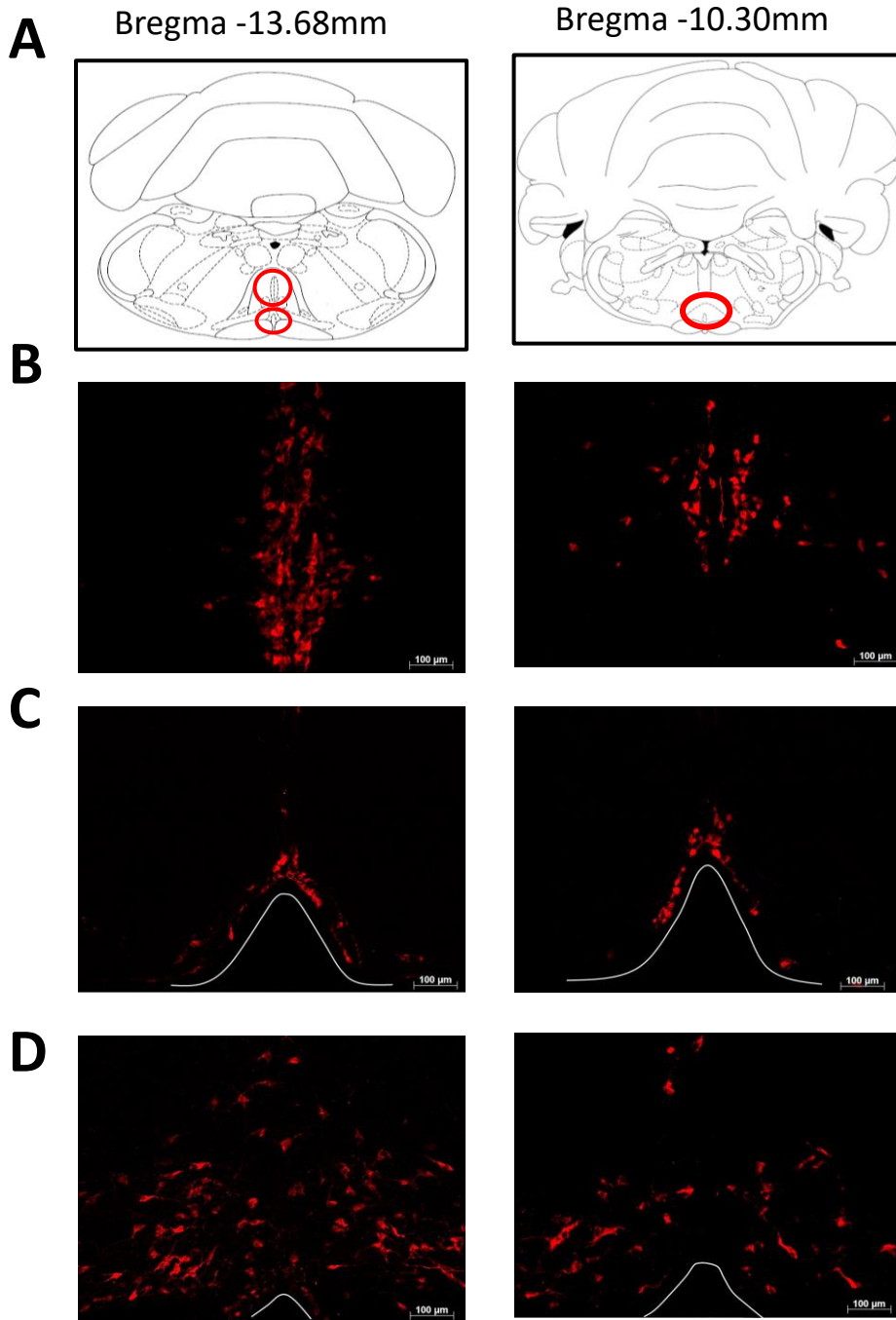
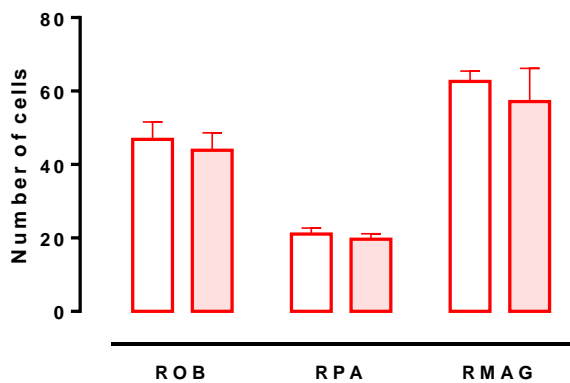


Figure 4



E CTRL female (n=4)
DZP female (n=5)



F CTRL male (n=5)
DZP male (n=4)

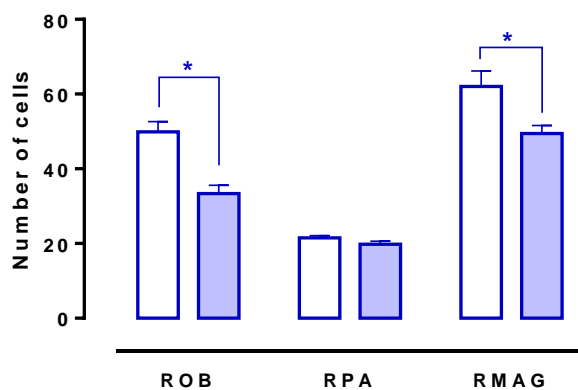


Figure 5