

29 178

Tesis que presenta: Mariana Ramos Avila, para optar
por el Título en la Licenciatura de Biología.

PREVENCION PASIVA OBSERVADA EN CRIAS DE RATONES
DE MACHOS TRATADOS CON DIAZEPAM (VALIUM).

Bajo la dirección de :

M. en C., Ma. Cristina Márquez-Orozco

FACULTAD DE CIENCIAS 1989 MEXICO D.F.
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FALLA DE ORIGEN



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

I N D I C E

Pag.	
2)	Resumen.
	Introducción.
3)	a. Antecedentes sobre benzodiazepinas.
21)	b. Aspectos esenciales en prevención pasiva.
27)	Objetivo.
27)	Hipótesis.
28)	Metodología.
32)	Resultados.
35)	Discusión.
40)	Conclusiones.
42)	Bibliografía.

R E S U M E N

Se estudiaron los efectos de la escopolamina (ESC), en los procesos de consolidación de la memoria de largo plazo, en las crías de ratones macho de la cepa CD - 1, tratados con diazepam (DZP), con dosis de 2.7 mg / kg aplicadas diariamente durante 6 semanas. 9 semanas después del término del tratamiento fueron apareados con hembras de la misma cepa.

Dos meses después del nacimiento, las crías (grupo DZP), fueron entrenadas a evitar un choque eléctrico nociceptivo que recibieron en una cámara de prevención pasiva. La retención (memoria), de la tarea se midió 5 y 8 días después. También se estudió un grupo de crías de padres que no recibió tratamiento alguno (grupo control).

Cada uno de estos dos grupo se distribuyó en 4 subgrupos: machos tratados con escopolamina (ESC), hembras tratadas con ESC, machos tratados con solución salina isotónica (SAL), y hembras tratadas con SAL. Las inyecciones intraperitoneales de ESC y de SAL se aplicaron inmediatamente después del entrenamiento.

Se encontraron diferencias significativas entre los grupos solamente durante la segunda sesión de retención : los grupos DZP, a los que recibieron ESC, mostraron una retención menor que los de los grupos tratados con SAL.

A su vez, las hembras de los grupos inyectados con DZP-ECS tuvieron una ejecución menor que la de los tratados con SAL. Estos resultados sugieren que la ESC interactúa con los efectos del DZP para producir deficiencias en la memoria de largo plazo.

ANTECEDENTES SOBRE BENZODIAZEPINAS

Las benzodiazepinas son sustancias, relacionadas estructuralmente entre sí, tienen aplicación terapéutica como ansiolítica. Las más utilizadas son : el diazepam (valium), el clordiazepóxido (librium), el nitrazepam (pacidrim), el oxazepam (bonare), el lorazepam (ativán), el modazepam (emopan), y flunitrazepam (rohypnol). (51)

En general son sustancias incoloras y cristalinas, el clordiazepóxido es fotosensible e inestable, con excepción de éste y del diazepam, son solubles en agua. El último es liposoluble y soluble en un disolvente especial elaborado por los laboratorios Roche. (51)

Sternbach y Reeder, en 1961 publicaron un artículo en el que comunicaron que habían sintetizado una benzodiazepina denominada diazepam, cuya fórmula química es 7-cloro-1, metil-5-fenil-2H-1,4 benzodiazepina-2-ona, con peso molecular de 284.74 g . Posteriormente en 1963, los laboratorios Hoffman La Roche, lo comercializaron con el nombre de Valium y desde ese entonces esta benzodiazepina se emplea en diversos trastornos emocionales, enfermedades neurológicas y mentales, en casos de ansiedad, de aprehensión, insomnio, temblores, histeria, problemas de personalidad y en víctimas de accidentes, siendo muy útiles porque disminuyen la angustia, aumentan la tolerancia a la agresión psíquica, logrando una mejoría en la confianza del

paciente, así, Ramírez reporta un efecto de bienestar y de mayor cordialidad en los pacientes tratados. (51, 53)

Su principal acción la ejerce sobre el sistema nervioso central al inducir efectos tranquilizante, ansiolítico, anticonvulsionante, sedante e hipnótico. No tiene propiedades antidepressivas, estimulantes o antipsicóticas y facilita la transmisión gabaérgica en el sistema nervioso central. (18,51,61)

Las benzodiazepinas y en particular el diazepam deprimen el sistema límbico, que es el sustrato principal de la emoción y de la conducta, lo cual explica su efecto hipogénico, al inducir una relajación de la angustia, la tensión y la excitación. Entre sus efectos colaterales se pueden mencionar la depresión del sistema nervioso central, la sedación, la somnolencia, la confusión, la apatía, la relajación, la debilidad muscular, la incoordinación motriz, la disartria, la visión borrosa, la diplopia, el vértigo y la ataxia. Estas manifestaciones pueden ser más graves si las personas durante el tratamiento toman alcohol y otros depresivos centrales. (51, 60)

Otras de sus acciones es la de producir una profunda relajación en el músculo estriado, al inhibir los reflejos post-sinápticos, a consecuencia de ejercer su acción a nivel central y medular sobre las sinápsis de la médula espinal y en el sistema reticular ascendente, también actúa sobre el miometrio, por lo cual disminuye la duración del trabajo de parto al acelerar y facilitar la relajación del mismo y de los músculos pélvicos, acciones importantes en la regulación de las contracciones. Aunado a estos efectos se encuentran el de

inducir a la parturienta a una relajación mental y una disminución de la tensión emocional, que benefician tanto a ésta como al producto. (61)

Durante el embarazo se prescribe cuando se presentan: amenaza de aborto, placenta previa, eclampsia, pre-eclampsia, actividad prematura del útero, en casos de existir durante la gestación trastornos emocionales, psicológicos, neurodermatitis, asma, epilepsia, e incluso traumatismos. (60)

La vía habitual de administración es la oral, sin embargo, durante el trabajo de parto, en la eclampsia y en la pre-eclampsia es administrado por vía parenteral e incluso endovenosa. (25)

El diazepam y sus metabolitos, desde el primer trimestre del embarazo pasan a través de la barrera placentaria. debido a su bajo peso molecular y a su liposolubilidad y lo hace a mayor velocidad a partir del cuarto mes del embarazo, cuando al iniciarse la desaparición del citotrofoblasto se adelgaza paulatinamente la barrera placentaria (25).

Por estudios realizados en mujeres embarazadas, a las que se les aplicó por vía endovenosa, una inyección de diazepam de 10 mg antes del parto, se logró determinar que el fármaco ya estaba presente en la sangre del cordón umbilical a los 30 segundos de la aplicación. En situación similar, Mandelli reportó que a los 12 minutos, en el cordón umbilical alcanzó concentraciones sanguíneas equivalentes a las encontradas en la sangre materna. Cuando se hizo la aplicación por vía endovenosa, las concentraciones de diazepam, de las muestras de sangre obtenidas

de la vena del cordón umbilical, eran mayores que las cuantificadas en las arterias, con lo que se demostró la existencia de un retraso en la eliminación fetal del fármaco, que muy probablemente se debe a que éste sea retenido en sus tejidos. Prueba de ello puede ser que, se ha detectado en concentraciones elevadas en el corazón de recién nacidos, de madres tratadas durante la gestación, en estos niños se encontraron modificaciones de la actividad eléctrica del corazón, consistentes en una disminución del ritmo cardiaco, que pudiera relacionarse con un bloqueo de la actividad del sistema nervioso autónomo, regulador de la función cardiaca. Otros signos que revelan la actividad del fármaco en el recién nacido son : el descenso de 3 a 5 del Apgar, hiperbilirrubinemia, dificultad en su alimentación, depresión respiratoria y depresión neurológica que llegan a ser muy severas, hipotonía e hipotermia. (23,25,42)

La hipotermia podría deberse a la acción directa del diazepam sobre los centros de regulación de la temperatura, o bien, a que éste efecto fuera mediado por una depresión de la actividad muscular, presente en ellos. (42)

Cuando la exposición prenatal al fármaco ha sido prolongada, su acumulación en el cerebro, el riñón, el estómago, el intestino, el pulmón, el corazón y prácticamente en todos los tejidos del recién nacido, llega a provocar un cuadro similar al síndrome de abstinencia, cuya severidad y duración, dependen fundamentalmente de la dosis materna, su absorción fetal, su unión de éste a los tejidos del recién nacido, a la velocidad individual de la eliminación fetal, a su vida media.

plasmática y a la de sus metabolitos. En recién nacidos, de madres tratadas con el diazepam durante el embarazo, se han encontrado niveles de hasta el doble que los maternos, y pueden permanecer altos dos o tres semanas después del nacimiento, debido a que la demetilación e hidroxilación hepática del diazepam son muy bajas durante este periodo. (49, 11)

Por estudios in vitro, se determinó que el metabolismo del diazepam es similar en el hombre, la rata y el ratón y se efectúa principalmente en el hígado, en el cual se encuentran altas concentraciones de sus metabolitos y experimenta una N-demetilación y una hidroxilación del carbón 3, para formar fundamentalmente el oxazepam, el oxidiazepam y el N-demetildiazepam, todos los productos hidroxilados se conjugan con el ácido glucurónico, formando glucuronatos, que son eliminados en la orina. Los metabolitos excretados conservan su acción anticonvulsivante y son menos tóxicos que el diazepam. (16,17,57)

Su absorción es muy rápida como ha sido comprobada en hembras de ratón gestantes, en las cuales 15 segundos después de haberlas inyectado por vía endovenosa 15 mg de diazepam tritiado, éste se detectó en los grandes vasos y en los músculos del corazón. La radioactividad persistió aún 6 horas después. (61)

Al minuto de la administración del fármaco, de los mismos animales, la mucosa del estómago presentaba radioactividad, que indica una abundante excreción hacia el lumen. Aunque las mucosas de las partes proximal y distal del intestino, el ciego, el colón y el recto presentaban mayor radioactividad que la serosa, no se pudo probar su paso a la cavidad intestinal, sin

embargo, a los 30 minutos se observó que la luz del intestino mostraba radioactividad, pudiendo derivar de las secreciones del estómago y de la bilis. Cuando se administró por vía oral, se comprobó que sólo se puede absorber a través de la mucosa intestinal, posiblemente esto también ocurra en el hombre y en el perro. (61)

Las características poco basófilas y lipofílicas del clordiazepóxido y del diazepam, pueden explicar la abundante excreción de las drogas hacia la luz del estómago. En los fetos de las hembras tratadas durante la preñez, también existe la circulación entérica de estas drogas, y son excretadas por vía nasal, estomacal, en las sales biliares y por las glándulas intestinales lo que permite una rápida absorción hacia el tracto gastrointestinal. La gran capacidad de unión de este compuesto a las proteínas y a macromoléculas de las mucosas gástrica e intestinal del feto, es confirmada por la radioactividad presente en estas, 30 minutos después de la administración del diazepam tritiado. Se sabe que de un 96 a 98% se une a las proteínas plasmáticas, ya que compite por los sitios de unión de la globulina y preálbmina que se enlazan a la tiroxina. (12, 61)

Estudios en ratas preñadas a las que se les inyectaron 2.5 mg de diazepam del día 13 al 20 de la gestación, revelaron que, en las hembras, el 52% del total inyectado se eliminó el día 21 de la gestación, 10% en la orina y 42% en las heces. (25)

Dosis de diazepam de 120 a 980 mg / kg, aplicadas por vía intraperitoneal, a hembras de ratón en el 8 día de la gestación, provocaron una disminución dosis-dependiente del número de crías

por camada y un aumento en la incidencia de muerte fetal. El clordiazepóxido, aplicado de la misma manera, a dosis de 280 a 3100 mg / kg, también disminuyó el número de crias por camada y provocó un incremento en la incidencia de reabsorciones embrionarias. Las dos benzodiazepinas produjeron malformaciones como la craneosquisis y la exencefalia, hipodesarrollo fetal, que en ocasiones llega a ser muy severo. (59)

La administración de diazepam a dosis de 0.04, 0.17, 0.44, 1.3 y 2.7 mg / kg de peso corporal / día, provocaron alteraciones histológicas en fetos de ratón, de madres tratadas intraperitonealmente del 6 al 17 día de la gestación, entre los principales cambios observados están los de la retina, en la cual se encontraron alteraciones del espesor de las capas neuroblásticas y de la ganglionar, que puedan deberse a un retardo del crecimiento y de la diferenciación del bulbo ocular, relacionados probablemente con una disminución de la actividad mitótica y de modificaciones de la membrana celular que impiden su migración normal. Al microscopio electrónico se observó un aumento del número de mitocondrias y polirribosomas de los fotorreceptores en desarrollo, el retículo endoplásmico rugoso estaba desorganizado al igual que sus microvellosidades. La cromatina de los núcleos tenía una distribución atípica. (6, 37)

En los fetos tratados con dosis de diazepam de 2.7 mg / kg de peso corporal / día, se encontró que en el corazón se incrementó el espesor de las paredes ventriculares, las trabéculas carnosas se veían pequeñas y ausentes en algunas zonas. Los mioblastos tenían miofibrillas desorganizadas, que al

microscopio electrónico se vieron acortadas y con las bandas Z mal desarrolladas, en el citoplasma el retículo endoplásmico rugoso tenían cisternas dilatadas y existían vacuolas gigantes, rodeadas por acúmulos inespecíficos de glucógeno. (9, 31)

La osteogénesis de la tibia fetal fué atípica, las células estaban hipertrofiadas, tanto las del cartilago como las osteogénicas, había mayor cantidad de calcio que en los testigos y la arquitectura de las trabéculas era anormal. (27)

En el hígado fetal se observó una hipertrofia de los hepatocitos que tenían núcleos muy voluminosos, con cromatina formada por grumos muy gruesos, hubo un aumento del número de megacariocitos. Al microscopio electrónico se observaron vacuolas muy grandes, rodeadas de abundantes gránulos de glucógeno, cuerpos electrodensos, retículo endoplásmico rugoso distendido, polirribosomas muy abundantes, al igual que el complejo de Golgi. En el hígado de animales jóvenes, del mismo tratamiento hubo la persistencia del aumento del tamaño de los hepatocitos, que son menos numerosos por campo, en cambio se observó un incremento de los hepatocitos binucleados y de macrófagos (30).

En el riñón fetal disminuyó el número de nefronas en diferenciación y diferenciadas, tenían células de talla mayor, lo que sucedió también en los túbulos contorneados, las asas de Henle y los conductos colectores, la luz de estos era más pequeña y las células más altas. (38)

El espesor de la barrera placentaria estaba muy reducida, los espacios intervellosos eran más amplios al igual que lo son

los vasos coriales, sus células gigantes son más grandes. Al microscopio electrónico se observó que la barrera placentaria tenían un aumento de las microvellosidades presentes entre las capas 1 y 2, habiendo un depósito inespecífico de glucógeno y aumentó del número de lisosomas. (28, 2)

En el intestino delgado la talla celular fué mayor, los núcleos de las células eran más voluminosos y existía una hipertrofia de los tejidos de la submucosa, las capas musculares y la serosa. (39)

En el páncreas fetal las células de los acinos y las de los islotes pancreáticos eran más grandes que las de los testigos, en las acinares se observaron gránulos de zimógeno almacenados y los núcleos eran enormes. La cantidad de células de los islotes pancreáticos, por campo, disminuyó. En el páncreas de ratones de 21 días, persistieron las alteraciones descritas en el páncreas fetal. (35)

En el pulmón fetal el epitelio del árbol bronquial se observó aumentado en su espesor, los alveolos no distendidos normalmente y con menor secreción. Los cambios observados en el pulmón fetal, persistieron en el pulmón adulto, en el cual también aumentó la cantidad de fibras colágenas. (32, 33, 26)

En el ovario fetal, todos los tejidos estaban hipertrofiados y en los animales en crecimiento y adultos aumentó la atresia folicular y la arquitectura de los cuerpos lúteos estaba alterada (36).

Además de las alteraciones histológicas descritas probablemente por el depósito del diazepam en estos órganos;

debido a sus características es captado con rapidez, por el tejido graso y penetra fácilmente en la sustancia blanca del sistema nervioso del mono, en donde es retenido por periodos prolongados; por las similitudes filogenéticas es probable que también se acumule en los tejidos nervioso y graso humanos. (61)

Después de una aplicación endovenosa de 10 mg de diazepam en ratones adultos, se observó que era captado por la materia gris de la corteza cerebral y cerebelosa, de los colículos, el tálamo y la médula espinal, alcanzando su máxima concentración un minuto después de la inyección endovenosa y cinco minutos después de la administración oral. (61)

En ambos casos la radioactividad se detectó en la materia blanca, especialmente en el cuerpo calloso, el cerebro medio, el cerebelo, y el sistema nervioso periférico y en pares craneales como el trigémino, el óptico entre los 15 y 30 minutos posteriores al tratamiento y persistió en los animales sacrificados a las 24 horas. (61)

Frieder et al, observaron en los cerebros de rata expuestos prenatalmente durante 16 días, a dosis únicas diarias de diazepam, de 10 mg / kg de peso corporal, o en el primer tercio de la gestación, la presencia de gliosis extensa que pudiera deberse a que durante la digestión y remoción de los restos de las células destruidas por cambios degenerativos provocados por el diazepam, produzcan reacciones nocivas. Otra posible explicación es que la exposición intrauterina al diazepam altere la maduración del sistema inmunológico de las ratas, propiciándoles una respuesta autoinmune. También podría

explicarse porque el fármaco produzca cambios en las membranas celulares que repercutan sobre el aumento de la permeabilidad de la barrera hematoencefálica, facilitando el paso de los agentes inflamatorios. Finalmente, la presencia de acúmulos perivasculares podría estar relacionada con infecciones virales, bacterianas o de otra naturaleza, favorecidas por la falta de anticuerpos maternos, ya que también el diazepam deprime el sistema inmunológico materno y por lo tanto al carecer las crías de inmunidad pasiva al nacimiento, puedan infectarse con facilidad. (13)

En las ratas expuestas prenatalmente a dosis de diazepam de 2.5 mg / kg de peso corporal, del día 13 al 20 de la gestación, se detectó radioactividad en el cerebro de la cría, de 10 días de vida post-natal: las concentraciones de oxazepam, metildiazepam eran mayores que las maternas, sin embargo, las de diazepam eran similares en el cerebro de la madre y de las crías de 0 y 10 días, y éste y sus metabolitos persisten en niveles altos en el cerebro de las crías de 10 días, lo que significa que éstos pueden ser los responsables de las alteraciones cerebrales y de la conducta, que se evidencian en las ratas, entre la segunda y cuarta semana de vida post-natal. (19, 20)

Por experimentos similares en el que se aplicaron dosis de diazepam de 1.0, 2.5 y 10 mg / kg de peso corporal, del día 13 al 20 de la gestación, se vió que las crías de rata presentaban alteraciones en el desarrollo fisiológico de las neuronas norepinefrínicas del hipotálamo, mediado por modificaciones de los receptores benzodiazepínicos, causantes de un retraso en el

crecimiento de las terminaciones nerviosas. En las crías adultas expuestas al fármaco, durante el periodo prenatal, al ser sometidas a tensión emocional por inmovilización, se encontró que no hubo cambios en la secreción y liberación de la norepinefrina en las neuronas hipotalámicas y se atenuaron los cambios de los niveles plasmáticos de la corticosterona y de la prolactina, lo que indica que la activación temprana de los sitios neurales específicos de unión a benzodiazepinas, pueden inducir alteraciones neurales que persisten en los animales adultos, que provoquen cambios fisiológicos que pueden involucrar a todo el organismo. (55, 56, 57)

Estudios histológicos del mesencéfalo fetal de la corteza cerebral, cerebelosa y el cuerpo estriado de ratón de crías de 30 días de edad, expuestos al diazepam en dosis diarias únicas de 2.7 mg / kg de peso corporal, del día 6 al 17 de la gestación, demostraron un retraso evidente en la diferenciación neuroblástica. (29)

En el mesencéfalo de los fetos de ratón se observó que las paredes eran más delgadas, de menor densidad celular y cavidad más amplia. La cantidad de sus núcleos era menor, aún cuando éstos eran más voluminosos y tenían la cromatina constituida por granulaciones gruesas, las células tenían menor cantidad de citoplasma y había menos fibras. En la corteza cerebral y en el cuerpo estriado se observó el retardo de la diferenciación neuronal, un enpaquetamiento de las neuronas que también tenían un núcleo voluminoso y la cromatina distribuida atípicamente, mayor afinidad tintórea y poco desarrollo del

neurópilo. En la corteza cerebelosa las alteraciones fueron similares, siendo muy notable el retardo de la migración de los granos. Estas alteraciones persisten en animales adultos, en los cuales también se detectaron trastornos del aprendizaje, de la actividad locomotora y de la conducta de natación. (29)

Podría ser que el retardo de la diferenciación neuronal se deba a un efecto tóxico, producido por la acción del diazepam sobre los organelos citoplasmáticos de los neuroblastos, que impliquen los cambios en la diferenciación morfológica y fisiológica, incluyendo la maduración de los receptores benzodiazepínicos, lo que se traducen en modificaciones conductuales que requieran de una integridad armónica del organismo. (29, 19, 20, 55, 56)

Se observó que en los ratones expuestos intrauterinamente, presentaron al nacimiento hipotermia, hipotonía, depresión neurológica y respiratoria. A los 5 días de nacidos su conducta de natación era incoordinada, en un principio no podían mantenerse en la superficie del agua y conservaban por un mayor tiempo el patrón de nado en círculos. Del 6 al 12 día persistió la incoordinación, la hipotonía, se les separaban anormalmente los miembros pélvicos, sólo erguían la cabeza por lapsos muy breves, de modo que al salir estaban cansados, mostraban flacidez corporal, había signos de cianosis, la respiración era superficial y presentaban salvas apnéicas y tiros intercostales bajos (40).

Experimento similar en ratas, administrando oralmente 10 mg / kg / día, mostraron que en las crías aumentó la actividad

locomotora espontánea y la actividad locomotora en campo abierto, debido a que el fármaco actúa directamente sobre el sistema nervioso central. (22)

Las evidencias experimentales sobre la acción teratogénica de fármacos por vía paterna, la proporcionaron los estudios por Cecilia Lutwak-Mann, en conejos machos tratados con talidomina antes del apareamiento, la cual provocaba un aumento significativo de la mortandad de sus crías pre o neonatalmente, debidos a defectos congénitos fetales. Después de este estudio se identificaron fármacos y tóxicos como el plomo, la cafeína, el alcohol y algunos narcóticos, que administrados exclusivamente a las ratas machos, antes del apareamiento eran teratogénos. G. Kolata et al, menciona que Justin Joffe y Lester Soyka determinaron que en las crías de ratas macho tratadas con metadona se presentan efectos adversos tales como la muerte antes del destete, tenían pesos menores a los de los controles, en algunas pruebas conductuales mostraban un desempeño anormal y el número de crías de las camadas era menor, de las hembras apareadas con machos del grupo experimental que el normal. (21)

Aún cuando la investigación de la acción de teratogénos por vía paterna, en el hombre es más difícil que la realizada en diversas especies animales, en 1974, se logró obtener evidencias confiables sobre la acción nociva que producen los gases anestésicos de las salas de operaciones, sobre la descendencia de los varones expuestos a la inhalación de los mismos, observándose que sus esposas tenían con mayor frecuencia abortos espontáneos y en sus hijos aumentaba el número de defectos

congénitos. (21) .

Sin embargo, no existen datos suficientes para correlacionar los defectos congénitos, con la exposición de los machos a sustancias con acción teratogénica, la cual podría deberse a :

- 1) que impiden la diferenciación normal de los espermatozoides.
- 2) que las drogas presentes en el semen pasen a través de las paredes de la vagina, circulen en la madre, en la placenta, y en el embrión, alterando el desarrollo del producto. Se ha comprobado que sustancias como la talidomina, los narcóticos y los anticonvulsivos son excretados en el semen.
- 3) que estas sustancias actúen localmente en el útero afectando al embrión. (21)

El tratamiento crónico de ratas macho, con dosis de diazepam de 50 mg / kg/ día, aplicadas por vía intraperitoneal, durante 10 días, no modificó el peso de los testículos, de la pituitaria y de la próstata, ni alteró los niveles séricos de la testosterona y de la hormona luteinizante, en cambio aumentó significativamente la cantidad de receptores benzodiazepínicos cerebrales, aún con la aplicación de una sola inyección de diazepam de 50 mg / kg de peso corporal. En los testículos mantenidos in vitro, a los que se les agregaron 2.4×10^{-4} M de diazepam, se vio que incrementó significativamente la producción de testosterona en ausencia de estimulación con la hormona luteinizante. (62)

Un estudio preliminar en ratas hembras similar al anterior, parece demostrar que los estrógenos no producen el

mismo efecto que tiene la testosterona sobre la unión del flunitrazepam tritiado, a las membranas del cerebro completo ni de las membranas hipotalámicas. (62)

Probablemente la alteración del número de receptores benzodiazepínicos centrales pudiera correlacionarse con los síntomas del síndrome de abstinencia, que experimentan los pacientes, aún cuando toman dosis moderadas de Valium o de Librium. Los efectos del síndrome de abstinencia en si podrían provocar efectos indeseables sobre el sistema cerebro-hipofisiario-gonadal. (62)

Por medio de autorradiografías de testículos de ratas, se evidenció la existencia de receptores benzodiazepínicos, que son más abundantes en el estroma, en el que se localizan las células de Leydig, están en menor proporción en las células germinales y en las de Sertoli y no están en la luz de los túbulos. (10)

Clarke investigó en cultivos de células 3T3 que cuando se incubaron en un medio con 0.5% de suero, su índice de incorporación de timidina tritiada fué bajo, pero al incubarse con 6% de suero aumentaba a 88%, reduciéndose al agregar dosis de diazepam de 64 microgramos / ml, con lo que no se dividieron e incluso murieron, sin embargo, al cambiarlas a un medio control después de 48 horas de experimentación en 3 horas se dividieron en un 99%, por lo que concluyeron que el diazepam es citostático más que citotóxico. (8)

Miernik hizo cultivos del alga verde, Dunaliella bioculata, en agua salada sintética, las cuales se sincronizaron para su división, mediante ciclos de luz-oscuridad de 12 por 12 y se les

agregaron benzodiazepinas como el diazepam, el medazepam, el flunitrazepam, el nitrazepam y el clonazepam disueltas previamente en dimetilsulfóxido, a concentraciones entre 10^{-4} y 10^{-5} M, encontrando que el flunitrazepam y el medazepam inhibieron la proliferación en concentraciones iguales o menores que las requeridas para el diazepam. Si las drogas se agregaron al inicio del ciclo nocturno, solo el diazepam y el medazepam aumentaban el volumen celular después de un tratamiento de 24 horas. (24)

Al microscopio electrónico, se observó que la mayoría de las células tratadas, tanto de origen animal como vegetal, presentaban mitosis con metafases anormales, mientras que las control ya estaban divididas. En las células tratadas se vió que sus cromosomas tenían la cromatina bien condensada, sus microtúbulos bien polimerizados, el huso era unipolar, lo cual se relaciona con la inhibición de la separación de los cuerpos basales al final de la profase, mientras que durante el desarrollo normal, ésta separación se relaciona con la formación de un huso bipolar y con su elongación en la metafase. Anderson observó en los fibroblastos humanos que el diazepam bloquea la prometáfase, sin afectar a los microtúbulos inhibiendo la separación centriolar, por el mecanismo antes propuesto. (1 y 24).

En los fibroblastos humanos cultivados con dosis de diazepam de 0.1, 1.0, 10 y 20 microgramos / ml, se observó que había un aumento de elementos membranosos que ocupaban grandes porciones del citoplasma, mayor cantidad de mitocondrias, del aparato de

Golgi, de cuerpos electrodensos también era más abundante el retículo endoplásmico liso y rugoso, éste último se encontró dilatado (53).

Los efectos de diazepam in vivo sobre los cromosomas humanos de los leucocitos de 23 pacientes, de 1 a 75 años de edad, expuestos de 0.5 a 36 semanas, consistieron en la producción de rupturas cromosómicas y estas mostraron una relación dosis-dependiente, ya que el paciente con mayor número de estas fué el que estuvo sometido a un tratamiento más prolongado del fármaco, sin embargo, al discontinuar su uso durante 6 meses las características cromosómicas retornaron a la normalidad. (52)

Estudios in vitro de los ovocitos de ratón, cultivados en medio Krebs-Ringer a concentraciones de diazepam desde 1, 10, 30, 50, 100 y 200 microgramos / ml, incubados por 17 horas, a 37 grados centígrados, en una atmósfera con 5% de bióxido de carbono, que se registró si presentaban vesículas germinales en metafase I o II, se observó que la mayoría de las células tratadas se detenían en la metafase I, también había formas anómalas, encontrándose una relación dosis-dependiente de la inhibición de la meiosis. La degeneración de los ovocitos podría deberse a un efecto tóxico producido por las altas concentraciones del fármaco. (54)

ASPECTOS ESENCIALES EN LA PREVENCIÓN PASIVA

El sistema nervioso en todos los seres vivos coordina prácticamente todas sus actividades, sin embargo, su papel más importante es el de relacionarlas con su ambiente e interactuar con él. Así podemos decir que el aprendizaje es una de sus funciones más complejas, que puede ser considerado como un proceso de adaptación que le permite a un sujeto asimilar las características de su ambiente, a partir de los conocimientos adquiridos mediante estímulos de éste y la posibilidad de regular su comportamiento al utilizar dichas experiencias.

El almacenamiento en el sistema nervioso central, de las experiencias aprendidas constituyen la memoria. En el aprendizaje y la memorización interviene como estructura esencial el cuerpo estriado constituido por el núcleo caudado y el núcleo lenticular separados por la cápsula interna. Su límite externo lo constituye la cápsula externa, hacia el interior colinda con el tálamo, su techo sobresale en el piso de los ventrículos laterales y la pared ventral está en contacto con la parte basal de la corteza piriforme, la amígdala y el hipotálamo. (5, 41)

En el hombre el núcleo caudado adopta la forma de una virgula, con su extremo mayor hacia adelante, el cual se pone en contacto con la pared dorsal del tálamo, se separa de éste para pasar debajo del núcleo lenticular y terminar en el lóbulo temporal. Su longitud aproximada es de 7 cm y se puede subdividir en tres partes:

Anterosuperior o cabeza : de forma curva que se proyecta en la mayor parte de su superficie, hacia el piso del asta frontal del ventrículo lateral.

Intermedia o cuerpo; también cilíndrica, que circunscribe la cara superior y el polo posterior del tálamo, del cual está separado por el surco optoestriado y la cápsula interna.

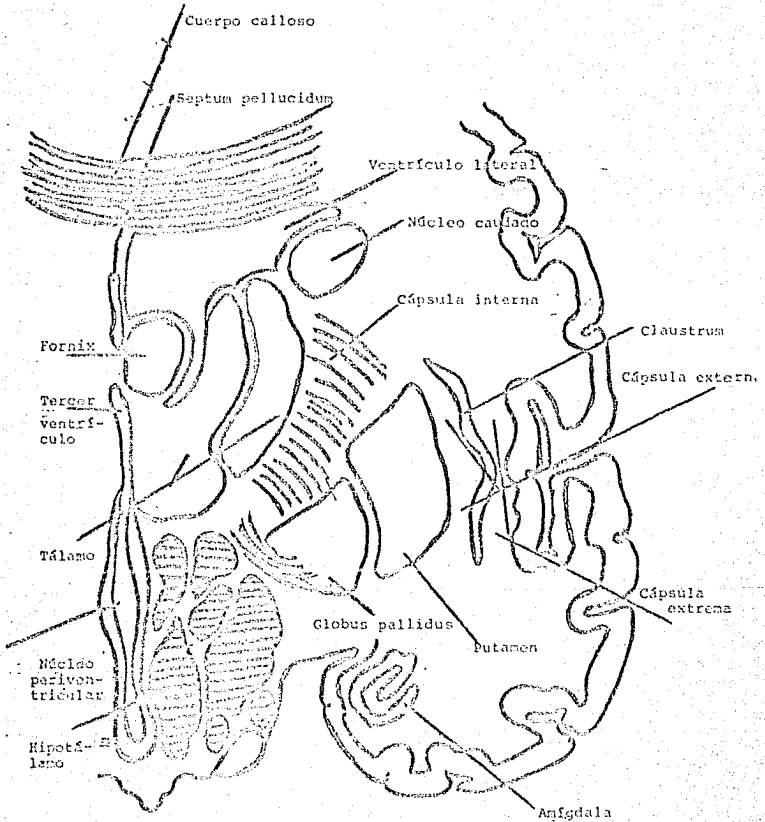
Anteroinferior; también cilíndrica, que se insinúa hacia adelante, por debajo del núcleo lenticular y de la cápsula interna, sobresaliendo en el techo del asta temporal del ventrículo lateral, su extremo caudal está en contacto con el núcleo amigdalino. (5, 41)

El núcleo lenticular está situado por fuera y ventral al núcleo caudado y separado de éste por la cápsula interna ; tiene forma de lente biconvexa y una longitud aproximada de 5 cm. El núcleo lenticular se subdivide en dos partes, una lateral llamada putamen, que al natural es de color rojizo, y una medial denominada globus pallidus, por su tonalidad clara. (5, 41)

La cápsula interna al igual que la externa está integrada por fibras córtico-tálamicas y tálamo-corticales. La cápsula externa se localiza entre la pared externa del cuerpo estriado y el claustrum. (5, 41; figura 1 y 2)

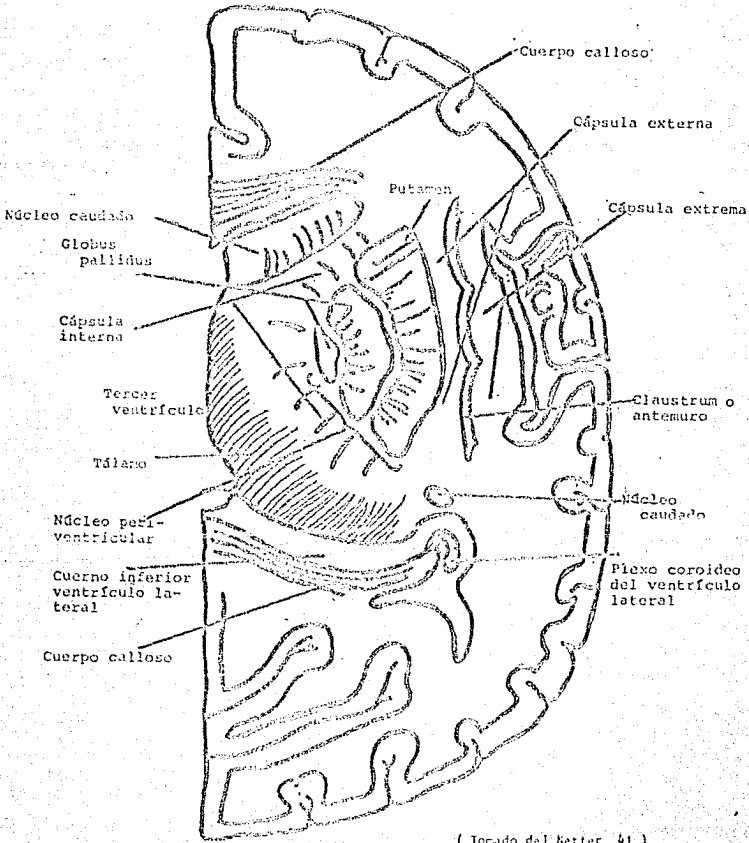
En los roedores como la rata y el ratón, el cuerpo estriado tiene una posición similar a la humana, sin embargo, su forma y estructura difieren de ésta, en que sus paredes dorsal y lateral, convexas, se ponen en contacto con el cuerpo caloso y solamente una parte de la interna se insinúa hacia el ventrículo lateral, la restante se adosa al tálamo y la ventral colinda con las áreas

FIGURA 1. CORTE FRONTAL DEL CUERPO ESTRIADO HUMANO



(Tomada del Netter , 41)

FIGURA 2. CORTE TRANSVERSAL DEL CUERPO ESTRIADO HUMANO



(Tomado del Netter, 41)

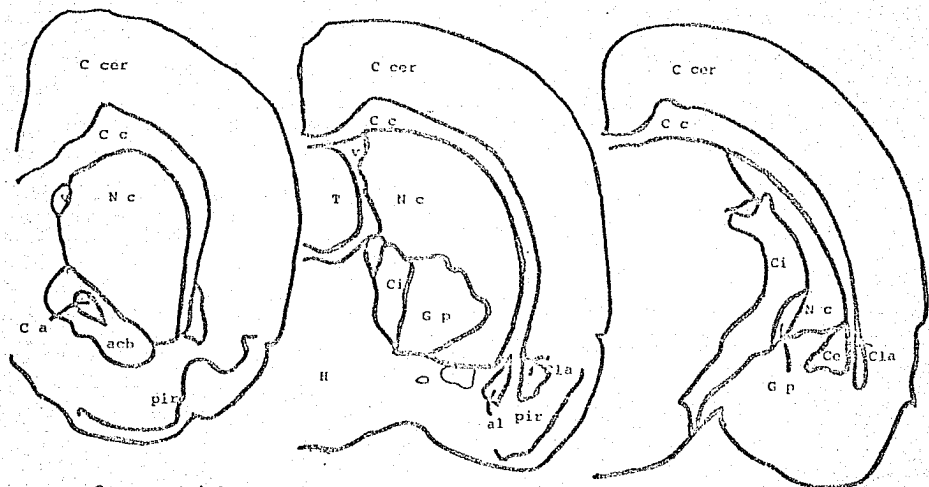
preóptica lateral, parasolfatoria lateral, el núcleo amigdalino y la corteza piriformes. El núcleo caudado y el putamen constituyen una sola estructura que en su pared interna permanece unida al globus pallidus, el cual está limitado, hacia el interior por las fibras de la cápsula interna, que en este caso separan al cuerpo estriado del tálamo. La cápsula externa se localiza en posición látero-ventral al cuerpo calloso. Al igual que en el hombre, las cápsulas interna y externa están formadas por fibras córtico-tálamicas y tálamo-corticales. (5,41,43, figura 3)

La actividad colinérgica del núcleo caudado participa de manera particular en la adquisición y en el mantenimiento de las etapas tempranas del aprendizaje instrumental. Existe una disociación funcional en el cuerpo estriado, en relación a los tipos de tareas que se deben aprender. La actividad colinérgica de la parte ántero-dorsal del cuerpo estriado, parece ser la más importante para la adquisición de la retención activa, y de la pasiva, en tanto que, las regiones anterior y posterior del núcleo caudado están involucradas en el reforzamiento positivo de la conducta operante. (45, 46, 47, 48)

Cuando existen hábitos previamente adquiridos, las neuronas colinérgicas de la parte ántero-dorsal controlan la conducta operante y la observada en un laberinto recto y las neuronas de la región póstero-dorsal controlan la prevención activa de dos vías. (44, 47, 48)

Las neuronas acetilcolinérgicas son importantes en tres sistemas: el motor, el sensorial y el límbico.

FIGURA 3. CORTES FRONTALES DEL CUERPO ESTRIADO DE RATA



Cuerpo estriado :

N c Núcleo caudado
 G p Globus pallidus
 Cla Claustrum
 Ci Cápsula interna
 Ce Cápsula externa

Otras estructuras :
 C a Comisura anterior
 C c Cuerpo calloso
 C cer Corteza cerebral
 ach Area paraolfatoria
 al Amígdala
 H Hipotálamo
 T Tálamo
 pir Área piriforme
 v Ventrículo

(Tomado del Pellegrino, '43)

El motor representado por los núcleos motores somáticos, los braquimotores, los visceromotores y las neuronas motoras somáticas de las astas ventrales de la columna y de los músculos esqueléticos periféricos, que por presentar acetilcolinesterasa se sugiere que éstas áreas pueden mediar el aumento de la actividad inducida por la escopolamina.

El sensorial constituido por las proyecciones colinérgicas de los centros motores de las áreas primarias o secundarias de cada sistema sensorial que se dirigen hacia la corteza sensorial, por las proyecciones sensoriales corticales que se dirigen hacia la corteza frontal, por la vía de la corteza parietal o por sistemas como el olfatorio que va por la vía del núcleo dorso-medial del tálamo, en los cuales probablemente module la entrada sensorial.

El límbico que incluye el hipocampo, el septum, el cuerpo estriado, el núcleo accumbens, el núcleo dorso-medial y la corteza frontal, que pueden mediar los aspectos de atención afectiva y emocional de la conducta, aunque éste circuito no sea colinérgico, las proyecciones colinérgicas del septum al hipocampo, del área preóptica a la corteza frontal y del tegmentum al núcleo dorso-medial, tal vez modulan la respuesta en cualquiera de estos contactos, por lo tanto estos tres sistemas podrían interactuar en cualquier comportamiento inducido por un bloqueo sistémico de receptores muscarínicos colinérgicos. (7)

Se ha determinado que los niveles de acetilcolina y colina en el cuerpo estriado, de ratas sometidas a una prueba de memoria de largo plazo, de un sólo ensayo, no se modifican con

respecto a los valores de control, pero si aumentó significativamente la síntesis de acetilcolina una hora después del entrenamiento (3).

En las pruebas conductuales se requiere de la producción de amnesias, empleando drogas anticolinérgicas muscarínicas, como la escopolamina y la atropina, administradas después del entrenamiento; ya que se ha demostrado que la consolidación de la memoria puede ser inhibida por estímulos ambientales producidos después del entrenamiento. (7, 14)

Cuando a ratas entrenadas para tomar agua de un tubo, se les sometió a un choque eléctrico en las patas y al terminar este entrenamiento se le inyectó escopolamina, en el complejo caudado-putamen del cuerpo estriado, un día después, habían olvidado la experiencia a las que fueron sometidas. (14, 15)

Se ha comprobado que la escopolamina administrada por vía parenteral o intraperitoneal también puede inhibir la consolidación del aprendizaje y producir amnesia, debido a su capacidad de atravesar la barrera hematoencefálica. (7, 14)

En un experimento de memoria de corto plazo, se observó cuando se inyectó colina en la parte posterior del núcleo caudado, de las ratas previamente entrenadas, hubo una mejoría en su desempeño, al facilitar los procesos de integración almacenada. Prado menciona que Neill y Grossman, demostraron que la adquisición de la retención activa no se alteró después de la aplicación de la escopolamina en la región ántero-dorsal del núcleo caudado, lo cual no sucedió cuando fué aplicada en la parte ventral, esta fué la primera evidencia de la heterogeneidad

funcional del núcleo caudado con respecto al condicionamiento y Winocur la reformó por lesiones electrolíticas (47, 63, 44)

Con estos experimentos se corroboró que la actividad de las interneuronas del núcleo caudado que contienen acetilcolina, están involucradas en el proceso de consolidación de la memoria reciente, mientras que el almacenamiento de la información de largo plazo probablemente es mediada por un sistema neuroquímico diferente, tal vez, localizado fuera del cuerpo estriado. Recientemente se ha propuesto que el núcleo caudado puede ser el primer sitio de almacenamiento de la memoria de la conducta operante, en tanto se transfiere a la corteza cerebral. (47)

Ninguno de los estudios desarrollados hasta la fecha, han demostrado inequívocamente, que una estructura o un grupo de estructuras cerebrales de los mamíferos, sea necesaria para el mantenimiento de la memoria de largo plazo, lo que refleja probablemente se parte de una apreciación teórica errónea del problema, al tratar de encontrar un sitio único para el almacenamiento de la memoria de diferentes tareas. Se ha sugerido que la búsqueda para el engrama deberá orientarse por una investigación de los sustratos neuroanatómico y neuroquímico, que puedan estar involucrados en forma secuencial en estas funciones complejas. Posiblemente se logran encontrar sistemas múltiples, de los cuales, cada uno interviene en diferentes tipos de conductas de aprendizaje, que podrían funcionar en forma secuencial, dependiendo de la edad relativa y el grado de entrenamiento de las respuestas aprendidas. (47)

O B J E T I V O

Teniendo en cuenta los antecedentes descritos, el propósito de éste trabajo, fué investigar si el diazepam altera el desarrollo de la memoria a largo plazo, de crías de ratones de padres de la cepa CD - 1, que se aparearon después de ser tratados durante 42 días y de haber tenido un periodo de reposo de 9 semanas.

H I P O T E S I S

El diazepam inyectado a los ratones macho durante un ciclo de la espermatogénesis pueda provocar daños genéticos en los espermatozoides, causando alteraciones del desarrollo del sistema nervioso central de sus crías, que pueden ser detectadas mediante pruebas conductuales, como las de prevención pasiva.

M E T O D O L O G I A

Se seleccionaron ratones machos de la cepa CD-1, de 2 meses de edad, de 30 a 32 g, de peso, los cuales se mantuvieron en un ambiente controlado a una temperatura de 18 a 22 grados centígrados, con una iluminación de 12 por 12 horas iniciando a las 7 am, se les proporcionó agua estéril y purina chow ad libitum.

Todos los animales se aparearon con hembras de la misma edad con un peso de 28 a 30 g, para comprobar que eran fértiles antes del inicio de la etapa experimental. Los machos fértiles se distribuyeron en 2 grupos, los del primer grupo fué inyectado intraperitonealmente con una dosis de 2.7 mg / kg de peso corporal, durante 42 días, para tener la certeza de que las células germinales estuvieron expuestas al diazepam durante un ciclo de la espermatogénesis y que todos los espermatozoides de los animales de experimentación provienen de espermatogonias expuestas al fármaco. Un ciclo de la espermatogénesis en el ratón, dura aproximadamente 32 días. El segundo grupo de animales no fué inyectado.

Los machos del grupo experimental se mantuvieron en reposo durante 9 semanas después del tratamiento, con el fin de dejar pasar 2 ciclos de la espermatogénesis normal para tener la seguridad de que los espermatozoides eyaculados no estuvieron expuestos al diazepam y de observarse alguna alteración en la

conducta de las crías, ésta se debería fundamentalmente a un efecto del diazepam a largo plazo.

Los machos del grupo control y los de del experimental, se aparearon durante 30 minutos, de 7 a 7:30 am, con hembras vírgenes de dos meses de edad y con un peso de 28 a 30 g, en una relación de 5 hembras por macho. Las hembras que presentaron tapón vaginal se separaron y se dejó que continuará la gestación normalmente. Entre el día 18 y 19 nacieron las crías, las camadas fueron reducidas a 8 crías por hembra después de ser sexadas y pesadas.

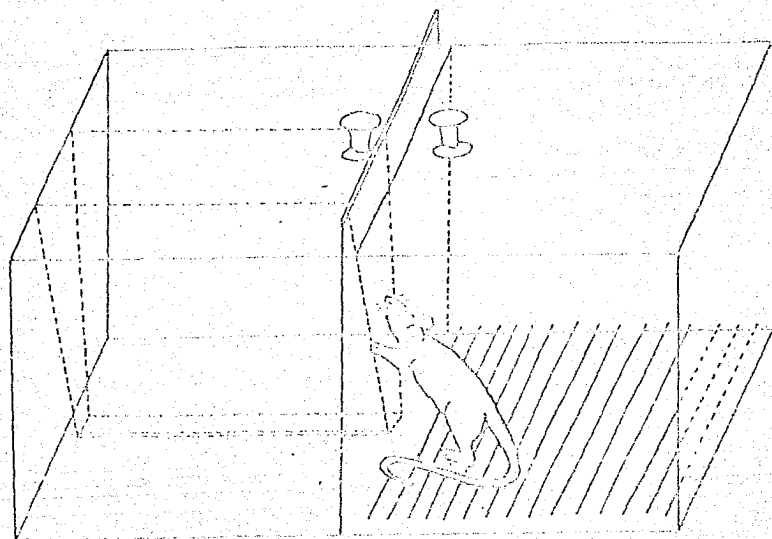
Se destetaron las crías a los 21 días y se separaron en grupos de 5 hembras o de 5 machos y permanecieron así, hasta los 60 días, en que se iniciaron las pruebas de prevención pasiva.

Para medir la prevención pasiva de los ratones se utilizó una cámara de entrenamiento como la ilustrada en la figura 4. La prueba se llevó a cabo en dos etapas, una de condicionamiento o adquisición y otra en la que se midió la memoria de largo plazo o prevención pasiva.

En la primera se hizo lo siguiente: se colocó al ratón durante 10 segundos en el compartimiento de seguridad; transcurrido este lapso se abrió la puerta que separa a los compartimientos de seguridad y de castigo, permitiendo que el ratón pasará al segundo, en esta etapa se registró el tiempo que el animal tardó en hacerlo, medido desde que se abrió la puerta. Una vez que ocurrió esto se le encerró y se le aplicó un choque eléctrico de 3 miliamperes que se mantuvo durante 5 segundos, a continuación se abrió la puerta y el animal pudo escapar hacia el

FIGURA 4.

CAMARA DE PREVENCIÓN PASIVA



Compartimento
de control

Compartimento
de seguridad

compartimiento de seguridad, en el cual, permaneció durante 30 segundos, pasado este intervalo se retiró al ratón de la cámara de condicionamiento. También en este caso se registró la latencia de escape, tomada a partir del momento en que se abrió la puerta.

Tan pronto se retiró al ratón de la cámara, se le inyectó por vía intraperitoneal, tanto si era de los grupos experimental como de los controles, con una dosis de escopolamina de 6 mg / kg, de peso corporal o con una solución salina al 0.9%. El tiempo transcurrido entre que se retiró al ratón de la cámara y que se inyectó, no fué mayor de un minuto.

Se estudiaron 8 grupos de 10 crías cada uno; 4 de hembras y 4 de machos; de los cuales, 2 grupos de hembras y 2 grupos de machos, procedieron de padres tratados con diazepam, 42 días y con 9 semanas de reposo previos al apareamiento y los otros 4 eran crías de padres control.

De los 8 grupos mencionados, uno de hembras y uno de machos experimentales y uno de hembras y uno de machos control, que se inyectaron después del entrenamiento con escopolamina y los restantes con solución salina.

La sesión para probar la memoria de largo plazo o de retención pasiva se hicieron al quinto y octavo día, posteriores a la sesión de adquisición y consistió en : colocar al ratón en el compartimiento de seguridad durante 10 segundos, al cabo de los cuales, se abrió la puerta divisoria de las cámaras, con el fin de permitir el libre acceso del animal al compartimiento de castigo; etapa en la que se esperó a que el ratón pasara a ésta

área, midiendo el tiempo que transcurrió desde que se abrió la puerta, hasta que el animal asentó las cuatro patas en el piso del compartimiento de castigo; si el ratón no pasó, la prueba se suspendió a los 300 segundos, considerándose en este caso que el animal aprendió.

En esta fase de experimentación, los ratones que olvidaron la tarea y entraron a la cámara de castigo, no recibieron una descarga eléctrica.

R E S U L T A D O S

Por medio del análisis de varianza, se comprobó que no existen diferencias estadísticamente significativas, entre la latencia de escape de machos tratados con diazepam y los de control; apareados 9 semanas después de concluido el periodo de administración del fármaco, el registro se hizo durante el entrenamiento previo a la prueba de retención.

Tampoco fueron significativas las diferencias entre la retención pasiva de las crías de todos los grupos, medida 5 días después del entrenamiento, observándose sólo que tiende a disminuir la retención pasiva de las crías de padres tratados (gráfica 1 y 3).

En la prueba de retención pasiva, realizada a los 8 días del entrenamiento, por análisis de varianza, se encontraron diferencias significativas, a un nivel menor de 0.05; entre las crías de los machos de diazepam y las de machos de control. Al aplicar la prueba de Scheffé para comparar los grupos, por pares, se observó que las diferencias se deben fundamentalmente a que el rendimiento de las crías, hembras de padres tratados con diazepam, a las que se les administró escopolamina después de la sesión de adquisición, bajó considerablemente, detectándose diferencias significativas entre este grupo de crías y los de hembras y machos tratados tanto con diazepam como los de control y a los que se les inyectó escopolamina o solución salina, después de la fase de adquisición.

También se observaron diferencias significativas entre las hembras de padres tratados con diazepam, que recibieron solución salina después del período de entrenamiento y las hembras, crías de padres de control que fueron inyectados con solución salina al finalizar la fase de adquisición.

Entre los machos y las hembras de padres del grupo experimental inyectados con escopolamina, se detectaron diferencias significativas en el rendimiento de las hembras de padres del grupo experimental inyectado con la escopolamina también fué bajo (gráfica 2 y 3).

VALORES PROMEDIOS EN PREVENCIÓN PASIVA

NOMENCLATURA :

Machos de padre tratado, con inyección salina (D-N-M)
 Hembras de padre tratado, con inyección salina (D-N-H)
 Machos de padre tratado, con inyección escopolamina (D-E-M)
 Hembras de padre tratado, con inyección escopolamina (D-E-H)
 Machos de padre control, con inyección salina (C-N-M)
 Hembras de padre control, con inyección salina (C-N-H)
 Machos de padre control, con inyección escopolamina (C-E-M)
 Hembras de padre control, con inyección escopolamina (C-E-H)

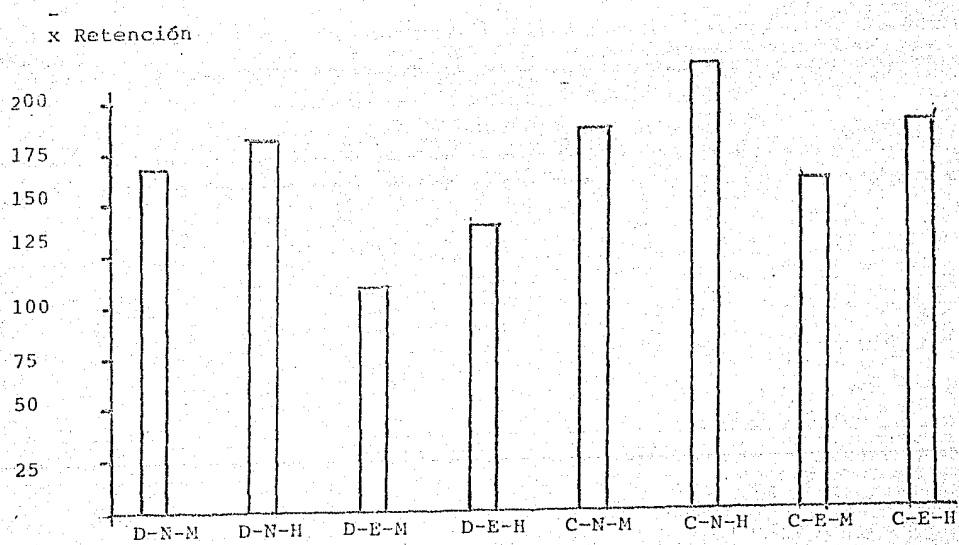
RETENCIÓN AL QUINTO DÍA :

D-N-M	169.76	C-N-M	192.110
D-N-H	186.59	C-N-H	227.05
D-E-M	112.82	C-E-M	167.46
D-E-H	145.56	C-E-H	194.75

RETENCIÓN AL OCTAVO DÍA :

D-N-M	98.05	C-N-M	92.58
D-N-H	89.62	C-N-H	152.93
D-E-M	52.53	C-E-M	72.69
D-E-H	27.79	C-E-H	90.71

GRAFICA 1. VALORES PROMEDIOS EN PREVENCIÓN PASIVA
(Medida 5 días después del entrenamiento)

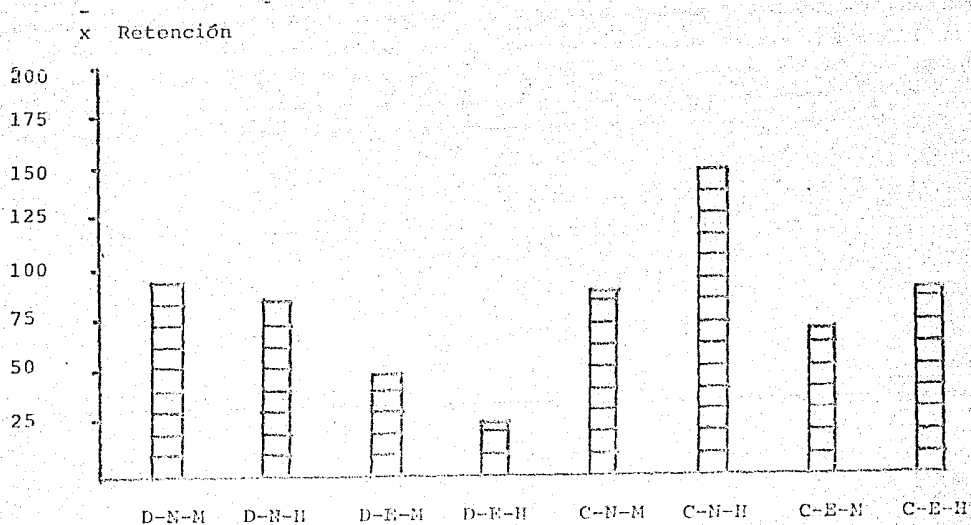


Tratamientos

D-Diazepam, C-Control; N-Solución salina, E-Escopolamina;

M-Machos, H-Hembras.

GRAFICA 2. VALORES PROMEDIOS EN PREVENCION PASIVA
 (Medida 8 días después del entrenamiento)

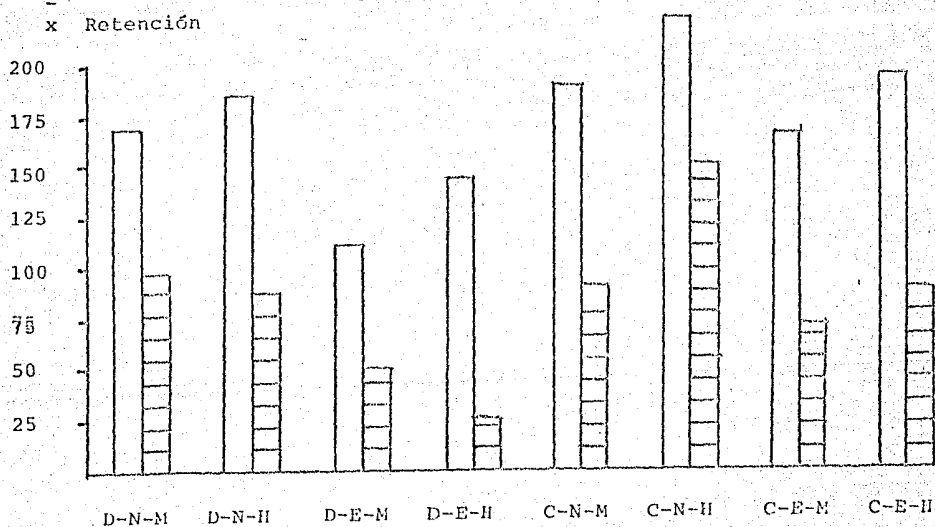


Tratamientos

D-Diazepam, C-Control; N-Solución salina, E-Escopolamina;
 M-Machos, H-Hembras.

GRAFICA 3. VALORES PROMEDIOS EN PREVENCION PASIVA

(Medida 5 y 8 días después del entrenamiento)



Tratamientos

D-Diazepam, C-Control; N-Solución salina, E-Escopolamina;
M-Machos, H-Hembras.

▭ 5 días

▨ 8 días

D I S C U S I O N

Los resultados obtenidos en relación con el rendimiento en las pruebas de prevención pasiva, de las crías de machos tratados con diazepam, durante 42 días y apareados 9 semanas después de haber concluido el tratamiento, podría deberse a alteraciones del genoma de los espermatozoides, las cuales se producirían durante la espermatogénesis debido a la acción directa del diazepam, ya que Errol B. de Souza (10), ha comprobado la presencia de receptores testiculares a benzodiazepinas, tanto en el estroma como en las células germinales y en las de Sertoli; el paso directo del fármaco puede modificar el metabolismo de las células de la línea germinal tanto a nivel citoplasmático, como nuclear, provocando disturbios serios, como los observados por Breen, Stanchever y Anderson (1, 4, 52), sobre el ciclo celular de fibroblastos y leucocitos humanos y ovocitos de ratón, estos estudios permitieron determinar que el diazepam produce rupturas cromosómicas in vitro (51 bis) e in vivo (53, 54). En pacientes adultos que recibieron el fármaco durante periodos de 6 meses; dichas rupturas podrían tener repercusiones a largo plazo, si se producen en las células germinales y a su vez, podrían ser responsables del patrón atípico de la distribución de la cromatina de las células germinales y de otros tipos celulares de las crías de madres expuestas, durante la gestación como en el pulmón, el hueso, la placenta, el mesencéfalo, el hígado, el corazón, el páncreas, la retina, los riñones y el intestino. (26

Además altera la separación de los centriolos al finalizar la profase, provocando la formación de un huso acromático unipolar, en lugar del bipolar, (1,24,52,53) la mayoría de las células tratadas se mantenían en una metafase anormal, mientras las controles completaban la mitosis. La cromatina en las células expuestas al fármaco tenían la cromatina condensada y la polimerización de los microtúbulos era normal .

Asimismo los ovocitos se afectaron de manera drástica, llegando a presentar alteraciones celulares que impedían que se completaran la primera o la segunda división meiótica e incluso se degeneraban. (54)

Clarke por medio de estudios in vitro determinó que la acción del diazepam es más bien citostática que citotóxica. (8)

Otro tipo de cambios que se podrían producir en las células germinales masculinas serían modificaciones de organelos celulares como el retículo endoplásmico rugoso y el liso, el complejo de Golgi, las mitocondrias y las membranas celulares (53).

Es probable que todas o algunas de las alteraciones tanto nucleares como citoplasmáticas, experimentadas por los espermatozoides de los animales inyectados con diazepam antes de aparearse , sean responsables de que el desarrollo del sistema nervioso central de sus crías esté afectado fisiológicamente, lo cual se puede comprobar al someterlas a las pruebas de conducta para medir su memoria de largo plazo (40, 45, 46, 47, 48).

Por la conducta observada en las crías, se infiere que las neuronas del sistema límbico y en particular del núcleo caudado,

son incapaces de integrar correctamente los procesos de adquisición y consolidación de la memoria de largo plazo, debido probablemente a que el metabolismo de la acetilcolina o los receptores que intervienen en estas tareas, estén modificados, de manera tan sutil que al aplicar la escopolamina se evidencian con mayor intensidad (40, 45, 46, 47, 48) .

Las modificaciones conductuales observadas son muy similares a las detectadas en las crías de rata y ratón, de hembras gestantas a las que se les aplicó diazepam durante diferentes lapsos de la preñez, que consistieron fundamentalmente en una disminución evidente de su retención pasiva (40,45-48), así como deficiencias en el desempeño en el laberinto recto (2 bis, 14 bis), modificaciones de su actividad locomotora espontánea (22, 14 bis), y en campo abierto (22, 14 bis), en su conducta de natación (40), en su respuesta a la tensión emocional causada por inmovilización (55) y la provocada por la exposición sorpresiva a un ruido (20) .

Los cambios conductuales se han podido correlacionar con alteraciones tanto de la maduración, como la morfología del tejido nervioso y en particular de las neuronas del cuerpo estriado y del mesencéfalo (29, 40) y con alteraciones en las terminaciones nerviosas de las neuronas norepinefrínicas hipotalámicas, debidas a que, en los órganos blanco de éstas, se desarrollan tempranamente los receptores benzodiazepínicos, que permiten la unión del diazepam, facilitando así, la alteración de su desarrollo (55,56) .

En apoyo a la posibilidad de que el daño sea debido a una alteración del genoma, existe el antecedente de que la exposición masculina a sustancias como los anticonvulsivos, la talidomina, el alcohol, la cafeína, el plomo y los gases anestésicos, provocan en las crías alteraciones del desarrollo como hipodesarrollo fetal, el aumento del índice de defectos congénitos, el desempeño anormal en alguna de las pruebas conductuales, y que en sus esposas se presentarán con mayor frecuencia abortos espontáneos (21) .

Otro mecanismo aunque remoto, que podría explicar el porqué de los cambios de la conducta de aprendizaje, sería el que el diazepam siendo altamente lipofílico (51), por ser captado por los receptores benzodiazepínicos en el testículo (10) y en general, en los tejidos del aparato reproductor masculino, pudiera ser transportado en el semen hacia el tracto genital femenino y dañar directamente el desarrollo de las crías (21) . Dado que en este caso, el apareamiento de los machos se efectuó 9 semanas después de haber terminado el tratamiento con diazepam, este último mecanismo podría ser menos factible, que el del daño genómico, sin embargo, no se puede descartar definitivamente, ya que el diazepam se retiene en los tejidos durante periodos muy prolongados. (61)

Las diferencias observadas entre la retención pasiva de las crías hembras y machos de padres tratados, podría deberse a que el diazepam actuó de forma distinta sobre el genoma masculino que en el femenino, que impidiera una maduración correcta del eje hipotálamo - hipofisario - gonadal en las hembras, las cuales

resultan más afectadas.

El observar solamente una tendencia a la disminución, pero no diferencias estadísticamente significativas entre la retención pasiva, de las crías de padres tratados y de machos de control, medida 5 días después del entrenamiento, podría deberse a que en este momento la curva del olvido es similar en todos los grupos investigados, sin embargo a los 8 días se acentúan las diferencias al caer con mayor velocidad las curvas en los animales del grupo experimental, tratados con diazepam e inyectados con escopolamina. Esta caída más brusca indica que la consolidación de la memoria no se integró correctamente, en especial en las crías hembras, de padres expuestos al fármaco.

C O N C L U S I O N E S

De los resultados obtenidos se concluye que las crías adultas de padres tratados por vía intraperitoneal, con dosis únicas diarias de diazepam, de 2.7 mg / kg / de peso corporal, presentan una disminución estadísticamente significativa de la retención pasiva, medida a los dos meses de edad.

Es posible que las deficiencias en la retención pasiva observada en crías, se deba a que el diazepam dañe directamente los genes del padre y que esto influya sobre la diferenciación neuronal de las crías.

Hay diferencias entre la memorización de largo plazo, entre las crías hembras y machos, lo que indica que el genoma masculino y femenino son afectados de manera distinta por el diazepam.

Las diferencias observadas en la respuesta de las crías hembras y macho, también puedan deberse a que la maduración del cerebro, el hipotálamo, la hipófisis, y las glándulas reproductoras tiene una diferenciación intrauterina específica, que puede ser afectada de manera distinta en cada sexo.

La retención pasiva medida 8 días después del entrenamiento, mostró una alteración más evidente en las hembras del grupo experimental, inyectado con escopolamina, debida probablemente a que la consolidación de la memoria no se efectuó correctamente.

Es poco probable, pero no se puede eliminar la posibilidad de que el diazepam pudiera ser transferido en el semen y actuar sobre las crías, afectando el desarrollo de su sistema nervioso.

Es importante destacar que este tipo de investigación, es la primera realizada en crías de ratones, de padres tratados con diazepam, en el que se comprueban la producción de alteración de la conducta.

B I B L I O G R A F I A

1. Anderson, L.C., Lehto, V. P., Stenman, S. Bradley, R. A. y Virtanen, I. : Diazepam induces mitotic arrest at prometaphase by inhibiting centriolar separation. *Nature*. 291: 247 - 248, 1981.
2. Alvarez-Fernández, G., Márquez-Orozco, M. C., Márquez Orozco, A. y Sámano-Bishop, A. : Efectos del Diazepam (valium) sobre la ultraestructura de la barrera placentaria de fetos de ratón. *Bol. Estud. Med. Biol. Mex.* 33 (1 - 8): 138, 1984 - 1985.
- 2 bis. Barlow, S. M. : Drugs in pregnancy : effects in post - natal development and behavior. *T I P S* : 254 - 256, 1982.
3. Barker, L. A., Glick S. D., Green, I. P. y Khandelwa, J. : Acetylcoline metabolism in rat hippocampus and striatum following one trial passive training. *Neuropharmacology*. 21: 183 - 185, 1982.
4. Breen, P. C., y Stenchever, M. A.: Some effects of diazepam on the fine structure of fibroblasts in tissue culture. *Amer. J. Obstet. Gynecol.* 108 (4): 520 - 527, 1970.
5. Bouchet, A. y Cuilleret, J.: *Anatomía Descriptiva, Topográfica y*

- Funcional. Sistema Nervioso Central. Ed. Medica Panamericana, México, D. F., p. 98, 1978.
6. Corréa-García, L., Márquez-Orozco, M. C. y Márquez-Orozco, A.: Effects of administration of diazepam (valium) of fetal retina mice. Res. Congr. Int. Anat. 12: I65, 1980.
 7. Cheal, M.: Scopolamine disrupts maintenance of attention rather than memory process. Neuropsychology Lab, 1984.
 8. Clarke, D. C. y Ryan, P. J.: Tranquilizers can block mitogenesis in 3T3 cells and induce diferentiation in friend cells. Nature. 297 : 160 - I6I, 1980.
 9. De la Fuente-Juárez, G., Márquez-Orozco, M.C. y Márquez-Orozco, A.: Alterations of fetal heart mice produced by treatment of diazepam (valium) during gestation. Res. Congr. Int. Anat. 12: 169, 1980.
 10. De Souza, E. B., Anholt, R. R. H., Murpy, M. M. K., Snyder y S.H. Kuhar, M. J.: Peripheral type benzodiazepine receptors in endocrine organs: autoradiographic localization in rat pituitary adrenal and testis. Endocrinology. 116 (2): 567 - 573, 1985.
 11. Erkkola, R., Kanto y J., Sellman, R.: Diazepam in early human pregnangy. Acta Obstet. Gynecol. Scand. 53 : I35 - 138, 1974.
 12. Fishburne, J. I.: Análgesia durante el parto. Clínicas de perinatología. Vol I, I ed., Ed. Interamericana; p 43, México, D. F., 1982.
 13. Frieder, B., Meshorer, A. y Grim, V.: The effect of exposition of diazepam through the placenta or through the mother milk. Neuropharmacology. 23 (9): I099 - I104, 1984.
 14. Glick, S. A. y Zimmerberg, B.: Amnesic effects of scopolamine.

Behavioral Biology. 7 : 245 - 254 , 1972.

- 14 bis. Grimm, V. E.y Hershkowitz, M. : The effect of chronic diazepam treatment on discrimination performance and 3H flunitrazepam binding in the brains of shocked and non - shocked rats . Psychopharmacology. 14: 132 - 136, 1981.
15. Haycock, I. W.,Deadwyler, S. A.y McGaugh, J. L.: Retrograde amnesia and cholinergic in the caudate-putamen complex and dorsal hippocampus of the rat. Experimental Neurology. 41: 201 - 213 , 1973.
16. Idapaan-Heikkila, J. E., Joupila, P. I., Puolaka,y Vorne, M. S.: Placental transfer and fetal metabolism of diazepam in early human pregnancy. Amer. J. Obstet.Gynec. 109: 1011 - 1016, 1971.
17. Idapaan-Heikkila, J. E., Taska, R. J., Allen, H. A.y Schoolar, J. C.: Placental transfer of diazepam 14C in mice, hamsters and monkeys. J. Pharmacol. Exp. Therap. 176 (3): 752 - 757, 1971.
18. I. L. Martin: The benzodiazepine receptor functional complexity. Elsevier Science Publishers, B. V. 0165 (6147): 343 - 347, 1980.
19. Kellogg, C., Tervo, D., Ison,yJ.,Miller, R.: Prenatal exposure to diazepam alters behavioral development in rats. Science. 207: 205 - 207, 1980.
20. Kellogg, C. K.,Crisholm, J., Simmons, R. D., Ison,y J.R., Miller, R. K.: Natural and behavioral consequences of prenatal exposure to diazepam . Monogr. Neural. Sci. 9: 119 - 123, 1983.
21. Kolata, G. B. Behavioral teratology : birth deficits of the mind. Science. 202 (17) : 732 - 734, 1978.
22. Lyubimov, B. I., Smolnikova, N. M.y Strekalova, S. N.: Effect of

- diazepam in development of the offspring. *Byulleten Eksperimentalnoi Biologii; Meditsiny*. 78 (10): 64 - 66, 1974.
- 23 .Mc.Allister, C. B.: Placental transfer and neonatal effects of diazepam when administered to women just before delivery. *Br. J. Anaesthesiol.* 52: 423- 427 , 1980.
- 24 .Miernik, A., Santa-Maria, A.y Marano, F.: The antimitotic activities of some benzodiazepines. *Experientia*. 42: 956 - 958 , 1986.
25. Mandelli, M., Morselli, P. L., Nordio, G., Pardi, N., Principi, N., Sereni, y F.Tognoni.G.: Placental transfer of diazepam and its disposition in the newborn . *Cli. Pharmacol. Ther.* 17 (5): 564 - 572, 1985.
26. Márquez-Orozco, M. C., Márquez-Orozco, A.y Sámano-Bishop, A.: Estudios de las alteraciones pulmonares de fetos de ratón de 18 días de gestación producidas por la administración de diazepam (valium). *Arch. Mex. Anat.* 20 (I): 21 - 30, 1983.
- 27.Márquez-Orozco, M. C., Márquez-Orozco, A., Alvarez-Fernández, G.y Sámano-Bishop, A.: Acción del diazepam sobre la osteogénesis de la tibia fetal de ratón. *Bol. Soc. Mex. Cienc. Fisiol.* 7 (I): 10, 1984.
- 28.Márquez-Orozco, M.C., Márquez-Orozco. A.y Flores-Olvera, H.: Histological alterations produced by diazepam (valium) in mice placenta. *Res. Congr. Int. Anat.* 12: 218, 1980.
29. Márquez-Orozco, M. C.y Márquez-Orozco, A.: Efectos del diazepam sobre el mesencéfalo de fetos de ratón. *Res. Congr. Nacl. Cienc. Fisiol.* 28: 20-2C, 1985.
30. Márquez-Orozco. M. C., Márquez-Orozco, A.y Sámano-Bishop, A.:

- Alteraciones del hígado fetal de ratón, causadas por administración de diazepam (valium) durante la gestación. Res. Rev. Nacl. Morfol. 5:31, 1983.
31. Márquez-Orozco, M. C., Márquez-Orozco, A.y Gazca-Ramírez, V.: Ultraestructural alterations of fetal micc heart produced by treatment with diazepam during gestation. Proc. West. Pharmacol. Soc. 26: 83 - 84, 1983.
32. Márquez-Orozco, M. C.y Márquez-Orozco, A.: Alteraciones ultraestructurales del pulmón fetal del ratón provocadas con diazepam in vivo. Res. Congr. Nacl. Cienc. Fisiol. 28: 31-2C, 1985.
33. Márquez-Orozco, A.y Márquez-Orozco, M. C.: Hallazgos histológicos en el pulmón de ratones adultos expuestos a diazepam durante la gestación. Res. Congr. Nacl. Cienc. Fisiol. 28:31-3C, 1985.
34. Márquez-Orozco, M. C., Márquez- Orozco, A.y Sámano-Bishop, A.: Alteraciones del hígado fetal de ratón, causadas por administración de diazepam (valium) durante la gestación. Res. Rev. Nacl Morfol. 5: 31, 1983.
35. Márquez-Orozco, M. C.y Márquez-Orozco, A.: Modificaciones de la parte exócrina del páncreas fetal de ratón causadas por diazepam. Res. Congr. Nacl. Cienc. Fisiol. 28: 39C; 1985.
36. Hernández-Alvarez, L. I., Márquez-Orozco, M. C.y Márquez-Orozco, A.: Alteraciones morfológicas del ovario de ratones de la cepa CD-I ocasionadas por exposición prenatal a diazepam (valium). Res. Congr. Nacl. Cienc. Fisiol. 31: 18C, 1988.
37. Márquez-Orozco, M. C., Márquez-Orozco, A.y Gazca-Ramírez, V.: Cambios ultraestructurales de la retina de fetos de ratón de

- madres tratadas con diazepam (valium) durante la gestación. Res. Congr. Nacl. Cienc. Fisiol. 31: 216C, 1988.
38. Márquez-Orozco, M. C., Márquez-Orozco, A. y Sámano-Bishop, A.: Efecto del diazepam (valium) en riñones fetales in vivo. Bol. Soc. Mex. Cienc. Fisiol. 7 (I): 16- 20, 1984.
39. Márquez-Orozco, M. C., Dorantes-Sierra, L. y Márquez-Orozco, A., Sámano-Bishop, A.: Alteraciones histológicas del intestino delgado de fetos de ratón, causadas por la administración materna de diazepam (valium). Res. Congr. Nacl. Anat. 10: 29, 1984.
40. Márquez-Orozco, M. C., Márquez-Orozco, A. y Zarco de Coronado, I.: Efectos de la administración prenatal de diazepam sobre la conducta de natación en ratones lactantes. Res. Congr. Nacl. Cienc. Fisiol. 30: C - 18, 1987.
41. Netter, F. H.: Nervous system: The ciba collection of medical illustrations. Volume I. 11 ed. Ed. Colorpress New York, U. S. A., 1975.
42. Owen, J. R., Irani, S. F. y Blair, A. W.: Effects of diazepam administered to mothers during labour on temperature regulation of neonate. Arch. Dis. Child. 47: 107 - 110, 1972.
43. Pellegrino, L.; Pellegrino, S. A. y Cushman, A.: A stereotaxic atlas of the rat brain. 2 ed., Ed. Plenum Press, U. S. A., 1979.
44. Prado-Alcalá, R. A., Cepeda, G., Verduzco, L., Jiménez, A. y Vargas-Ortega, E.: Effects of cholinergic stimulation of the nucleus caudate on active avoidance. Neurosci. Lett. 51: 31 - 36, 1984.
45. Prado-Alcalá, R. A. y Cobos-Zaplain, C. G.: Learning deficits induced by cholinergic blockade of the caudate nucleus as a

- function of experience. Brain Res. 138: 190 - 196, 1977.
46. Prado-Alcalá, R. A., Cruz-Morales, S. E. y López-Miro, F.A.: Differential effects of cholinergic blockade of anterior and posterior caudate nucleus on avoidance behavior. Neurosc. Lett. 18: 339 - 345, 1980.
47. Prado-Alcalá, R. A.: Is cholinergic activity of the caudate nucleus involved in memory. Life Science 37: 2135 - 2142, 1985.
48. Prado-Alcalá, R. A. y Quiariarte, G.: Núcleo caudado y aprendizaje. XXXIII. Efectos del bloqueo colinérgico de diferentes regiones sobre la memoria. Res. Congr. Nacl. Cienc. Fisiol. 31: 197C, 1983.
49. Rementería, J. I. y Rhatt, K.: Withdrawal symptoms in neonates from intrauterine exposure to diazepam. J. Pediat. 90 (I): 123 - 126, 1977.
50. Roche Scientific Service. Valium roche in obstetriche and gynecology. Collective Abstract Valium. 212: 552- 556, 1970.
51. Ramírez-Rojas, J.A.: Benzodiazepinas.: Rev. Fac. de Med. 18 (I): 32-35, 1975.
- 51 bis. Staiger, R. C. : Studies in the chromosomes of human lymphocytes treated with diazepam in vitro. Mutation Res. 10: 635 - 644, 1970.
52. Stenchever, M. A., Frankel, R. S. y Jarvis, J. A.: Effects of diazepam on chromosomes of human leukocytes in vivo. Amer. J. Obstet. Gynecol. 17: 456 - 460, 1970.
53. Stenchever, M. A., Frankel, R. S., Jarvis, J. A. y Veress, K.: Some effects of diazepam in human cells in vitro. Amer. J. Obstet. Gynecol. 103: 836 - 842, 1969.

54. Stenchever, M. A. y Smith, W. D.: The effect of diazepam on meiosis in the CF-1 mouse. *Teratology*. 23: 279 - 282, 1981.
55. Simmons, R. D., Miller, R. K. y Kellogg, C. K.: Prenatal exposure to diazepam alters central and peripheral responses to stress in adult rat offspring. *Brain Res.* 307: 39 - 46, 1984.
56. Simmons, R. D., Miller, R. K. y Kellogg, C. K.: Prenatal diazepam exposure in rats. Long-lasting, receptor mediated effects on hypothalamic containing neurons. *Brain Res.* 293: 73- 83, 1984.
57. Simmons, R. D., Miller, R. K. y Kellogg, C. K.: Prenatal diazepam distribution and metabolism in perinatal rats. *Teratology*. 28: 181 - 188, 1983.
58. Steecher, P. G.: An enciclopaedia of chemical and drugs. Merck Index, Merck and Co. Ind. 8, p 341, 1968.
59. Tarlok, J. G., Gwam, J. M. y Geber, F. W.: Comparative study of the teratogenic effects of clordiazepoxide and diazepam in the fetal hamster. *Life Science*. 29 (21) : 2141 - 2147, 1981.
60. Valium Roche Lab. Valium diazepam. *The Journal of Family Practice*. 6 (I), 1978.
61. Van der Kleijn, E.: Kinetics of distribution and metabolism of diazepam and chlordiapoxide in mice. *Arch. Int. Pharmacodyn.* 178 (I) : 193 - 215, 1969.
62. Wilkinson, M., Moger, W. H. y Grovestine, D.: Chronic treatment with valium (diazepam) fails to affect the reproductive system of the male rat. *Life Science*. 27: 2285 - 2291, 1980.
63. Winocur, G.: Functional dissociation within the caudate nucleus of rats. *J. Comp. Physiol. Psychol.* 86: 432 - 439, 1974.