

El Diazepam Altera la Ultraestructura del Atrio Fetal de Ratón

Diazepam Alters the Ultrastructure of Fetal Atrium in Rat

Amalia Márquez-Orozco*; Graciela de la Fuente-Juárez* & María Cristina Márquez-Orozco*

MÁRQUEZ-OROZCO, A.; DE LA FUENTE-JUÁREZ, G. & MÁRQUEZ-OROZCO, M. C. El diazepam altera la ultraestructura del atrio fetal de ratón. *Int. J. Med. Surg. Sci., 3(4):991-996, 2016.*

RESUMEN: El diazepam (DZ) es un tranquilizante menor sintético, utilizado en pacientes con trastornos psicológicos y psiquiátricos. Es sedante, miorrelajante, anticonvulsionante y antipsicótico. El DZ atraviesa la barrera placentaria humana y la del ratón. Mujeres jóvenes que son adictas al fármaco, si se embarazan y continúan utilizándolo, sobre todo durante el primer trimestre, exponen a sus hijos a presentar alteraciones psicomotoras. El propósito de este trabajo fue investigar si el DZ administrado durante la gestación, induce alteraciones ultraestructurales del miocardio fetal de ratón. El grupo (DZ) de hembras gestantes de ratón de la cepa CD-1 fue tratado con dosis únicas diarias de 1,0 mg/kg/pc/sc del día 6 al 17 y un grupo (C) que recibió solución salina. El día 18 las hembras de ambos grupos se anestesiaron, los fetos se perfundieron por vía intracardiaca con paraformaldehído al 1 % y glutaraldehído al 2,5 %, se les extrajo el corazón, se disecó el atrio, se fijó en OsO₄ al 1 % y se incluyó en resina epóxica. Los cortes finos se contrastaron con acetato de uranilo y citrato de plomo y se observaron en un microscopio electrónico de transmisión. En los miocitos de los fetos del grupo DZ las sarcómeras del miocardio compacto tenían menor longitud que las del grupo C. Se observaron zonas con miofibrillas desorganizadas. El retículo sarcoplásmico de algunos miocitos presentaba cisternas distendidas y fragmentadas, mitocondrias alteradas y se observaron abundantes polirribosomas. Los cambios podrían deberse al efecto del DZ sobre la síntesis de actina y miosina pesada y sobre los organelos citoplásmicos, mediados por receptores benzodiazepínicos periféricos presentes en la membrana externa de las mitocondrias y asociados a canales de calcio dependientes de voltaje. Las alteraciones ultraestructurales del miocardio atrial de fetos de ratones expuestos in utero a DZ podrían tener efectos posnatales.

PALABRAS CLAVE: Diazepam; Benzodiazepinas; Corazón fetal; Ratón; Ultraestructura.

INTRODUCCIÓN

Las benzodiazepinas son un grupo de tranquilizantes menores sintéticos, del que existen más de 3,000 compuestos de los cuales el más empleado en medicina, es el diazepam (DZ) (Stenbach *et al.*, 1962), comercializado por los laboratorios Roche como Valium, se utiliza en la eclampsia, preeclampsia, actividad prematura del útero, amenaza de aborto y en la analgesia obstétrica durante el trabajo de parto. Es sedante miorrelajante, anticonvulsionante y antipsicótico (Feldman *et al.*, 1997). También se utiliza en diabéticas, hipertensas, con trastornos emocionales y psiquiátricos. En mujeres jóvenes en edad

reproductiva, el DZ se usa como droga de recreación y mientras están expuestas al fármaco, pueden embarazarse y continuar su ingesta durante el primer trimestre, hasta que se comprueba este estado (Cole & Chiarello, 1990). El DZ y sus metabolitos por tener un peso molecular menor a 250 kDa, atraviesan la barrera placentaria de la especie humana, el ratón, la rata y el hámster. En el ratón además de atravesar la barrera placentaria altera su estructura histológica (Márquez-Orozco *et al.*, 2014). Se distribuyen en todos los tejidos fetales, en los que permanece por más de diez días posnatales

*Departamento de Embriología, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Mexico, México.

(Idänpään-Heikkilä *et al.*, 1971a, Idänpään-Heikkilä *et al.*, 1971b & Mandelli *et al.*, 1975).

El propósito del estudio fue investigar si el diazepam (DZ) administrado durante la gestación induce alteraciones en la ultraestructura en el atrio fetal de ratones.

MATERIAL Y MÉTODO

Hembras gestantes de ratón de la cepa CD-1, de dos meses de edad, se distribuyeron al azar en dos grupos, que fueron tratados del día 6 al 17, el primero (DZ) con dosis únicas diarias de DZ de 1,0 mg/kg/pc, administradas por vía subcutánea y el segundo (C) recibió solución salina al 0,9 %. El día 18, las hembras se anestesiaron, se obtuvieron los fetos, se perfundieron por vía intracardiaca a nivel ventricular con paraformaldehído al 1 % y glutaraldehído al 2,5 %, se extrajeron los corazones, se disecaron los atrios, se posfijaron en OsO_4 al 1 % y se incluyeron en resina epóxica. Se hicieron cortes finos, se contrastaron con citrato de plomo y acetato de uranilo y se observaron en un microscopio electrónico de transmisión.

RESULTADOS

En los fetos del grupo DZ los miocitos del miocardio presentaban núcleos con frecuencia lobulados y con heterocromatina en grumos gruesos adheridos a la membrana nuclear o distribuidos de manera atípica. El nucléolo en ocasiones estaba fragmentado y era más electrodenso (Figs. 1 y 2).

Las sarcómeras tenían menor longitud en el miocardio de los fetos del grupo DZ que las del grupo C. En algunas zonas se observaron sarcómeras con miofibrillas desorganizadas. Algunas líneas Z no estaban bien definidas o eran muy densas. (Figs. 3 a 8). El retículo sarcoplásmico de los miocitos del grupo DZ tenía cisternas distendidas, e incluso fragmentadas que no se observaban en los miocitos del grupo C. En los de grupo DZ había polirribosomas distribuidos en cúmulos más densos que las de los miocitos del grupo C y mitocondrias alteradas. (Figs. 7 a 10).

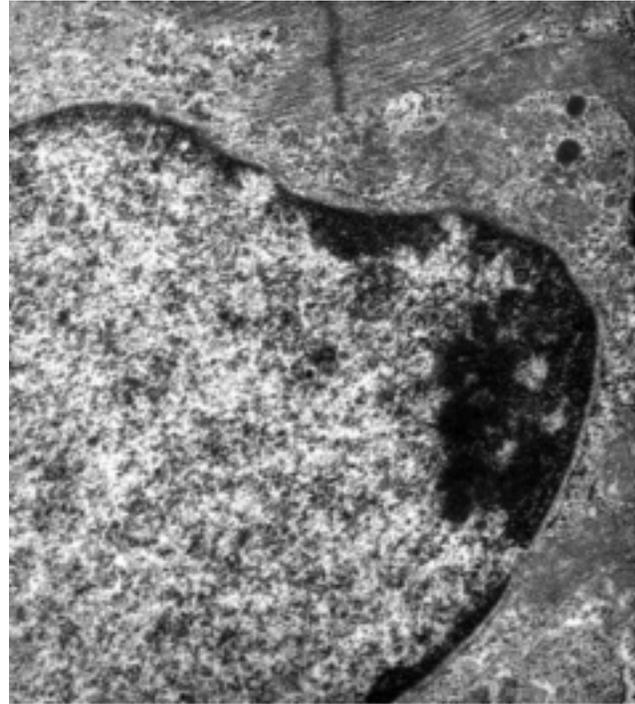


Fig. 1. Aspecto normal de la heterocromatina de un miocito del miocardio compacto del atrio de un feto de ratón de 18 días del grupo C. Aumento original 25.000X.

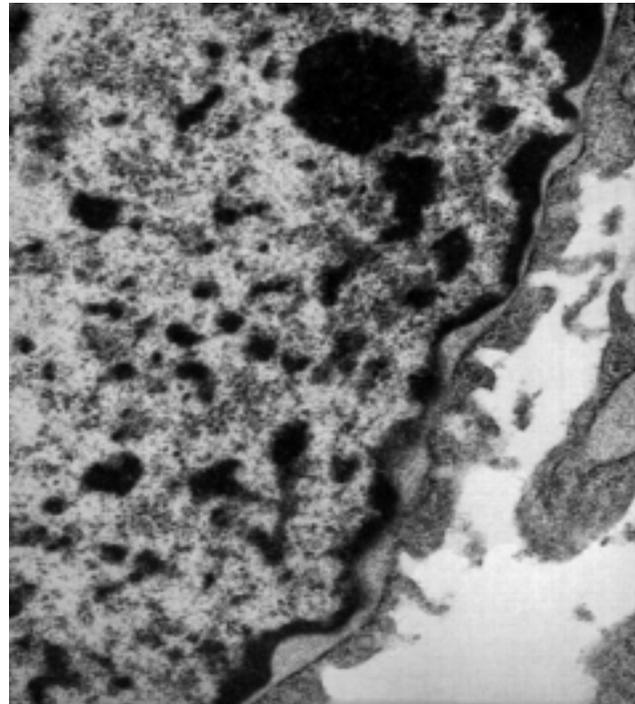


Fig. 2. Heterocromatina distribuida de manera atípica, en cúmulos densos dispersos entre la cariolinfa y un nucléolo de un miocito del miocardio compacto del atrio de un feto de ratón de 18 días del grupo DZ. Aumento original 25.000X.

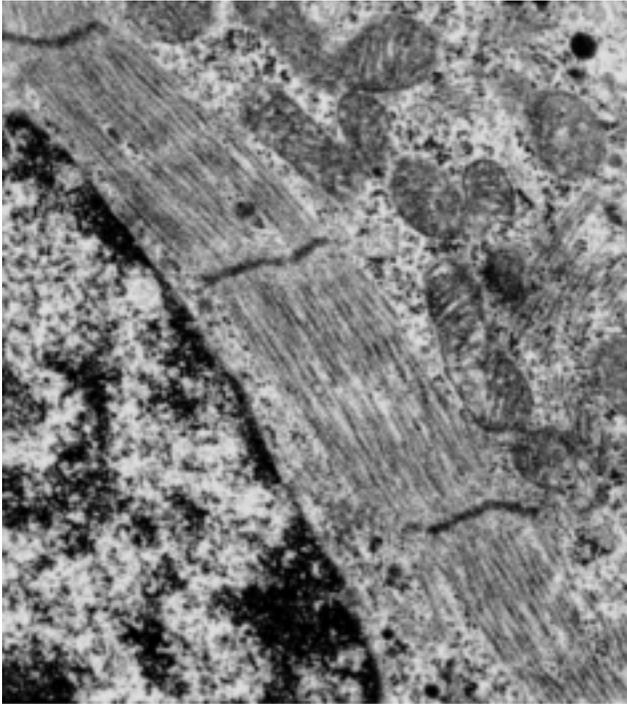


Fig. 3. Sarcómeras y mitocondrias de aspecto normal de un miocito atrial del miocardio de un feto de ratón de 18 días del grupo C. Aumento original 25.000X.

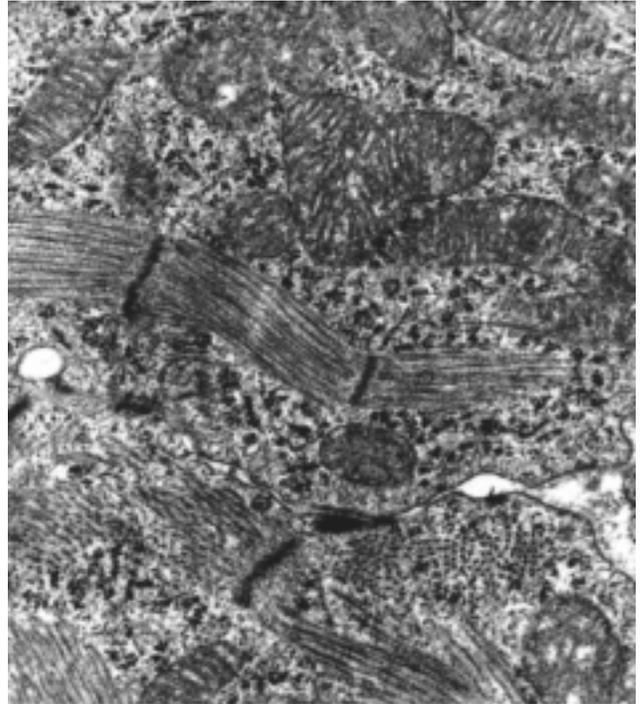


Fig. 5. Sarcómeras, mitocondrias y polirribosomas con apariencia normal, de un miocito de miocardio atrial compacto de un feto de 18 días del grupo C. Aumento original 25.000X.

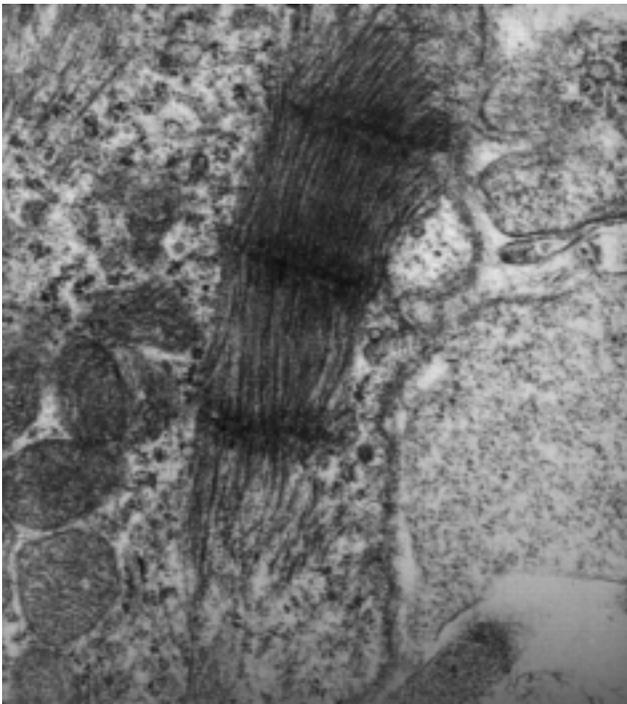


Fig. 4. Sarcómeras muy cortas, mitocondrias voluminosas, polirribosomas abundantes y retículo sarcoplásmico distendido de un miocito del miocardio atrial de un feto del grupo DZ de 18 días. Aumento original 25.000X.



Fig. 6. Sarcómeras muy cortas con miofibrillas desorientadas, mitocondrias alteradas y polirribosomas de un miocito del miocardio atrial compacto de un feto de 18 días del grupo DZ. Aumento original 25.000X.

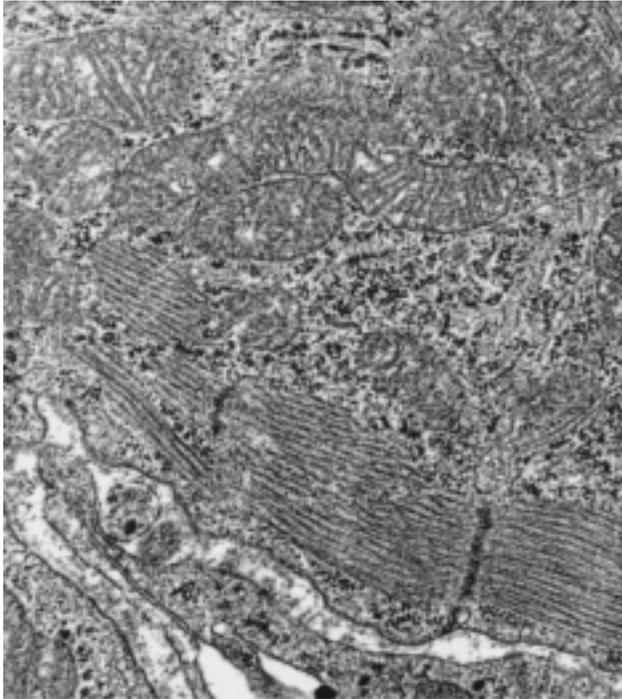


Fig. 7. Sarcómeras con miofibrillas en contacto con mitocondrias, polirribosomas y retículo sarcoplásmico normales. Miocito atrial de un feto de ratón de 18 días del grupo C. Aumento original 25.000X.

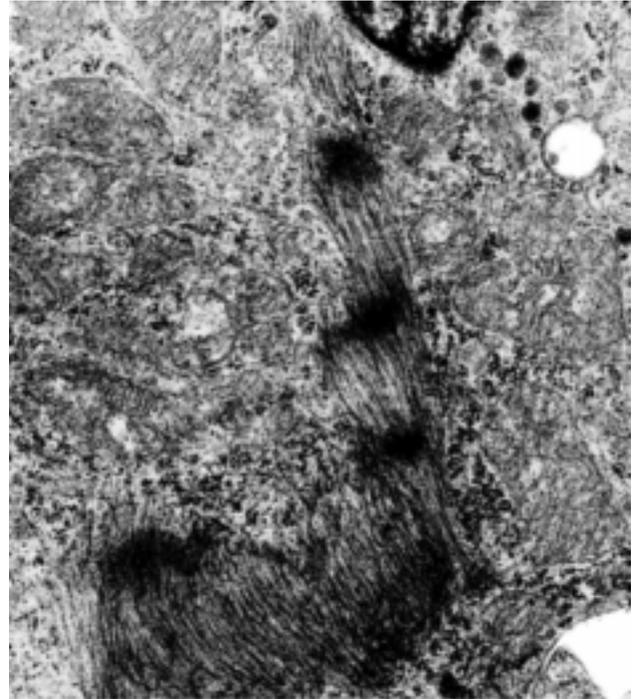


Fig. 8. Sarcómeras muy cortas con miofibrillas desorientada, en contacto con el retículo sarcoplásmico y mitocondrias alteradas y polirribosomas. Miocito atrial de un feto de ratón de 18 días del grupo DZ. Aumento original 25.000X.

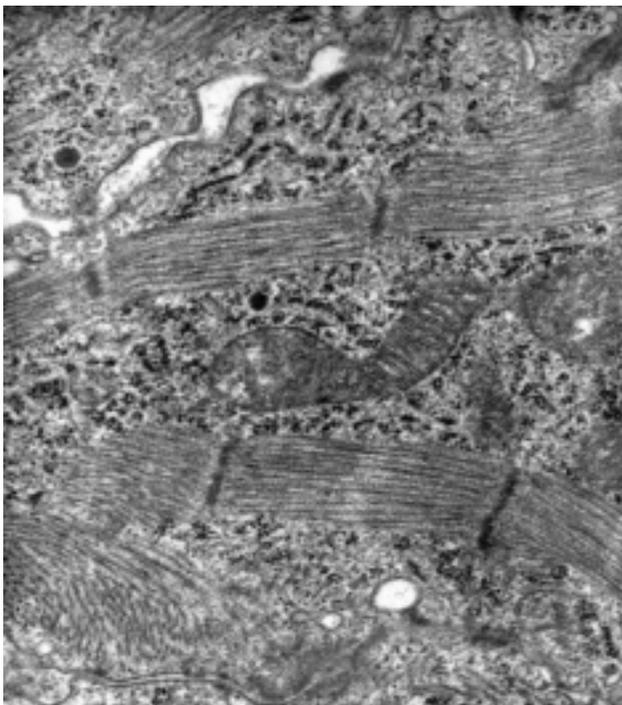


Fig. 9. Sarcómeras, retículo endoplásmico, mitocondrias y polirribosomas de aspecto normal. Miocito atrial de un feto de ratón de 18 días, del grupo C. Aumento original 25.000X.

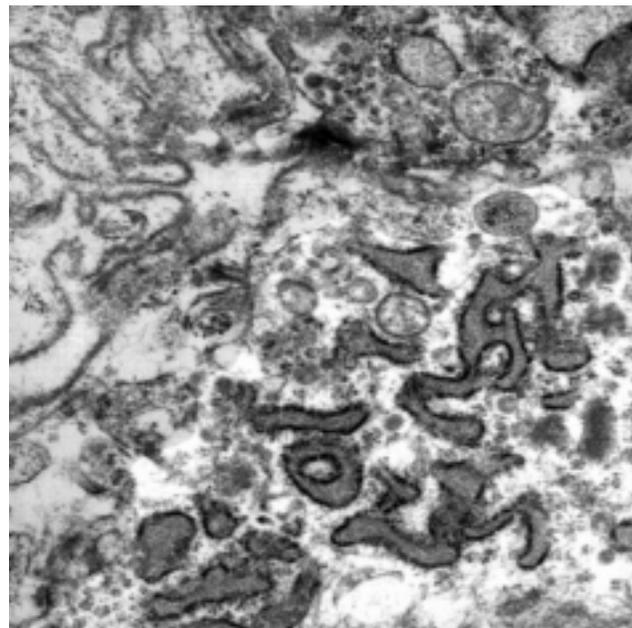


Fig. 10. Retículo sarcoplásmico con cisternas distendidas y fragmentadas, en contacto con mitocondrias alteradas y polirribosomas. Miocito atrial de un feto de ratón de 18 días, del grupo DZ. Aumento original 25.000X.

DISCUSIÓN

Las alteraciones ultraestructurales del miocardio del atrio de los fetos del grupo DZ, pueden ser causadas por el efecto que tiene el DZ sobre los organelos citoplásmicos, como fue observado en el hígado fetal de ratones expuestos *in utero* a DZ, en los que existían cisternas distendidas del RER, semejantes a las encontradas en el retículo sarcoplásmico, lo mismo que las mitocondrias alteradas, el aumento de cúmulos de polirribosomas (Márquez-Orozco *et al.*, 2015).

En la retina se encontraron alteraciones de los organelos semejantes a las descritas (Márquez-Orozco *et al.*, 1992). En fibroblastos humanos cultivados con DZ se describió que el fármaco que inducía distensión del RER, la presencia de elementos membranosos, gránulos electrodensos, incremento de cisternas del complejo de Golgi, retraso en el crecimiento de los cultivos y disminución de la síntesis de proteínas en particular de colágeno (Breen & Stenchever, 1970). Por otra parte, las alteraciones ultraestructurales podrían asociarse a que el DZ produce rupturas cromosómicas, lo que se comprobó en leucocitos de pacientes que fueron tratados por un periodo máximo de 35 meses con DZ y en cultivos de fibroblastos de pacientes y de fetos humanos a los que se agregó el fármaco (Stenchevert *et al.*, 1970; Stenchevert *et al.*, 1969).

La apariencia atípica de la heterocromatina de los núcleos de los miocitos pudiera relacionarse con rupturas cromosómicas y la formación de aductos estables del DZ en el DNA. Las rupturas además pueden interferir con la separación de los centriolos, lo que se observó en cultivo de tejidos de células JOK-1 (Andersson *et al.*, 1981). Una evidencia más de la toxicidad del DZ, puede ser la inhibición que produce en la segunda división meiótica de ovocitos y la degeneración de las células reproductoras que pudiera relacionarse con la desorganización de los organelos citoplásmicos y de la síntesis de proteínas.

En mioblastos de embriones de pollo se comprobó la inhibición de cadenas de miosina pesada causada por DZ (Bandman *et al.*, 1978,

Renehan & Kulikowski, 1981). Este tipo de inhibición podría ocurrir en los miocitos fetales de ratón y asociarse con la desorganización y acortamiento de las sarcómeras. En el tejido cardiaco existen receptores benzodiazepínicos periféricos localizados en la membrana externa de las mitocondrias asociados a canales de calcio dependientes de voltaje (Anholt *et al.*, 1985; Calvo *et al.*, 1990; Verma & Snyder, 1989), y por lo tanto la alteración del metabolismo del calcio sería un factor adicional en la producción de alteraciones del miocardio. En mujeres que recibieron DZ durante el trabajo de parto sus hijos presentaron una disminución significativa de la fluctuación de la frecuencia cardiaca (Scher *et al.*, 1973; Burn, 1978), que sería desencadenada por la acción directa del DZ sobre el SNC.

Las alteraciones de la ultraestructura del miocardio del atrio de los fetos expuestos *in utero* a DZ probablemente tengan repercusiones fisiológicas posnatales del ritmo cardiaco.

MÁRQUEZ-OROZCO, A.; DE LA FUENTE-JUÁREZ, G. & MÁRQUEZ-OROZCO, M. C. Diazepam alters the ultrastructure fetal atrium in rat. *Int. J. Med. Surg. Sci.*, 3(4):991-996, 2016.

SUMMARY: Diazepam (DZ) is a synthetic minor tranquilizer, used in patients with psychological and psychiatric disorders. It is a relaxing sedative, anticonvulsant and antipsychotic. DZ crosses the human placental barrier in mouse. Young women who are addicted to the drug, if they become pregnant and continue to use it, particularly during the first trimester, expose their children to psychomotor disorders. The purpose of this study was to investigate whether DZ administered during pregnancy induces ultrastructural alterations of fetal mouse myocardium. The group (DZ) of pregnant female mice of the CD-1 strain was treated with a single daily dose of 1.0 mg / kg / pc / sc of day 6 to 17 and a group (C) that received saline solution. On day 18 females of both groups were anesthetized, the fetuses were perfused by intracardiac route with 1 % paraformaldehyde and 2.5 % glutaraldehyde, the heart was removed, the atrium was dissected, fixed in 1 % OsO₄, it was immersed in epoxy resin. The fine sections were contrasted with uranyl acetate and lead citrate and observed in a transmission electron microscope. In the myocytes of the fetuses of the DZ group, the sarcomers of the compact myocardium were shorter than those of the C group. Areas with disorganized myofibrils were observed. The sarcoplasmic reticulum of some myocytes had distended and fragmented

cisterns, altered mitochondria, and abundant polyribosomes were observed. The changes may be due to the effect of DZ on the synthesis of actin and heavy myosin and on cytoplasmic organelles mediated by peripheral benzodiazepine receptors present on the outer membrane of the mitochondria and associated with voltage-dependent calcium channels. Ultrastructural alterations of the atrial myocardium of fetuses of mice exposed to DZ in utero may have postnatal effects.

KEY WORDS: Diazepam; Benzodiazepines; Fetal heart; Mouse; Ultrastructure.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Andersson, L. C.; Letho, V. P.; Steinman, S.; Bradley, R. A. & Virtanen, L. Diazepam induces mitotic arrest at prometaphase by inhibiting centriolar separation. *Nature*, 21:291(5812):247-8, 1981.
- Anholt, R. R. H.; De Souza, E. B.; Kuhar, M. J. & Snyder, S. H. Depletion of peripheral-type benzodiazepine receptors after hypophysectomy in the rat adrenal gland and testis. *Eur. J. Pharmacol.*, 110:41-46, 1985.
- Bandman, E.; Walker, C. R. & Strohman, R. C. Diazepam inhibits myoblast fusion and expression of muscle specific protein synthesis. *Science*.,200(4341):559-61, 1978.
- Breen, P. C. & Stenchever, M. A. Some effects of diazepam on the fine structure of human fibroblasts in tissue culture. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 108(4):520-7, 1970.
- Burn, J. M. Effect of maternal diazepam on the newborn. *Br. Med. J.*, 1(6121):1216-7, 1978.
- Calvo, D. J.; Ritta, M. N.; Calandra, R. S. & Medina, J. H. Peripheral-type benzodiazepine receptors are highly concentrated in mitochondrial membranes of rat testicular interstitial cells. *Neuroendocrinology*, 52:350-3, 1990.
- Cole, J. O. & Chiarello, R. The benzodiazepines as drugs of abuse. *J. Psychiatr. Res.*, 24(2):135-44, 1990.
- Feldman, R. S.; Mayers, J. S. & Quenzer, L. F. *Sedative-hypnotic and anxiolytic drugs*. Principles of Neuropsychopharmacology. 1st ed. Sunderland Sinauer, 1997, pp. 686-729.
- Idänpään-Heikkilä, J. E.; Jouppila, P. I.; Poulakka, J. O. & Vorne, M. S. Placental transfer and fetal metabolism of diazepam in early human pregnancy. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 109:1011-6, 1971a.
- Idänpään-Heikkilä, J.E.; Taska, R.J.; Allen, H.A. & Schoolar, J.C. Placental transfer of diazepam 14C in mice, hamster and monkeys. *J. Pharmacol. Exp. Therap.*, 176(3):752-7, 1971b.
- Mandelli, M.; Morselli, P. L.; Nordio, S.; Pardi, G.; Principi, N.; Sereni, F. & Tognoni, G. Placental transfer of diazepam and its disposition in the newborn. *Clin. Pharmacol. Ther.*, 17(5):564-72, 1975.
- Márquez-Orozco, M. C.; Márquez-Orozco, A. & Gazca-Ramírez, M. V. Ultrastructural changes in photoreceptors and retinal layers of the mouse exposed to diazepam. *Proc. West. Pharmacol. Soc.*, 35:43-47, 1992.
- Márquez-Orozco, M. C.; Gazca-Ramírez, M. V.; De la Fuente-Juárez, G. & Márquez-Orozco, A. Morphological alterations in mouse placenta induced by diazepam. *Int. J. Morphol.*, 32(2):426-31, 2014.
- Márquez-Orozco, M. C.; De la Fuente-Juárez, G. & Márquez-Orozco, A. Ultrastructure of fetal mice hepatocytes exposed in utero to diazepam. *Int. J. Morphol.*, 33(4):1436-40, 2015.
- Renehan, W. E. & Kulikowski, L. R. R. Abnormal heart development in valium-treated embryo. *Biophys. J.*, 33:244a, 1981.
- Scher, J.; Hailey, D. M. & Bread, R. W. The effects of diazepam on the fetus. *J. Obstet. Brit. Comm.*, 82:349-52, 1973.
- Stenbach, L. H.; Koechlin, B. A. & Reeder, E. Quinazolines and 1,4 benzodiazepines (VIII). The photoisomerization of 7-chloro-2-metilamine-5phenyl-3H-1,4 benzodiazepine 4-oxide. *J. Org. Chem.*,27:4671-2, 1962.
- Stenchevert, M. A.; Frankelt, R. B.; Jarvis, J. A. & Veress, K. Some effects of diazepam in human cells in vitro. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 103:836-42, 1969.
- Stenchevert, M. A.; Frankelt, R. B. & Jarvis, J. A. Effects of diazepam on chromosomes of human leukocytes *in vivo*. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 17:456-60, 1970.
- Verma, A. & Snyder, S. H. Peripheral type benzodiazepine receptor. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 23:307-22, 1989.

Correspondencia para:
María Cristina Márquez Orozco
Departamento de Embriología
Facultad de Medicina
Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM)
MÉXICO

Email: cmarquezor@gmail.com

Recibido : 10-11-2016
Aceptado: 09-12-2016