



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA E BIOQUÍMICA

LUIZ GUSTAVO DOS REIS DE FREITAS

**POTENCIALIZAÇÃO DO EFEITO DEPRESSOR DO ÁLCOOL
PELO FLUNITRAZEPAM EM RATOS: UM ESTUDO
ELETROCORTICOGRÁFICO, RESPIRATÓRIO E
ELETROCARDIOGRÁFICO**

BELÉM-PA

2024

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA E BIOQUÍMICA

**POTENCIALIZAÇÃO DO EFEITO DEPRESSOR DO ÁLCOOL
PELO FLUNITRAZEPAM EM RATOS: UM ESTUDO
ELETROCORTICOGRÁFICO, RESPIRATÓRIO E
ELETROCARDIOGRÁFICO**

Autor(a): LUIZ GUSTAVO DOS REIS DE FREITAS

Orientador(a): Prof. Dr. MOISÉS HAMOY

Documento de Dissertação apresentada
ao Programa de Pós-graduação em
Farmacologia e Bioquímica do Instituto
de Ciências Biológicas da Universidade
Federal do Pará como requisito para a
obtenção do título de Mestre em
Farmacologia e Bioquímica.

BELÉM-PA

2024

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) de acordo com ISBD
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do Pará
Gerada automaticamente pelo módulo Ficat, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

F862p Freitas, Luiz Gustavo dos Reis de.
Potencialização do efeito depressor do álcool pelo
flunitrazepam em ratos: um estudo eletrocorticográfico, respiratório
e eletrocardiográfico / Luiz Gustavo dos Reis de Freitas. — 2024.
46 f. : il. color.

Orientador(a): Prof. Dr. Moisés Hamoy
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Pará,
Instituto de Ciências Biológicas, Programa de Pós-graduação em
Farmacologia e Bioquímica, Belém, 2024.

1. Flunitrazepam. 2. Álcool. 3. Ondas cerebrais. 4.
Eletroencefalograma. 5. Eletrocardiograma. I. Título.

CDD 615.7



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA E BIOQUÍMICA

ATA DA BANCA EXAMINADORA DE
DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO
APRESENTADA E DEFENDIDA PELO
DISCENTE LUIZ GUSTAVO DOS REIS DE
FREITAS, DE 26 DE JULHO DE 2024.

Aos vinte e seis dias do mês de julho de dois mil e vinte quatro, às dez horas, reuniu-se a Banca Examinadora constituída para julgar a defesa de Dissertação de Mestrado em Farmacologia e Bioquímica, apresentada e defendida pelo **LUIZ GUSTAVO DOS REIS DE FREITAS** e intitulada: "**POTENCIALIZAÇÃO DO EFEITO DEPRESSOR DO ÁLCOOL PELO FLUNITRAZEPAM EM RATOS: UM ESTUDO ELETROCORTICOGRÁFICO, RESPIRATÓRIO E ELETROCARDIOGRÁFICO.**". A Banca Examinadora, organizada obedecendo ao disposto nas Resoluções e Normativas do Conselho Superior de Ensino e Pós-Graduação e do Programa de Pós-graduação em Farmacologia e Bioquímica (PPG FARMABIO), foi constituída pelos professores: **Dr. Moisés Hamoy** (UFPA), na condição de Presidente (sem direito a voto), **Dr. Nilton Akio Muto** (UFPA), membro externo ao Programa, e **Dra. Dielly Catrina Favacho Lopes Rêgo** (UFPA), membro interno ao Programa. Em sessão pública, após o discente haver apresentado as informações referentes ao Documento de Defesa de Dissertação, obedecendo ao prazo regimental, foi dada a palavra aos examinadores para arguição, tendo o discente respondido às perguntas formuladas. Seguidamente, reuniu-se a Banca Examinadora para proceder ao julgamento, decidindo pela APROVAÇÃO da defesa de Dissertação em Farmacologia e Bioquímica realizada pelo discente. Nada mais havendo a tratar, o Presidente da Banca Examinadora deu por encerrado os trabalhos, e foi lavrada a presente Ata, que vai devidamente assinada pelos membros da Banca Examinadora.

Belém, 26 de Julho de 2024.

Prof. Dr. Moisés Hamoy
Presidente (sem direito a voto)

Prof. Dr. Nilton Akio Muto
Membro externo ao PPG FARMABIO

Profa. Dra. Dielly Catrina Favacho Lopes Rêgo
Membro interno ao PPG FARMABIO

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Universidade Federal do Pará, ao Instituto de Ciências Biológicas e ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia e Bioquímica, pela oportunidade em cursar o Mestrado com excelência e dedicação.

Agradeço aos membros do laboratório de Farmacologia Molecular, pela acolhida e pelos ensinamentos iniciais dentro do programa.

Agradeço aos membros do laboratório de Farmacologia e Toxicologia de Produtos Naturais, pela recepção e em especial ao professor Dr. Moisés Hamoy pela orientação e acompanhamento durante todo o processo de definição do Mestrado.

As amizades construídas durante todo o processo do programa, deixando as aulas mais divertidas e facilitando minha experiência na universidade.

Agradeço as amizades duradouras que mantive desde a graduação Paulo e Phamela, e aos meus melhores amigos Kewin, Leila e Lua, e ao grupo mais incomum ao qual faço parte, Gabriel, Sandra e Rapha.

Agradeço a minha família pelo suporte e companheirismo durante toda minha vida e principalmente durante esta etapa tão exigente que é a pós-graduação, seus incentivos foram as bases para a continuação deste trabalho.

RESUMO

O álcool, uma droga psicotrópica amplamente comercializada, e o benzodiazepínico Flunitrazepam, um ansiolítico amplamente prescrito para pacientes com problemas de ansiedade e insônia, são substâncias bem conhecidas e ambas atuam no sistema nervoso central. O uso indevido e a associação dessas duas substâncias são preocupações de saúde pública em vários países e podem causar efeitos momentâneos, duradouros e até mesmo problemas neurofisiológicos letais, devido à potencialização de seus efeitos adversos em sinergia. O presente estudo observou o resultado da associação dessas drogas nas respostas eletrofisiológicas do cérebro, coração e frequência respiratória de ratos Wistar. Foram determinados 8 grupos experimentais: um grupo controle, um grupo álcool (20% na dose de 1 ml/100 g VO), três grupos Flunitrazepam (doses 0,1; 0,2 e 0,3 mg/kg) e três grupos com associação de álcool-Flunitrazepam (20% na dose de 1 ml/100 g VO de álcool, combinado com 0,1; 0,2 e 0,3 mg/kg de Flunitrazepam, respectivamente). Os resultados mostraram que houve uma redução mais acentuada da potência das ondas alfa e teta nos grupos álcool-Flunitrazepam com diminuição da potência das oscilações beta, além de maior sedação. Verificou-se uma diminuição progressiva da frequência respiratória de acordo com aumento da dose de Flunitrazepam na administração associada álcool-Flunitrazepam. Foi observada alteração na frequência cardíaca e no intervalo Q-T em doses elevadas de Flunitrazepam. Sob a perspectiva destes resultados, concluímos que a associação álcool-Flunitrazepam apresentou um aprofundamento dos efeitos sinérgico-depressores no sistema nervoso central de acordo com o aumento da dose do benzodiazepínico, o que poderia causar alterações nas oscilações cerebrais, na respiração e na hemodinâmica do rato.

Palavras-chave: Flunitrazepam; Álcool; Ondas cerebrais; Eletroencefalograma; Eletrocardiograma

ABSTRACT

Alcohol, a widely commercialized psychotropic drug, and the benzodiazepine Flunitrazepam, an anxiolytic widely prescribed for patients with anxiety and insomnia problems, are well known drugs and both act on the central nervous system. The misuse and the association of these two drugs are public health concerns in several countries and could cause momentary, long-lasting and even lethal neurophysiological problems due to the potentiation of their adverse effects in synergy. The present study observed the result of the association of these drugs on electrophysiological responses in the brain, heart, and respiratory rate in Wistar rats. 8 experimental groups were determined: control, one alcohol group (20% at a dose of 1 ml/100 g VO), three Flunitrazepam groups (doses 0.1; 0.2 and 0.3 mg/kg) and three alcohol-Flunitrazepam groups (20% at a dose of 1 ml/100 g VO of alcohol, combined with 0.1; 0.2 and 0.3 mg/kg of Flunitrazepam, respectively). The results showed that there was a more pronounced reduction in alpha and theta wave power in the alcohol-Flunitrazepam groups, a decrease in the power of beta oscillations and greater sedation. There was a progressive decrease in respiratory rate linked to the increase of Flunitrazepam dose in the alcohol-Flunitrazepam associated administration. It was observed alteration in heart rate and Q-T interval in high doses of Flunitrazepam. Therefore, we conclude that the association alcohol-Flunitrazepam presented deepening of depressant synergistic effects according to the increase in the dose of the benzodiazepine, and this could cause alterations in brain oscillations, breathing, and hemodynamics of a rat.

Keywords: Flunitrazepam; Alcohol; Brainwaves; Electroencephalogram; Electrocardiogram

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Representação molecular do Etanol (álcool etílico)	1
Figura 2 - Vias metabólicas do álcool no organismo.	3
Figura 3 - Representação molecular de Flunitrazepam.	4
Figura 4 - Perfil Metabólico do Flunitrazepam	6
Figura 5 - Desenho experimental	11
Figura 6 - Demonstração dos registros obtidos após administração de álcool e Flunitrazepam.	15
Figura 7 - Gráficos representando registros da potência e oscilações das ondas.	16
Figura 8 - Demonstração dos registros eletromiográficos realizados no décimo músculo intercostal dos ratos.....	18
Figura 9 - Gráficos representando a frequência respiratória	19
Figura 10 - Demonstração dos registros eletrocardiográficos (ECG).	21
Figura 11 - Gráficos demonstrando os valores médios dos registros de atividade cardíaca.	23

LISTA DE SIGLAS E SÍMBOLOS

ADH = Álcool desidrogenase.

ALDH = aldeído desidrogenase.

GABA = Ácido gama-aminobutírico.

H₂O = Água.

H₂O₂ = Peróxido de hidrogênio.

MEOS = Sistema microssomal de oxidação do etanol.

NAD = Nicotinamida adenina dinucleotídeo.

NADPH = Dinucleotídeo de nicotinamida adenina.

NCBI = National Center for Biotechnology Information.

NIAAA = National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism.

NIDA = National Institute of Drug Abuse.

NMDA = N-metil D-Aspartato.

REL = Retículo Endoplasmático Liso.

SNC = Sistema Nervoso Central.

VO = Via oral.

WHO = World Health Organization.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Álcool.....	1
1.2 Benzodiazepínicos	3
1.3 Interação com Flunitrazepam.....	4
1.4 Avaliação de eletroencefalograma, eletrocardiograma e frequência respiratória	7
2. OBJETIVO GERAL.....	8
2.1 Objetivos específicos	8
3. MATERIAIS E MÉTODOS	8
3.1 Animais.....	8
3.2 Drogas	9
3.3 Delineamento experimental.....	9
3.4 Implementação dos eletrodos e Eletrocorticograma (ECoG)	9
3.5 Registro da atividade respiratória	10
3.6 Registros eletrocardiográficos (ECG)	10
3.7 Eutanásia dos animais	11
3.8 Análise dos dados	11
3.9 Análise estatística	12
4. RESULTADOS	12
4.1 A combinação de álcool e Flunitrazepam alterou os padrões de ondas cerebrais	12
4.2 A combinação de álcool e Flunitrazepam causou diminuição da frequência respiratória	17
4.3 A combinação de álcool e Flunitrazepam causou mudanças na atividade cardíaca	19
5. DISCUSSÃO	24
6. CONCLUSÃO	28
7. REFERÊNCIAS	29

1. INTRODUÇÃO

1.1 Álcool

O álcool etílico é uma substância psicoativa amplamente consumida em todo o mundo, especialmente para fins recreativos. A sua estrutura química tem duas cadeias de carbono e um grupo hidroxila (Fig. 1A, B), é conhecido pela sua composição equilibrada de moléculas hidrofílicas e moléculas hidrofóbicas e pelo seu baixo peso molecular, o que facilita a difusão através dos tecidos e distribuição no organismo (Maher 1997; Heckmann & Silveira 2009; Costardi et al. 2015). O seu consumo constante ou em grande volume ao longo da vida, combinado com as propriedades intoxicantes dessa substância, podem comprometer os aspectos sociais dos usuários e afetar seus órgãos e tecidos, como o sistema cardiovascular e o sistema nervoso central (SNC) (World Health Organization - WHO 2005; Rehm & Roerecke 2017; Lau et al. 2024). No SNC, o álcool pode atuar como um depressor ao agir nos receptores GABA_A e nos receptores de glutamato, aumentando o influxo de Cl⁻ mediado por GABA_A e inibindo os efeitos excitatórios do glutamato nos receptores NMDA (glutamatérgicos N-metil-Daspartato). Quando utilizados continuamente, podem ser observados outros problemas, como perturbações no comportamento, demência, deficiências cognitivas e deficits de memória (Evert & Oscar-Berman 1995; Oscar-Berman e Marinkovic 2003; Costardi et al. 2015; Sigel & Ernst 2018).

Figura 1 - Representação molecular do Etanol (álcool etílico)

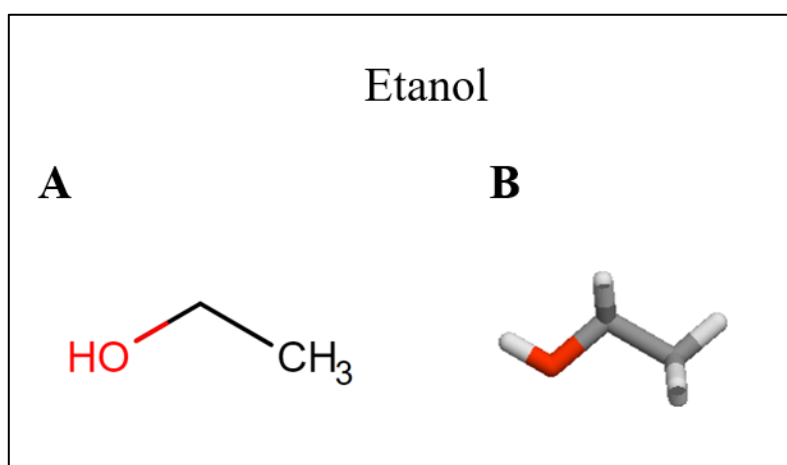


Fig. 1 Representação 2D e 3D da estrutura química de Etanol (álcool etílico) (A e B). **Fonte:** arquivo do autor, produzido com software DrugBank e MoLinspiration.

Paralelamente, os efeitos excitatórios também promovidos pelo álcool no SNC contribuem para a manutenção do seu consumo pela sociedade. O álcool pode agir sobre os níveis de dopamina, serotonina, aspartato e glutamato, sendo neurotransmissores do SNC (Costardi et al. 2015). No primeiro caso, tendo a dopamina uma ação motivadora e de reforço nos neurônios em diversas regiões do cérebro a exemplo do nucleus accumbens (componente do sistema recompensa, relacionado com o prazer e euforia), os neurônios dessa região que contém dopamina são ativados por estímulos que influenciam na execução e repetição de um comportamento e o aumento liberação de dopamina contribui para os efeitos recompensadores do álcool, promovendo o contínuo consumo (Di Chiara, 1997; Ji et al, 2017). Já a serotonina associada a endorfinas podem contribuir para manifestação do estado de bem-estar e melhora do humor em situações de intoxicação alcoólica, com aumento da transmissão de serotonina observada na administração aguda de álcool (Bittencourt, 2000; Costardi et al. 2015). Ainda sob a condição de exposição crônico ao álcool, os receptores NMDA tendem a ser estimulados em resposta aos efeitos depressivos do etanol para reestabelecer o balanço energético inibitório e excitatório (De Witte, 2004; Alexandre, 2018).

Após sua absorção no estômago e intestino, o etanol é metabolizado no fígado, onde é oxidado em acetaldeído, por três vias metabólicas: a principal sendo a via da enzima álcool desidrogenase (ADH) no citosol, auxiliado pelo cofator nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD⁺), o qual é reduzido a NADH; pela via da enzima catalase nos peroxissomos dos hepatócitos, onde o etanol doa elétrons reduzindo o peróxido de hidrogênio (H₂O₂) em água (H₂O), responsável por apenas cerca de 10% da oxidação do etanol; e quando em grandes quantidades de consumo de álcool, pelo sistema microssomal de oxidação do etanol (MEOS), nos microssomos do retículo endoplasmático liso (REL), através do citocromo P450 IIE1 (CYP2E1 = isoforma) e pelo cofator fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida adenina (NADPH) (NIAAA, 2007). O acetaldeído formado é oxidado a acetato pela enzima (ALDH) presente nas mitocôndrias dos hepatócitos, partindo para a circulação. Grande parte do acetado formado é oxidado em dióxido de carbono ou metabolizado em Acetil-CoA (Zehkari, 2013; Alexandre, 2018) (Fig.2).

Figura 2 - Vias metabólicas do álcool no organismo.

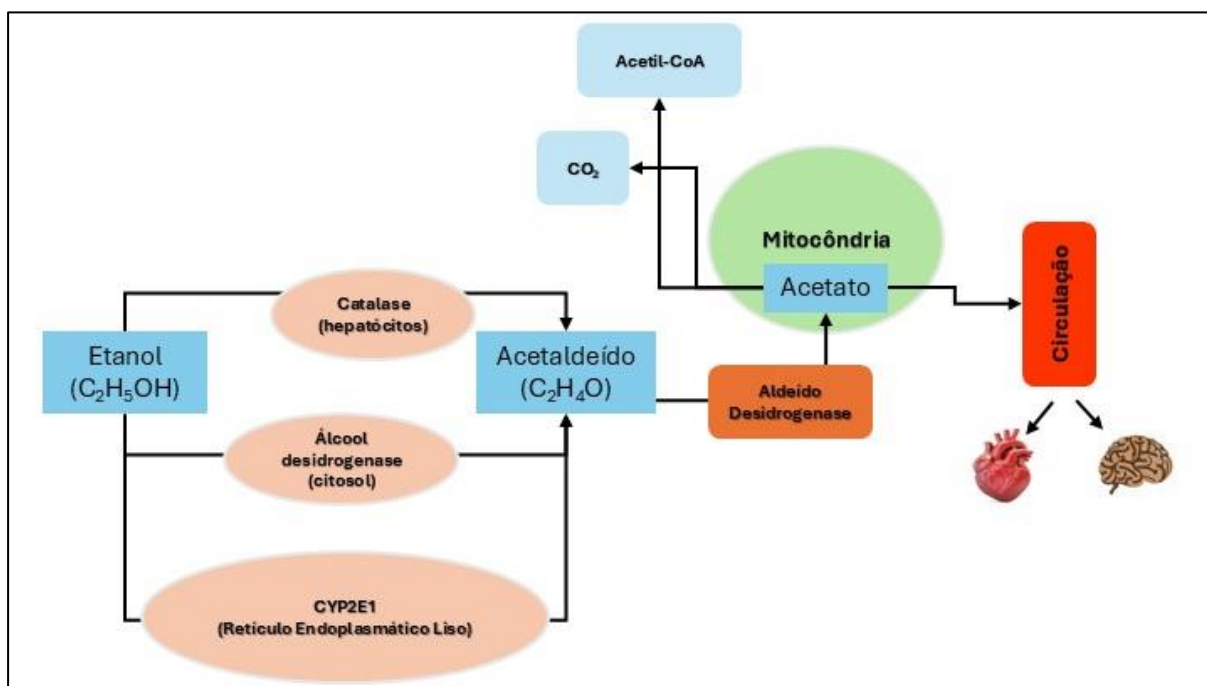


Fig. 2 Metabolismo do álcool. O etanol é oxidado em acetaldeído por Álcool desidrogenase, Catalase e CYP2E1 no REL. O acetaldeído formado é oxidado a acetato pela enzima Aldeído desidrogenase sendo distribuído pelo organismo. **Fonte:** arquivo do autor, adaptado de Zehkari, 2013; Alexandre, 2018; Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism -NIAAA- 2007, produzido com software BioRender.

1.2 Benzodiazepínicos

Os benzodiazepínicos são um grupo de drogas psicotrópicas com estruturas geralmente compostas por anéis de benzeno fundidos com heterociclos de sete membros contendo nitrogênio (Zhang et al. 2023) e atuam como moduladores alostéricos positivos do recetor GABA_A, um canal iônico seletivo de cloreto. O GABA é o principal neurotransmissor inibitório no SNC e tem a capacidade de reduzir a excitabilidade neuronal, produzindo assim um efeito depressor (Grifn et al. 2013; Hernandez-Martin et al. 2023; Pallanti et al. 2023) (Fig. 3A, B). Por conseguinte, os fármacos desta classe podem ter propriedades ansiolíticas, hipnóticas, amnésicas, anticonvulsivantes e relaxantes musculares, e estão entre os medicamentos psicotrópicos mais amplamente prescritos para a insônia e a ansiedade (Veldhuizen et al. 2009; Quagliato et al. 2018; Cloos et al. 2021; Einloft et al. 2023; Adhikari et al. 2023). No entanto, quando os benzodiazepínicos são usados por um período prolongado, podem levar a problemas relacionados com a abstinência e o abuso (Olfson et al. 2015; Lin et al. 2023). No caso do abuso, é frequentemente descrito que

os benzodiazepínicos são geralmente usados em combinação com outras drogas (National Institute of Drug Abuse - NIDA 2020).

Figura 3 - Representação molecular de Flunitrazepam.

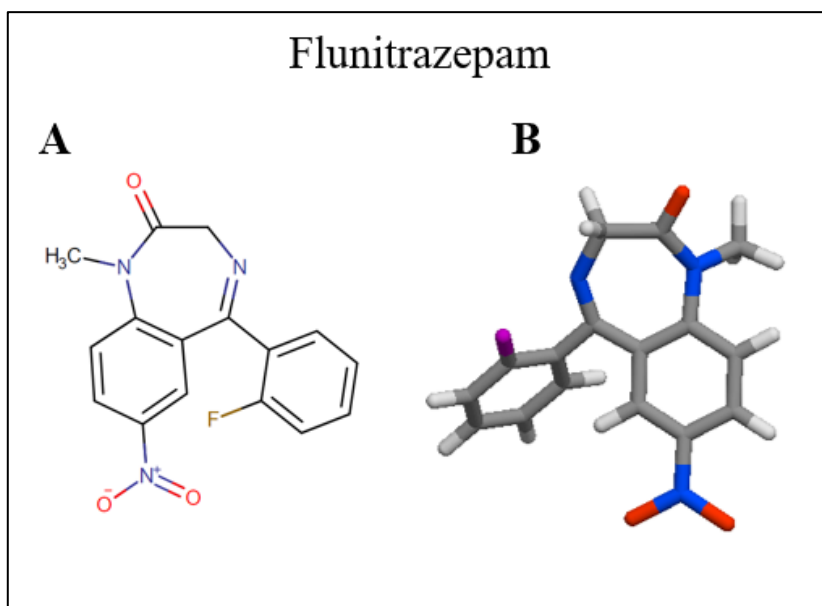


Fig. 3 Representação 2D e 3D do benzodiazepínico flunitrazepam (A e B). **Fonte:** arquivo do autor, produzido com software DrugBank e MoLinspiration.

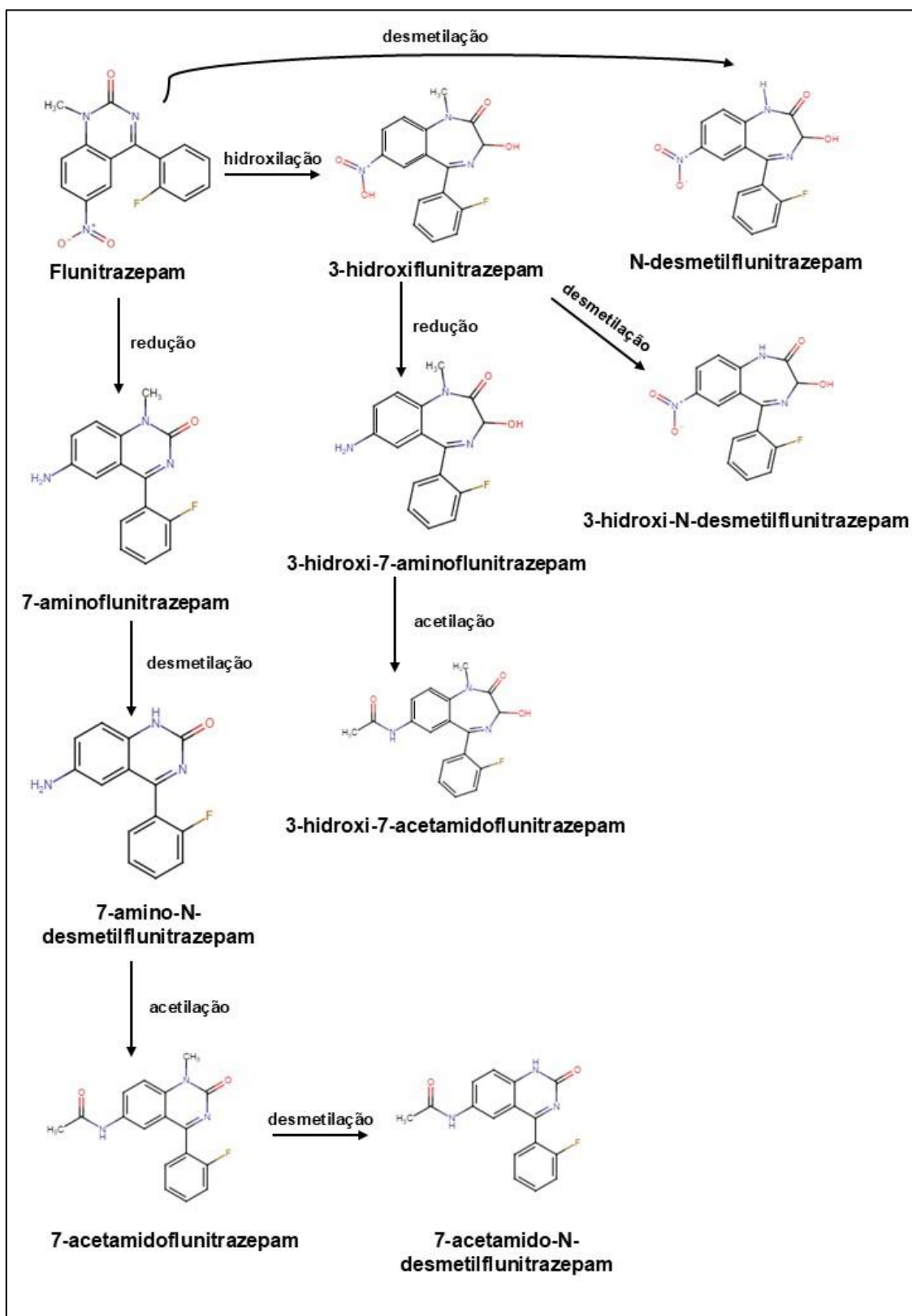
1.3 Interação com Flunitrazepam

A interação deste tipo de medicamento com o álcool pode promover modificações farmacocinéticas, desestabilizando o metabolismo e as propriedades iniciais do fármaco, bem como também modificações farmacodinâmicas. Nesse contexto, essa interação compromete mais especificamente as atividades do SNC, intensificando os efeitos sedativos durante o uso de benzodiazepínicos (Weathermon e Crabb 1999). Os efeitos observados na interação entre álcool e o Flunitrazepam (Rohypnol®, um benzodiazepínico com ação sedativa-hipnótica rápida) incluem sonolência extrema e amnésia, que podem levar o usuário a um estado de vulnerabilidade (Seppälä et al. 1983; Simmons e Cupp 1998). Popularmente, esta combinação é conhecida pela sua utilização em casos de agressão sexual, roubo e overdose (Druid et al. 2001; Treweek et al. 2010).

As principais vias metabólicas do Flunitrazepam (Fig. 4) incluem N-desmetilação, 3-hidroxilação, nitro-redução e N-acetilação adicional do grupo amino, resultando na produção de N-desmetilflunitrazepam, 3-hidroxi flunitrazepam, 7-

aminoflunitrazepam e 7-acetamidoflunitrazepam, respectivamente. A combinação destas reações pode levar à formação de 7-amino-N-desmetilflunitrazepam, 7-acetamido-N-desmetilflunitrazepam, 3-hidroxi-7-aminoflunitrazepam, 3-hidroxi-7-acetamidoflunitrazepam e 3-hidroxi-N-desmetilflunitrazepam. Vários destes metabolitos apresentam atividade e mantêm a sinergia com o álcool (Druid et al. 2001; Dinis-Oliveira 2017; Busardò et al. 2019).

Figura 4 - Perfil Metabólico do Flunitrazepam



Fonte: Arquivo do autor. Produzido com software DrugBank e MoLinspiration com base em Katselou et al. 2016.

1.4 Avaliação de eletroencefalograma, eletrocardiograma e frequência respiratória

Os efeitos sinérgicos da interação medicamentosa entre os benzodiazepínicos e o álcool podem ser avaliados inicialmente através de testes comportamentais (Almeida et al. 2010; Albrecht et al. 2014) e parâmetros eletroencefalográficos (EEG) (Reeves-Darby et al. 2023), que analisam a atividade elétrica do cérebro através do exame dos potenciais pós-sinápticos gerados pelas células piramidais do córtex cerebral (Buzsáki et al. 2012).

Ondas de menor frequência como Delta (0,5-4Hz) estão relacionadas com o estado de sono profundo, Teta (4-8Hz) com um relaxamento profundo ou foco mais direcionado, ondas Alfa (8-12Hz) também apresentam relaxamento e atenção passiva além do estado observador com os eventos ao redor do indivíduo, já ondas de maior frequência como Beta (12-35Hz) e Gama (35-80Hz) estão relacionadas com estados de alerta, a primeira ainda mantém um pequeno nível de relaxamento, mas para a segunda é observado o foco e atenção total, estando também relacionada a capacidade de memória (Abhang et al. 2016; Terlouw et al. 2016; Schomer & Fernando, 2024). A literatura neurocientífica destaca as similaridades na observação de regiões específicas do cérebro de humanos e roedores, o que resultou na vasta utilização de modelos animais para avaliar respostas a estímulos, assim como padrões comportamentais e a própria atividade das ondas cerebrais (Ellenbroek & Youn, 2016; Estumano et al. 2019; Beauchamp et al. 2022). Entretanto, no campo na neuropsicofarmacologia, especificamente no teste de drogas psicoativas há o desafio de se traduzir os resultados obtidos no tratamento de roedores para o cérebro humano (Watrous et al. 2013; Hay et al. 2014; Beauchamp et al. 2022), o que depende de outros estudos complementares para entender como os efeitos no cérebro do roedor poderiam se manifestar em outras espécies.

Além disso, os benzodiazepínicos podem bloquear os canais de potássio no tecido cardíaco, sendo assim associados a alterações na repolarização ventricular (Spadafore et al. 2015). Estas alterações podem ser observadas no eletrocardiograma (ECG) como desvios na morfologia da onda T (especificamente no comprimento da onda), “notching”, intervalo QT, variabilidade QT, dispersão QT e área da onda T. A avaliação do ECG pode ser melhor utilizada na observação de eventos cardiovasculares adversos em casos de intoxicação (overdose) por benzodiazepínicos comumente prescritos, como Flunitrazepam, Lorazepam e

Midazolam (Olkola e Ahonen 2008; Manini et al. 2010), quer sejam utilizados individualmente ou em combinação com álcool.

O presente estudo investigou os efeitos da combinação de álcool etílico e Flunitrazepam através da análise dos parâmetros eletrocorticográficos (ECoG) e eletrocardiográficos, bem como registros de frequência respiratória em ratos Wistar. O estudo avaliou o comportamento das ondas cerebrais, incluindo as ondas Delta, Teta, Alfa, Beta e ondas Gama, bem como a atividade cardíaca e respiratória, em doses crescentes de Flunitrazepam.

2. OBJETIVO GERAL

Avaliar o potencial depressor do álcool etílico em sinergia com diferentes doses de Flunitrazepam a partir de parâmetros eletrofisiológicos neurais, respiratórios e cardíaco.

2.1 Objetivos específicos

- Verificar alterações no padrão de ondas cerebrais a partir de análise eletrocorticográfica após a administração dos fármacos.
- Observar possíveis alterações na frequência respiratória dos animais e potência da contração muscular, após a administração dos fármacos.
- Averiguar prováveis alterações na atividade cardíaca a partir da análise do eletrocardiograma, após a administração dos fármacos.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

O estudo foi realizado no Laboratório de Farmacologia e Toxicologia de Produtos Naturais, do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará (UFPA), Brasil.

Um total de 72 (n=9 ratos por grupo) ratos “Wistar” (*Rattus norvegicus*) com idades entre 90 e 120 dias, pesando entre 240-280 gramas, foram utilizados no estudo. Os ratos foram obtidos do Biotério da UFPA e mantidos em ambiente com temperatura de 22 ± 2 °C, umidade de $55\pm 10\%$ e ciclo claro/escuro de 12 horas, com água e comida *ad libitum* durante todo o estudo. As gaiolas foram limpas três vezes na semana.

O estudo teve a aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Animais de Experimentação da UFPA (CEPAE-UFPA) sob o protocolo CEUA N° 6233270619.

3.2 Drogas

O álcool etílico absoluto foi obtido da “ACS científica” (Rio de Janeiro, RJ, Brasil); o Flunitrazepam (Rohypnol® 1 mg) foi obtido do laboratório Roche; o cloridrato de cetamina foi obtido do laboratório Köing (Santana de Parnaíba, SP, Brasil); e cloridrato de xilazina foi obtido do laboratório Vallée (Montes Claros, MG, Brasil).

3.3 Delineamento experimental

Para a experiência de avaliação do ECoG após a implantação do eletrodo e administração do fármaco, foram formados 8 grupos cada um composto por 9 ratos com as drogas sendo administradas por gavagem: a) Grupo I (controle); b) Grupo II recebeu álcool a 20% na dose de 1 ml/100 g de peso do animal por via oral (VO); c) Grupo III recebeu Flunitrazepam na dose de 0,1 mg/kg (VO); d) Grupo IV recebeu Flunitrazepam na dose de 0,2 mg/kg (VO); e) Grupo V recebeu Flunitrazepam na dose de 0,3 mg/kg (VO); f) O grupo VI recebeu uma combinação de álcool a 20% (1 ml/100 g) e Flunitrazepam na dose de 0,1 mg/kg (VO); g) O grupo VII recebeu uma combinação de álcool a 20% (1 ml/100 g) e Flunitrazepam na dose de 0,2 mg/kg (VO); h) O grupo VIII recebeu uma combinação de álcool a 20% (1 ml/100 g) e Flunitrazepam na dose de 0,3 mg/kg (VO). Foram avaliados os eletrocorticogramas, a atividade respiratória e a atividade cardíaca. Os registros foram efetuados 20 minutos (período de acomodação) após a administração da droga e duraram 120 segundos.

3.4 Implementação dos eletrodos e Eletrocorticograma (ECoG)

Os protocolos e o desenho experimental (Fig. 5) foram estabelecidos seguindo os procedimentos descritos por Hamoy et al. (2018), Estumano et al. (2019), Muto et al. (2021) e Bastos de Araújo et al. (2023). Os animais foram anestesiados com uma combinação de cloridrato de xilazina (5 mg/kg) e cloridrato de cetamina (100 mg/kg) por injeção intraperitoneal. Quando o animal apresentava perda de reflexo interdigital, era fixado em um aparelho estereotático para a implantação de eletrodos. O procedimento iniciou-se com a tricotomia da pele na região da cabeça, seguida de assepsia adequada. A lidocaína a 2% foi infiltrada no local da incisão cirúrgica, que foi feita a 1,0 cm da linha média no sentido rostro-caudal, expondo a superfície óssea craniana. A lidocaína também foi aplicada no canal auditivo externo para reduzir os efeitos da pressão das barras do aparelho estereotático. Após a exposição do osso craniano, foram feitos dois orifícios com broca odontológica seguindo as coordenadas

estereotáxicas de -0,96 mm de bregma e 1 mm latero-lateral (Paxinos e Watson 2013). Os elétrodos (Ag/AgCl), com um diâmetro de 0,5 mm, foram implantados na dura-máter e fixados com acrílico dental autopolimerizável.

O principal método de aquisição de dados foi através de registros eletrofisiológicos de potencial de campo, que foram realizados com um amplificador diferencial AC de alta impedância (Grass Technologies, Modelo P511) ajustado com configurações de filtro de 0,3 Hz (passa-alta) e 300 Hz (passa-baixa). Os sinais foram monitorados com um osciloscópio (Protek, modelo 6510) e continuamente digitalizados a uma taxa de 1 kHz por um computador equipado com uma placa de aquisição de dados (National Instruments, Austin, TX). Os dados foram armazenados em disco rígido e processados utilizando software específico (LabVIEW Express). Para a análise das modificações neuronais, foi utilizado o programa Python 2.7, que permitiu a inspeção das frequências das ondas cerebrais.

O eletrodo de registro foi colocado no hemisfério direito e o eletrodo de referência no lado esquerdo. Todo o experimento foi realizado dentro de uma gaiola de Faraday. Após um período de acomodação de 20 minutos, foi efetuado um registro de 2 minutos para cada animal.

3.5 Registro da atividade respiratória

Para a análise da frequência respiratória e da potência de contração muscular, foram colocados eletrodos com 2 mm de comprimento e diâmetro de 0,2 mm, posicionados a 2 mm de distância um do outro. Eles foram inseridos no décimo espaço intercostal para registrar a atividade muscular, utilizando amplificação de 2000X, com filtro passa-baixa de 300 Hz e passa-alta de 0,3 Hz, utilizando o mesmo modelo de amplificador citado anteriormente. Os registros foram realizados com duração de 1 minuto. (Muto et al. 2021).

3.6 Registros eletrocardiográficos (ECG)

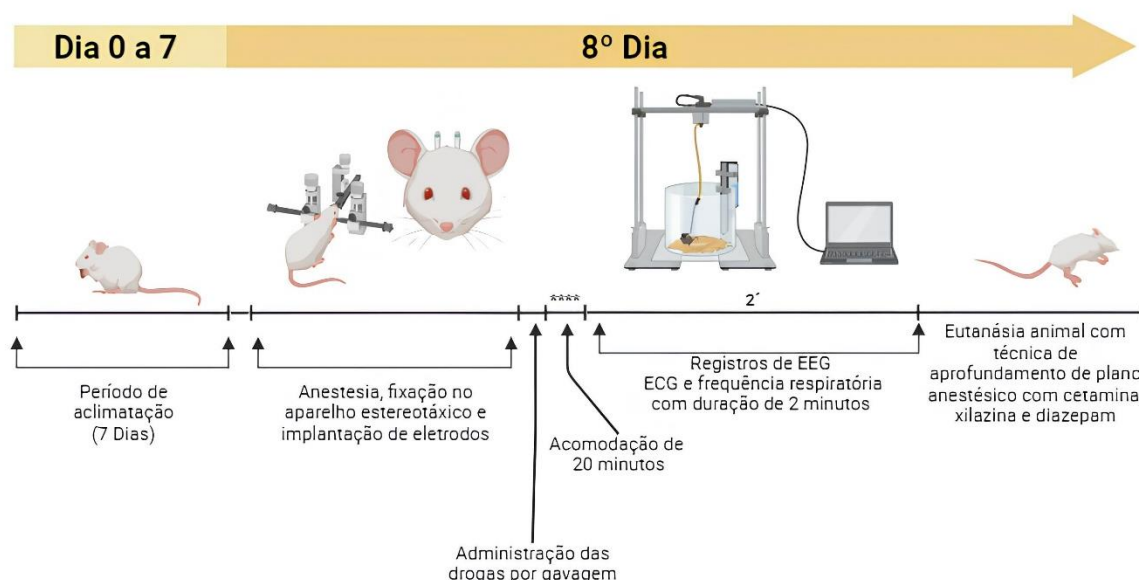
Os registros eletrocardiográficos foram obtidos na derivação D-2. Os eletrodos não foram conjugados, com o eletrodo de referência ficando posicionado abaixo da axila direita (0,5 cm) e o eletrodo de registro colocado no décimo espaço intercostal, 2,5 cm abaixo da axila esquerda, seguindo o vetor de registro. Cada registro teve a duração de 2 minutos e foram analisados os seguintes parâmetros: Frequência

cardíaca (BPM), Amplitude (mV), intervalo R-R (ms), intervalo P-Q (ms), duração do QRS (ms) e intervalo QT (ms). (Muto et al. 2021; Bastos de Araújo et al 2023).

3.7 Eutanásia dos animais

Ao final do experimento, os animais utilizados no estudo foram submetidos à eutanásia, utilizando a técnica de aprofundamento de plano anestésico com cetamina (300mg/kg i.p.), xilazina (20 mg/kg i.p.) e diazepam (10mg/kg i.p.) para evitar ao máximo maiores sofrimentos aos animais.

Figura 5 - Desenho experimental



Fonte: arquivo do autor. Produzido com software BioRender.

3.8 Análise dos dados

Para a análise dos sinais adquiridos, foi desenvolvida uma ferramenta utilizando a linguagem de programação Python versão 2.7. As bibliotecas “Numpy” e “Scipy” foram utilizadas para o processamento matemático e a biblioteca “Matplotlib” para a geração de gráficos. A interface gráfica do usuário foi desenvolvida com a biblioteca PyQt4.

Os gráficos de amplitude mostram a diferença de potencial entre os eletrodos de referência e de registro. Os sinais foram observados a uma taxa de 1000 amostras por segundo. Os espectrogramas foram calculados usando uma janela de Hamming com 256 pontos (256/1000 segundos), e cada quadro foi gerado com uma sobreposição de 128 pontos por janela. Para cada fotograma, a densidade de potência

espectral (PSD) foi calculada usando o método do periodograma de Welch (Ferreira et al. 2020).

3.9 Análise estatística

Os resultados foram submetidos à estatística descritiva, como média e desvio padrão. Teste de normalidade Kolmogorov-Smirnov, análise de variância de uma via (ANOVA), seguida do teste de Tukey. Um nível de significância de $*p<0,01$, $**p<0,001$ e $***p<0,0001$ foi adotado.

4. RESULTADOS

4.1 A combinação de álcool e Flunitrazepam alterou os padrões de ondas cerebrais

No registro do grupo controle, observou-se regularidade no traçado eletrocorticográfico, como visto na amplificação do registro e no espectrograma mostrando maior intensidade de energia nas frequências abaixo de 10 Hz (Fig. 6A). A média linear de potência obtida no grupo foi de $0,7030 \pm 0,08959 \text{ mV}^2 / \text{Hz} \times 10^{-3}$ (Fig. 6A). Após a administração do álcool, observou-se diminuição da amplitude do registro (Fig. 6B), e o espectrograma demonstrou menor intensidade de potência (Fig. 6B). Esse grupo apresentou média linear de potência de até 40 Hz de $0,1213 \pm 0,01074 \text{ mV}^2/\text{Hz} \times 10^{-3}$ e diferença estatística em relação ao grupo controle ($P < 0,0001$) (Fig. 7A). Após a administração de Flunitrazepam nas doses de 0,1, 0,2 e 0,3 mg/kg, os traços apresentaram maiores irregularidades, com amplitudes acima de 0,05 mV e maior distribuição de potências nos espectrogramas até 40 Hz (Fig. 6C, D e E).

As respectivas médias lineares de potência de $0,5014 \pm 0,06054 \text{ mV}^2/\text{Hz} \times 10^{-3}$, $0,4760 \pm 0,08207 \text{ mV}^2/\text{Hz} \times 10^{-3}$ e $0,5115 \pm 0,07469 \text{ mV}^2/\text{Hz} \times 10^{-3}$ apresentaram diferença estatística em relação aos grupos controle e álcool ($P<0,0001$). Após a administração da combinação álcool-Flunitrazepam, as amplitudes dos registros diminuíram e tornaram-se menos irregulares, caindo abaixo de 0,05 mV. Os espectrogramas revelaram diminuição da intensidade de potência (Fig. 6F, G e H). As médias lineares de potência para os grupos álcool-Flunitrazepam (0,1, 0,2 e 0,3 mg/Kg) foram $0,1233 \pm 0,01715 \text{ mV}^2 / \text{Hz} \times 10^{-3}$, $0,1255 \pm 0,01401 \text{ mV}^2 / \text{Hz} \times 10^{-3}$ e $0,1049 \pm 0,01892 \text{ mV}^2 / \text{Hz} \times 10^{-3}$, e demonstraram diferenças estatísticas em relação ao grupo controle e grupos Flunitrazepam 0,1 mg/kg, Flunitrazepam 0,2 mg/kg e Flunitrazepam 0,3 mg/kg ($P < 0,0001$) (Fig. 7A).

As oscilações cerebrais delta médias para o grupo controle foram $0,02341 \pm 0,02752 \text{ mV}^2 / \text{Hz} \times 10^{-3}$. Todos os outros grupos apresentaram diferenças estatísticas ($P < 0,0001$) em relação ao grupo controle devido à diminuição das oscilações delta. O grupo álcool apresentou $0,03110 \pm 0,003793 \text{ mV}^2/\text{Hz} \times 10^{-3}$ nas oscilações delta, o grupo Flunitrazepam 0,1 apresentou $0,03658 \pm 0,004676 \text{ mV}^2/\text{Hz} \times 10^{-3}$, o grupo Flunitrazepam 0,2 apresentou $0,03256 \pm 0,006148 \text{ mV}^2/\text{Hz} \times 10^{-3}$ e o grupo Flunitrazepam 0,3 apresentou $0,03730 \pm 0,003922 \text{ mV}^2/\text{Hz} \times 10^{-3}$. Quanto aos grupos de combinação de drogas, o grupo álcool-Flunitrazepam 0,1 apresentou $0,03157 \pm 0,004925 \text{ mV}^2 / \text{Hz} \times 10^{-3}$, o grupo álcool-Flunitrazepam 0,2 apresentou $0,03432 \pm 0,004089 \text{ mV}^2/\text{Hz} \times 10^{-3}$ e o grupo álcool-Flunitrazepam 0,3 apresentou $0,02953 \pm 0,004558 \text{ mV}^2/\text{Hz} \times 10^{-3}$ (Fig. 7B).

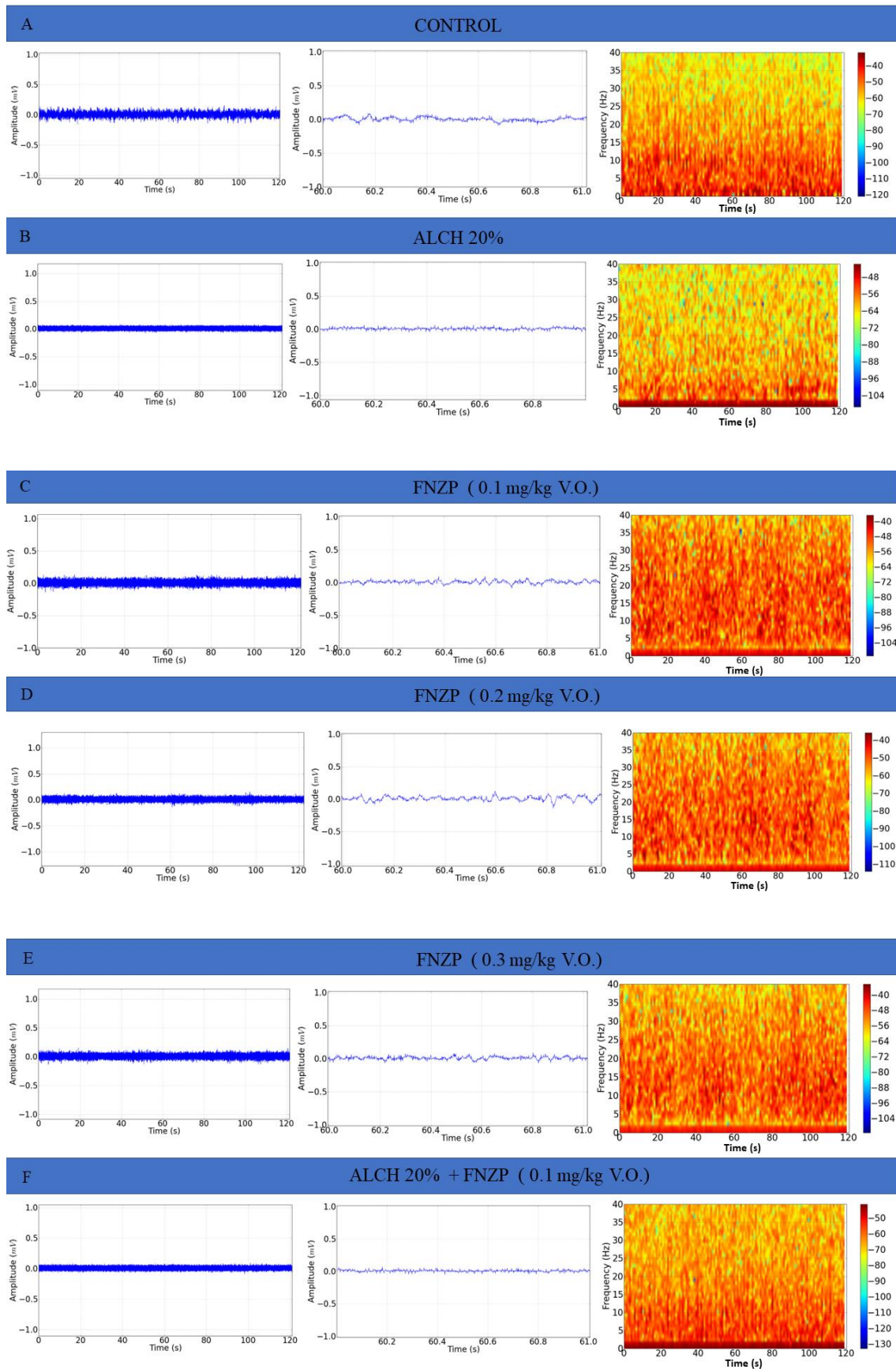
Houve diminuição da potência de teta em todos os grupos em relação ao grupo controle ($0,1291 \pm 0,01869 \text{ mV}^2 / \text{Hz} \times 10^{-3}$) ($P < 0,0001$). O grupo álcool ($0,01538 \pm 0,002185 \text{ mV}^2 / \text{Hz} \times 10^{-3}$) apresentou redução nas oscilações teta e manteve diferenças estatísticas ($P < 0,0001$) quando comparado ao grupo Flunitrazepam 0,1 ($0,05915 \pm 0,009238 \text{ mV}^2/ \text{Hz} \times 10^{-3}$), grupo Flunitrazepam 0,2 ($0,05936 \pm 0,005033 \text{ mV}^2/ \text{Hz} \times 10^{-3}$) e grupo Flunitrazepam 0,3 ($0,06231 \pm 0,010139 \text{ mV}^2/ \text{Hz} \times 10^{-3}$). Os grupos Flunitrazepam 0,1, 0,2 e 0,3 mg/kg apresentaram diferenças estatísticas ($P < 0,0001$) quando comparados aos grupos álcool-Flunitrazepam 0,1 ($0,01390 \pm 0,002145 \text{ mV}^2/\text{Hz} \times 10^{-3}$), grupo álcool-Flunitrazepam 0,2 ($0,01588 \pm 0,002205 \text{ mV}^2/\text{Hz} \times 10^{-3}$) e grupo álcool-Flunitrazepam 0,3 ($0,01321 \pm 0,001960 \text{ mV}^2/\text{Hz} \times 10^{-3}$) devido à diminuição da potência (Fig. 7C).

Houve diminuição das oscilações alfa ($P < 0,0001$) quando comparados os grupos administrados com fármacos e o grupo controle ($0,1368 \pm 0,02776 \text{ mV}^2/ \text{Hz} \times 10^{-3}$). O grupo álcool ($0,02070 \pm 0,0035502 \text{ mV}^2/ \text{Hz} \times 10^{-3}$) apresentou diferença estatística ($P < 0,0001$) em relação ao grupo Flunitrazepam 0,1 ($0,06579 \pm 0,01237 \text{ mV}^2/ \text{Hz} \times 10^{-3}$), grupo Flunitrazepam 0,2 ($0,06667 \pm 0,01235 \text{ mV}^2/ \text{Hz} \times 10^{-3}$) e grupo Flunitrazepam 0,3 ($0,08314 \pm 0,01463 \text{ mV}^2/ \text{Hz} \times 10^{-3}$). O grupo álcool também demonstrou diferença estatística ($P < 0,01$) em relação ao grupo álcool-Flunitrazepam 0,1 ($0,01425 \pm 0,002577 \text{ mV}^2/ \text{Hz} \times 10^{-3}$), grupo álcool-Flunitrazepam 0,2 ($0,006502 \pm 0,001392 \text{ mV}^2/\text{Hz} \times 10^{-3}$) e grupo álcool-Flunitrazepam 0,3 ($0,005402 \pm 0,0007311 \text{ mV}^2/\text{Hz} \times 10^{-3}$) devido à sua diminuição nas oscilações alfa (Fig. 7D).

Para as oscilações beta, todos os grupos apresentaram diferenças estatísticas ($P < 0,0001$) quando comparados ao grupo controle ($0,1223 \pm 0,01647 \text{ mV}^2/\text{Hz} \times 10^{-3}$). Como resultado da diminuição das oscilações beta, o grupo álcool ($0,06645 \pm 0,01331 \text{ mV}^2/\text{Hz} \times 10^{-3}$) apresentou diferença significativa ($P < 0,0001$) em relação ao grupo Flunitrazepam 0,1 ($0,02161 \pm 0,03008 \text{ mV}^2/\text{Hz} \times 10^{-3}$), grupo Flunitrazepam 0,2 ($0,2382 \pm 0,02293 \text{ mV}^2/\text{Hz} \times 10^{-3}$) e grupo Flunitrazepam 0,3 ($0,2176 \pm 0,04078 \text{ mV}^2/\text{Hz} \times 10^{-3}$), uma vez que esses últimos grupos apresentaram um aumento na potência de beta. Devido à diminuição explícita da potência beta nos grupos álcool-Flunitrazepam 0,1 ($0,01949 \pm 0,001003 \text{ mV}^2/\text{Hz} \times 10^{-3}$), álcool-Flunitrazepam 0,2 ($0,01526 \pm 0,001994 \text{ mV}^2/\text{Hz} \times 10^{-3}$) e álcool-Flunitrazepam 0,3 ($0,01011 \pm 0,0009309 \text{ mV}^2/\text{Hz} \times 10^{-3}$), eles mantiveram uma diferença estatística em relação aos grupos álcool, Flunitrazepam 0,1, Flunitrazepam 0,2 e Flunitrazepam 0,3 ($P < 0,0001$) (Fig. 7E).

Após a administração de Flunitrazepam nas doses de 0,1, 0,2 e 0,3 mg/kg, houve aumento das oscilações gama, com valores de ($0,02132 \pm 0,006896 \text{ mV}^2/\text{Hz} \times 10^{-3}$), ($0,01866 \pm 0,006323 \text{ mV}^2/\text{Hz} \times 10^{-3}$) e ($0,02042 \pm 0,006597 \text{ mV}^2/\text{Hz} \times 10^{-3}$), respectivamente. Esses valores apresentaram diferença estatística em relação ao grupo controle ($0,01237 \pm 0,001904 \text{ mV}^2/\text{Hz} \times 10^{-3}$) e o grupo álcool ($0,005919 \pm 0,0009495 \text{ mV}^2/\text{Hz} \times 10^{-3}$) ($P < 0,0001$). Para os grupos álcool-Flunitrazepam 0,1 ($0,004302 \pm 0,0005440 \text{ mV}^2/\text{Hz} \times 10^{-3}$), álcool-Flunitrazepam 0,2 ($0,004177 \pm 0,0004988 \text{ mV}^2/\text{Hz} \times 10^{-3}$), e álcool-Flunitrazepam 0,3 ($0,003368 \pm 0,0006748 \text{ mV}^2/\text{Hz} \times 10^{-3}$), manteve-se diferença estatística em relação aos grupos Flunitrazepam 0,1, 0,2 e 0,3, bem como para o grupo controle ($P < 0,0001$) devido à diminuição das oscilações gama (Fig. 7F).

Figura 6 - Demonstração dos registros obtidos após administração de álcool e Flunitrazepam.



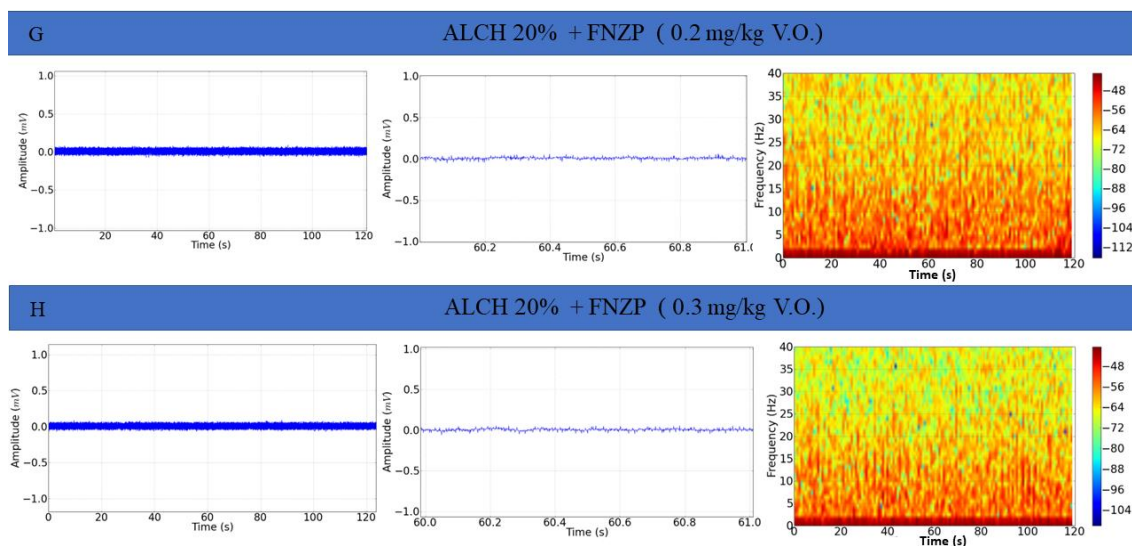
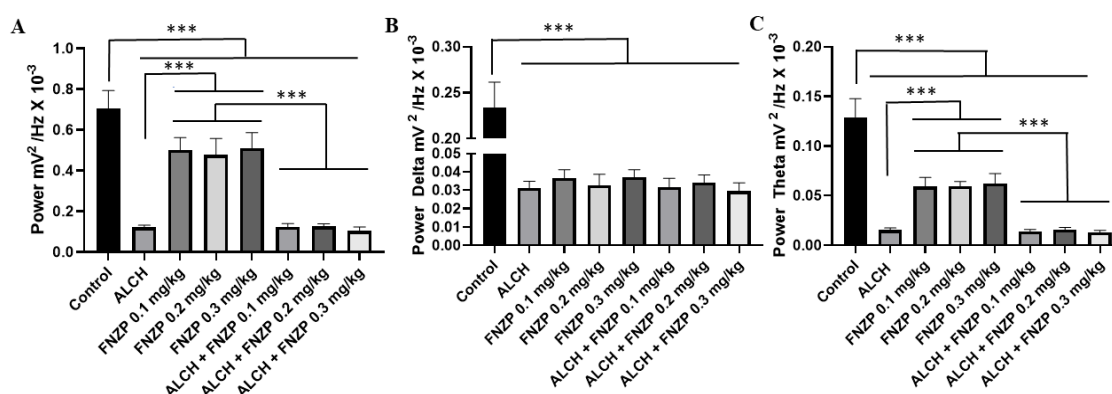


Figura. 6 Registros obtidos após administração de álcool e Flunitrazepam, com duração de dois minutos (esquerda), amplificação dos registros (centro) e espectrograma de distribuição de potência (direita). **(A)** Registro ECoG do grupo controle; **(B)** Registro ECoG obtido do grupo administrado apenas com álcool (a 20%, 1 ml/100 g por via oral); **(C)** Registro ECoG obtido após administração de Flunitrazepam 0,1 mg/kg por via oral; **(D)** Registro ECoG obtido após administração de Flunitrazepam 0,2 mg/kg por via oral; **(E)** Registro ECoG obtido após administração de Flunitrazepam 0,3 mg/kg por via oral; **(F)** Registro ECoG obtido após administração da associação álcool-Flunitrazepam 0,1 mg/kg por via oral; **(G)** Registro ECoG obtido após administração da combinação álcool-Flunitrazepam 0,2 mg/kg por via oral; **(H)** Registro do ECoG obtido após a administração da associação álcool-Flunitrazepam 0,3 mg/kg por via oral. **Fonte:** arquivo do autor.

Figura 7 - Gráficos representando registros da potência e oscilações das ondas.



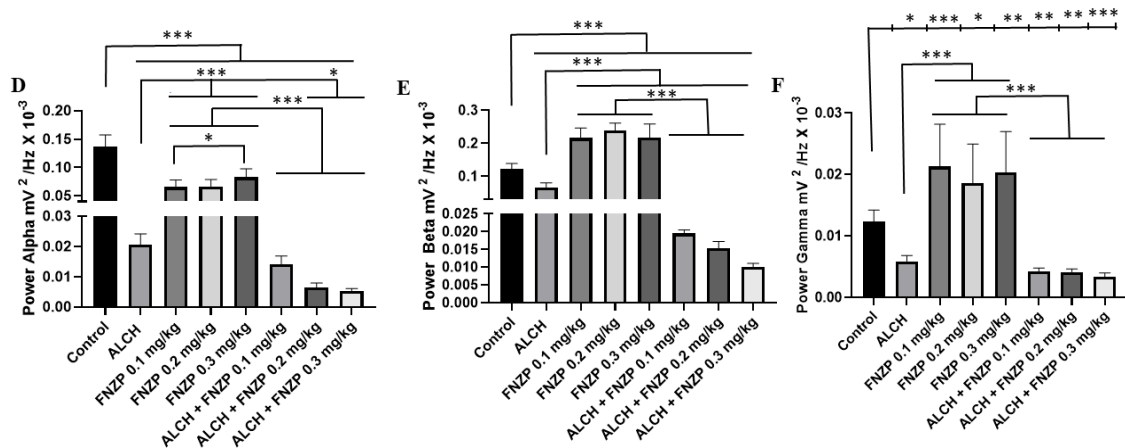


Fig. 7 (A) Gráficos mostrando a média linear de potência da atividade registrada captada pelos eletrodos para os grupos; (B) Avaliação da potência em oscilações delta; (C) Análise de potência em oscilações teta; (D) Análise de potência em oscilações alfa; (E) Análise da média linear de potência em oscilações beta; (F) Análise da potência em oscilações gama. Após ANOVA e teste de Tukey, (*) $P < 0,01$; (**) $P < 0,001$; (***) $P < 0,0001$. **Fonte:** arquivo do autor.

4.2 A combinação de álcool e Flunitrazepam causou diminuição da frequência respiratória

Houve manutenção da frequência respiratória para os grupos: controle ($66,67 \pm 4,796/\text{minuto}$), grupo álcool ($67,11 \pm 8,433/\text{minuto}$), grupos Flunitrazepam 0,1 mg/kg ($69,11 \pm 7,079/\text{minuto}$), Flunitrazepam 0,2 mg/kg ($70,44 \pm 4,773/\text{minuto}$) e Flunitrazepam 0,3 mg/kg ($66,44 \pm 5,457/\text{minuto}$) (Figs. 8A, 8B, 8C, 8D, 8E e 9A). Entretanto, houve diminuição da frequência respiratória ($P < 0,0001$) nos grupos que receberam a combinação álcool-Flunitrazepam nas doses de 0,1 mg/kg ($50,57 \pm 3,606/\text{minuto}$), 0,2 mg/kg ($36,00 \pm 5,657/\text{minuto}$) e 0,3 mg/kg ($31,78 \pm 2,333/\text{minuto}$). Os grupos que receberam doses de Flunitrazepam 0,2 e 0,3 mg/kg em combinação com álcool apresentaram maior depressão respiratória ($P < 0,0001$) em comparação ao grupo que recebeu Flunitrazepam a 0,1 mg/kg em combinação com álcool (Figs. 8F, 8G, 8H e 9A).

Na avaliação da potência de contração muscular do décimo músculo intercostal durante o tratamento, o grupo controle ($17,39 \pm 4,086 \text{ mV}^2/\text{Hz} \times 10^{-3}$) e o grupo álcool ($14,98 \pm 1,830 \text{ mV}^2/\text{Hz} \times 10^{-3}$) apresentaram diferença estatisticamente significativa ($P < 0,0001$) devido à diminuição da potência em relação aos grupos Flunitrazepam 0,1 mg/kg ($10,87 \pm 1,312 \text{ mV}^2/\text{Hz} \times 10^{-3}$), Flunitrazepam 0,2 mg/kg ($9,030 \pm 0,6202 \text{ mV}^2/\text{Hz} \times 10^{-3}$) e Flunitrazepam 0,3 mg/kg ($10,09 \pm 0,9611 \text{ mV}^2/\text{Hz} \times 10^{-3}$).

Hz $\times 10^{-3}$), que apresentaram diminuição da potência. Por outro lado, houve um aumento estatisticamente significativo na potência ($P < 0,0001$) para os grupos álcool-Flunitrazepam 0,2 mg/kg ($21,85 \pm 2,338 \text{ mV}^2/\text{Hz} \times 10^{-3}$) e álcool-Flunitrazepam 0,3 mg/kg ($23,71 \pm 1,301 \text{ mV}^2/\text{Hz} \times 10^{-3}$). Os grupos tratados apenas com Flunitrazepam apresentaram diferença estatisticamente significativa ($P < 0,0001$) em relação aos grupos que receberam a combinação álcool-Flunitrazepam (Fig. 9B).

Figura 8 - Demonstração dos registros eletromiográficos realizados no décimo músculo intercostal dos ratos

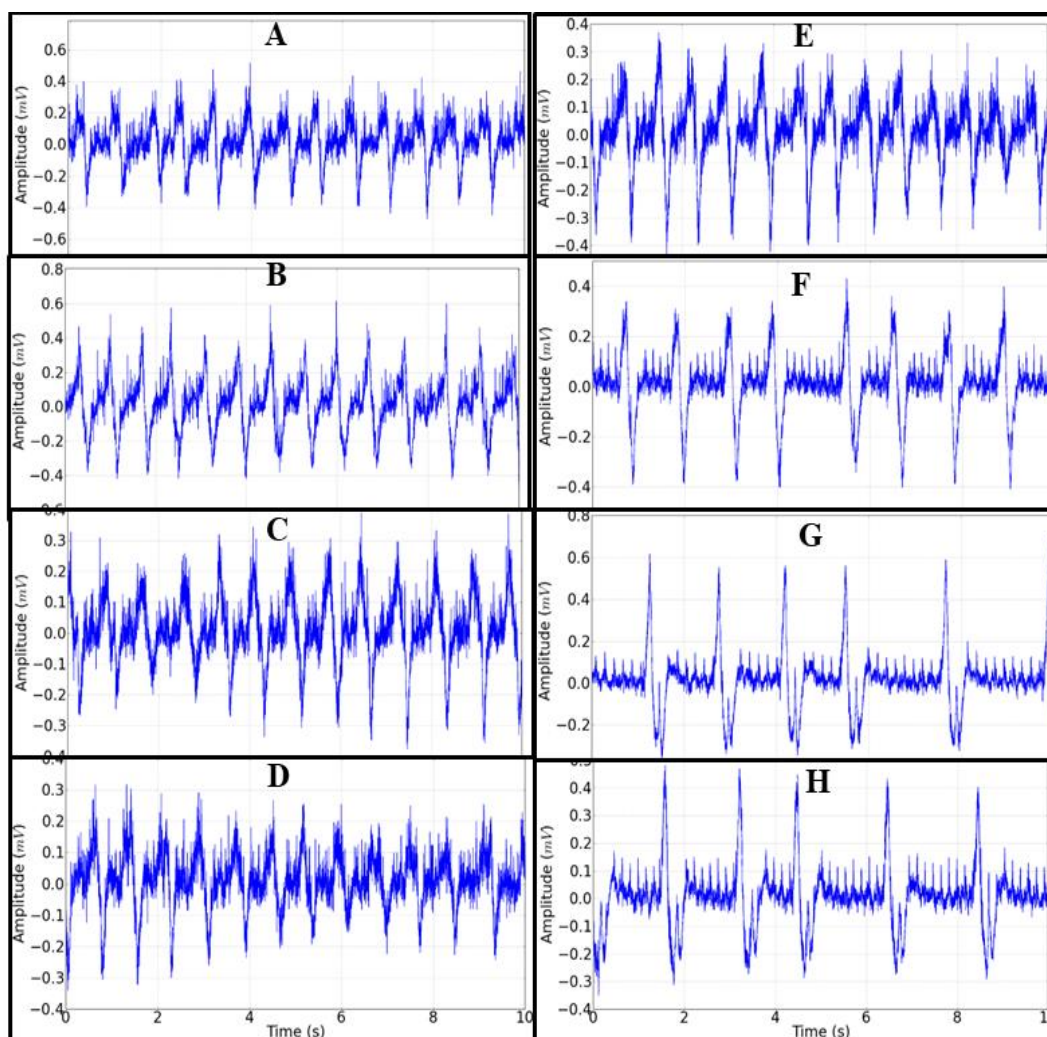


Fig. 8 (A) Grupo controle; (B) Grupo álcool; (C) Grupo Flunitrazepam 0,1 mg/kg; (D) Grupo Flunitrazepam 0,2 mg/kg; (E) Grupo Flunitrazepam 0,3 mg/kg; (F) Grupo álcool-Flunitrazepam 0,1 mg/kg grupo; (G) Grupo álcool-Flunitrazepam 0,2 mg/kg grupo; (H) Grupo álcool-Flunitrazepam 0,3 mg/kg. Cada registro durou 10 segundos. **Fonte:** arquivo do autor.

Figura 9 - Gráficos representando a frequência respiratória

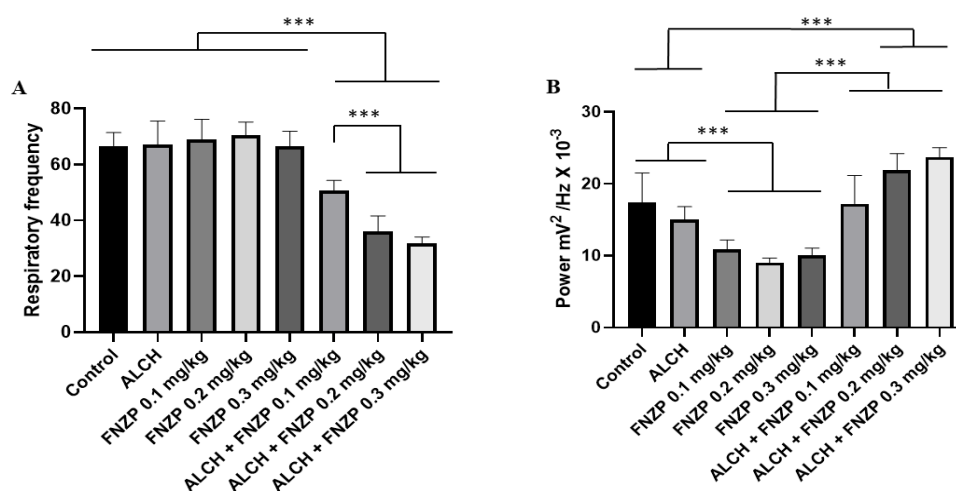


Fig. 9 (A) Gráfico mostrando a frequência respiratória média durante os tratamentos; **(B)** Gráfico mostrando a média linear da potência das contrações do músculo intercostal nos grupos de animais submetidos ao tratamento. Após ANOVA e teste de Tukey, (***) $P < 0,0001$. **Fonte:** arquivo do autor.

4.3 A combinação de álcool e Flunitrazepam causou mudanças na atividade cardíaca

A frequência cardíaca média (Fig. 10) para o grupo controle foi de $325,0 \pm 11,75$ bpm e não apresentou diferença estatística em relação ao grupo álcool ($310,1 \pm 12,57$ bpm) ($p=0,1968$), grupo Flunitrazepam 0,1 ($316,4 \pm 11,44$ bpm) ($p=0,8246$), grupo Flunitrazepam 0,2 ($318,4 \pm 13,14$ bpm) ($p = 0,9501$) e grupo Flunitrazepam 0,3 ($306,7 \pm 15,00$ bpm) ($p = 0,0503$). Entretanto, demonstrou diferença estatística para os grupos álcool-Flunitrazepam 0,1 ($283,3 \pm 16,58$ bpm), álcool-Flunitrazepam 0,2 ($251,6 \pm 9,684$ bpm) e álcool-Flunitrazepam 0,3 ($247,6 \pm 6,386$ bpm). Os grupos álcool-Flunitrazepam 0,1 e álcool-Flunitrazepam 0,2 foram semelhantes ($p=0,9972$), mas diferiram estatisticamente dos grupos Flunitrazepam 0,3 e álcool-Flunitrazepam 0,1. O grupo álcool-Flunitrazepam 0,1 apresentou diferença cardíaca em relação ao grupo Flunitrazepam 0,3 (Fig. 11A).

Para a amplitude do QRS, não houve diferença estatística entre os grupos controle ($2,563 \pm 0,306$ mV), grupo álcool ($2,690 \pm 0,145$ mV), grupo Flunitrazepam 0,1 ($2,574 \pm 0,0996$ mV), grupo Flunitrazepam 0,2 ($2,484 \pm 0,2224$ mV), grupo Flunitrazepam 0,3 ($2,433 \pm 0,1925$ mV), grupo álcool-Flunitrazepam 0,1 ($2,536 \pm$

0,2022 mV), grupo álcool-Flunitrazepam 0,2 ($2,517 \pm 0,1311$ mV) e grupo álcool-Flunitrazepam 0,3 ($2,503 \pm 0,1002$ mV) ($F(7, 64)=1,490$; $p=0,1869$) (Fig. 11B).

O intervalo R-R médio para o grupo controle foi de $0,1848 \pm 0,0069$ ms, não apresentando diferença estatística em relação ao grupo álcool ($0,1894 \pm 0,01301$ ms) ($p = 0,9648$), grupo Flunitrazepam 0,1 ($0,1893 \pm 0,00717$ ms) ($p=0,9675$), grupo Flunitrazepam 0,2 ($0,1882 \pm 0,008303$ ms) ($p=0,9936$) e grupo Flunitrazepam 0,3 ($0,1958 \pm 0,00914$ ms) ($p=0,2119$). Entretanto, diferenças estatísticas foram observadas para os grupos álcool-Flunitrazepam 0,1 ($0,2121 \pm 0,01165$ ms), álcool-Flunitrazepam 0,2 ($0,2361 \pm 0,00957$ ms) e álcool-Flunitrazepam 0,3 ($0,2422 \pm 0,00641$ ms). Os grupos álcool-Flunitrazepam 0,2 e álcool-Flunitrazepam 0,3 foram semelhantes entre si ($p=0,8557$), mas estatisticamente diferentes dos grupos Flunitrazepam 0,3 e álcool-Flunitrazepam 0,1. O grupo álcool-Flunitrazepam 0,1 apresentou diferença estatística em relação ao grupo Flunitrazepam 0,3 (Fig. 11C).

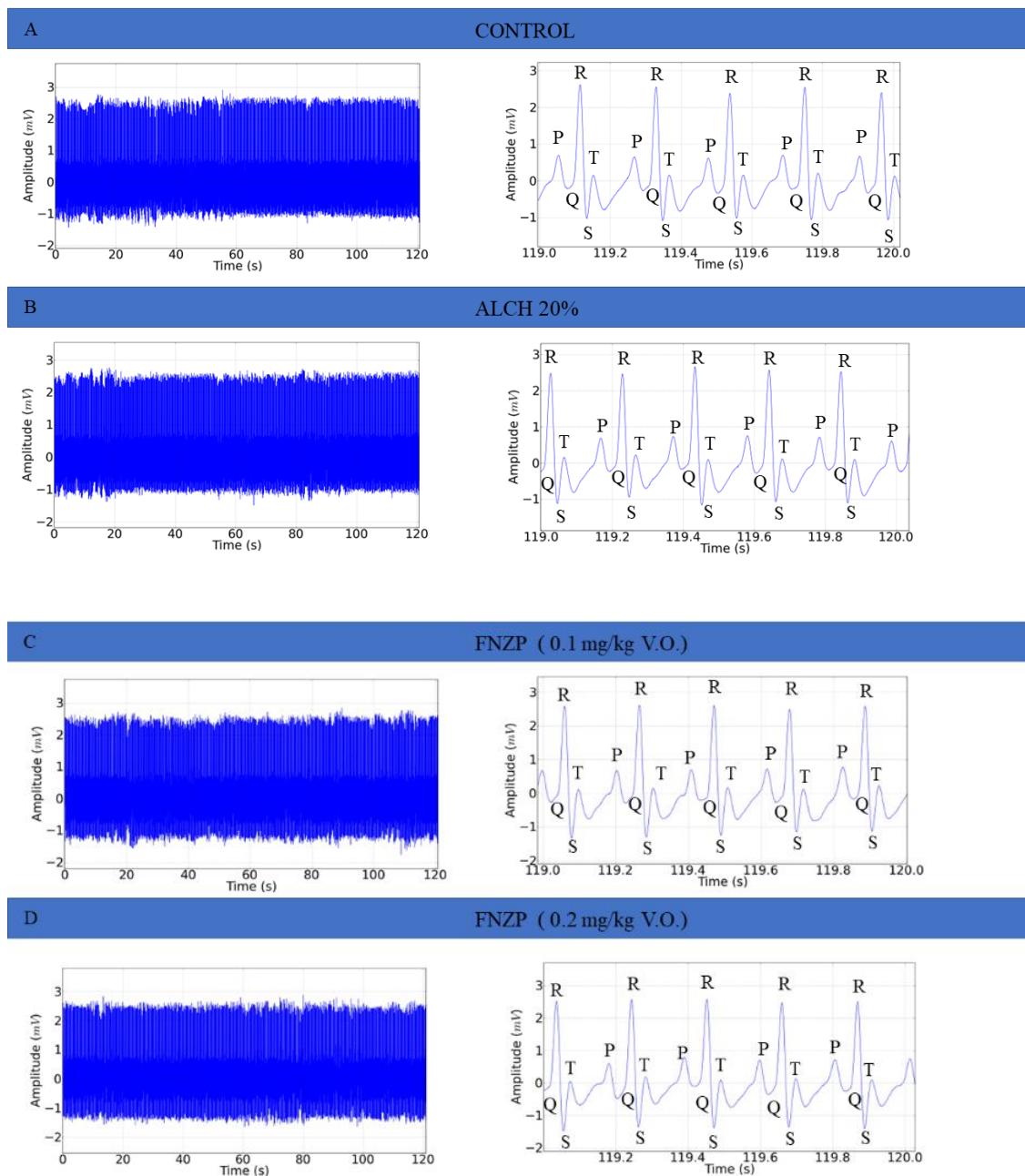
Para o intervalo P-Q, a média do grupo controle foi de $62,0 \pm 3,082$ ms, não apresentando diferença estatística para o álcool ($60,33 \pm 4,153$ ms) ($p = 0,9986$), Flunitrazepam 0,1 ($61,78 \pm 3,032$ ms) ($p = 0,9999$), Flunitrazepam 0,2 ($61,11 \pm 3,756$ ms) ($p=0,9999$), Flunitrazepam 0,3 ($61,56 \pm 4,065$ ms) ($p = 0,9999$), álcool-Flunitrazepam 0,1 ($65,56 \pm 6,307$ ms) ($p = 0,8958$) e álcool-Flunitrazepam 0,2 ($67,89 \pm 8,710$ ms) ($p=0,3941$). O grupo álcool-Flunitrazepam 0,3 ($73,89 \pm 9,347$ ms) apresentou diferença estatística para os grupos: controle, álcool, Flunitrazepam 0,1, Flunitrazepam 0,2 e Flunitrazepam 0,3, mas não demonstrou diferença estatística para os grupos álcool-Flunitrazepam 0,1 ($p=0,0627$) e álcool-Flunitrazepam 0,2 ($p=0,3699$) (Fig. 11D).

Para a duração do QRS não houve diferenças estatísticas entre os grupos controle ($7,267 \pm 0,0,0 396$ ms), álcool ($7,500 \pm 0,441$ ms), Flunitrazepam 0,1 ($6,689 \pm 0,6314$ ms), Flunitrazepam 0,2 ($7,056 \pm 0,4876$ ms), Flunitrazepam 0,3 ($7,378 \pm 0,5761$ ms), álcool-Flunitrazepam 0,1 ($7,133 \pm 0,7616$ ms), álcool-Flunitrazepam 0,2 ($6,778 \pm 0,4816$ ms) e álcool-Flunitrazepam 0,3 ($7,200 \pm 0,324$ ms) ($F(7, 64)=2,509$; $p=0,0242$) (Fig. 11E).

Para o intervalo Q-T, a média do grupo controle foi de $82,11 \pm 5,061$ ms, não apresentando diferença estatística para os grupos álcool ($88,22 \pm 9,404$ ms) ($p = 0,3056$), Flunitrazepam 0,1 ($83,89 \pm 5,349$ ms) ($p=0,9975$), Flunitrazepam 0,2

(82,89±5,036 ms) ($p=0,9999$), Flunitrazepam 0,3 (82,22±3,328 ms) ($p=0,9999$) e álcool-Flunitrazepam 0,1 (84,00±3,841 ms) ($p=0,9963$). Os grupos álcool-Flunitrazepam 0,1 (67,89±8,710 ms) ($p=0,3941$), álcool-Flunitrazepam 0,2 (98,22±5,783 ms) e Flunitrazepam 0,3 (106,3±4,873 ms) não apresentaram diferença estatística ($p=0,0599$) entre si. Entretanto, observou-se diferença estatística para os demais grupos (Fig. 11F).

Figura 10 - Demonstração dos registros eletrocardiográficos (ECG).



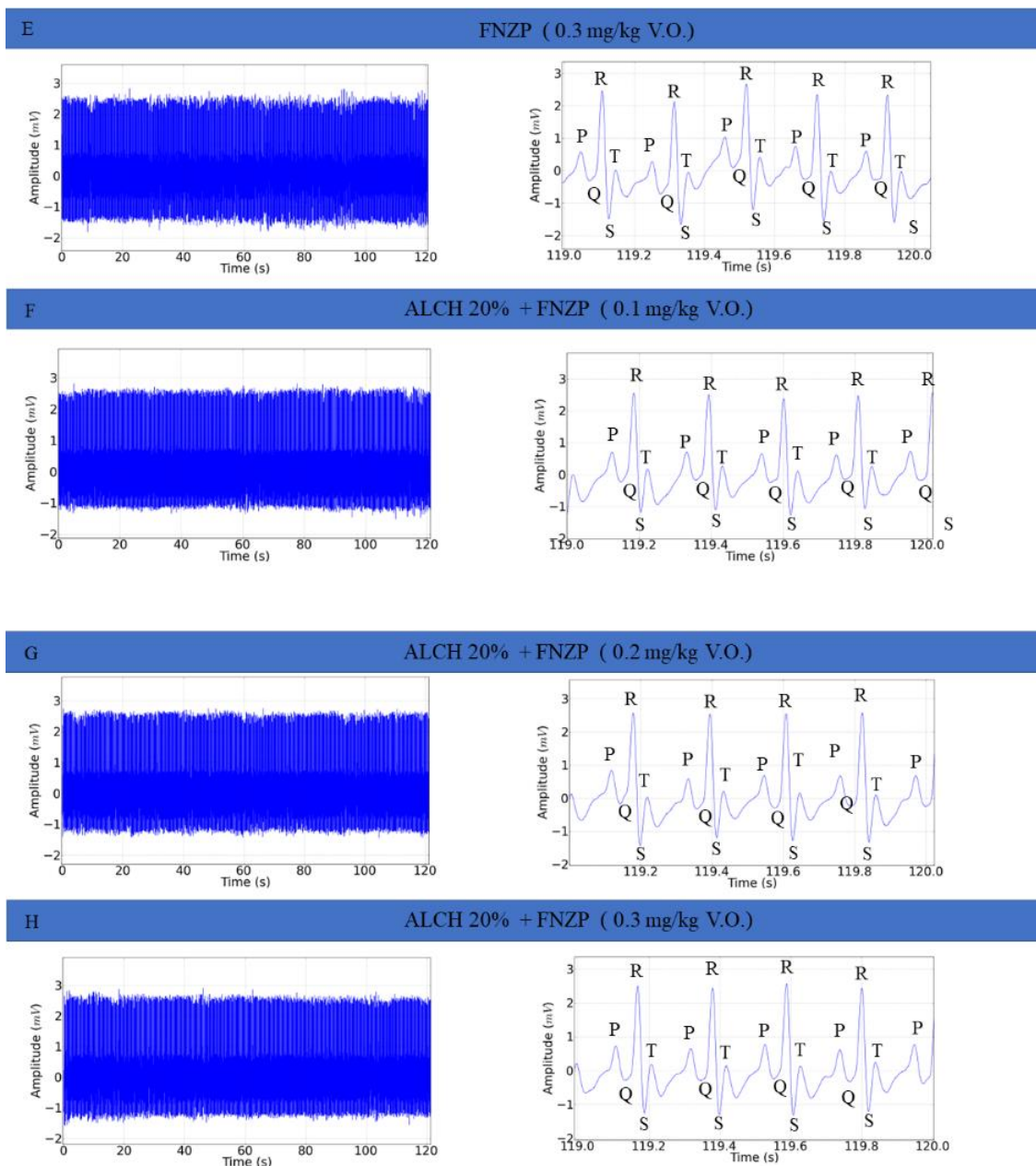
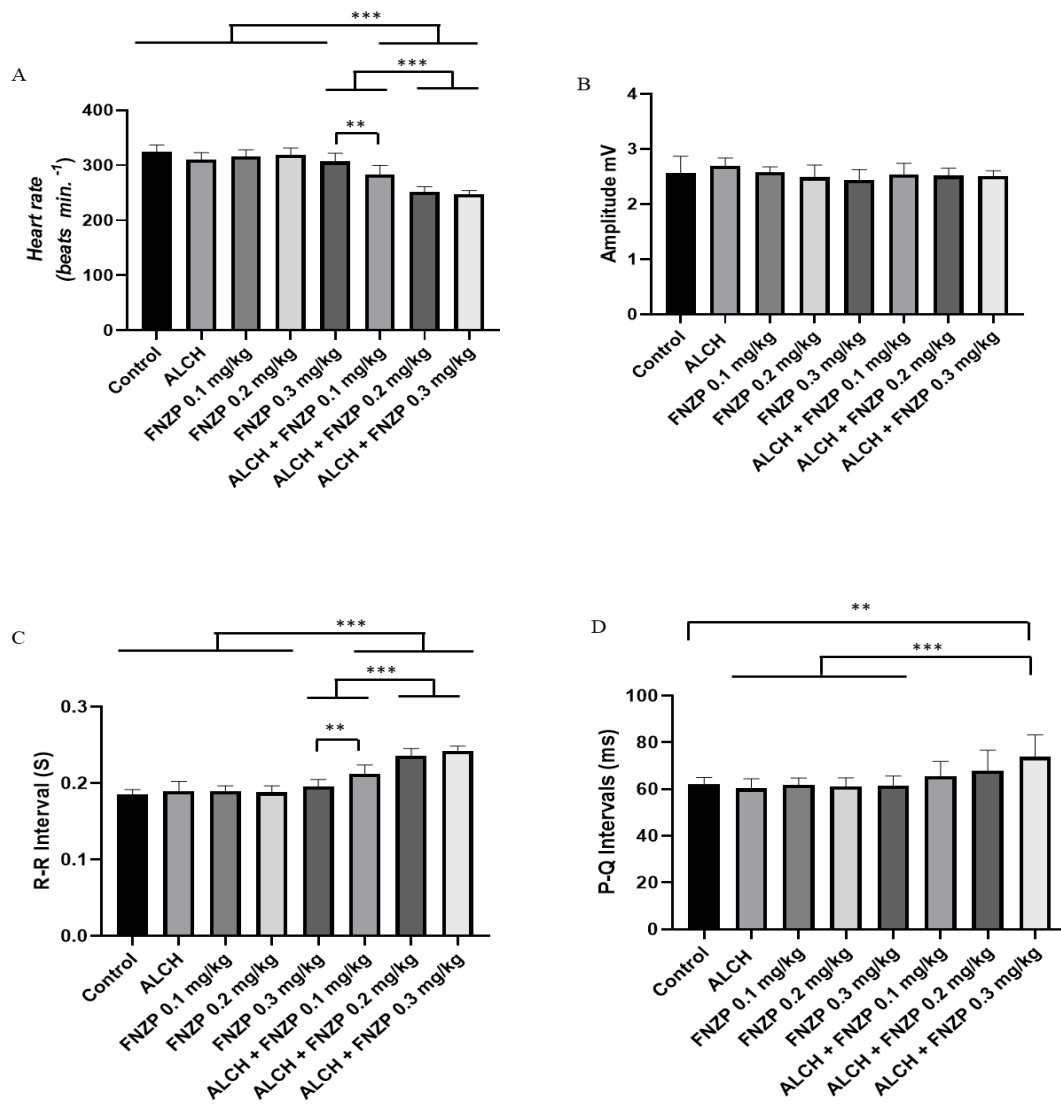


Fig. 10 ECGs obtidos após a administração de álcool e Flunitrazepam, com registros com duração de 120 segundos (esquerda) e registros amplificados com duração de 1 segundo (119–120 s) (direita), mostrando os componentes do registro eletrocardiográfico analisados: frequência cardíaca, amplitude, intervalo R-R, intervalo P-Q, intervalo Q-T e duração do QRS. **(A)** Registro de ECG do grupo controle; **(B)** Registro de ECG obtido após a administração de álcool a 20% (1 ml/100 g via oral); **(C)** Registro obtido após a administração de Flunitrazepam 0,1 mg/kg via oral; **(D)** Registro de ECG obtido após a administração de Flunitrazepam 0,2 mg/kg via oral; **(E)** Registro obtido após a administração de Flunitrazepam 0,3 mg/kg via oral; **(F)** Registro obtido após a administração de álcool-Flunitrazepam 0,1 mg/kg via oral; **(G)** Registro obtido após a administração de álcool-Flunitrazepam 0,2 mg/kg via oral; **(H)** Registro obtido após a administração de álcool-Flunitrazepam 0,3 mg/kg via oral. **Fonte:** arquivo do autor.

Figura 11 - Gráficos demonstrando os valores médios dos registros de atividade cardíaca.



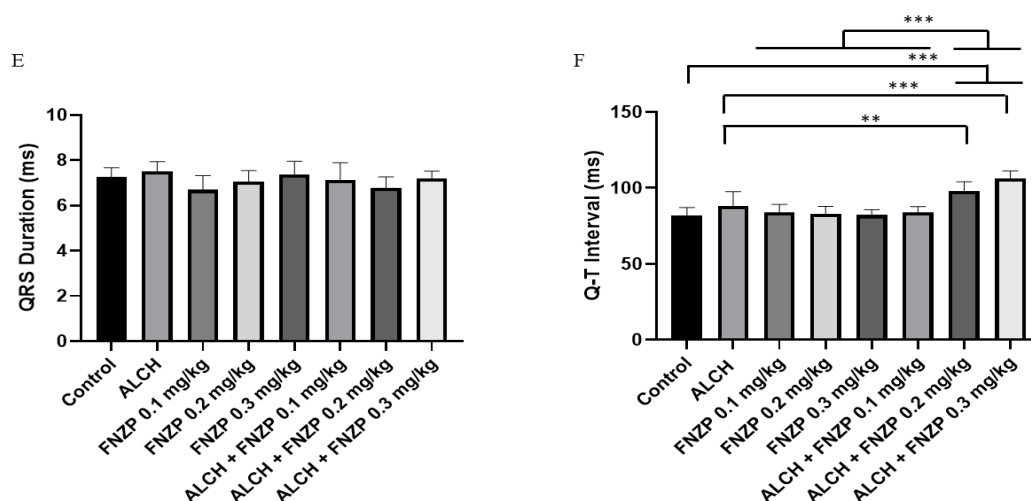


Fig. 11 Foram avaliados os seguintes parâmetros morfográficos cardíacos: (A) Frequência cardíaca (bpm); (B) Amplitude do QRS (mV); (C) Intervalo R-R (ms); (D) Intervalo P-Q (ms); (E) Duração do complexo QRS (ms); (F) Intervalo Q-T (ms). Após ANOVA e teste de Tukey, (*) P<0,01; (**) P<0,001; (***) P<0,0001. **Fonte:** arquivo do autor.

5. DISCUSSÃO

Os efeitos do álcool promovem ação depressora da atividade neuronal como resultado da potencialização dessa ação no receptor do neurotransmissor GABA através da atividade do receptor GABA_A. Essa atividade foi demonstrada por meio de registros eletrocorticográficos, nos quais foi observada uma diminuição na potência dos registros como resultado da diminuição da diferença de potencial captada pelo eletrodo (Sanei e Chambers 2007; Imã 2010; Michalak & Biala 2016; Varghese & Darkhode 2022; Kobayashi et al., 2022). O álcool age sobre a transmissão glutamatérgica através de efeitos nos receptores NMDA e AMPA (Roberto et al. 2012). Nossos resultados demonstraram uma redução na intensidade de potência do sinal elétrico no grupo álcool, com diferença significativa em relação ao grupo controle, o que está de acordo com os achados descritos na literatura atual.

De acordo com Jin et al. (2021), astrócitos de camundongos podem metabolizar o álcool por meio da síntese de aldeído desidrogenase 2, gerando acetato, que age no cerebelo e exalta o estado de intoxicação nesses animais, levando a alterações comportamentais caracterizadas pelo aumento da agressividade quando combinado com o Flunitrazepam. O trabalho de Gruol et al. (2023) examinou os efeitos durante o consumo e no pós-consumo de álcool na atividade cerebral e registros de EEG de

camundongos transgênicos e ninhadas “wild type”, observando que as bandas de frequência alfa e teta foram afetadas negativamente pela administração de álcool. Nossos dados também demonstram uma redução nas oscilações alfa e teta, que estão relacionadas ao desempenho de tarefas e atenção, em animais expostos ao consumo de álcool, essa redução na potência oscilatória foi ainda mais perceptiva quando o álcool foi combinado com o Flunitrazepam.

De acordo com Berro et al. (2021), a administração de altas doses de benzodiazepínicos (Alprazolam) poderia aumentar o poder das oscilações cerebrais no córtex occipital na banda de frequência beta, juntamente com a indução de efeitos sedativos, diminuição da temperatura corporal e atividade locomotora. Esses dados corroboram nossos achados, pois observamos um aumento da banda beta após a administração de Flunitrazepam, acompanhado de sedação nos animais. No entanto, após a administração de Flunitrazepam combinado com álcool, a banda beta perdeu potência, levando a um aprofundamento da sedação. Resultados semelhantes foram observados por Feinberg et al (2000) e Engel e Fries (2010).

A atividade de alta potência ligada ao ritmo teta (4–7,5 Hz) foi proposta para manter a consciência, a percepção e a função cognitiva durante a vigília e as funções relacionadas à atividade cortical (Ehlers et al. 2018; Leitão et al., 2022; Gruol et al., 2023). As ondas apresentaram potência reduzida nos grupos álcool e álcool-Flunitrazepam em todas as doses administradas quando comparadas aos grupos que utilizaram Flunitrazepam isoladamente, demonstrando que o álcool compromete mais intensamente a atividade da onda (Ehlers et al. 2012; Abrahão et al., 2020; Young e McNaughton 2020) quando comparados aos benzodiazepínicos (Kopp et al. 2004; Van Lier et al., 2004).

Outros estudos em animais propuseram que as ondas gama estão associadas à atividade sensorial, motora e cognitiva, portanto, um aumento nessas atividades está diretamente relacionado a um aumento na atividade da onda gama (Mann et al., 1993; Jacobs & Kahana 2009), podendo haver um ligeiro aumento ou redução durante o uso de benzodiazepínicos (Van Lier et al., 2004; Ito et al., 2013).

Quando comparados ao grupo controle, houve aumento da atividade gama nos grupos administrados apenas com Flunitrazepam e diminuição nos grupos administrados apenas com álcool e grupos administrados com a associação álcool-

Flunitrazepam. O aumento da atividade gama após a administração de benzodiazepínicos foi observado nos trabalhos de Van Lier et al. (2004) e Hao et al. (2022), inferindo que o aumento da atividade gama causado pelos benzodiazepínicos está ligado à estimulação do comportamento ativo individual por um mecanismo compensatório. No entanto, esse mecanismo tem sua operação comprometida quando ocorre associação com o álcool, indicando uma influência maior da ação deste.

Ainda considerando que tanto para Teta quanto para Gama, o Flunitrazepam isolado mostrou as maiores médias entre os grupos administradas com as drogas, e que o álcool provocou redução acentuada dessas médias quando administrado isoladamente e em conjunto, é importante considerar uma prevalência do efeito do álcool sobre o efeito do benzodiazepínico na interação medicamentosa para essas ondas. Observando que Teta está relacionada com o relaxamento profundo e Gama com a alta concentração cognitiva, outros estudos justificam a grande influência do álcool em estados de sonolência (Kobayashi et al, 2001; Thakkar et al, 2015; Sharma et al, 2018) e no comprometimento de ações motoras e cognitivas (Sullivan et al, 2010; Campbell et al, 2014), para ambas as situações a ação do álcool que inibe os efeitos excitatórios do glutamato nos receptores NMDA, agindo como depressor nos receptores GABA_A e de glutamato é tida como possível resposta para explicar as condições de relaxamento e perda de reflexo como mencionado anteriormente, efeitos do álcool que se sobressaem em comparação aos efeitos do benzodiazepínico.

Musizza et al. (2007), demonstrou que durante a anestesia de animais monitorados com EEG, a diminuição das oscilações delta está deterministicamente relacionada a uma diminuição unidirecional da atividade cardiorrespiratória. Podemos observar que tanto a administração isolada de álcool quanto de Flunitrazepam resultaram em diminuição da potência em oscilações de baixa frequência como a delta.

Os resultados dos grupos da combinação álcool-Flunitrazepam mostraram uma redução significativa na frequência respiratória em comparação com os outros grupos, com uma diminuição na frequência associada ao aumento das doses de Flunitrazepam (0,1,0,2 e 0,3 mg/kg). Houve também maior potência nos registros musculares intercostais dos animais do grupo da combinação álcool-Flunitrazepam,

indicando uma resposta compensatória para aprofundar a respiração (Matsuo & Morita 2007). Essa maior dependência da musculatura acessória para respirar destaca a potencial letalidade associada à combinação de álcool e benzodiazepínicos (Hollister 1990; Hirschtritt et al., 2019; Uchida et al., 2019).

Estudos anteriores também observaram o potencial dos benzodiazepínicos associados a outras drogas para alterar a dinâmica respiratória em animais e humanos, o experimento de Afzal & Kiyatkin (2019) propôs que a coadministração de Midazolam e heroína em um tratamento de hipóxia cerebral induzido por heroína em ratos, poderia aumentar os efeitos do opioide, causando mais diminuição nos já baixos níveis de oxigênio, já Hagiwara et al. (2018) observou que a administração de Propofol combinado com Midazolam alterou a dinâmica respiratória de um grupo de voluntários humanos adultos mais rapidamente do que a administração de Propofol isolado. Ao compararmos os dois estudos citados acima com nossos achados, o efeito sinérgico do benzodiazepínico associado a outras drogas com propriedades sedativas que podem comprometer o sistema respiratório é mais evidente e pode promover uma condição prejudicial durante o uso indevido.

No eletrocardiograma, todos os grupos apresentavam ritmo sinusal com todas as despolarizações cardíacas normais. Após o uso de álcool e Flunitrazepam, os parâmetros mais afetados foram frequência cardíaca, intervalo R-R, intervalo P-Q e intervalo Q-T, especialmente em doses mais elevadas da combinação álcool-Flunitrazepam, indicando que essa interação prejudica a homeostase circulatória. A intoxicação aguda com doses mais elevadas de benzodiazepínicos pode levar a alterações circulatórias, incluindo diminuição da frequência cardíaca (National Center for Biotechnology Information -NCBI, 2016), intervalo Q-T prolongado (mesmo em indivíduos sem histórico de problemas cardíacos) (Ahn et al., 2020) e alterações em outros intervalos, como R-R e P-Q (Manini et al., 2010). Esses intervalos também são prolongados em casos de overdose de álcool (Aasebø et al. 2007; Aasebø 2009).

De acordo com a literatura revisada, há um consenso quanto ao potencial desenvolvimento de arritmias cardíacas como um dos principais efeitos adversos da intoxicação em relação a esse tecido (Manini et al., 2010; NCBI 2016; NIDA 2020). Entretanto, não foram observadas arritmias cardíacas graves nos traçados

eletrocardiográficos, que permaneceram em ritmo sinusal, mesmo durante a administração concomitante de álcool e o benzodiazepínico.

6. CONCLUSÃO

Sob a perspectiva do experimento e análise de dados, as alterações morfológicas observadas nos registros demonstraram o envolvimento de órgãos que são alvos dos principais fatores deletérios resultantes da sinergia de álcool e benzodiazepínicos. Houve alteração no padrão de ondas em todas as administrações de droga testadas, a associação álcool-Flunitrazepam influenciou a queda acentuada nas médias de ondas Beta e Alfa, geralmente associadas com estados de atenção passiva, memória e percepção espacial, já em Teta e Gama foi observado prevalência do efeito do álcool sobre o do Flunitrazepam quando durante a associação, perceptível pela médias menores em comparação a administração isolada de Flunitrazepam. Além disso, com a diminuição da frequência respiratória paralela ao aumento da frequência cardíaca conforme o aumento da dose da associação álcool-Flunitrazepam, observou-se uma correspondência entre as atividades cerebral, respiratória e cardíaca influenciada pelo benzodiazepínico Flunitrazepam devido aos efeitos adicionais sobre as alterações cardiorrespiratórias já resultantes da ação do álcool, isso demonstra a letalidade desta interação medicamentosa, principalmente em casos onde o indivíduo já é suscetível à problemas nestes sistemas. Os achados deste trabalho legitimam e incrementam o debate sobre os problemas do uso irregular de remédios ansiolíticos junto ao álcool e suas possíveis consequências. Para todo modo, análises complementares são necessárias para se estabelecer o real grau de comprometimento dos órgãos expostos a intoxicação por estas drogas. Este trabalho resultou na autoria de um artigo intitulado “Potentiation of the depressant effect of alcohol by flunitrazepam in rats: an electrocorticographic, respiratory and electrocardiographic study”, na revista “Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology” (Anexo I) e co-autoria de outro artigo intitulado “Cryoanesthesia in tambaqui *Colossoma macropomum*: Behavioral and electrocardiographic responses”, na revista “Aquaculture” (Anexo II).

7. REFERÊNCIAS

- Aasebø W (2009). **ECG-voltage in alcoholics and non-alcoholics with acute alcohol intoxication.** J Forensic Leg Med 16(7):381–384. <https://doi.org/10.1016/j.jfm.2009.01.016>
- Aasebø W, Erikssen J, Jonsbu J, Stavem K (2007). **ECG changes in patients with acute ethanol intoxication.** Scand Cardiovasc J 41(2):79–84. <https://doi.org/10.1080/14017430601091698>
- Abrahamo KP, Pava MJ, Lovinger DM (2020). **Dose-dependent alcohol effects on electroencephalogram: Sedation/anesthesia is qualitatively distinct from sleep.** Neuropharmacology 164:107913. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2019.107913>
- Abhang PA, Gawali BW, Mehrotra SC (2016). **Introduction to EEG- and Speech-Based Emotion Recognition.** Academic Press. (1^oEd):1-50. ISBN 9780128044902. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-804490-2.00002-6>.
- Adhikari S, Kumar R, Driver EM, Bowes DA, Ng KT, Sosa-Hernandez JE, Oyervides-Muñoz MA, Melchor-Martínez EM, MartínezRuiz M, Coronado-Apodaca KG, Smith T, Bhatnagar A, Piper BJ, McCall KL, Parra-Saldivar R, Barron LP, Halden RU (2023). **Occurrence of Z-drugs, benzodiazepines, and ketamine in wastewater in the United States and Mexico during the Covid-19 pandemic.** Sci Total Environ 857(Pt 2):159351. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.159351>
- Afzal A, Kiyatkin EA (2019). **Interactions of benzodiazepines with heroin: Respiratory depression, temperature effects, and behavior.** Neuropharmacology 158:107677. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2019.107677>
- Ahn HJ, Jeong WJ, Kim KJ et al (2020). **Serial plasma and urine measurements of a patient with acute intoxication of zolpidem and flunitrazepam resulting in QT prolongation and ventricular tachycardia.** Clin Toxicol 58(6):501–503. <https://doi.org/10.1080/15563650.2019.1663206>
- Albrecht B, Staiger PK, Hall K, Miller P, Best D, Lubman DI (2014). **Benzodiazepine use and aggressive behaviour: A systematic review.** Aust N Z J Psychiatry 48:1096–1114. <https://doi.org/10.1177/0004867414548902>
- Alexandre MCM (2018). **Consumo abusivo do álcool altera parâmetros dopaminérgicos: Abordagem experimental e revisão sistemática.** Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Universidade do Extremo Sul, Criciúma, Brasil.
- Almeida RM, Saft DM, Rosa MM, Miczek KA (2010). **Flunitrazepam in combination with alcohol engenders high levels of aggression in mice and rats.** Pharmacol Biochem Behav 95(3):292–297. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2010.02.004>
- Bastos de Araújo D, Gurgel do Amaral AL, Maia da Fonseca S et al (2023). **Lippia organoides essential oil possesses anticonvulsant effect in pentylenetetrazol-induced seizures in rats: a behavioral, electroencephalographic, and electromyographic study.** Front Pharmacol 14:1289336. <https://doi.org/10.3389/fphar.2023.1289336>

Beauchamp A, Yee Y, Darwin BC, Raznahan A, Mars RB, Lerch JP (2022). **Whole-brain comparison of rodent and human brains using spatial transcriptomics**. eLife, (11), e79418. <https://doi.org/10.7554/eLife.79418>.

Berro LF, Overton JS, Reeves-Darby JA, Rowlett JK (2021). **Alprazolam-induced EEG spectral power changes in rhesus monkeys: a translational model for the evaluation of the behavioral effects of benzodiazepines**. Psychopharmacology 238(5):1373–1386. <https://doi.org/10.1007/s00213-02105793-z>

Bittencourt AL (2000). **Mecanismo de ação do etanol: envolvimento de etanol, gaba e dopamina**. Rev Psiquiatr Clin 27(1):26-31.

Busardò FP, Varì MR, di Trana A, Malaca S, Carlier J, di Luca NM (2019). **Drug-facilitated sexual assaults (DFSA): a serious underestimated issue**. Eur Rev Med Pharmacol Sci 23(24):10577–10587. https://doi.org/10.26355/eurrev_201912_19753

Buzsáki G, Anastassiou C, Koch C (2012). **The origin of extracellular fields and currents — EEG, ECoG, LFP and spikes**. Nat Rev Neurosci 13:407–420. <https://doi.org/10.1038/nrn3241>

Campbell AE, Sumner P, Singh KD, Muthukumaraswamy SD (2014). **Acute effects of alcohol on stimulus-induced gamma oscillations in human primary visual and motor cortices**. Neuropsychopharmacology. 39(9):2104-13. <https://doi.org/10.1038/npp.2014.58>. Epub 2014 Mar 13. PMID: 24622470; PMCID: PMC4057932.

Cloos JM, Lim CW, Bocquet V (2021). **Benzodiazepine high doses: The need for an accurate definition**. Int J Methods Psychiatr Res 30(4):e1888. <https://doi.org/10.1002/mpr.1888>

Costardi JVV, Nampo RAT, Silva GL (2015). **A review on alcohol: from the central action mechanism to chemical dependency**. J Braz Med Assoc 61(4):381–387. <https://doi.org/10.1590/1806-9282.61.04.381>

De Witte P (2004). **Imbalance between neuroexcitatory and neuroinhibitory amino acids causes craving for ethanol**. Addict Behav., 29(7):1325-39. <https://doi.org/10.1016/j.addbeh.2004.06.020>.

Dinis-Oliveira RJ (2017). **Metabolic profile of Flunitrazepam: clinical and forensic toxicological aspects**. Drug Metab Lett 11(1):14–20. <https://doi.org/10.2174/1872312811666170407164216>

Di Chiara G. **Alcohol and dopamine**. Alcohol Health Res World. 1997;21(2):108-14. PMID: 15704345; PMCID: PMC6826820.

Druid H, Holmgren P, Ahlner J (2001). **Flunitrazepam: an evaluation of use, abuse and toxicity**. Forensic Sci Int 122(2–3):136–141. [https://doi.org/10.1016/s0379-0738\(01\)00481-9](https://doi.org/10.1016/s0379-0738(01)00481-9)

Ehlers CL, Wills DN, Havstad J (2012). **Ethanol reduces the phase locking of neural activity in human and rodent brain.** Brain Res 1450:67–79.
<https://doi.org/10.1016/j.brainres.2012.02.039>

Ehlers CL, Sanchez-Alavez M, Wills D (2018). **Effect of gabapentin on sleep and delta and theta EEG power in adult rats exposed to chronic intermittent ethanol vapor and protracted withdrawal during adolescence.** Psychopharmacology (Berl). 2018;235(6):1783– 1791. <https://doi.org/10.1007/s00213-018-4888-6>

Einloft FMS, Kopittke L, Dias TGM, Schultz LVA, Dotta MR, Barros MTH (2023). **The use of benzodiazepines and the mental health of women in prison: a cross-sectional study.** Sci Rep 13(1):4491. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-30604-0>

Ellenbroek B, Youn J (2016). **Rodent models in neuroscience research: is it a rat race? Disease Models & Mechanisms**, (9):1079–1087.
<https://doi.org/10.1242/dmm.026120>.

Engel AK, Fries P (2010). **Beta-band oscillations—signalling the status quo?** Curr Opin Neurobiol 20(2):156–165. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2010.02.015>

Estumano DP, Ferreira LO, Bezerra PAL et al (2019). **Alteration of testosterone levels changes brain wave activity patterns and induces aggressive behavior in rats.** Front Endocrinol 10:654. <https://doi.org/10.3389/fendo.2019.00654>

Evert DL, Oscar-Berman M (1995). **Alcohol-Related Cognitive Impairments.** Alcohol Health Res World 19(2):89–96

Feinberg I, Maloney T, Campbell IG (2000). Effects of hypnotics on the sleep EEG of healthy young adults: new data and psychopharmacologic implications. J Psychiatr Res 34(6):423–438. [https://doi.org/10.1016/s0022-3956\(00\)00038-8](https://doi.org/10.1016/s0022-3956(00)00038-8)

Ferreira LO, Souza RD, Araújo Silva F et al (2020). **Electrocorticographic patterns dominated by low-frequency waves in camphor-induced seizures.** Sci Rep 10(1):18222. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-75309-w>

Griffin CE, Kaye AM, Bueno FR, Kaye AD (2013). **Benzodiazepine pharmacology and central nervous system-mediated effects.** Ochsner J 13(2):214–223

Gruol DL, Calderon D, French K, Melkonian C, Huitron-Resendiz S, Cates-Gatto C, Roberts AJ (2023). **Neuroimmune interactions with binge alcohol drinking in the cerebellum of IL-6 transgenic mice.** Neuropharmacology 228:109455.
<https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2023.109455>

Hagiwara A, Matsuura N, Ichinohe T (2018). **Comparison of changes in respiratory dynamics immediately after the start of propofol sedation with or without midazolam.** J Oral Maxillofac Surg 76(1):52–59.
<https://doi.org/10.1016/j.joms.2017.05.038>

Halverson HE, Kim J, Freeman JH (2023). **Dynamic changes in local activity and network interactions among the anterior cingulate, amygdala, and cerebellum during associative learning.** J Neurosci 43(49):8385–8402.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0731-23.2023>

- Hamoy M, Dos Santos BL, Mello VJ et al (2018). **Cunaniol-elicited seizures: behavior characterization and electroencephalographic analyses.** *Toxicol Appl Pharmacol* 360:193–200. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2018.10.008>
- Hao Z, Xia X, Bai Y, Wang Y, Dou W (2022). **EEG evidence reveals zolpidem-related alterations and prognostic value in disorders of consciousness.** *Front Neurosci* 16:863016. <https://doi.org/10.3389/fnins.2022.863016>
- Hay M, Thomas DW, Craighead JL, Economides C, Rosenthal J (2014). **Clinical development success rates for investigational drugs.** *Nat Biotechnol.*, 32(1):40-51. <https://doi.org/10.1038/nbt.2786>.
- Heckmann W, Silveira CM (2009). **Dependência do álcool: aspectos clínicos e diagnósticos.** In: Andrade AG, Anthony JC (org.) *O álcool e suas consequências, uma abordagem multiconceitual.* Minha Editora, Barueri, pp 67–87
- Hernandez-Martin E, Vidmark JSL, MacLean JA, Sanger TD (2023). **What is the effect of benzodiazepines on deep brain activity? A study in pediatric patients with dystonia.** *Front Neurol* 14:1215572. <https://doi.org/10.3389/fneur.2023.1215572>
- Hirschtritt ME, Palzes VA, Kline-Simon AH et al (2019). **Benzodiazepine and unhealthy alcohol use among adult outpatients.** *Am J Manag Care* 25(12):358–365
- Hollister LE (1990). **Interactions between alcohol and benzodiazepines.** *Recent Dev Alcohol* 8:233–239
- Imam I (2010). **Alcohol and the central nervous system.** *Br J Hosp Med* 71(11):635–639. <https://doi.org/10.12968/hmed.2010.71.11.79653>
- Ito J, Maldonado P, Grün S (2013). **Cross-frequency interaction of the eye-movement related LFP signals in V1 of freely viewing monkeys.** *Front Syst Neurosci* 7(1). <https://doi.org/10.3389/fnsys.2013.00001>
- Jacobs J, Kahana MJ (2009). **Neural representations of individual stimuli in humans revealed by gama-band electrocorticographic activity.** *J Neurosci* 29(33):10203–10214. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2187-09.2009>
- Ji X, Saha S, Kolpakova J, Guildford M, Tapper AR, Martin GE (2017). **Dopamine Receptors Differentially Control Binge Alcohol Drinking-Mediated Synaptic Plasticity of the Core Nucleus Accumbens Direct and Indirect Pathways.** *J Neurosci.*, 37(22):5463-5474. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3845-16.2017>.
- Jin S, Cao Q, Yang F et al (2021). **Brain ethanol metabolism by astrocytic ALDH2 drives the behavioral effects of ethanol intoxication.** *Nat Metab* 3(3):337–351. <https://doi.org/10.1038/s42255-021-00357-z>
- Katselou M, Papoutsis I, Nikolaou P, Spiliopoulou C, Athanaselis S. (2016). **Metabolites replace the parent drug in the drug arena. The cases of fonazepam and nifoxipam.** *Forensic. Toxicology.* 35(1). <https://doi.org/10.1007/s11419-016-0338-5>.

- Kobayashi T, Madokoro S, Wada Y, Misaki K, Nakagawa H (2001). **Ethanol effect on sleep electroencephalogram by the correlation dimension**. Psychiatry Clin Neurosci. 55(3):233-234. <https://doi.org/10.1046/j.1440-1819.2001.00838.x>.
- Kobayashi NHC, Farias SV, Luz DA et al (2022). **Ketamine plus alcohol: what we know and what we can expect about this**. Int J Mol Sci 23(14):7800. <https://doi.org/10.3390/ijms23147800>
- Kopp C, Rudolph U, Löw K, Tobler I (2004). **Modulation of rhythmic brain activity by diazepam: GABA(A) receptor subtype and state specificity**. Proc Natl Acad Sci USA 101(10):3674–3679. <https://doi.org/10.1073/pnas.0306975101>
- Lau G, Ang JY, Kim N, Gabbe BJ, Mitra B, Dietze PM, Reeder S, Scott D, Beck B (2024). **Prevalence of alcohol and other drug use in patients presenting to hospital for violence-related injuries: a systematic review**. Trauma Violence Abuse 1:306–326. <https://doi.org/10.1177/15248380221150951>
- Leitão DS, Andrade AR, Medeiros NCL, Martins MFC, Ferreira LO, Santos VC, Hamoy AO, Barbas LAL, Muto NA, Jôia de Mello V, Lopes DCF, Hamoy M (2022). **Benzodiazepine partially reverses tonic-clonic seizures induced by thiocolchicoside**. Braz J Med Biol Res 55:e11771. <https://doi.org/10.1590/1414-431X2021e11771>
- Lin W, Qin Y, Ren Y (2023). **Flunitrazepam and its metabolites induced brain toxicity: Insights from molecular dynamics simulation and transcriptomic analysis**. J Hazard Mater 465:133113. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2023.133113>
- Maher JJ (1997). **Exploring alcohol effects on liver function**. Alcohol Health Res World. 21(1):5–12
- Manini AF, Nelson LS, Skolnick AH, Slater W, Hofman RS (2010). **Electrocardiographic predictors of adverse cardiovascular events in suspected poisoning**. J Med Toxicol 6(2):106–115. <https://doi.org/10.1007/s13181-010-0074-x>
- Mann K, Bäcker P, Rösche J (1993). **Dynamical properties of the sleep EEG in different frequency bands**. Int J Neurosci 73(3–4):161– 169. <https://doi.org/10.3109/00207459308986666>
- Matsuo N, Morita T (2007). **Efficacy, safety, and cost effectiveness of intravenous midazolam and flunitrazepam for primary insomnia in terminally ill patients with cancer: a retrospective multicenter audit study**. J Palliat Med 10(5):1054–1062. <https://doi.org/10.1089/jpm.2007.0016>
- Michalak A, Biała G (2016). **Alcohol dependence, neurobiology and treatment**. Acta Pol Pharm 73(1):3–12
- Musizza B, Stefanovska A, McClintock PV et al (2007). **Interactions between cardiac, respiratory and EEG-delta oscillations in rats during anesthesia**. J Physiol 580(Pt 1):315–326. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2006.126748>

Muto NA, Hamoy M, Rodrigues-Lucas DC et al (2021). **Myorelaxation, respiratory depression and electrocardiographic changes caused by the administration of extract of açai (*Euterpe oleracea* Mart.) stone in rats**. Toxicol Reports 2021(8):829–838. <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2021.03.024>

National Center for Biotechnology Information – NCBI, Substance Abuse and Mental Health Services Administration (US), & Office of the Surgeon General (US) (2016). **Facing Addiction in America: The Surgeon General's Report on Alcohol, Drugs, and Health**. Washington (DC): United States Department of Health and Human Services, pp 383–405

National Institute of Drug Abuse – NIDA (2020). **Commonly used drug charts**. Available at <https://nida.nih.gov/research-topics/commonly-used-drugs-charts#rohypnol>. Acessado em 25/05/2023

National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism -NIAAA-. **Alcohol Metabolism: An Update**. NIH Publication. 2007;72.

Olfson M, King M, Schoenbaum M (2015). **Benzodiazepine Use in the United States**. JAMA Psychiat 72(2):136–142. <https://doi.org/10.1001/jamapsychiatry.2014.1763>

Olkola KT, Ahonen J (2008). **Midazolam and other benzodiazepines**. Handb Exp Pharmacol 182:335–360. https://doi.org/10.1007/978-3-540-74806-9_16

Oscar-Berman M, Marinkovic K (2003). **Alcoholism and the brain: an overview**. Alcohol Res Health. 27(2):125–133

Pallanti S, Zohar J, Kasper S, Möller HJ, Hollander E (2023). **Revisiting benzodiazepines (GABA Enhancers): a transdiagnostic and precision medicine approach**. J Psychiatr Res 170:65–72. <https://doi.org/10.1016/j.jpsychires.2023.11.042>

Paxinos G, Watson C (2013). **The rat brain in stereotaxic coordinates**, 7th ed. Elsevier Science:Academic Press, San Diego

Quagliato LA, Freire RC, Nardi AE (2018). **Risks and benefits of medications for panic disorder: a comparison of SSRIs and benzodiazepines**. Expert Opin Drug Saf 17(3):315–324. <https://doi.org/10.1080/14740338.2018.1429403>

Ray S, Crone NE, Niebur E, Franaszczuk PJ, Hsiao SS (2008). **Neural correlates of high-gamma oscillations (60–200 Hz) in macaque local field potentials and their potential implications in electrocorticography**. J Neurosci 28(45):11526–11536. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2848-08.2008>

Reeves-Darby JA, Berro LF, Platt DM, Rüedi-Bettschen D, Shafery JP, Rowlett JK (2023). **Pharmaco-EEG analysis of ligands varying in selectivity for $\alpha 1$ subunit-containing GABAA receptors during the active phase in rats**. Psychopharmacology (Berl) 240(12):2561–2571. <https://doi.org/10.1007/s00213-023-06450-3>

- Rehm J, Roerecke M (2017). **Cardiovascular effects of alcohol consumption.** Trends Cardiovasc Med 27(8):534–538. <https://doi.org/10.1016/j.tcm.2017.06.002>
- Roberto M, Gilpin NW, Siggins GR (2012). **The central amygdala and alcohol: role of γ -aminobutyric acid, glutamate, and neuropeptides.** Cold Spring Harb Perspect Med 2(12):a012195. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a012195>
- Sanei S, Chambers JA (2007). **EEG signal processing.** 1st edn, pp. 1–125, John Wiley & Sons Ltd. <https://doi.org/10.1002/9780470511923>
- Schomer DL, Fernando H. LS (eds) (2017). **Niedermeyer's Electroencephalography: Basic Principles, Clinical Applications, and Related Fields.** 7^o ed (New York, 2017; online edn, Oxford Academic). <https://doi.org/10.1093/med/9780190228484.001.0001>,
- Seppälä T, Nuotto E, Dreyfus JF (1983). **Drug-alcohol interactions on psychomotor skills: zopiclone and flunitrazepam.** Pharmacology 27(Suppl 2):127–135
- Sharma R, Sahota P, Thakkar MM (2018). **A single episode of binge alcohol drinking causes sleep disturbance, disrupts sleep homeostasis, and down-regulates equilibrative nucleoside transporter 1.** J Neurochem. 146(3):304–321. <https://doi.org/10.1111/jnc.14470>.
- Sigel E, Ernst M (2018). **The benzodiazepine binding sites of GABAA receptors.** Trends Pharmacol Sci 39(7):659–671. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2018.03.006>
- Simmons MM, Cupp MJ (1998). **Use and abuse of flunitrazepam.** Ann Pharmacother 32:117–119. <https://doi.org/10.1345/aph.17027>
- Spadafore MT, Syed Z, Rubinfeld IS (2015). **Automated detection of benzodiazepine dosage in ICU patients through a computational analysis of electrocardiographic data.** AMIA ... Annual Symposium proceedings. AMIA Symposium, 2083–2091. Available at <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4765584/?report=reader>. Acessado em 25/05/2023
- Sullivan EV, Harris RA, Pfefferbaum A (2010). **Alcohol's effects on brain and behavior.** Alcohol Res Health. 33(1-2):127–43. PMID: 23579943; PMCID: PMC3625995.
- Terlouw C, Bourguet C, Deiss V (2016). **Consciousness, unconsciousness and death in the context of slaughter. Part I. Neurobiological mechanisms underlying stunning and killing.** Meat Science, (118):133–146. ISSN 0309-1740. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2016.03.011>.
- Thakkar MM, Sharma R, Sahota P (2015). **Alcohol disrupts sleep homeostasis.** Alcohol. 49(4):299–310. <https://doi.org/10.1016/j.alcohol.2014.07.019>.
- Treweek JB, Roberts AJ, Janda KD (2010). **Super additive effects of ethanol and flunitrazepam: implications of using immunopharmacotherapy as a therapeutic.** Mol Pharm 7(6):2056–2068. <https://doi.org/10.1021/mp900293a>

Uchida T, Hirano J, Sakurai H, Suzuki T, Mimura M, Uchida H (2019). **Concomitant use of alcohol and benzodiazepine hypnotics in psychiatric outpatients: a cross-sectional survey**. *Int Clin Psychopharmacol* 34(6):291–297.
<https://doi.org/10.1097/YIC.0000000000000264>

Van Lier H, Drinkenburg WH, Van Eeten YJ, Coenen AM (2004). **Effects of diazepam and zolpidem on EEG beta frequencies are behavior-specific in rats**. *Neuropharmacology* 47(2):163–174.
<https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2004.03.017>

Varghese J, Darkhode S (2022). **Effects of alcohol consumption on various systems of the human body: a systematic review**. *Cureus* 14(10):e30057.
<https://doi.org/10.7759/cureus.30057>

Veldhuizen S, Wade TJ, Cairney J (2009). **Alcohol consumption among Canadians taking benzodiazepines and related drugs**. *Pharmacoepidemiol Drug Saf* 18(3):203–210. <https://doi.org/10.1002/pds.1702>

Watrous AJ, Lee DJ, Izadi A, Gurkoff GG, Shahlaie K, Ekstrom AD (2013). **A comparative study of human and rat hippocampal low-frequency oscillations during spatial navigation**. *Hippocampus*, 23(8):656-661.
<https://doi.org/10.1002/hipo.22124>.

Weathermon R, Crabb DW (1999). **Alcohol and medication interactions**. *Alcohol Res Health* 23(1):40–54

World Health Organization – WHO (2005). **Public-health problems caused by harmful use of alcohol**. World Health Assembly 58. Available at <https://apps.who.int/iris/handle/10665/20376>. Acessado em 22/04/2023

Young CK, McNaughton N (2020). **Mixed effects of low-dose ethanol on cortical and hippocampal theta oscillations**. *Neuroscience* 429:213–224.
<https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2020.01.007>

Zakhari S (2013). **Alcohol Metabolism and Epigenetics Changes**. *Alcohol research: current reviews*. (35);6-16. PMID: 24313160

Zhang YX, Zhang Y, Bian Y, Liu YJ, Ren A, Zhou Y, Shi D, Feng XS (2023). **Benzodiazepines in complex biological matrices: Recent updates on pretreatment and detection methods**. *J Pharm Anal* 5:442–462.
<https://doi.org/10.1016/j.jpha.2023.03.007>