

## **Alteraciones locomotoras de crías de ratón inducidas por exposición posnatal a midazolam**

### **Locomotor alterations of mouse pups induced by postnatal exposure to midazolam**

DOI: 10.46919/archv3n4-002

Recebimento dos originais: 31/03/2022

Aceitação para publicação: 18/04/2022

#### **Graciela de la Fuente Juárez**

Maestrante en Ciencias (Biología)

Institución: Universidad Nacional Autónoma de México

Dirección: Gounod 129, Col.Ex-Hipódromo de Peralvillo, Del. Cuauhtémoc  
México 06250

Correo electrónico: cmarquezor@gmail.com

#### **Ismael Jiménez**

Dr. En Ciencias

Institución: CINVESTAV

Dirección: Departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias

Correo electrónico: ijimenez@fisio.cinvestav.mx

#### **María Cristina Márquez Orozco+**

Dr. En Ciencias (Biología)

Institución: Universidad Nacional Autónoma de México

Dirección: Gounod 129, Mexico 06250, Alcaldía Cuauhtémoc

Correo electrónico: Cmarquezor@gmail.com

#### **Amalia Márquez Orozco**

Química

Institución: Universidad Nacional Autónoma de México

Dirección: Gounod 129, Mexico 06250, Alcaldía Cuauhtémoc

Correo electrónico: Cmarquezor@gmail.com

### **RESUMEN**

El midazolam (MDZ) se emplea en pediatría como medicación previa a la anestesia y para producir amnesia anterógrada. Se emplea en prematuros y recién nacidos con problemas respiratorios severos que requieren cuidados intensivos o con crisis epilépticas. Se investigó si las crías de ratón machos de 21 días de edad tratadas del día 6 al 9 postnatales modifican su actividad locomotora y exploratoria medidas en un campo abierto. Dos grupos de crías macho de ratón de la cepa ICR fueron inyectadas del día 6 al 9 posnatales el primero (MDZ) con dosis únicas diarias de MDZ (1 mg/kg/pc/sc) y el segundo (C) con solución salina. La actividad locomotora y la exploratoria se midieron durante 5 min en un campo abierto de 50 x 50 x 20 cm. Las pruebas se videograbaron. Sobre un monitor se dividió el campo abierto en nueve cuadros numerados. Se registró el número de veces que cada ratón visitó los cuadros en 5 min. La distancia (cm) y la velocidad (cm/s) se analizaron con el sistema digital del Departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias del CINVESTAV-IPN. En los machos del grupo MDZ el promedio de la distancia recorrida, la velocidad, el número de cuadros visitados y la actividad exploratoria fueron mayores en el grupo MDZ que en el grupo C ( $p < 0.05$ ). Los resultados podrían correlacionarse con las alteraciones de la corteza cerebelar causadas por

el MDZ observadas en estos animales. Se sabe que el MDZ administrado a crías de rata de 7 días de edad causa neurodegeneración apoptótica en el cerebro y alteraciones de aprendizaje y memoria.

**Palabras clave:** midazolam, benzodiazepinas, campo abierto, actividad locomotora.

## ABSTRACT

Midazolam (MDZ) is used in pediatrics as a pre-anesthesia medication and to produce anterograde amnesia. It is used in premature and neonates with severe respiratory problems requiring intensive care or with epileptic seizures. We investigated whether 21-day-old male mouse pups treated from postnatal day 6 to 9 modify their locomotor and exploratory activity measured in an open field. Two groups of male mouse pups of the ICR strain were injected from postnatal day 6 to 9 the first (MDZ) with single daily doses of MDZ (1 mg/kg/pc/sc) and the second (C) with saline. Locomotor and exploratory activity were measured for 5 min in an open field of 50 x 50 x 20 cm. The tests were videotaped. On a monitor, the open field was divided into nine numbered squares. The number of times each mouse visited the squares in 5 min was recorded. Distance (cm) and speed (cm/s) were analyzed with the digital system of the Department of Physiology, Biophysics and Neurosciences of CINVESTAV-IPN. In the males of the MDZ group, the average distance traveled, speed, number of frames visited and exploratory activity were greater in the MDZ group than in the C group ( $p < 0.05$ ). The results could correlate with the alterations of the cerebellar cortex caused by MDZ observed in these animals. MDZ administered to 7-day-old rat pups is known to cause apoptotic neurodegeneration in the brain and alterations in learning and memory.

**Keywords:** midazolam, benzodiazepines, open field, locomotor activity.

## 1 INTRODUCCIÓN

Midazolam (MDZ) es una benzodiazepina (BDZ) que se prescribe ampliamente como un tranquilizante menor cada vez más utilizado en pediatría por ser antiepiléptico, ansiolítico, tranquilizante, sedante e hipnótico, que produce amnesia anterógrada cuando se administra antes de un procedimiento quirúrgico o antes de la inducción de la anestesia(1). Por vía endovenosa el MDZ se usa con gran frecuencia en pacientes pediátricos a los que se les practica punción lumbar, endoscopia esofágica biopsia por aspiración de médula ósea. El MDZ se administra a los niños que deben sedarse con fines diagnósticos y a los que se les realizan estudios radiográficos o tomografías. El MDZ se emplea en niños prematuros o recién nacidos que deben ser atendidos en los servicios de cuidados intensivos por presentar problemas respiratorios severos y en los que presentan estatus epilepticus(1).

La sedación intravenosa es continua en pacientes intubados. En los pacientes pediátricos la dosis inicial que se les administra es de 0.05 a 2.0 mg/kg. La dosis máxima es de 6 a 10 mg/kg (2, 3).

El MDZ se une a receptores benzodiazepínicos estéreo específicos de las neuronas postsinápticas del sistema nervioso central, como es la corteza cerebral, la cerebelar, el sistema límbico, el hipocampo y la formación reticular. El mecanismo primario de las BDZs involucra una modulación alostérica del complejo receptor central de GABA<sub>A</sub> asociado a los canales de Cl<sup>-</sup>. El receptor de GABA<sub>A</sub> de las sinapsis GABAérgicas forma con cuatro receptores de BDZs un complejo GABA<sub>A</sub>-BDZ localizado alrededor de un

ionóforo de Cl<sup>-</sup> constituido por cinco dominios, el sitio de agonistas y antagonistas del GABA<sub>A</sub>; en contacto con el sitio receptor de agonistas y antagonistas. Agonistas inversos de las BDZs y etanol. Al lado del sitio receptor de esteroides, anestésicos, incluso los volátiles, el sitio receptor de barbitúricos y depresores no barbitúricos y por último el sitio receptor de picrotoxina un convulsivante que cierra un círculo al estar en contacto con el de GABA<sub>A</sub>(4, 5).

En crías de ratón tratadas con dosis únicas diarias de MDZ (2 mg/kg/pc/sc) del 8° al 29° día, sacrificadas al día 30 se demostró que la corteza cerebral tenía un espesor menor que la del control, las neuronas piramidales de las capas II-III, IV y V estaban desorientadas tenían dendritas desorientadas sus somas en algunos casos mostraban retracción y en otros eran más voluminosos, con núcleos picnóticos y nucléolos conspicuos(6). En el cerebelo de los mismos ratones el espesor de la corteza era reducido al igual que el número de somas de las células de Purkinje, que presentaban un árbol dendrítico desorientado y el espesor de la capa granulosa era menor que el de los animales del grupo control(7).

El propósito de este trabajo fue investigar si la administración subcutánea de MDZ a crías de ratón del día 6 al 9 postnatales en dosis únicas diarias de 1 mg/kg/pc altera la actividad locomotora y su comportamiento cuando se colocan en un campo abierto durante cinco minutos.

## 2 MATERIAL Y MÉTODOS

Hembras de ratón de la cepa ICR (Harlan México) parieron entre la noche del día 18 y el 19 de la gestación, un día después se ajustaron las camadas a 8 crías (cuatro hembras y cuatro machos). Del día 6 al 9 de edad las crías de cada hembra, dos hembras y dos machos se marcaron e inyectaron por vía subcutánea con solución salina y dos hembras y dos machos con una dosis de MDZ de 1mg/kg/pc. Las crías permanecieron con sus madres hasta el día 21 en el que se destetaron. Cada cría macho (10 controles y 10 MDZ) se colocó en la misma esquina de un campo abierto de acrílico negro, despulpado, de 50x50x20 cm, alumbrado de manera uniforme para evitar reflejos que pudieran interferir en el análisis digital de la prueba (Figura 1). Se registró con una cámara digital la actividad locomotora y el comportamiento de cada animal durante cinco minutos. La base del campo se retiró después del registro de cada ratón y se sustituyó por una limpia, para evitar la exposición al olor de la cría probada con anterioridad. Durante la grabación se usó ruido blanco.

Las videograbaciones se ajustaron a una duración exacta de cinco minutos. Sobre un monitor se colocó una mica que abarcaba todo el campo, que se dividió en nueve cuadros isodiamétricos. A doble ciego se analizaron en un sistema digital del Departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias del CINVESTAV-IPN, la velocidad en cm/s, la distancia recorrida en cm y el comportamiento exploratorio que tuvieron los ratones de cada grupo. Los resultados del número de cuadros se analizó por una prueba de  $\chi^2$  y el de la distancia y velocidad por una prueba de T ( $p < 0.05$ ).

### 3 RESULTADOS

En las crías de ratón de 21 días de edad a los que se les inyectó del día 6 al 9 de edad solución salina (grupo C) o dosis únicas subcutáneas de MDZ (1 mg/kg/pc) grupo MDZ. El número de veces que cada ratón visitó durante cinco minutos, los mismos cuadros del campo abierto fue significativamente mayor que el del grupo C ( $p < 0.05$ ). Figura 2.

La distancia recorrida en cm y la velocidad desarrollada en cm/s, fueron mayores en los ratones del grupo MDZ, que en los del grupo C. Figuras 3 y 4.

La actividad exploratoria en los ratones de 21 días de edad del grupo MDZ fue aberrante, ya que atravesaron el campo con mayor frecuencia, con respecto al recorrido que hicieron cerca de las paredes del campo. Esta conducta fue inversa a la que presentaron los ratones del grupo C, en las que el recorrido cerca de las paredes fue más frecuente que su incursión al centro del campo. Figuras 5 y 6.

### 4 DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

El hecho de que las crías del grupo MDZ en promedio visitaran más cuadros del campo abierto durante cinco minutos, se puede deber a que la actividad exploratoria de estos animales fue desarrollada en toda la superficie del campo, sin mostrar una tendencia preferente por la periferia, como en la conducta instintiva típica de los ratones, como se observó en los del grupo C, que por seguridad incursionan menos hacia el centro del campo. En un estudio previo realizado en machos de ratón expuestos prenatalmente a dosis únicas diarias de DZ (2.7 mg/kg/pc) del día 6 al 17 de la gestación, probados en un campo abierto a las 10 semanas de edad se demostró que tuvieron cambios significativos ( $p < 0.05$ ) en un aumento de cambios de dirección en el campo y en las veces que entraron al centro, lo que concuerda con lo observado en los ratones de 21 días tratados posnatalmente del día 6 al 9(8).

En un estudio en el que se usó un laberinto no radial de ocho brazos con ratones tratados prenatalmente con DZ, se encontró que llegaban más rápido a la salida que los del grupo control, lo que se interpretó como una disminución del estrés causado por el DZ. Siendo el MDZ una BDZ que actúa sobre el mismo complejo receptor central GABA<sub>A</sub>-BDZ<sub>β</sub> podría ser que la exposición posnatal a MDZ causa cambios conformacionales en ese complejo.

La conducta aberrante también se manifiesta como una hiperactividad al aumentar la velocidad y la distancia recorrida por los ratones, que podría ser otra manifestación de desinhibición del estrés (9).

En las crías de ratón tratadas durante los días 6 al 9 posnatales con MDZ (1 mg/kg/pc) tuvieron un patrón de natación anómalo a los 15 días de edad y en la corteza cerebelar se encontró una disminución significativa de la población de las células de Purkinje, que en algunos casos el soma estaba retraído y el núcleo picnótico y en otros estaba hinchado. Los árboles dendríticos estaban desorientados. Se observó la persistencia de granos en la granulosa externa, una menor en la interna con glomi mal diferenciado. Las

mismas alteraciones en el patrón de natación y en la corteza cerebelar se observaron en ratones de 12 días tratados con DZ del día 6 a 9 posnatales con dosis de 1 mg/kg/pc/sc.

En los ratones tratados con MDZ del día 8 al 29 posnatales sacrificados el día 30 se observaron en las cortezas cerebral y cerebelar, signos de neurodegeneración apoptótica(8, 9).

Por una investigación se demostró que la exposición temprana a los anestésicos comunes como el MDZ causan neurodegeneración en el cerebro en desarrollo de rata y persistencia de alteraciones de aprendizaje(10). En crías de ratón de siete días de edad tratadas con una dosis de MDZ de 0.9 mg/kg/pc/sc que se sacrificaron cinco horas después del tratamiento se demostró la presencia de neurodegeneración apoptótica identificada por inmunocitoquímica con actividad de caspasa-3 en el núcleo caudado y en el putamen(11). Se sabe que la anestesia general causa alteraciones de largo plazo en las propiedades ultraestructurales de las sinapsis en desarrollo de ratas jóvenes(12)

Se puede concluir que la administración de MDZ a crías macho de ratón de 21 días de edad tratadas del día 6 al 9 posnatales presentan alteraciones de su actividad locomotora probada en un campo abierto.

## REFERENCIAS

- 1 Rosen DA, Rosen KR. Intravenous conscious sedation with midazolam in pediatric patients. *Int J Clin Pract*, 52(1):46-50, 1998.
- 2 Koul R, Cheko A, Javed H, Al Riyamik K. Eight-year study of childhood status epilepticus: midazolam infusion in management and out-come. *J Chil Neurol*, 17(12):908-910, 2002.
- 3 Rivera R, Segnini M, Beltonano A, Pérez V. Midazolam in the treatment of status epilepticus in children. *Intensive Critic Care Med*, 21(7):991-994, 1993.
- 4 Lüddens H, Korpi ER, Seeburg PH. GABA<sub>A</sub>/Benzodiazepine receptor heterogeneity: neurophysiological implications. *Neuropharmacology*, 34:245-254, 1995.
- 5 Jones-Davis DM, Song L, Gallagher MJ, Medona RL. Structural determinant of benzodiazepine allosteric regulation of GABA(A) receptor currents. *J Neurosci*, 25(35):8056-8066, 2005.
- 6 Márquez-Orozco MC, Gazca-Ramírez MV, De la Fuente-Juárez G, Márquez-Orozco A. Midazolam induced cerebral cortex changes in 30day-old mice treated from 8 to 29 days of age. *Proc West Pharmacol Soc*, 52:112-114, 2009.
- 7 Márquez-Orozco MC, Gazca-Ramírez MV, De la Fuente-Juárez G, Márquez-Orozco A. Midazolam administered to 8-days-old mouse pups from three weeks induces cerebellar cortex alterations. *Proc West Pharmacol Soc*, 52:109-111, 2009.
- 8 Márquez-Orozco A, Zarco de Coronado I, Pérez Arredondo A, Gazca-Ramírez MV, De la Fuente-Juárez G, Vergara-Aragón P, Márquez-Orozco MC. Comportamiento de ratones machos adultos en un campo abierto se altera por la exposición *in utero* a diazepam. *Reunión Reglamentaria AIP*, 99:118-125, 2004.
- 9 Márquez-Orozco MC, Pérez Arredondo A, Márquez-Orozco A, Vergara P, De la Fuente-Juárez G, Gazca-Ramírez MV, Valencia Hernández AL, Zarco de Coronado I. Efecto de la exposición prenatal a diazepam en la conducta de ratones adultos en un laberinto. *Reunión Reglamentaria AIP*, 98:13-27, 2004.
- 10 Jevtovic-Tedorovic V, Hartman RE, Izumi Y, Benshoff ND, Dikranian K, Zorumski CF, Olrey JW, Wozniak DF. Early exposure to common anesthetic agents causes widespread neurodegeneration in the developing rat brain and persistent learning deficits. *J Neurosci*, 23(3):876-882, 2003.
- 11 Young C, Jevtovic-Todorovic V, Qui Y-Q, Tenkova T, Wang H, Labrouyere JO. Potential of ketamine and midazolam individually or in combination, to induce apoptotic neurodegeneration in the infant mouse brain. *Br J Pharmacol*, 146(2):189-197, 2005.
- 12 Lunardi N, Ori C, Erisir A, Jevtovic-Tedorovic V. General anesthesia causes long-lasting disturbances in the ultrastructural properties of developing synapses in Young rats. *Neurosci Res*, 17(2):179-188, 2010.

## FIGURAS

Fig. 1 Campo abierto de 50x50x20 cm dividido en cuadros numerados, sobre el que se registró el número de veces que cada ratón de 21 días de edad de los grupos C y MDZ visitó durante cinco minutos. El ratón siempre inició la prueba en el cuadro número 1.

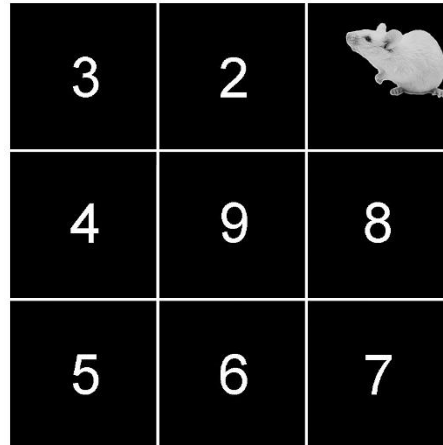


Fig. 2 Promedio de cuadros visitados en un campo abierto, por los ratones de los grupos C y MDZ, de 21 días de edad, durante cinco minutos ( $p < 0.05$ ).

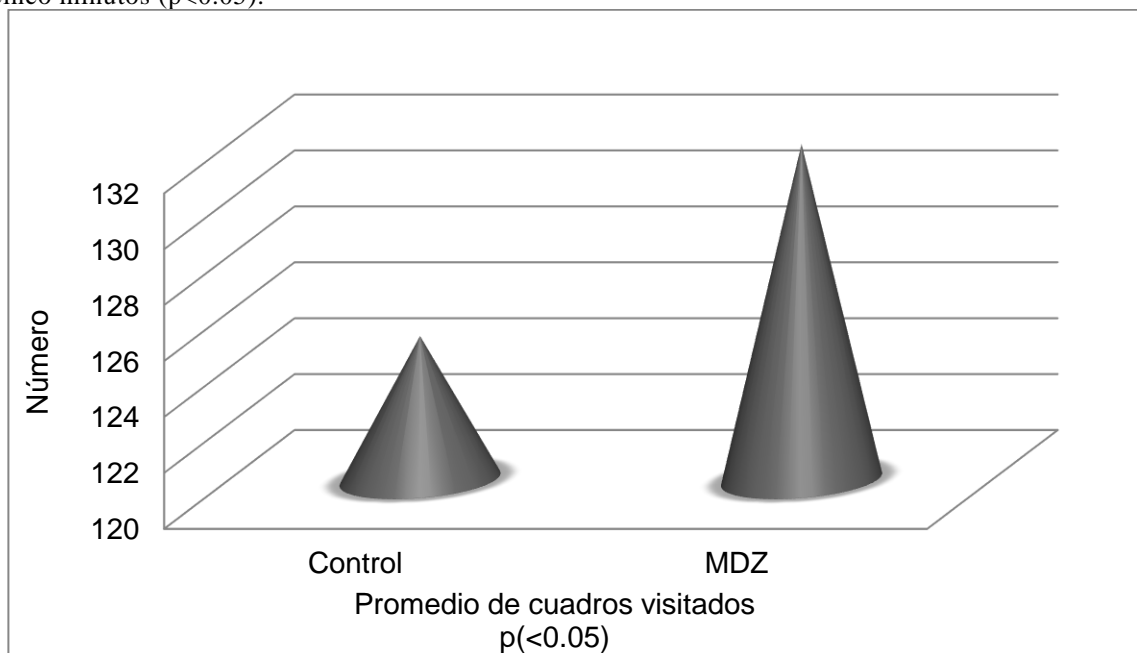


Fig. 3. Promedio de la distancia recorrida (cm) en un campo abierto (durante cinco min), por los ratones de 21 días de edad de los grupos C y MDZ inyectados con solución salina (C) o con dosis únicas diarias de MDZ (1.0 mg/kg/pc/sc) del día 6 a 9 postnatales ( $p < 0.05$ ).

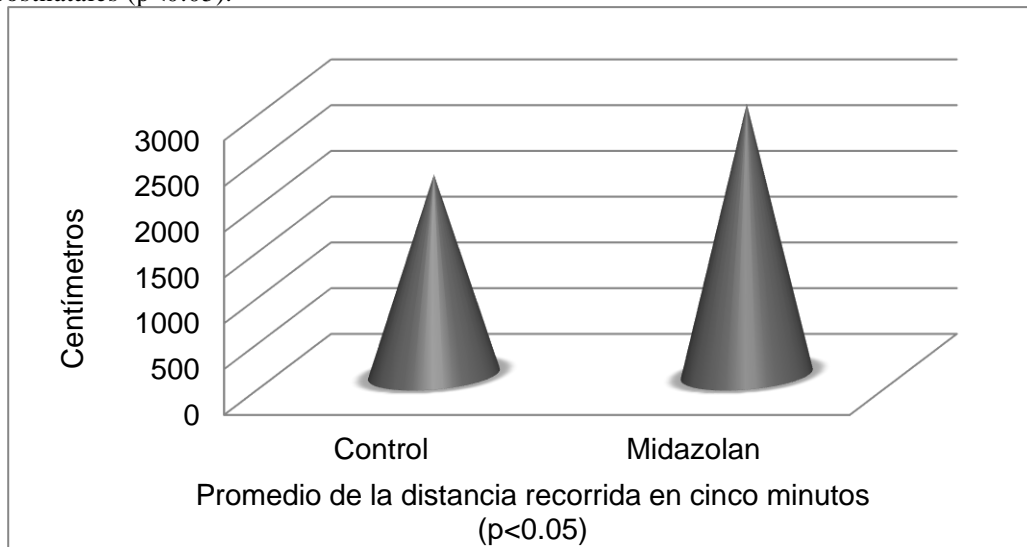


Fig. 4. Promedio de la velocidad desarrollada en el campo abierto durante cinco minutos, por los ratones de 21 días de edad del grupo C y del MDZ, que recibieron dosis únicas diarias de solución salina o MDZ (1.0 mg/kg/pc/sc) del día 6 a 9 postnatales ( $p < 0.05$ ).

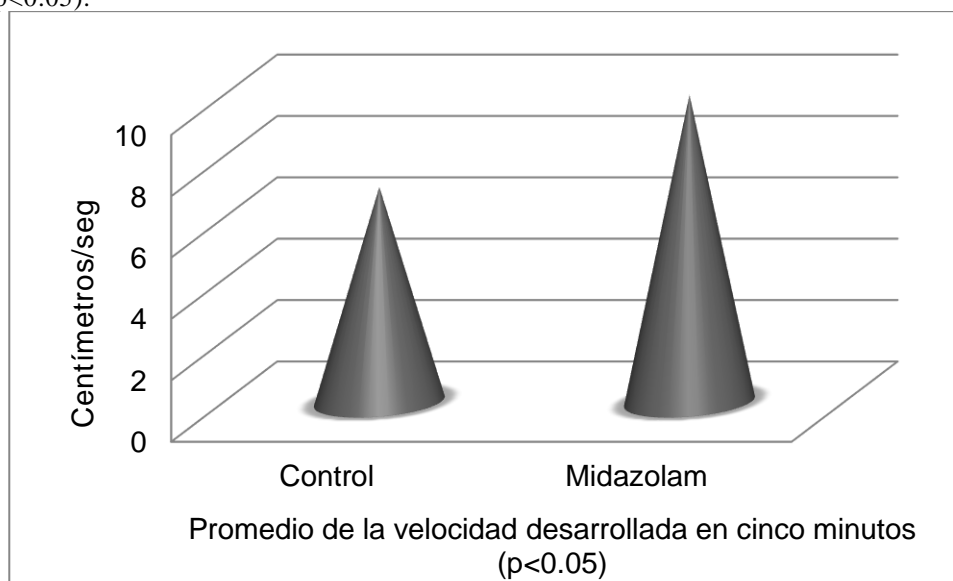




Fig. 5. Registro de la actividad exploratoria desarrollada por un ratón de 21 días de edad del grupo C, durante cinco minutos, en un campo abierto de 50x50x20 cm.

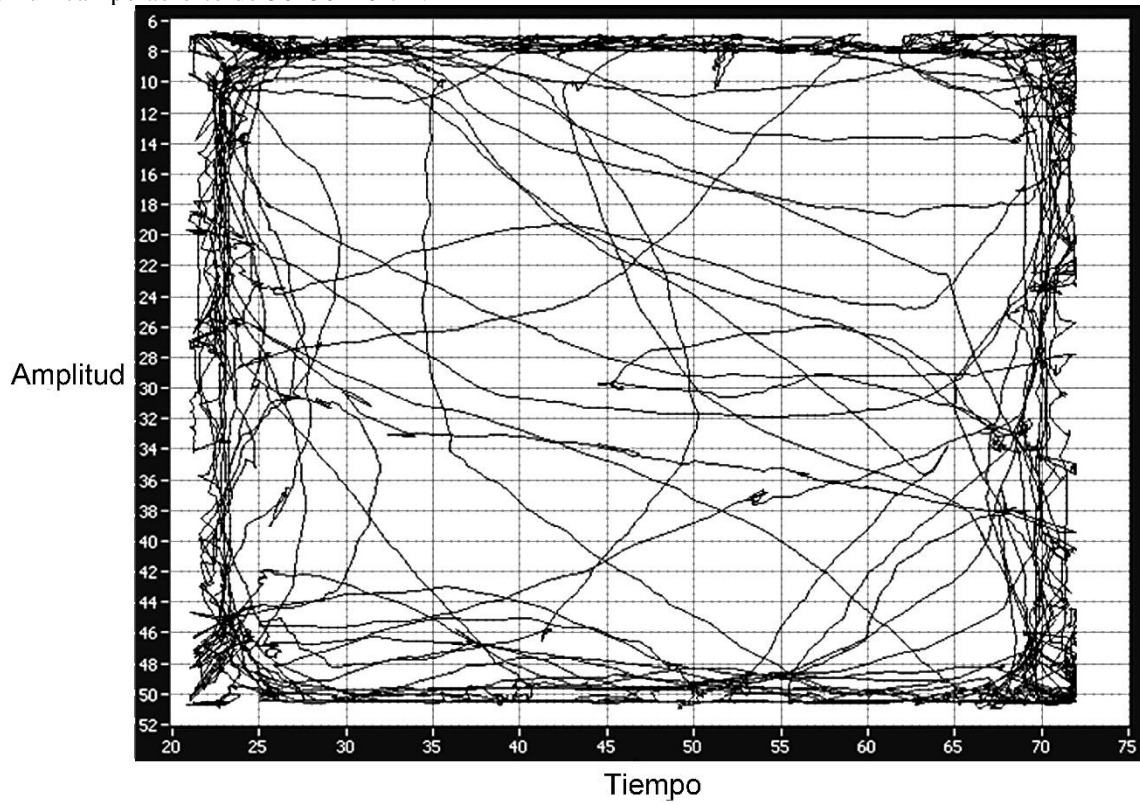


Fig. 6 Registro de la actividad exploratoria desarrollada por un ratón de 21 días de edad del grupo MDZ, durante cinco minutos, en un campo abierto.

