

00346

12
26j



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

**FACULTAD DE CIENCIAS
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO**

**ALTERACIONES TESTICULARES HISTOLOGICAS
PROVOCADAS POR LA ADMINISTRACION
CRONICA DE DIAZEPAM (VALIUM), A RATONES
MACHO DE LA CEPA CD-1.**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE
MAESTRIA EN CIENCIAS
(BIOLOGIA CELULAR)**

**P R E S E N T A :
MARIANA RAMOS AVILA**

DIRECTORA DE TESIS

M. EN C. MA. CRISTINA MARQUEZ OROZCO

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México



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 esta 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.

La humanidad tiene razones suficientes objetivas para comprender y dedicarse a salvaguardar la naturaleza. Pero la naturaleza no será salvada sino con nuestro espíritu. Solo lo será si el hombre le manifiesta un poco de amor, simplemente porque es bella y nosotros tenemos necesidad de belleza, cualquiera que sea la forma a la que seamos sensibles por nuestra cultura. También esto forma parte integrante del alma humana.

Gerardo Ceballos.

Con especial cariño a mis padres: Delfina y Guillermo Ramos, quiénes siempre me apoyan con mucho entusiasmo en mis metas.

A mi hermana, Cecilia Ramos, con quién comparto éste trabajo, satisfacción y muchísimos lindos recuerdos.

A mis hermanos, Sergio y Ernesto Ramos.

A la M. en C., Ma. Cristina Márquez Orozco, quién siempre me brindó dedicación, paciencia y enseñanza, para disfrutar y lograr una muy grande ilusión para mi. Agradezco y admiro tu calidad humana.

A la Quím. Amalia Márquez Orozco, por su valiosa ayuda.

A la Dra. Ma. Carmen Uribe Aranzábal, por su muy buena disposición y consideraciones realizadas en el trabajo.

A mis demás sinodales, por sus sugerencias aportadas.

Al Departamento de Embriología, Facultad de Medicina, U.N.A.M., por las facilidades brindadas durante la elaboración de mi tesis.

A mis queridísimas amigochas, quiénes siempre están en mi pensamiento y corazón. Gracias mil, por su cariño y apoyo.

I N D I C E.

	PAG.
RESUMEN	4
INTRODUCCION:	
GENERALIDADES DE LAS BENZODIAZEPINAS.	5
BENZODIAZEPINAS ENDOGENAS.	12
EFECTOS DEL DIAZEPAM "IN VITRO" E "IN VIVO".	15
RECEPTORES GABA - B.	18
RECEPTORES GABA - A.	19
RECEPTORES BENZODIAZEPINICOS PERIFERICOS.	23
HIPOTESIS.	28
OBJETIVOS.	28
METODOLOGIA.	29
RESULTADOS.	34
DISCUSION.	65
CONCLUSIONES.	73
BIBLIOGRAFIA.	75

R E S U M E N.

- 4 -

El objetivo de este trabajo fué investigar si el diazepam (DZ), administrado a ratones adultos, altera la morfología y la población de células de Leydig, la del epitelio germinal y el diámetro de los túbulos seminíferos. Un grupo (DZ) de 30 machos fértiles de ratones de la cepa CD-1, de dos meses de edad, recibieron por vía subcutánea, durante 60 días discontinuos (5 días a la semana), dosis únicas diarias de DZ de 2.7 mg/kg/de peso corporal; un segundo grupo (S) recibió suero fisiológico en volúmenes equivalentes a los inyectados con el DZ y un tercero (NT) de control, que no recibió ningún tratamiento, de la misma edad, que fueron mantenidos en las mismas condiciones experimentales que los grupos tratados. 15 machos de cada grupo se sacrificaron en una atmósfera de CO₂, al término de la administración del fármaco o solución salina, respectivamente, lo mismo que 15 ratones controles no tratados, llamados en conjunto como "grupos sin reposo". 15 ratones de cada grupo, se sacrificaron por el mismo método nueve semanas después de concluido el tratamiento y se denominaron "grupos con reposo". Se extrajeron los testículos, se fijaron, se deshidrataron, se incluyeron en parafina-paraplast, se cortaron, se tificaron por medio de técnicas rutinarias y especializadas para la identificación de ADN y ARN y se observaron en un microscopio fotónico. Las células de Leydig DZ tenían citoplasma abundante con inclusiones lipídicas gruesas y numerosas, que le daban un aspecto de encaje, los núcleos eran voluminosos, con grumos gruesos de cromatina. Por un sistema de digitalización de imágenes, mediante el programa ipplus.2, se midió el diámetro mayor de las células de Leydig, lo mismo que el diámetro mayor y menor, de sus núcleos y se calculó el área que ocupaban estas células $\mu\text{m}^2/\text{mm}^2$, de los testículos. Los datos obtenidos se analizaron por ANOVA y por las pruebas de Dunn y Student-Newman-Keuls, y se comprobó que en todos los casos eran mayores las dimensiones en el grupo DZ, y estadísticamente significativas, con respecto a los dos grupos de control, entre los que no había diferencias ($p < 0.05$). También se midió el diámetro de los túbulos seminíferos de los grupos y se calculó el área de los túbulos ocupada por el epitelio germinal. Por el análisis estadístico de los datos mediante la aplicación de las mismas pruebas mencionadas anteriormente, se comprobó que mientras el diámetro de los túbulos estaba aumentado en el grupo DZ ($p < 0.05$), el área del epitelio germinal era menor, que en los grupos S y NT, entre los que no hubo diferencias estadísticamente significativas, lo mismo que no las hubo en el diámetro ($p < 0.05$). Al hacer la comparación de las medidas obtenidas en los testículos con y sin reposo, tanto de DZ como de los grupos controles, no se observan diferencias ($p < 0.05$), lo que apoya la hipótesis de que los cambios producidos por el diazepam, en la morfología de las células testiculares podrían ser permanentes y de largo plazo. Los resultados sugieren que el DZ administrado a machos adultos altera la morfología de las células de Leydig, el área que ocupan en el testículo y la fisiología. Asimismo altera el diámetro y el área ocupada por el epitelio germinal de los túbulos seminíferos. El efecto podría deberse a la acción del DZ sobre el eje hipotálamo-hipófisis-gónadas, mediado por receptores benzodiazepínicos GABA A y B, periféricos y centrales, o mediante una influencia directa sobre las células de Leydig y las germinales.

I N T R O D U C C I O N

- 5 -

GENERALIDADES DE LAS BENZODIAZEPINAS

Las benzodiazepinas son sustancias relacionadas estructuralmente, la primera que se sintetizó en 1959 fué el clorodiazepóxido, en 1961, Sternbach y Reeder, publicaron un artículo en el que comunicaron que habían sintetizado una nueva 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, que tenía efectos sedantes (Ramírez-Rojas, 1975).

En 1963, los laboratorios Hoffman-La Roche, lo comercializaron con el nombre de Valium y desde entonces, se emplea en el tratamiento de diversas enfermedades neurológicas y mentales, en casos de ansiedad, aprensión, insomnio, temblores, histeria, problemas de personalidad y en víctimas de accidentes. De acuerdo a los estudios de Ramírez (1975) disminuye la angustia, aumenta la tolerancia a la agresión psíquica, logra aumentar la confianza del paciente, (Martin et al., 1980; Ramírez-Rojas, 1975; Roche Scientific Service, 1970; Valium Roche Lab; 1978).

En la actualidad se han sintetizado más de tres mil de éstos compuestos y cerca de 120 se han ensayado para establecer su actividad biológica y aproximadamente 25 tienen uso terapéutico en diversas partes del mundo. Entre los más utilizados a nivel farmacológico están el diazepam (valium), el clorodiazepóxido (librium), el nitrazepam (pacidrim), el oxazepam (bonare), el lorazepam (ativán), el modazepam (emopan), el flunitrazepam (rohypnol), el midazolam (dormicum), el triazolam (halción) y el aprazolam (tafil) (Ramírez-Rojas, 1975).

En general son sustancias hidrosolubles, incoloras, cristalinas y estables, con excepción del clordiazepóxido y el diazepam que son fotosensibles, inestables y liposolubles. El último también es soluble en un disolvente especial elaborado por los laboratorios Roche (Ramírez-Rojas, 1975; Valium Roche Lab., 1978; Roche Scientific Service, 1970).

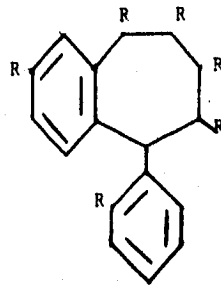
La estructura general de las benzodiazepinas es la representada en el esquema 1, en la que también se muestra la del diazepam, la del PK11195 y la del Ro5-4864. Estos últimos son moléculas agonistas del diazepam utilizadas en investigaciones sobre este tipo de fármacos.

Las principales acciones que ejerce el diazepam sobre el sistema nervioso central (SNC), son: facilitar la transmisión gabaérgica en el SNC, mediante receptores benzodiazepínicos centrales (RBZDC), lo cual tiene como consecuencia: inducir un estado de tranquilidad, la eliminación de la ansiedad, es anticonvulsivante e hipnótico. No tiene propiedades antidepresivas o antipsicóticas. Aún cuando la presencia de receptores benzodiazepínicos periféricos (RBZDP) y microsomaes también intervienen en la regulación del metabolismo celular del diazepam (Martin et al., 1980; Ramírez-Rojas, 1975; Roche Scientific Service, 1970; Valium Roche Lab., 1978).

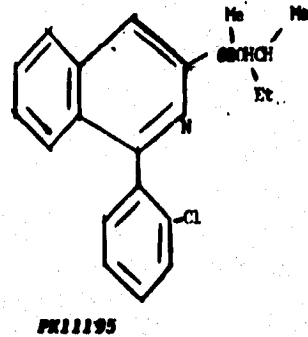
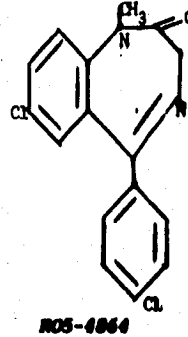
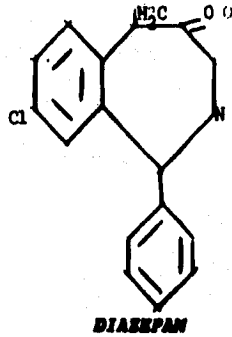
Las benzodiazepinas y en particular el diazepam deprimen el sistema límbico, que es el sustrato principal de las emociones y de la conducta, lo cual explica su efecto hipnogénico, al inducir una disminución de la angustia, la tensión, y la excitación. Entre sus efectos colaterales se pueden mencionar la depresión del SNC, la sedación, la somnolencia, la confusión, la apatía, la relajación, la debilidad muscular, la incoordinación motriz, la disartia,

ESQUEMA 1.

- 7 -



ESTRUCTURA GENERAL DE LAS BENZODIAZEPINAS



ESTRUCTURAS DE ALGUNAS

BENZODIAZEPINAS

(ANNOLT ET AL., 1986; RANPE ET AL., 1986; SCHOEEMAKER ET AL., 1983)

la visión borrosa, la diplopia, el vértigo y la ataxia. Si las personas durante el tratamiento toman alcohol y otros depresores centrales, que refuerzen su acción sedante, suelen presentar manifestaciones que llegan a ser graves. En caso de combinarse con otros medicamentos debe de cuidarse las reacciones individuales, ya que pueden potenciar su efecto (Ramírez-Rojas, 1975; Roche Scientific Service, 1970; Valium Roche Lab., 1978).

En recién nacidos y en personas psicóticas, produce una profunda y prolongada depresión del SNC, por lo cual, no se recomienda su uso en este tipo de pacientes. Algunos autores han señalado que la administración crónica del diazepam induce intentos suicidas (Ramírez-Rojas, 1975; Valium Scientific Service, 1978).

Por otra parte, el diazepam es capaz de producir una profunda relajación del músculo estriado, debido a la inhibición de los reflejos post-sinápticos a nivel del sistema reticular cerebral y medular. El diazepam no solo induce la relajación de músculos estriados como los pélvicos, tan importantes en la regulación de las contracciones que se producen durante el parto, sino que ejerce este efecto sobre el liso, por lo cual disminuye la duración del mismo, al acelerar y facilitar la relajación del miometrio, a la vez que controla la hiperventilación debido a su acción sobre las fibras mioepiteliales de los pulmones (Ramírez-Rojas, 1975; Roche Scientific Service, 1970; Valium Roche Lab., 1978).

A pesar de que en las farmacopeas se indica que el diazepam no debe utilizarse durante el embarazo o debe hacerse bajo supervisión médica, y los laboratorios farmacéuticos que lo produce, no recomiendan el uso de este medicamento durante el primer trimestre del embarazo, por no haberse descartado el riesgo de malformaciones congénitas, no es raro que hasta en la actualidad se administre en casos de

amenaza de aborto, placenta previa, pre-eclampsia, eclampsia, actividad prematura del útero, en pacientes embarazadas, en las que existen trastornos emocionales, psicológicos, neurodermatitis, asma, epilepsia e incluso traumatismos (Ramírez-Rojas, 1975; Valium Roche Lab., 1978).

El diazepam se absorbe muy rápidamente generalmente. En ratones machos adultos, a los que se les aplicaron por vía endovenosa dosis únicas de diazepam marcado con carbono 14, de 3 miligramos/kg de peso corporal con 12.3 microcuries/miligramos o clordiazepóxido con el mismo marcador, en dosis únicas de 15 miligramos/kg con 39.8 microcuries/miligramos, su absorción fué tan rápida que 14 segundos después se detectó en los grandes vasos, en los músculos cervicales, en los riñones, en las glándulas suprarrenales, en el cerebro y más tarde se observó captación del marcaje en el testículo (Van Der Klein E, 1969).

Cuando las benzodiazepinas son empleadas para el tratamiento de trastornos emocionales, se administran por vía oral. Como son compuestos débilmente básicos son absorbidos con mayor eficacia en un medio con pH ácido, como el del duodeno, sin embargo, hay diferencias al respecto, ya que el diazepam pasa con mayor rapidez al torrente sanguíneo, que otras benzodiazepinas como el oxazepam. La biodisponibilidad de éstos fármacos al ser aplicados por vía intramuscular es poco confiable. También se puede aplicar por vía endovenosa diluido en solución salina (Katzung, 1987; Ramírez-Rojas, 1975; Roche Scientific Service, 1970; Valium Roche Lab, 1978).

Su transporte en la sangre es un proceso dinámico, donde las moléculas del medicamento entran y salen de los tejidos a una velocidad que dependen de la circulación sanguínea, de los gradientes de concentración y de la permeabilidad de las células (Goodman et al., 1989).

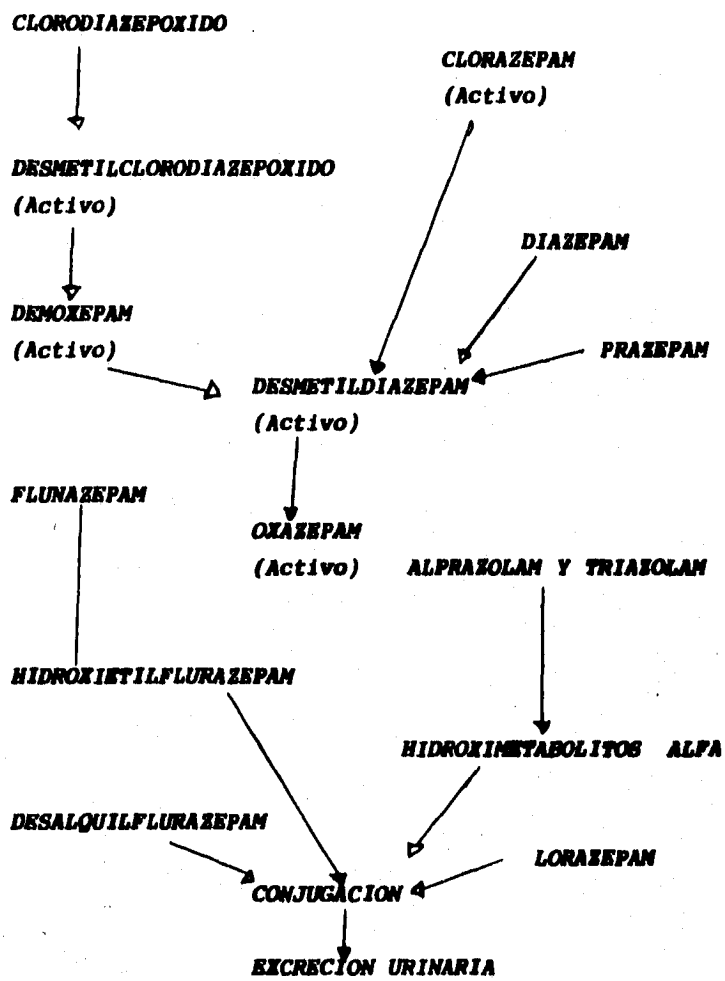
La liposolubilidad es un factor determinante de la velocidad de entrada de las benzodiazepinas al SNC. El diazepam, por tener esta propiedad en mayor grado que el clordiazepam y el lorazepam, por lo que tiene una latencia de acción menor sobre el SNC, que al que lo hacen los dos últimos (Goodman et al., 1989).

Las benzodiazepinas se fijan a las proteínas plasmáticas en una proporción del 85 al 95%, por lo cual, su velocidad de distribución es elevada. En conjunto tiene interacciones farmacocinéticas mínimas, aunque su metabolismo puede ser inhibido por otros fármacos como la cimetidina, el disulfiram, la isoniazida y los anticonceptivos orales. En los recién nacidos prematuros y en ancianos, el diazepam puede tener una vida media de 3 a 4 veces más prolongadas que en los adultos jóvenes y en los niños nacidos a término, en donde es de 48 a 96 h, aún cuando se ha encontrado en el cerebro de los últimos, 10 días después de su nacimiento (Goodman et al., 1989).

Por estudios "in vitro" se demostró que el metabolismo del diazepam es similar en el hígado humano, en el de la rata y en el del ratón. En el parénquima hepático se encuentran altas concentraciones de sus metabolitos, y en éste experimentan una N-desmetilación y una hidroxilación del carbono 3 para formar fundamentalmente el N-desmetildiazepam y el oxazepam. Todos los productos hidroxilados se conjugan con el ácido glucurónico, por lo que forman glucuronatos que son eliminados en la orina y en las heces fecales. Estos metabolitos excretados conservan su acción anticonvulsivante y son menos tóxicos que el diazepam. Este proceso se esquematiza en el esquema 2 (Idäpään Häikkilä et al., 1971; Mandelli et al., 1985; Simmons et al., 1983).

ESQUEMA 2.

- 11 -



METABOLISMO DE LAS BENZODIAZEPINAS

(GOODMAN ET AL., 1989)

Los estudios realizados por De Blas et al., en el cerebelo de rata utilizando el anticuerpo monoclonal a benzodiazepinas 21-7F9, demostraron que existen benzodiazepinas endógenas y que estas tienen una distribución similar a la que se encontró en algunas células gabaérgicas como en las células piramidales de la capa 5, las del hipocampo y las células granulosas del giro dentado (De Blas et al., 1987). Lo anterior sugiere que en la rata se producen sustancias similares a benzodiazepinas, que pudieran intervenir como reguladoras de los neurotransmisores gabaérgicos. Lo anterior sugiere que un inadecuado funcionamiento de este sistema de benzodiazepinas endógenas pudieran conducir a formas patológicas de ansiedad y epilepsia, que responden eficientemente a un tratamiento con benzodiazepinas sintéticas (Sangameswaran et al., 1985).

En cerebro de ratón se han encontrado que algunas neuronas tienen epítopes similares a las benzodiazepinas que son reconocidas por el anticuerpo monoclonal a benzodiazepinas 21-7F9, y que ésta molécula al ser obtenida por cromatografía de afinidad, inhibe la unión del flunitrazepam tritiado a los RBZDC, aunque se ha visto que éste mismo anticuerpo reacciona con los RBZDCP (Sangameswaran et al., 1985).

Estas moléculas similares a benzodiazepinas fueron encontradas en 5 cerebros humanos incluidos en parafina desde 1940, 15 años antes de que se sintetizaran las primeras benzodiazepinas, lo que sugiere que éstas son productos de síntesis natural o endógenas (Sangameswaran et al., 1985).

En cerebro de vaca mediante cromatografía de afinidad se aisló una sustancia parecida a la benzodiazepina, la que se identificó mediante espectrofotometría y cromatografía de alta resolución, se determinó como N-desmetildiazepam, existiendo varias explicaciones al respecto:

Que ésta benzodiazepina sea el producto de síntesis industrial, debido a que el N-desmetildiazepam y sus metabolitos se acumulen en cerebro, como resultado del consumo normal, que están presentes en el agua, comida animal o bien, proporcionarse intencionalmente al ganado (De Blas et al., 1987).

Que estas moléculas parecidas a las benzodiazepinas son productos sintetizados por mamíferos, microorganismos y plantas, que se consumen dentro de la dieta regular (De Blas et al., 1987).

Hay evidencias de que las benzodiazepinas endógenas son producidas en mamíferos, lo que se ha demostrado mediante técnicas de inmunoprecipitación con el anticuerpo monoclonal a benzodiazepinas 21-7F9, empleado en el cerebro, el hígado, el bazo y el riñón, en los cuales, se puso en evidencia que el péptido más abundante fué el de 100,000 kd, asociado a membrana sinaptosomal y en menor cantidad los péptidos de 70,000 y 30,000 kd. Al ser analizados por métodos de inmunoensayo, se comprobó que éstas moléculas eran parecidas estructuralmente a las benzodiazepinas, termoestables y resistentes a las proteasas (De Blas et al., 1987).

Otra evidencia de la producción natural de estas moléculas en mamíferos, fué aportada por los estudios realizados en la línea celular híbrida de neuroblastoma y glioma NG108-15 de ratón, mantenidas "in vitro", y procesadas mediante técnicas de inmunoprecipitación. Los péptidos obtenidos fueron similares a los encontrados en los tejidos de ratón. También en investigaciones realizadas por Manning et al., (1986), se identificó la presencia del N-desmetildiazepam en el suero de personas que nunca habían tomado benzodiazepinas. Asimismo se sabe que otro tipo de organismos como el hongo Penicillium cyclopius sintetiza benzodiazepinas (De Blas et al., 1987).

EFECTOS DEL DIAZEPAM 'IN VITRO' E 'IN VIVO'

Se han realizado numerosos estudios, para caracterizar los efectos producidos por el diazepam, tanto "in vitro" como "in vivo", y entre éstos destacan los de Stenchever et al. (1969). Estos autores observaron que en fibroblastos humanos cultivados con dosis de diazepam de 0.1, 1.0, 10 y 20 microgramos/ml, observaron que había un retardo en el crecimiento, un menor depósito de colágena, en comparación con los controles, y al microscopio electrónico de transmisión se encontró que existía un aumento de elementos membranosos que ocupaban grandes porciones del citoplasma. La cantidad de mitocondrias estaba incrementada al igual que los integrantes del complejo de Golgi, y cuerpos electrodensos. También era más abundante el retículo endoplásmico liso y el rugoso, que estaba constituido por cisternas dilatadas e irregulares. Las alteraciones celulares fueron similares en los tejidos cultivados con las tres dosis, sin embargo, hubo una relación dosis-dependiente con respecto al número de células afectadas (Staiger et al., 1970; Stenchever et al., 1969).

En cultivos de linfocitos humanos, se observó la presencia de rupturas cromosómicas, principalmente en los del grupo C y en el X. En un estudio "in vivo", sobre los efectos del diazepam en cromosomas humanos de los linfocitos de 23 pacientes, expuestos de 0.5 a 36 meses en dosis diarias que variaron entre de 0.5 a 30 mg, se registró la presencia de 15.3% aberraciones cromosómicas, entre las que se encontraban rupturas cromosómicas e isocromosomas. Dichas aberraciones

tuvieron una relación dosis-dependiente, ya que el paciente con mayor número de rupturas cromosómicas fué el que estuvo sometido a un tratamiento de 30 mg durante 18 meses. También se detectaron cromosomas tetrarradiales en pacientes a los que fueron sometidos a una dosis de 30 mg por dos semanas y a 15 mg cuatro semanas. Al descontinuar el uso del fármaco durante seis meses, las características cromosómicas de los linfocitos de la sangre retornaron a la normalidad (Stenchever et al., 1970).

Miernick (1986) hizo cultivos del alga verde Dunaliella bioculata, en agua salada sintética, cuyas divisiones mitóticas se sincronizaron mediante ciclos de luz-oscuridad de 12 por 12 h, y se les agregaron benzodiazepinas como el diazepam, el medazepam, el flunitrazepam y el clonazepam disueltas previamente en dimetilsulfóxido a concentraciones de 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. Cuando las drogas se agregaban al inicio del ciclo nocturno, sólo el diazepam y el medazepam aumentaban el volumen celular después de un tratamiento de 24 horas (Miernick et al., 1986).

Estudios de microscopio electrónico indicaron que la mayoría de las células tratadas, tanto de origen animal como vegetal, presentaban metafases anormales, mientras que las del control se dividieron. En las experimentales se vió que los cromosomas tenían la cromatina condensada de manera normal y los microtúbulos bien polimerizados. El huso fué unipolar, lo cual se relacionó con la inhibición de la separación

de los cuerpos basales al final de la profase, mientras que en la división celular la duplicación de los centriolos indujeron la formación de un huso bipolar que se elonga en la metafase (Anderson et al., 1981; Miernick et al., 1986; Staiger et al., 1970; Stenchever et al., 1970; Stenchever et al., 1969).

En ovocitos de ratón, cultivados en un medio Krebs-Ringer, a concentraciones de diazepam, de 1.0, 10, 30, 50 y 200 microgramos/ml incubados por 17 h, a 37°C, en una atmósfera con 5% de bióxido de carbono, se registró la presencia de vesículas germinales en metafase I o II, se observó que la mayoría de las células tratadas se detenían en la metafase I, que había formas anómalas, y que la inhibición de la meiosis era dosis-dependiente. La degeneración de los ovocitos podría deberse a un efecto tóxico, producido por las altas concentraciones del fármaco (Stenchever et al., 1981).

R E C E P T O R E S G A B A B

Algunas de las acciones de las benzodiazepinas en el SNC se deben a que se acoplan a los canales de calcio y potasio, por ejemplo: el diazepam y el flunitrazepam a concentraciones de 10^{-6} M inhiben las contracciones inducidas por el potasio y el calcio del músculo liso y de preparaciones de músculo atrial. En concentraciones micromolares de diazepam inhiben la depolarización inducida por la captación del calcio en sinaptosomas y la inducida por la liberación de dopamina en preparaciones de cuerpo estriado; también se tienen evidencias de que el diazepam y el Ro5-4864 reducen el potencial de acción de neuronas de las astas posteriores mantenidas "in vitro", asimismo el diazepam y midazolam bloquean los potenciales de acción mediados por calcio en las neuronas mioentéricas (Rampe et al., 1986).

Entre las funciones de los receptores GABA B está el estimular la liberación de corticotropina y de la hormona luteinizante (Bowery et al., 1989).

RECEPTORES GABA A

Como ya se mencionó, el diazepam facilita la transmisión gabaérgica en las neuronas del SNC mediante RBZDC, localizados en los canales del cloro de su membrana. El ácido gamma aminobutírico (GABA), es el neurotransmisor inhibitor más importante del SNC, de éste existen dos grandes grupos de RBZDC el A y el B (Tallman et al., 1985; Schwartz et al., 1985; Schoefield et al., 1987).

El GABA A también tiene un receptor, que con el de las benzodiazepinas forma el complejo receptor benzodiazepina-GABA, que sólo es una parte de los componentes de los canales del cloro, los cuales se abren o cierran de acuerdo al sitio del receptor que es estimulado. En particular las benzodiazepinas aumentan su frecuencia de apertura, en cambio los convulsivantes y moléculas como la pregnenolona, precursora de la testosterona, la picrotoxina, el butilciclofosforotionato (TBPS), las pirazolpiridinas y los esteroides, los cierran impidiendo la función gabaérgica, por lo que son clasificados como antagonistas de las benzodiazepinas y del GABA A (Tallman et al., 1985; Schwartz et al., 1985; Schoefield et al., 1987).

El complejo receptor benzodiazepínico-GABA A está formado por subunidades proteicas de diferentes tipos, entre las que existen dos alfa y dos beta, responsables de la sensibilidad al GABA, y cada una de sus moléculas es transcrita por un gen específico. Mediante

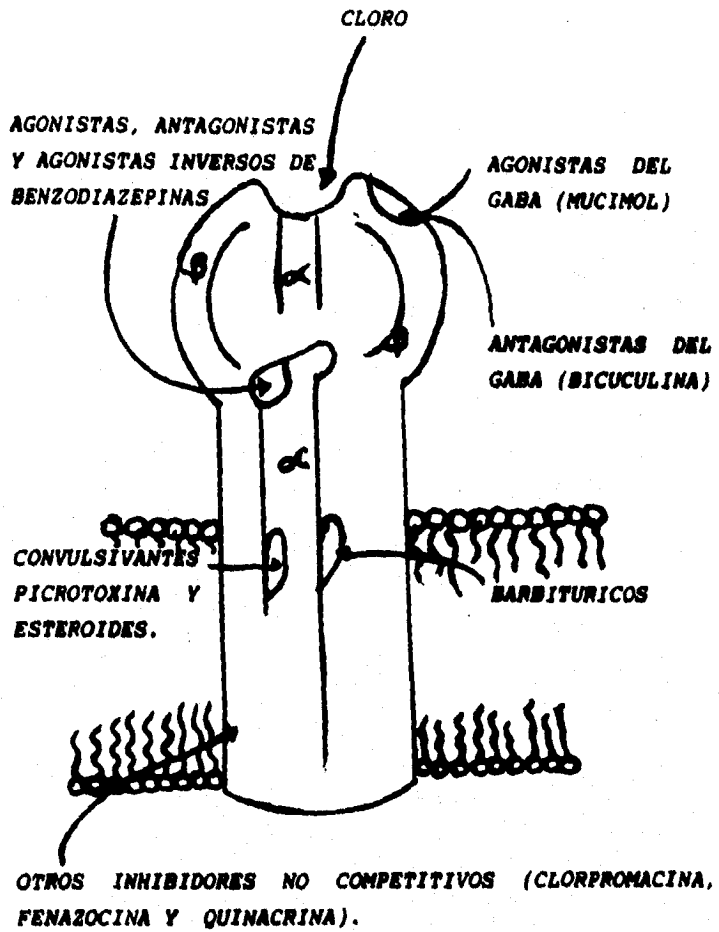
hibridación se ha determinado la existencia de una homología en la secuenciación de los aminoácidos de un 70% entre las alfa y de un 34% con las beta. No todos los complejos receptor GABA A nativos son sensibles a las benzodiazepinas, lo que parece indicar que algunos no tienen sitios de unión para éstas. Las subunidades alfa y beta del receptor GABA A son similares a la alfa del receptor nicotínico-acetilcolinérgico, el cual está formado por una subunidad alfa, dos beta, una gamma y una delta (Sieghart et al., 1989; Schwartz et al., 1989).

Las evidencias experimentales indican que las diferentes combinaciones de las subunidades alfa y beta, que conforman los receptores GABA A, producen diferente grado de sensibilidad al GABA, mientras que la asociación entre las subunidades alfa, beta y gamma, determinan su sensibilidad farmacológica (Sieghart et al., 1989).

Mediante los mismos experimentos se ha demostrado que en el canal del cloro, los cuatro dominios hidrofóbicos de las subunidades alfa y beta atraviesan la membrana y que las 16 hélices que los constituyen contribuyen a estabilizar sus paredes, para mantener una luz de 5.6 amstrongs. Los grupos aminos terminales se localizan en el lado extracelular y es el sitio en el que se localiza la señal peptídica de los receptores. Los grupos carboxilos cercanos al lado extracelular se relacionan funcionalmente con la fosforilación celular del AMP cíclico (Schoefield et al., 1987).

Otro tipo de complejo receptor GABA constituido por dos subunidades alfa y dos beta, tiene 26 cargas positivas y 4 negativas del lado extracelular, siendo que las cargas positivas en el inicio del canal del cloro, sirven como un filtro aniónico selectivo que aumenta la conductancia, lo que concuerda con el comportamiento reversible del canal del cloro, encontrando dos sitios de unión a aniones acoplados a éstos. El esquema de éste complejo benzodiazepina-GABA A se ejemplifica en el esquema 3 (Tallman et al., 1985; Schoefield et al., 1987)

Los sitios de unión a agonistas y antagonistas de las benzodiazepinas probablemente se localizan en los dominios amino terminales, que contienen un total de 10 sitios de glicosilación por complejo receptor GABA A. Lo que se apoya en la evidencia de que la glicosilación del GABA modifica la unión de los agonistas y antagonistas de las benzodiazepinas, mientras que la unión del GABA a la subunidad beta produce cambios conformacionales del canal, exponiendo las cargas positivas al inicio de éste, lo que facilita la conductancia del cloro. Otras regiones del canal tienen sitios de fosforilación (Schoefield et al., 1987).



RECEPTOR BENZODIAZEPINA-GABA-A

SCHWARTZ ET AL., 1988).

RECEPTORES BENZODIAZEPINICOS PERIFERICOS

Las benzodiazepinas además de actuar a nivel del SNC, lo hacen en otros tejidos del cuerpo mediante receptores benzodiazepínicos periféricos (RBZDP) que se localizan en la membrana externa de las mitocondrias, asociados a sus canales de calcio y potasio, que al igual que los del cloro de las neuronas, los activan o inactivan. Estos sitios de unión están conformados por un complejo de proteínas transmembranales, que constituyen los canales aniónicos dependientes del voltaje, con una apertura de poro de alrededor de 15 amstrongs, por donde son transportados los metabolitos (Anholt et al., 1986; Anholt, 1986; Schwaiger et al., 1983; Verma et al., 1989).

Los RBZDP tienen una configuración prácticamente igual a la de los GABA B centrales, y se demostró su presencia en el riñón, el corazón, el pulmón, las glándulas salivales, la lengua y en glándulas endócrinas como las suprarrenales, la pituitaria y en los testículos (Anholt et al., 1986; Anholt, 1986; Rampe et al., 1986).

En relación con los órganos reproductores, Anholt et al. (1986), mediante técnicas autorradiográficas detectaron en el testículo la presencia de abundantes RBZDP en el tejido intersticial, en donde se encuentran las células de Leydig, responsables de la producción de la testosterona, y en menor proporción en la zona de los túbulos seminíferos ocupada por el epitelio germinal y por las células de Sertoli, pero no los pudieron evidenciar en el lumen. Al emplear técnicas citoquímicas en el testículo, no lograron apreciar la monoamin-oxidasa, que es el marcador de la membrana externa de las mitocondrias, no obstante, éstos resultados no son confiables, debido a las dificultades que los autores tuvieron para obtener las fracciones subcelulares puras (De Souza et al., 1985; Anholt et al., 1986; Anholt et al., 1985).

Sin embargo, otros investigadores al utilizar un agonista benzodiazepínico, denominado Ro5-4864 marcado con tritio, en ensayos sobre su unión específica a la fracción mitocondrial de células intersticiales observaron una relación lineal entre la unión específica del Ro5-4864 y las proteínas membranales, de hasta 150 microgramos por ensayo, que fué óptimo cuando se realizó a 0°C. Alcanzó el equilibrio después de 90 minutos, fué saturable y totalmente reversible al agregar 10 micromolas de Ro5-4864 o de PK11195, otro agonista de RBZDP. Por análisis de Scatchard determinaron la presencia de una sola población de sitios de unión. Lo que comprueba que en la fracción mitocondrial de las células intersticiales de ratas, hay una cantidad elevada de RBZDP (Calvo et al., 1990; Gavish et al., 1986).

Cuando las ratas fueron hipofisectomizadas, los testículos experimentaron una reducción del 80% de su peso, debida a la atrofia de las células intersticiales y del epitelio germinal, la cantidad de RBZDP se redujó de 5 a 6 veces, y los sitios de unión se saturaban con el Ro5-4864, lo que permitió concluir que la cantidad de RBZDP testiculares depende de la actividad trófica de la hipófisis (Anholt et al., 1985).

Gavish et al. (1986), al aplicar por vía subcutánea, a ratas, dosis de estradiol de 2 mg/kg de peso corporal, durante 10 días, provocó un descenso del 43% de la población de RBZDP testiculares sin afectar la constante de disociación, ni el peso testicular.

Cuando se dió un tratamiento crónico intraperitoneal de diazepam de 3 mg/kg de peso corporal, durante 14 días, se encontró que en el testículo disminuyeron significativamente los niveles plasmáticos de testosterona, que los de HL no cambiaron y hubo un descenso del 37% del número de RBZDP, y cuando se administró una sólo dosis igual del fármaco los

niveles plasmáticos de testosterona incrementaron significativamente al doble y no se modificaron los de HL, ni los de RBZDP. Con el mismo tratamiento más concentraciones "in vitro", de 10 a 100 uM de Ro5-4864 produjo una leve estimulación esteroideogénica (Calvo et al., 1991).

Wilkinson et al. (1980), administraron a ratas un tratamiento crónico de diazepam de 50 mg/kg de peso corporal, durante 10 días, por vía intraperitoneal, obtuvieron resultados contradictorios, ya que no encontraron modificaciones en el peso de los testículos, ni de la pituitaria, ni de la próstata, y los niveles de la testosterona y HL permanecieron constantes, aunque detectaron que el Valium produce un incremento de los RBZDC. Tejido testicular obtenido de animales sometidos al mismo tratamiento cuando fué sometido "in vitro", a concentraciones de 0.3, 1.0 y 3.0 ng de HL no experimentó cambio alguno en la secreción de testosterona. Al incubar los cultivos con diferentes dosis de Valium, la de 2.4×10^{-4} M elevó significativamente la secreción de testosterona.

Estos datos concuerdan con los obtenidos por Ritta et al. (1989), quienes agregando el Ro5-4864, en dosis de 10^{-9} y 10^{-5} M a suspensiones de células intersticiales, mantenidas durante 3 horas, provocaron un aumento de la producción basal de la testosterona e incorporando de 0.0001 a 1,000 mIU de la hormona gonadotropina coriónica (hGC), más dosis de Ro5-4864 de 10^{-7} M potenció el efecto de las gonadotropinas. Además, se demostró una relación dosis-dependiente del Ro5-4864, en la producción androgénica basal y la estimulada por la hGC, lo que confirma que las benzodiazepinas actúan sobre las células de Leydig incrementando la producción de testosterona. En las muestras incubadas con dosis de benzodiazepinas, la testosterona no se produjo en dosis menores de entre 10^{-6} y 10^{-8} M. De éstos experimentos se deduce que la producción de

testosterona puede ser estimulada por el diazepam y el Ro5-4864, en ausencia de hormonas hipofisiarias, aunque éstas potencian su acción.

Por otra parte Arthaud et al.(1981), demostraron el efecto directo de dosis elevadas de 1,4-benzodiazepina denominada Sch-15698, sobre la morfología testicular de ratas, mediante la administración oral única en dosis de 630, 1000, 1580 y 2500 mg/kg/de peso corporal. Las principales alteraciones histológicas detectadas fueron la marcada atrofia testicular y una disminución evidente del número de células germinales.

Investigaciones similares de Means et al. (1982), demostraron que otra 1,4-benzodiazepina Sch-32855, administrando por vía oral a perros Beagle adultos, en dosis diarias de 30, 100 y 300 mg/kg/de peso corporal, durante dos semanas, se encontró que en el animal que recibió dosis de 100 mg/kg/de peso corporal, la lámina propia y la membrana basal de los túbulos seminíferos estaban engrosadas, sólo se observaron algunas espermatogonias, había vacuolización del citoplasma de las células de Leydig y de las de Sertoli, encontraron restos de células necróticas en la luz de éstos, siendo más amplia que la de los testigos. En el tratado con 300 mg/kg/de peso corporal, se observaron células necróticas y no se pudieron identificar espermatogonias, existiendo un menor número de capas celulares distribuidas de manera diferente a las del grupo control, por lo que la luz tenía una mayor amplitud. Los efectos fueron similares pero menos severos en el animal tratado con 30 mg/kg/de peso corporal.

Investigaciones realizadas por Arthaud et al.(1981), con la benzodiazepina Sch-15698 aplicadas a ratas por vía oral, en dosis de 630, 1000, 1580 y 2500 mg/kg de peso corporal, produce una disminución en el peso de los testículos, de 18%, 33%, 37% y 57% respectivamente, 14 días

después del tratamiento. Asimismo éste tratamiento en dosis de 2500 mg/kg de peso corporal produjo alteraciones histológicas de los túbulos seminíferos y un descenso del peso de las vesículas seminales. Los mismos animales fueron apareados con hembras no tratadas para evaluar el índice de fertilidad por medio de la presencia de tapón vaginal o de espermatozoides en frotis vaginales, con lo cual probaron que la conducta sexual de los machos era normal. Sin embargo, disminuyó el número de embriones vivos por hembra apareada con los machos tratados, mantenidos de dos a seis semanas en reposo después de haber concluido el tratamiento, lo que sugiere podría ser causado por las alteraciones testiculares.

Por otro lado, Means et al. (1982), al utilizar la benzodiazepina de Sch-32855, en dosis orales de 30, 100 y 300 mg/kg de peso corporal, durante dos semanas, encontraron que el peso de los testículos disminuyó siendo de 12.4, 4.2 y 12.8 g comparando con el del control de 13.7 g.

Argüelles et al. (1975), al medir los niveles plasmáticos de testosterona detectaron un aumento significativo en un grupo de personas de 35 a 55 años de edad, que tomaron diazepam en dosis diarias de 10-20 mg/kg de peso corporal, durante dos semanas y que se redujeron de manera no significativa los 11-hidroxicorticoides, aún cuando las personas no estaban bajo tensión emocional. Probablemente el incremento de los niveles plasmáticos de la testosterona se deban a la acción del diazepam sobre el metabolismo enzimático que se lleva a cabo en los microsomas hepáticos. Los resultados confirman la existencia de cambios endócrinos asociados al consumo de diazepam.

H I P O T E S I S

El diazepam administrado a ratones adultos, altera la morfología de las células de Leydig y la del epitelio germinal.

O B J E T I V O S.

1.- Analizar los efectos del diazepam sobre la morfología de las células de Leydig y las del epitelio germinal.

2.- Comparar mediante la digitalización de imágenes de las preparaciones histológicas, y la aplicación de pruebas estadísticas, el área ocupada por las células de Leydig, la del epitelio germinal y el diámetro de los túbulos seminíferos, con respecto al de los controles, y entre los grupos de diazepam, sin y con reposo.

3.- Mediante análisis morfométrico, definir los efectos del diazepam en las dimensiones del núcleo, y del citoplasma de las células de Leydig, con respecto a los controles. Determinar si existen diferencias entre los dos grupos de diazepam, sacrificados al concluir el tratamiento o nueve semanas después.

4.- Relacionar el contenido de inclusiones lipídicas de testosterona en las células de Leydig, con posibles modificaciones fisiológicas.

Se utilizaron 90 ratones de la cepa CD-1, de dos meses de edad, de 30 a 32 g de peso, los cuales se mantuvieron en un ambiente controlado a una temperatura de 20 a 22 °C, con un fotoperiodo de 12 h, iniciando a las 7 am, se les dió agua esterilizada y comida purina chow esterilizable "ad libitum".

Los machos se aparearon con hembras de la misma edad de 28 a 30 g de peso, para probar su fertilidad y descartar de antemano, problemas en los animales, que no tienen ninguna relación con la aplicación del diazepam. Lo anterior se demostró cuando en las hembras se observó la presencia de tapón vaginal, que es el indicio de haber sido inseminadas.

Los machos fértiles se dividieron en los siguientes seis grupos, de quince individuos. Los tres primeros grupos fueron sacrificados en una atmósfera de bióxido de carbono, al final del tratamiento, por lo que se denominan grupos sin reposo.

1.- Grupo diazepam, sin reposo (DZSR). Inyectados subcutáneamente con dosis únicas diarias de diazepam de 2.7 mg/ kg/ de peso corporal, durante 60 días/ 5 días a la semana, para simular que una persona sujeta a tensión emocional durante los días hábiles de la semana, tuviera la necesidad de tomar el fármaco durante éste periodo y el fin de semana al estar relajado, lo suspendiera sin que esto le ocasionará problemas, ya que el diazepam tiene una vida media de 48 a 96 h, y el efecto se mantiene. El diazepam fué obtenido en ampollitas de Valium de 10 mg, en la farmacia de las que se tomaron directamente 16 microlitros con jeringas Hamilton de 50 microlitros.

2.- Grupo control salino, sin reposo (SSR). Inyectados por la misma vía y dosis únicas diarias de 16 microlitros de solución salina al 0.9%, durante el mismo periodo y en las mismas condiciones que del grupo 1.

3.- Grupo control no tratado, sin reposo (NTSR). No fueron tratados y se mantuvieron en las mismas condiciones experimentales, con la finalidad de comparar la histología de este grupo con el control salino.

Los siguientes tres grupos después del término del tratamiento, se mantuvieron en reposo durante nueve semanas, con el propósito de que el fármaco se eliminará por completo, que las células del epitelio germinal fueran las producidas después de un nuevo ciclo de espermatogénesis y de esta manera cualquier alteración histológica testicular sería debida al efecto de largo plazo del diazepam. Estos grupos se denominan grupos con reposo. También se sacrificaron de la misma manera.

4.- Grupo diazepam, con reposo (DZCR). Tratado por la metodología empleada para el grupo 1, diazepam sin reposo, pero sacrificado nueve semanas después de la aplicación del fármaco.

5.- Grupo control salino, con reposo (SCR). Inyectado igual que el 2 control salino, sin reposo, y sacrificado nueve semanas después de haber suspendido la aplicación del suero fisiológico.

6.- Grupo control no tratado, con reposo (NTRC). No tratado y mantenido por el mismo periodo que los grupos 4 y 5, sacrificándolos simultáneamente con esos animales.

T A B L A 1.

GRUPO	TRATAMIENTO	OBTENCION DE MUESTRAS	NUMERO DE RATONES
1 (DZSR)	Diazepam 2.5 mg/kg/día/ de peso corporal, durante 60 días discontinuos 5 días a la semana.	Término del tratamiento.	15
2 (SSR)	16 µl Sol. salina 0.9%/ día durante 60 días dis- continuos, 5 días a la semana.	Término del tratamiento.	15
3 (NTSR)	No recibió tratamiento.	Simultáneamente con los de los grupos 1 y 2.	15
4 (DZCR)	Diazepam 2.5 mg/kg/día/ de peso corporal, duran- te 60 días discontinuos 5 días a la semana.	9 semanas después del término del tratamiento.	15
5 (SCR)	16 µl Sol. salina 0.9%/ día durante 60 días dis- continuos, 5 días a la semana.	9 semanas después del término del tratamiento.	15
6 (NTCR)	No recibió tratamiento.	Simultáneamente con los de los grupos 4 y 5.	15

LEYENDA:

DZSR Diazepam sin reposo.

SSR Control salino sin reposo.

NTSR Control no tratado sin reposo.

DZCR Diazepam con reposo.

SCR Control salino con reposo.

NTCR Control no tratado con reposo.

Los testículos de todos los animales fueron fijados en formol amortiguado a un pH de 7.3 y en los líquidos de zenker, carnoy y bouin, se deshidrataron en alcoholes graduales, se incluyeron en parafina de 56 a 58 °C, se hicieron cortes de 5 micrometros de espesor, que fueron teñidos por los métodos de hematoxilina-eosina, y la técnica tricrómica de Mallory. Para el estudio morfológico y para colorear los ácidos nucleicos y las membranas basales se empleó las técnicas de Feulgen, y para identificar y observar la distribución del ADN y el ARN se aplicó la técnica de naranja de acridina. Las observaciones se hicieron en un microscopio de comparación Reichert y en un polyvar de Reichert, en éste se utilizó luz ultravioleta y se obtuvieron las fotomicrografías de los tejidos. Mediante un sistema automatizado de digitalización de imágenes, que tiene el programa de ipplus.2, del fotomicroscopio Zeiss, se midieron el diámetro de los túbulos seminíferos, el área que ocupan las células de Leydig, el diámetro menor y mayor del núcleo, así como el diámetro mayor del citoplasma de éstas mismas células, y el área ocupada por el epitelio germinal dentro de los túbulos seminíferos por $\mu\text{m}^2/\text{mm}^2$ de tejido.

Los datos fueron procesados para determinar si existían diferencias estadísticamente significativas. A continuación se menciona que pruebas fueron realizadas:

- 1.- Para el área ocupada por las células de Leydig. ANOVA (1 cola) y "t" de Student.

2.- Para el diámetro menor y mayor del núcleo de las células de Leydig. ANOVA (1 cola), Dunn y Student-Newman-Keuls.

3.- Para el diámetro mayor del citoplasma, de las células de Leydig. ANOVA (1 cola), Dunn y Student-Newman-Keuls.

4.- Para el diámetro de los túbulos seminíferos. ANOVA (1 cola) y Dunn.

5.- Para el área ocupada por el epitelio germinal. Student-Newman-Keuls.

R E S U L T A D O S.

Entre la estructura histológica de los testiculos de los ratones de los grupos controles: 2-SSR, 5-SCR, 3-NTSR y 6-NTCR, no se apreciaron diferencias morfológicas, de manera que al hacer la comparación del tejido testicular de los animales de los grupos tratados con diazepam, se hace indistintamente con la de cualquiera de los grupos mencionados, que en adelante serán denominados como grupo control.

Tubulos Seminiferos:

Al observar las características de los túbulos seminiferos a bajo aumento, se apreció que su tamaño fué distinto y mediante un digitalizador de imágenes se comprobó que en los animales de los grupos 1-DZSR y 4-DZCR, fué mayor ($p < 0.05$), que el de los grupos controles (Figuras 1A y 1B). En el grupo 1-DZSR y en el 4-DZCR fué $202.39 \pm 27.61 \mu\text{m}$ y $202.1 \pm 31.01 \mu\text{m}$, respectivamente, mientras que en el 2-SSR fué de $142.65 \pm 10.15 \mu\text{m}$, el 3-NTSR fué de $169.12 \pm 23.01 \mu\text{m}$, el 5-SCR fué de $153.73 \pm 24.92 \mu\text{m}$ y el 6-NTCR fué de $160.89 \pm 33.19 \mu\text{m}$ (Cuadros 1, 2, y gráfica 1).

Epitelio Germinal:

El epitelio germinal de los grupos controles y tratados presentó dos poblaciones celulares:

a) una no proliferativa o células de soporte, denominadas células de Sertoli y, b) otra proliferativa o células germinales, que se localizaron de la periferia de los túbulos seminiferos hacia al lumen.

FIGURA 1.

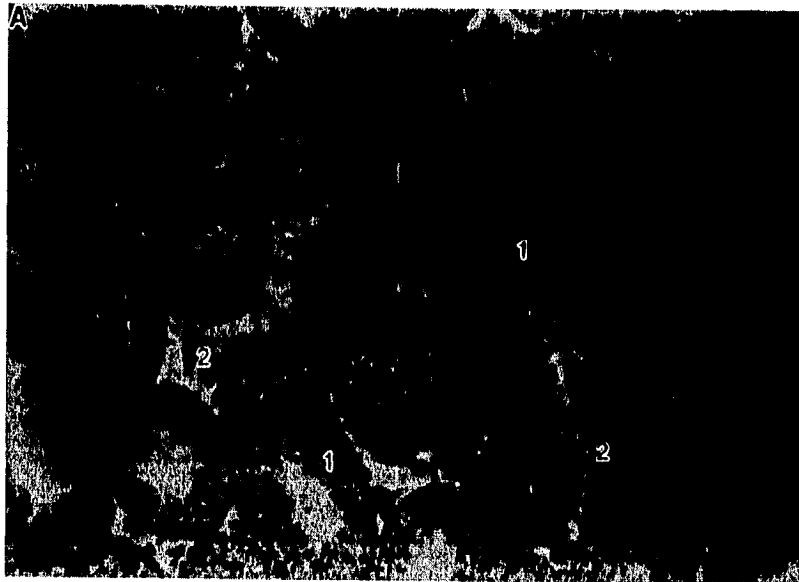
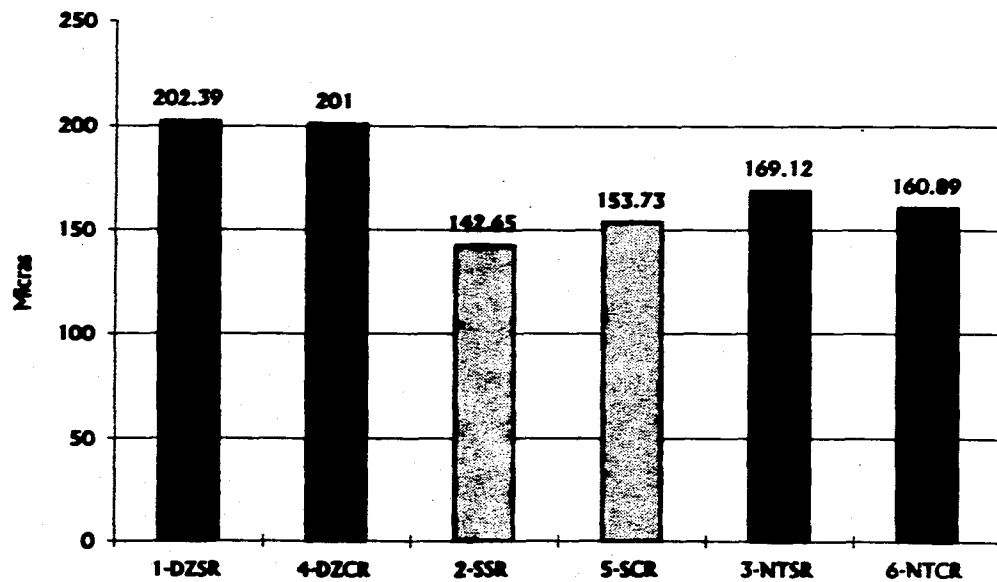


FIGURA 1.

Fotomicrografías de cortes histológicos de testículos de ratón. En A, los túbulos seminíferos procedentes de un animal del grupo 5-SCR, presentan el epitelio germinal (1), con características normales, al igual que la cantidad y la morfología de las células de Leydig (2). En B, el corte pertenece al grupo experimental 4-DZCR, con los túbulos seminíferos de mayor diámetro, el epitelio germinal de menor espesor y los acúmulos de células de Leydig ocupan una mayor área que la del control. Hematoxilina-eosina, 62.5 X.

DIÁMETRO DE LOS TÚBULOS SEMINÍFEROS



Tratamiento

1-DZSR - Tratado sin reposo
4-DZCR - Tratado con reposo
2-SSR - Control salino sin reposo
5-SCR - Control salino con reposo **GRAFICA 1.**
3-NTSR - Control no tratado sin reposo
6-NTCR - Control no tratado con reposo

En el testículo de los ratones controles, el epitelio germinal está formado por células epiteliales, dispuestas más o menos en forma concéntrica. De la periferia hacia el lumen se encontraron las espermatogonias, los espermatocitos primarios, los espermatocitos secundarios, las espermatidas recién formadas, en espermiogénesis, y los espermatozoides, con características normales, en su citoplasma como en el núcleo (Figuras 2A y 3A).

Las células de Sertoli tenían el citoplasma fibrilar y sus núcleos normales. Se pueden subdividir en tres porciones: la basal, la intermedia y la luminal. En la basal, más ancha, se localizó el núcleo de forma irregular, en contacto con las espermatogonias de todos los tipos y con espermatocitos primarios en leptoteno, que representan el 30% de las células germinales (Figuras 2A y 3A).

En el testículo de los ratones tratados, las células de Sertoli y las germinales estaban vacuoladas y con frecuencia presentaron gránulos basófilos. Se observaron espacios intercelulares abundantes, incremento en la talla de las células y del núcleo. Además fue evidente el aumento de la basofilia en la cromatina y la mayor cantidad de nucleoplasma, con respecto al de los controles (Figuras 2A y 3A).

Los túbulos seminíferos de los animales de los grupos controles (Figura 3A), presentó la túnica propia de un aspecto normal, en cambio en los grupos tratados sacrificados al término, como en los sacrificados nueve semanas después de concluir el tratamiento, la túnica propia estaba engrosada (Figura 3B).

FIGURA 2.

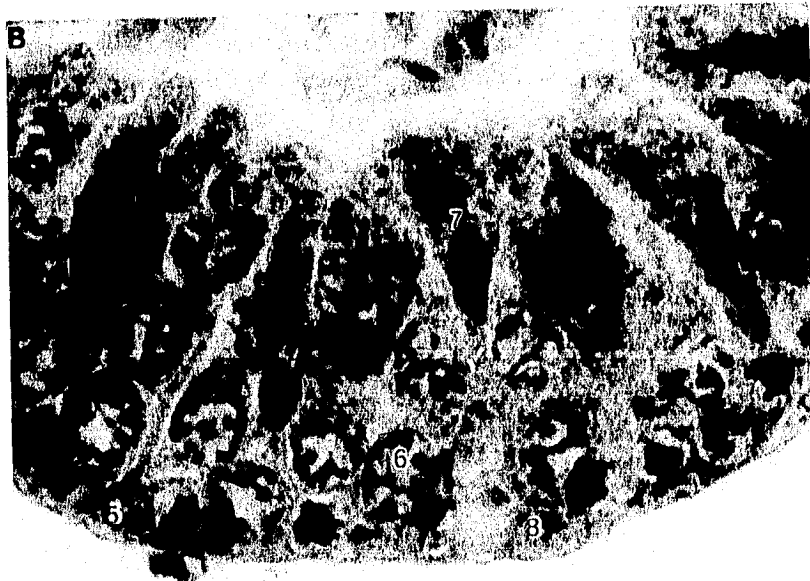


FIGURA 2.

Fotomicrografías del epitelio germinal de ratón. En A, de un animal control 3-NTSR, con las espermatogonias (5), los espermatocitos primarios (6), las espermátidas (7), en espermiogénesis, incluidos en el citoplasma de las células de Sertoli (8), son normales. En B, precedente de un animal del grupo 1-DZSR, se aprecian las espermatogonias, los espermatocitos primarios y las espermátidas con la cromatina intensamente acidófila y el nucleoplasma claro. En el citoplasma hay vacuolas y gránulos basófilos distribuidos irregularmente, tanto en las células germinales como en las de Sertoli. Entre las células del epitelio germinal se aprecian espacios intercelulares muy amplios. Hematoxilina-eosina, 625 X.

FIGURA 3.

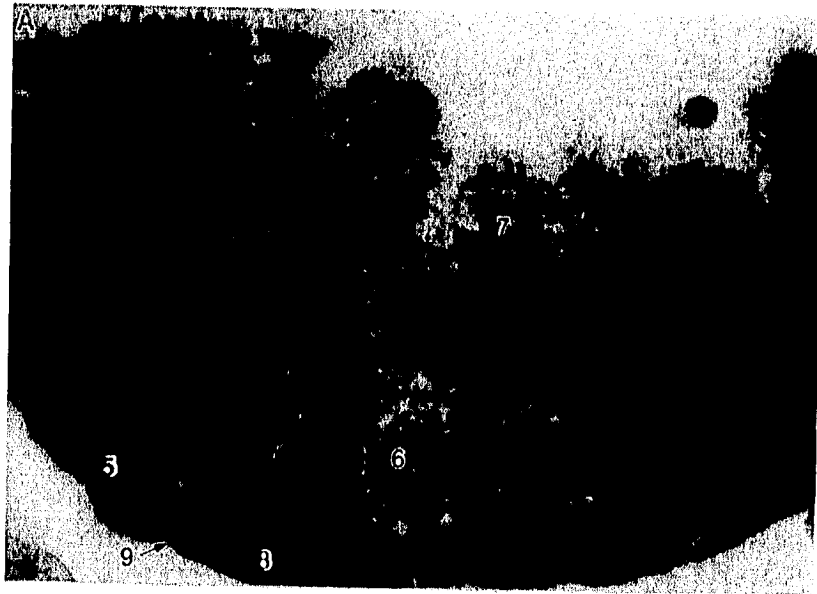


FIGURA 3.

Epitelio germinal de ratones. En A, pocedente del grupo 6-NTCR, las espermatogonias (5), los espermatoцитos primarios (6), las espermátidas (7), las células de Sertoli (8) y de la lámina basal (9) presentan características normales. En B, el epitelio de un ejemplar 4-DZCR, las células germinales tienen gránulos basófilos, citoplasma acidófilo vacuolizado y los espacios intercelulares son amplios. La lámina basal es de mayor espesor (9). Hematoxilina-eosina, 625 X.

El área ocupada por el epitelio germinal dentro de los túbulos seminíferos, en los animales de los grupos 1-DZSR y 4-DZCR, fué más angosta que en los animales de los cuatro grupos controles (Figuras 1A y 1B). En el grupo 1-DZSR fué $733.45 \pm 124.27 \mu\text{m}^2/\text{mm}^2$ y el 4-DZCR fué de $764.77 \pm 37.49 \mu\text{m}^2/\text{mm}^2$, mientras que el 2-SSR fué de $892.09 \pm 128.77 \mu\text{m}^2/\text{mm}^2$, el 5-SCR fué de $881.90 \pm 12.46 \mu\text{m}^2/\text{mm}^2$, el 3-NTSR fué de $887.86 \pm 34.30 \mu\text{m}^2/\text{mm}^2$ y el 6-NTCR fué de $899.28 \pm 26.95 \mu\text{m}^2/\text{mm}^2$ (Cuadros 3 y 4, y gráfica 2). Las diferencias fueron estadísticamente significativas ($p \leq 0.05$).

Células de Leydig.

Entre los túbulos seminíferos de los ratones, tanto de los grupos controles como de los tratados, se encontró el tejido intersticial constituido por las células de Leydig, y escasos fibroblastos (Figuras 3A y 3B).

En los controles, 2-SSR, 3-NTSR, 5-SCR y 6-NTCR, las células intersticiales o de Leydig, constituyeron acúmulos de diferente forma y tamaño, distribuidos de manera irregular, entre el escaso tejido conectivo laxo, del estroma, rico en vasos sanguíneos. Las células intersticiales presentaron forma y talla variable, algunas fueron esféricas y otras poliédricas o irregulares (Figuras 4A y 5A).

Su núcleo fué esférico, ovoide, o de contorno irregular. Los gránulos de heterocromatina estaban bien definidos y distribuidos típicamente, entre el nucleoplasma ligeramente basófilo y con uno a tres nucléolos grandes. El citoplasma, en general, fué abundante, acidófilo y con inclusiones lipídicas claras, de tamaño variable (Figuras 4A y 5A).

FIGURA 4.



FIGURA 4.

Fotomicrografía de las células de Leydig (2), de un ratón. En A, procedentes del grupo 3-NTSR, en donde el citoplasma acidófilo, es poco abundante, y tiene inclusiones lipídicas relativamente pequeñas. Sus núcleos esferoidales y el nucleoplasma presentan aspecto normal. En B, de un animal 1-DZSR, el citoplasma muestra inclusiones lipídicas pálidas, de gran tamaño, que probablemente corresponden a gránulos de testosterona, los cuales le dan al citoplasma un aspecto vacuolado. Entre las inclusiones se localizan gránulos y una red basófila, dispersa irregularmente. Los núcleos son esferoidales u ovoides. Hematoxilina-eosina, 625 X.

FIGURA 5.

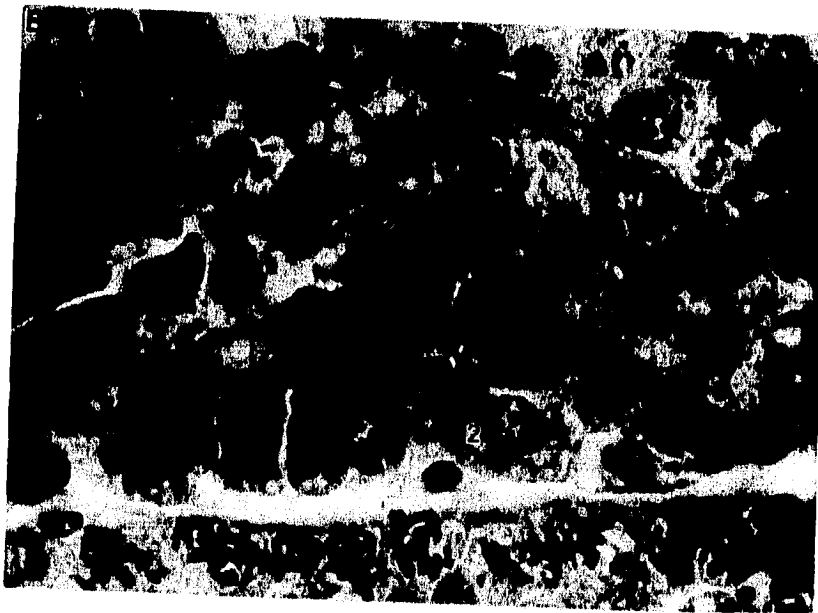


FIGURA 5.

Fotomicrografía de células de Leydig (2). En A, las de un animal del grupo 6-NTCR, las características morfológicas y la cantidad son normales. En B, las de un ratón del grupo 4-DZCR, la morfología y la abundancia están modificadas. La acidofilia del citoplasma y en las inclusiones lipídicas son evidentes. Hematoxilina-eosina, 625 X.

CUADRO 3. PROMEDIO DEL AREA OCUPADA POR EL EPITELIO GERMINAL EN $\mu\text{m}^2/\text{mm}^2$ DE LOS TUBULOS SEMINIFEROS DE LOS RATONES SACRIFICADOS AL TERMINO DEL TRATAMIENTO.

EPITELIO GERMINAL

Grupo	$\bar{X}(\mu\text{m}^2/\text{mm}^2) \pm \text{D.S.}$
1. Diazepam	733.451 \pm 124.270027
2. Salino	892.0858 \pm 128.766585
3. No Tratado	887.8558 \pm 34.29668

N = 10 \bar{X} = promedio D.S. = Desviación
p < 0.05 Estandar.

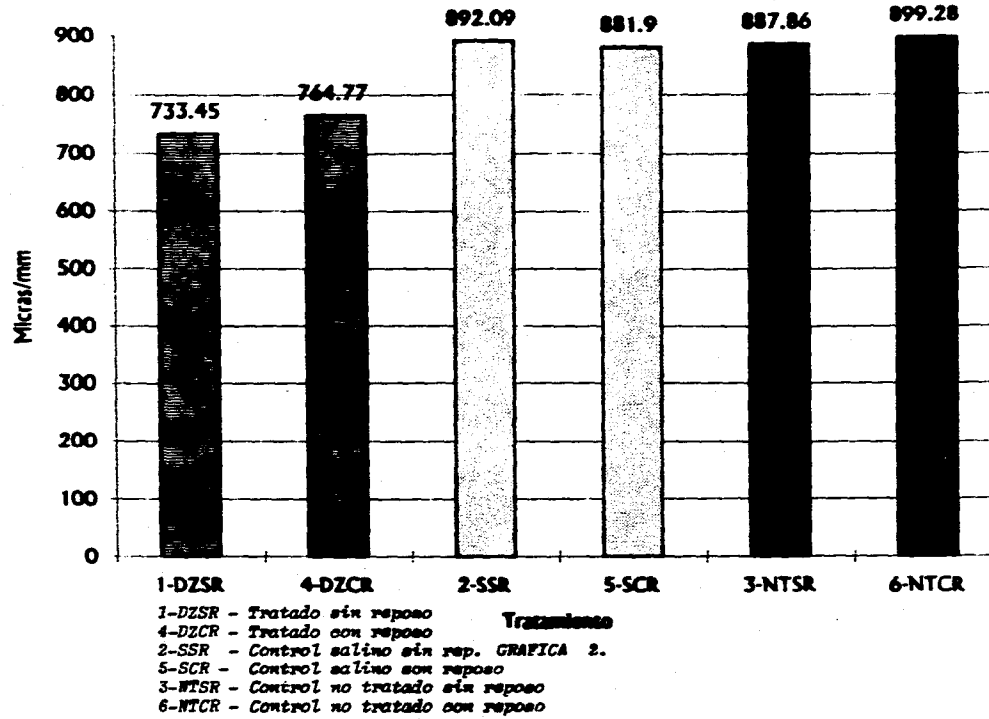
CUADRO 4. PROMEDIO DEL AREA OCUPADA POR EL EPITELIO GERMINAL EN $\mu\text{m}^2/\text{mm}^2$ DE LOS TUBULOS SEMINIFEROS DE LOS RATONES SACRIFICADOS 9 SEMANAS DESPUES DE CONCLUIDO EL TRATAMIENTO.

EPITELIO GERMINAL

Grupo	$\bar{X}(\mu\text{m}^2/\text{mm}^2) \pm \text{D.S.}$
4. Diazepam	764.7704 \pm 37.49068
5. Salino	881.9018 \pm 12.45693
6. No Tratado	899.276 \pm 26.9526

N = 10 \bar{X} = promedio D.S. = Desviación
p < 0.05 Estandar.

ÁREA OCUPADA POR EL EPITELIO GERMINAL



En el testículo de ratones tratados, sacrificados al concluir el tratamiento, como en los sacrificados nueve semanas después del término de la administración de diazepam, las células intersticiales o de Leydig, formaron acúmulos de mayor tamaño que los observados en los animales del grupo control. Fué notable un incremento en la cantidad de citoplasma y en la talla del núcleo. El citoplasma abundante fué acidófilo, con aspecto vacuolado, debido a la presencia de una gran cantidad de inclusiones lipídicas, con una ligera acidofilia. En el citoplasma que rodeaba a las inclusiones lipídicas se identificaron numerosos gránulos basófilos y una red con la misma afinidad tintórea (Figuras 4B y 5B).

La técnica de Feulgen y la de naranja de acridina, estimulada con luz ultravioleta, permitieron apreciar la estructura normal del citoplasma y el núcleo de las células germinales y de las de Leydig. En los animales de los grupos control, con la tinción de naranja de acridina, se observaron gránulos de color naranja-rojizo, que indicaron la presencia de ácido ribonucleico en el citoplasma y en el núcleo los grumos de cromatina tomaron una tinción amarillo-verdosa, lo que permitió observar su distribución típica (Figuras 6A y 7A).

En los animales 1-DZSR y 4-DZCR, con la técnica de naranja de acridina se pudo destacar con mayor nitidez la presencia de abundantes espacios intersticiales, los dos tipos de células, el aspecto vacuolado del citoplasma, la mayor cantidad de ácido ribonucleico, que coincide con la distribución de los gránulos basófilos, identificados en el citoplasma, al teñirlos, con la coloración de hematoxilina-eosina (Figuras 4B, 5B, 6B y 7B). En los núcleos de las mismas células, el ácido desoxirribonucleico, también se tiñó de color amarillo-

FIGURA 6.

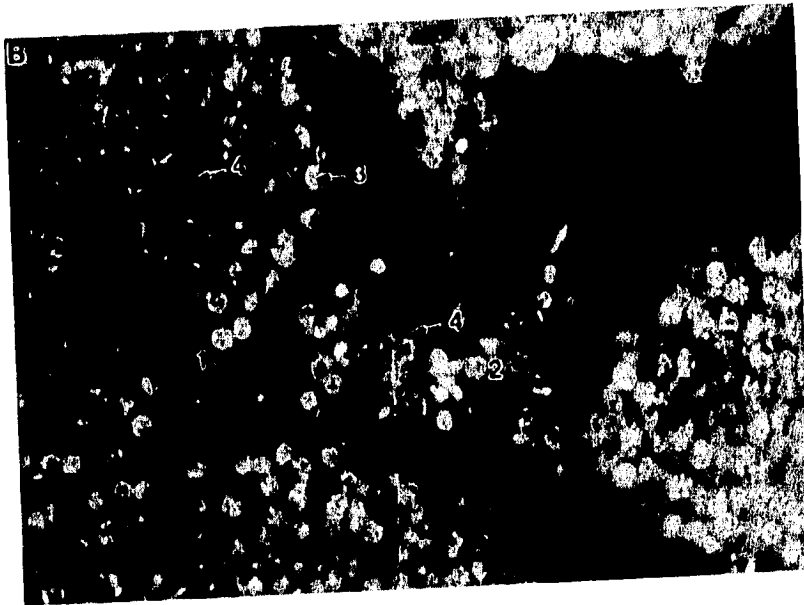
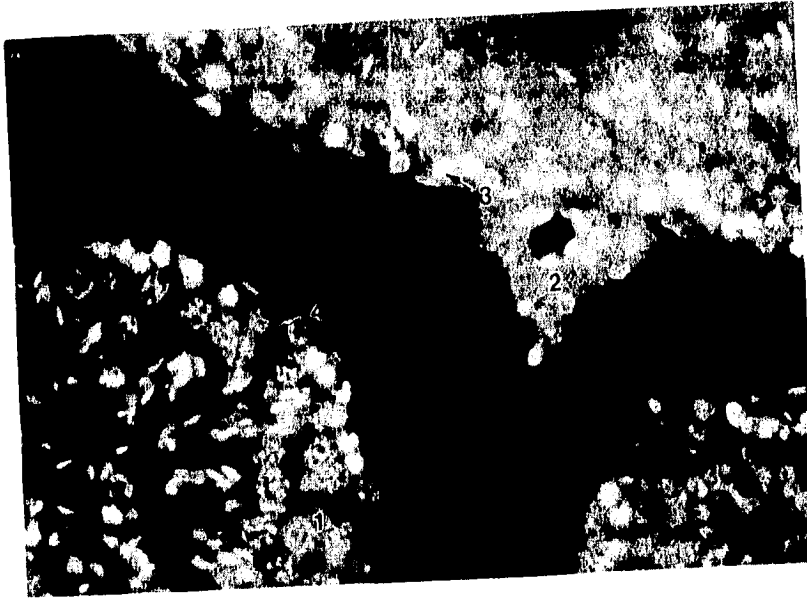


FIGURA 6.

Fotomicrografías de testículos de ratón. En A, procedente de un animal 2-SSR, en el que se aprecia la cromatina en color amarillo-verdoso (3) y los ácidos ribonucleicos naranja-rojizo (4), distribuidos en el citoplasma, de las células germinales (1), de las de Sertoli y de las de Leydig (2), con aspecto normal. En B, el ejemplar procedente del grupo 1-DZSR, se identifican las características y distribución de la cromatina y del ácido ribonucleico, de las células germinales, de las de Sertoli y de las de Leydig, que es distinta a la presente en el tejido de los ratones del grupo 2-SSR. También se observan amplios espacios intercelulares, en el epitelio germinal. Naranja de acridina, 240 X.

FIGURA 7.

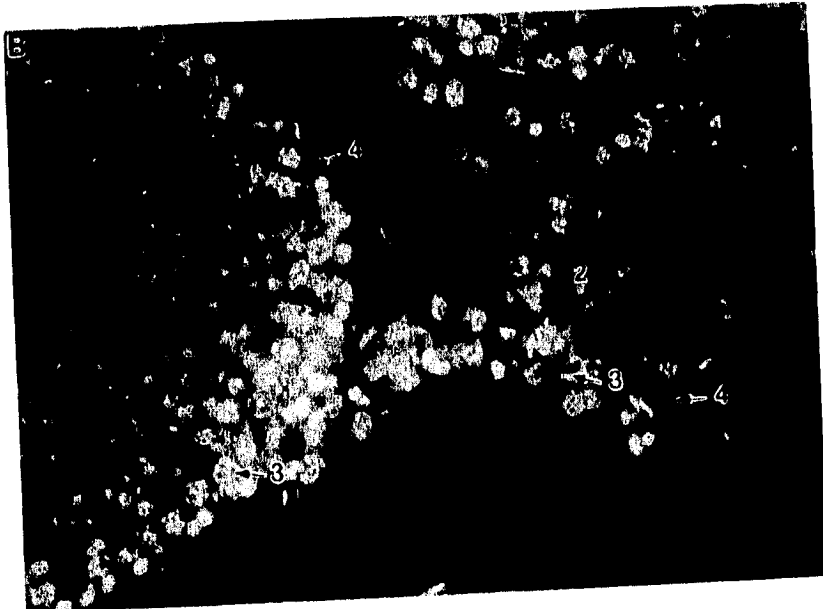
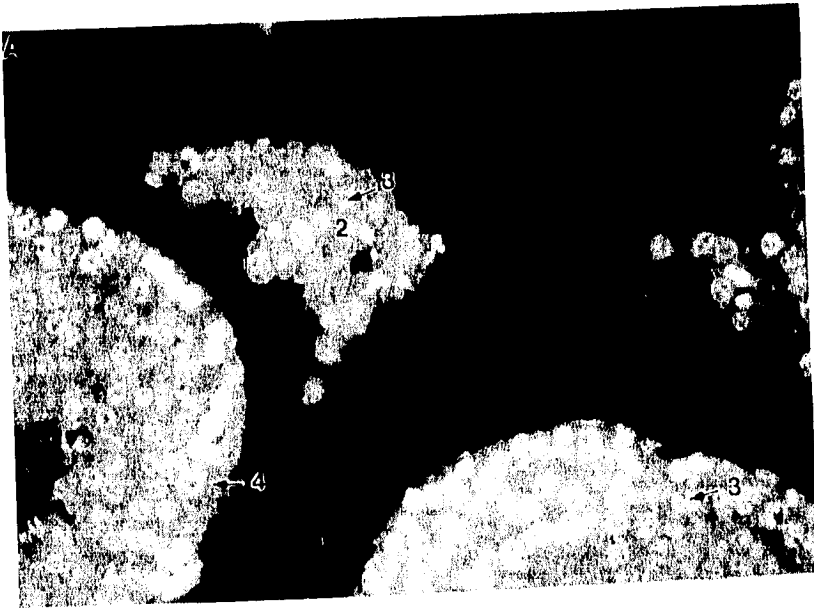


FIGURA 7.

Fotomicrografías de testículos de ratón. En A, perteneciente al grupo 5-SCR, se observa el ácido desoxirribonucleico (3), de las células germinales y de las de Leydig (2), de color amarillo-verdoso, de aspecto normal. El ácido ribonucleico (4), es naranja-rojizo. En B, perteneciente a un animal del grupo 4-DZCR, es evidente la distribución atípica de la cromatina, de color amarillo-verdoso, y los ácidos ribonucleicos, rojo-naranja, que son más abundantes con respecto a los de los controles. Entre las células germinales y las de Leydig se observan espacios intercelulares amplios. Naranja de acridina, 240 X.

verdoso, lo que permitió observar con mayor claridad, la distribución atípica de la heterocromatina (Figuras 6B y 7B).

Al digitalizar las imágenes de las células de Leydig, se comprobó que en los ratones de los grupos 1-DZSR y 4-DZCR, el área que ocupan en el testículo fue mucho mayor que la de los controles, ya que en el grupo 1-DZSR, fue de $119.51 \pm 41.90 \mu\text{m}^2/\text{mm}^2$, en el 4-DZCR fue de $107.09 \pm 14.90 \mu\text{m}^2/\text{mm}^2$, mientras que en el 2-SSR fue de $50.27 \pm 19.74 \mu\text{m}^2/\text{mm}^2$, el 3-NTSR fue de $58.07 \pm 17.59 \mu\text{m}^2/\text{mm}^2$, en el 5-SCR fue de $64.47 \pm 24.79 \mu\text{m}^2/\text{mm}^2$ y el 6-NTCR fue de $68.24 \pm 12.54 \mu\text{m}^2/\text{mm}^2$ (Cuadros 5, 6 y gráfica 3). Por lo cual, la diferencia estadística fue altamente significativa ($p \leq 0.001$).

Las células de Leydig, digitalizadas presentaron un diámetro mayor en los animales, de los grupos tratados, de $16.35 \pm 1.38 \mu\text{m}$ en el 1-DZSR y de $16.53 \pm 2.58 \mu\text{m}$ en el 4-DZCR, en cambio, en el 2-SSR fue de $11.95 \pm 2.35 \mu\text{m}$, en el 3-NTSR fue de $12.4 \pm 2.04 \mu\text{m}$, en el 5-SCR fue de $12.52 \pm 2.13 \mu\text{m}$ y en el 6-NTCR fue de $12.0 \pm 2.47 \mu\text{m}$ (Cuadros 7, 8 y gráfica 4), que al compararse estadísticamente resultó ser más grande en los grupos DZ, que en los controles ($p \leq 0.05$).

Los núcleos de las células de Leydig, de los animales de los grupos 1-DZSR y 4-DZCR, que tuvieron un diámetro mayor de $7.2 \pm 1.21 \mu\text{m}$ y de $7.6 \pm 1.36 \mu\text{m}$, respectivamente, y uno menor de $7.13 \pm 1.22 \mu\text{m}$ en el 1-DZSR y de $7.25 \pm 1.12 \mu\text{m}$ en el 4-DZCR, también fueron más grandes, que los de los grupos controles, cuyo diámetro mayor fue de $5.8 \pm 1.35 \mu\text{m}$ en el 2-SSR, de $6.66 \pm 1.57 \mu\text{m}$ en el 3-NTSR, de $6.05 \pm 1.23 \mu\text{m}$ en el 5-SCR y de $6.15 \pm 1.38 \mu\text{m}$ en el 6-NTCR. En cambio, el menor fue de $5.51 \pm 1.19 \mu\text{m}$ en el 2-SSR, de $5.4 \pm 0.93 \mu\text{m}$ en el 3-NTSR, de $5.32 \pm 1.42 \mu\text{m}$ en el 5-SCR y de $5.57 \pm 1.17 \mu\text{m}$ en el 6-NTCR (Cuadros 9, 10, gráfica 5 y 6). Las pruebas estadísticas fueron significativas a $p \leq 0.05$.

CUADRO 7. PROMEDIO DEL DIAMETRO MAYOR DEL CITOPLASMA DE LAS CELULAS DE LEYDIG DE LOS RATONES SACRIFICADOS AL TERMINO DEL TRATAMIENTO.

DIAMETRO MAYOR		
Grupo	\bar{X} (μm)	\pm D.S.
1. Diazepam	16.35	\pm 1.384
2. Salino	11.95	\pm 2.347
3. No Tratado	12.4	\pm 2.044
N = 30	\bar{X} = promedio	D.S. = Desviación Estandar.
p < 0.05		

CUADRO 8. PROMEDIO DEL DIAMETRO MAYOR DEL CITOPLASMA DE LAS CELULAS DE LEYDIG DE LOS RATONES SACRIFICADOS 9 SEMANAS DESPUES DE CONCLUIDO EL TRATAMIENTO.

DIAMETRO MAYOR		
Grupo	\bar{X} (μm)	\pm D.S.
4. Diazepam	16.53	\pm 2.578
5. Salino	12.517	\pm 2.132
6. No Tratado	12.0	\pm 2.469
N = 30	\bar{X} = promedio	D.S. = Desviación Estandar.
p < 0.05		

CUADRO 9. PROMEDIO DEL DIAMETRO MAYOR Y DEL MENOR DEL NUCLEO, DE LAS CELULAS DE LEYDIG DE LOS RATONES SACRIFICADOS AL TERMINO DEL TRATAMIENTO.

GRUPO	DIAMETRO MAYOR	DIAMETRO MENOR
	\bar{X} (um) \pm D.S.	\bar{X} (um) \pm D.S.
1. Diazepam	7.2 \pm 1.208	7.133 \pm 1.224
2. Salino	5.8 \pm 1.349	5.512 \pm 1.193
3. No Tratado	6.658 \pm 1.569	5.4 \pm 0.932

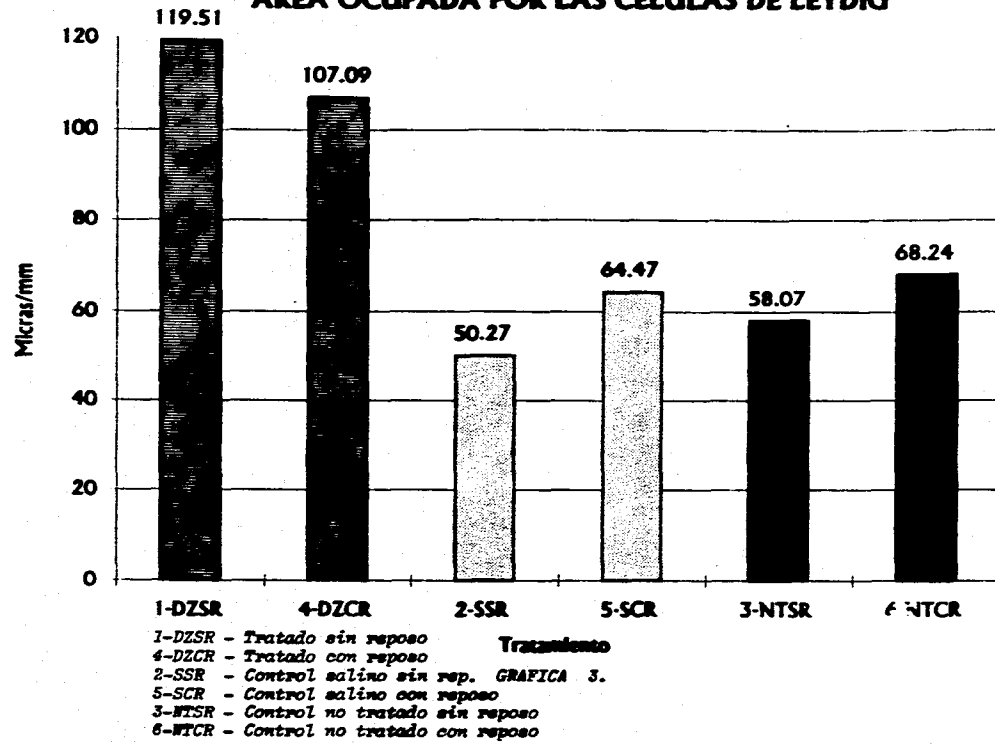
N = 30 \bar{X} = promedio D.S. = Desviación
 Diámetro menor p < 0.05 Estandar.
 Diámetro mayor p < 0.05

CUADRO 10. PROMEDIO DEL DIAMETRO MAYOR Y DEL MENOR DEL NUCLEO, DE LAS CELULAS DE LEYDIG DE LOS RATONES SACRIFICADOS 9 SEMANAS DESPUES DE CONCLUIDO EL TRATAMIENTO.

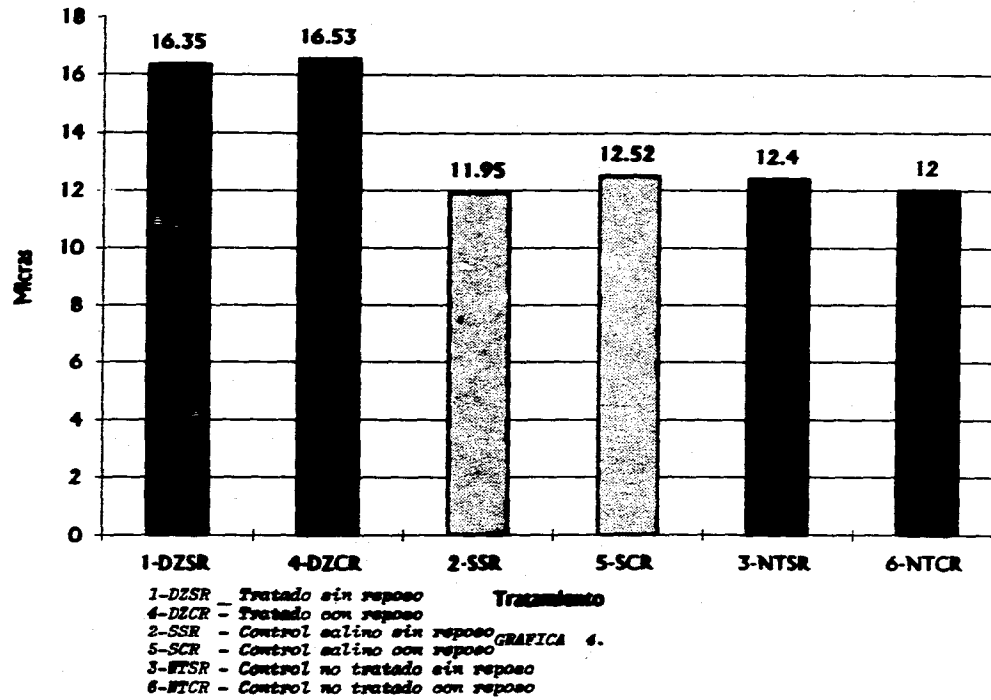
GRUPO	DIAMETRO MAYOR	DIAMETRO MENOR
	\bar{X} (um) \pm D.S.	\bar{X} (um) \pm D.S.
4. Diazepam	7.6 \pm 1.36	7.25 \pm 1.12
5. Salino	6.05 \pm 1.23	5.32 \pm 1.42
6. No Tratado	6.145 \pm 1.38	5.565 \pm 1.174

N = 30 \bar{X} = promedio D.S. = Desviación
 Diámetro menor p < 0.05 Estandar.
 Diámetro mayor p < 0.05

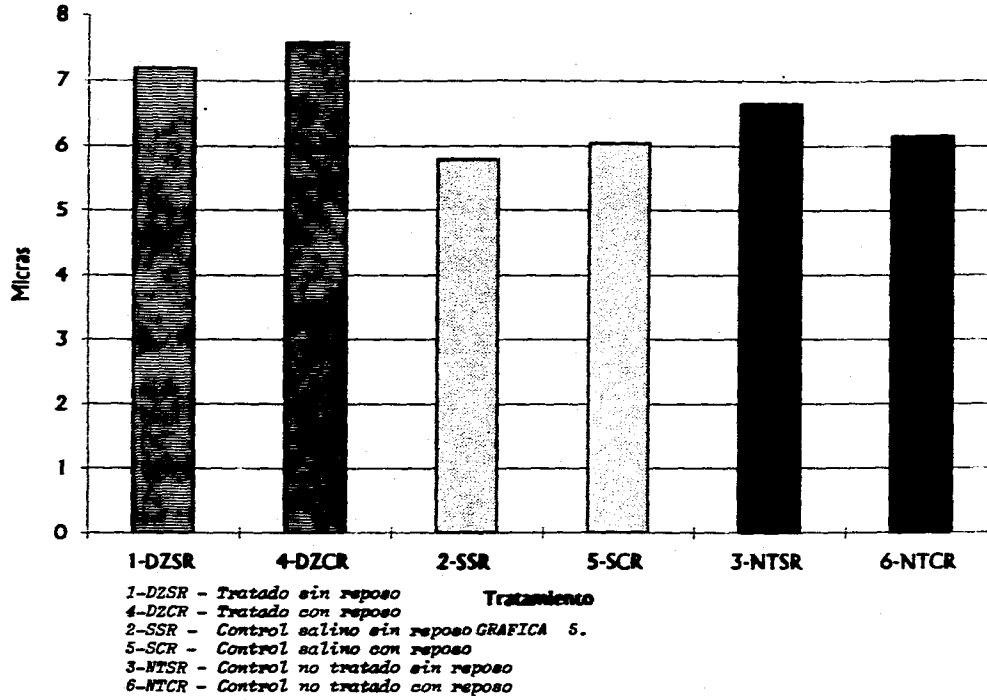
ÁREA OCUPADA POR LAS CÉLULAS DE LEYDIG



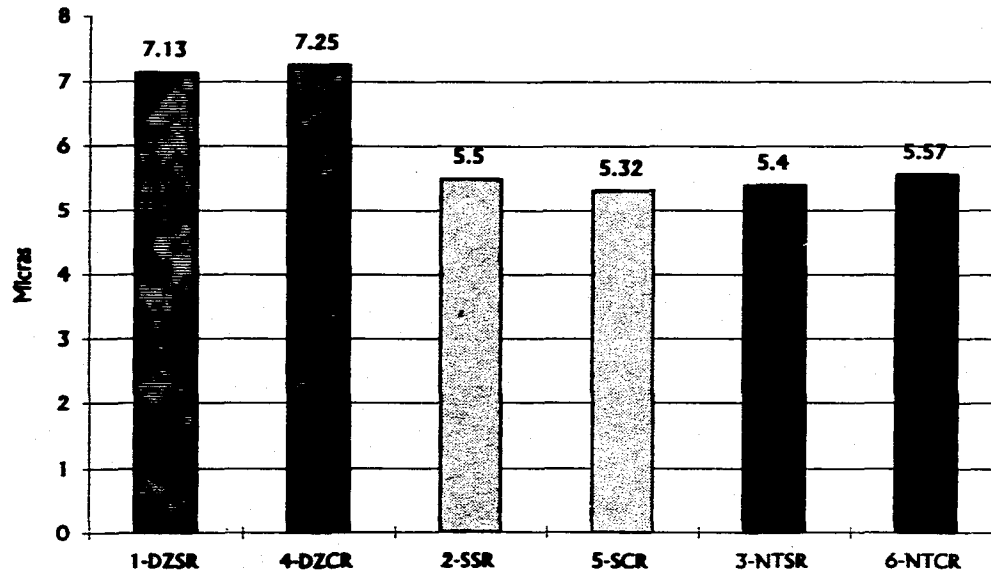
DIÁMETRO MAYOR DE LAS CÉLULAS DE LEYDIG



DIÁMETRO MAYOR DEL NÚCLEO DE LAS CÉLULAS DE LEYDIG



DIÁMETRO MENOR DEL NÚCLEO DE LAS CÉLULAS DE LEYDIG



Tratamiento
1-DZSR - tratado sin reposo
4-DZCR - tratado con reposo
2-SSR - Control salino sin reposo
5-SCR - Control salino con reposo
3-NTSR - Control no tratado sin reposo
6-NTCR - Control no tratado con reposo

GRAFICA 6.

Se sabe que el diazepam actúa sobre el receptor benzodiazepínico central (RBZDC) y el GABA A, asociados a canales de cloro, a nivel hipotalámico, y puede modificar la síntesis de la hormona liberadora de la hormona luteinizante o GnRH, que ejerce una influencia directa sobre la adenohipófisis, en la secreción de la hormona luteinizante o LH, de la que depende directamente la actividad trófica de las células de Leydig y la liberación de los espermatozoides del citoplasma de las células de Sertoli, lo que explicaría las modificaciones que produce en la morfología y posiblemente en la fisiología de las células de Leydig e indirectamente en las de Sertoli y en las del epitelio germinal, ya que la misma GnRH induce la secreción de la hormona folículo estimulante o FSH, que estimula a las células de Sertoli, a producir cuatro secreciones que son: 1.- La proteína fijadora de andrógenos, o ABP, 2.- El factor estimulante de las células de Leydig o LCSF, 3.- Los esteroides y 4.- La inhibina. (Bowery et al., 1989; Calvo et al., 1990 y 1991; Kirkness et al., 1989; Schwartz et al., 1989; Tallman et al., 1987; Sieghart et al., 1989).

De éstas, la ABP y los esteroides estimulan la espermatogénesis. La LCSF, asociada a pequeñas cantidades de esteroides actúan como un factor paracrino, sobre las células de Leydig, que se difunde del interior de los túbulos seminíferos, en el que se encuentran las células de Sertoli, hacia el tejido intersticial, en donde se localizan las células de Leydig (Argüelles et al., 1975; Calvo et al., 1990 y 1991; Ewing et al., 1983; Janszen et al., 1976; Ritta et al., 1989; Wilkinson et al., 1980; Williams et al., 1981; Zirkim et al., 1987 y 1980).

El aumento del área ocupada por las células de Leydig, en los testículos tratados, sin y con reposo, podría relacionarse con el hecho de que la inhibina tiene una acción supresora sobre la producción de GnRH hipotalámica y sobre las gonadotropinas hipofisarias. Por lo cual, el diazepam podría alterar el equilibrio de las funciones eje hipotálamo-hipófisis-testículo, e inducir el aumento de la cantidad de las células de Leydig, y probablemente de las inclusiones lipídicas de testosterona (Argüelles et al., 1975; Calvo et al., 1990 y 1991; Ewing et al., 1983; Janszen et al., 1976; Ritta et al., 1989; Wilkinson et al., 1980; Williams et al., 1981; Zirkim et al., 1987 y 1980).

Otra explicación para el incremento del área ocupada por las células de Leydig, sería por el efecto del diazepam sobre los receptores benzodiazepínicos periféricos (RBZDP) que intervienen en la proliferación celular (Wang et al., 1984; Matthew et al., 1981).

Se ha demostrado que el metabolismo del calcio se altera por la acción de las benzodiazepinas, y en particular, por la del diazepam, al actuar sobre los RBZDP-GABA-B localizados en los canales de calcio y de potasio, integrados a la membrana externa de las mitocondrias, las cuales como respuesta a la acción del diazepam, liberan calcio intracelular en mayor proporción. Como el calcio es uno de los principales segundos mensajeros, es probable que su liberación altere otros procesos del metabolismo hormonal, dependientes del calcio, como es la secreción de LH, que al ser alterada podría tener repercusiones fisiológicas, como el aumento de la producción de testosterona en las células de Leydig, que por esta razón son más voluminosas y presentan un incremento

en la presencia de inclusiones lipídicas (Anholt et al., 1986; Anholt, 1986; Argüelles et al., 1975; Bowery et al., 1989; Calvo et al., 1990 y 1991; Doble et al., 1985 y 1987; Ewing et al., 1983; Gijón et al., 1988; Janszen et al., 1976; Kirkness et al., 1989; Rampe et al., 1986; Schwartz et al., 1989; Schoefield et al., 1987; Sieghart et al., 1989; Tallman et al., 1989; Williams et al., 1981; Zirkin et al., 1980 y 1987).

Referente al aumento en la proporción de inclusiones lipídicas de testosterona, existen estudios realizados aplicando diazepam "in vivo", que confirman la elevación de los niveles sanguíneos de ésta hormona, (Arthaud et al., 1981; Argüelles et al., 1975; Calvo et al., 1990 y 1991; Means et al., 1982; Wilkinson et al., 1980) al igual que es incrementada por la exposición al fármaco, "in vitro" (Calvo et al., 1990 y 1991; Ritta et al., 1989; Wilkinson et al., 1980).

El aspecto y el volumen mayor de las inclusiones lipídicas, en las células de Leydig, se podrían deber a la acción del diazepam sobre el RBZDC-GABA-A, en el cual, se encuentra un sitio receptor a pregnenolona, precursor de la testosterona (Kirkness et al., 1989; Schwartz et al., 1989; Tallman et al., 1987; Sieghart et al., 1989).

Otra posible explicación para el aspecto del citoplasma de las células de Leydig, es la acumulación de colesterol, debida a una producción insuficiente de ABP, cuya función es transportarlo al interior de la mitocondria, en donde se une a la aromatasa del citocromo p-450. Por otro lado, el diazepam ejerce su acción sobre el metabolismo de los fosfolípidos de las membranas celulares, y siendo una molécula

lipofílica, es probable que al favorecer el transporte del colesterol mitocondrial, podría modificar el metabolismo de la testosterona y facilitar los efectos tóxicos del fármaco (Barnea et al., 1989; Besman et al., 1989; Ewing et al., 1979 y 1983; Gavish et al., 1986; Hirata et al., 1978 y 1979; Hutnaniemi et al., 1982; Mukhim et al., 1989; Schwaiger et al., 1983; Strittmatter et al., 1979; Verhoeven et al., 1992).

En ratones adultos tratados, con reposo, se encontraron alteraciones en las células de Sertoli, como un incremento de la amplitud de los espacios intercelulares. La microscopía electrónica reveló modificaciones en el retículo endoplásmico liso y rugoso, así como en el aparato de Golgi, en los lisosomas y en las mitocondrias (Gazca et al., 1994; Ramos et al., 1993).

Los datos descritos, apoyan la posibilidad de que el diazepam altere la ultraestructura de las células de Sertoli, lo que a su vez podría traer como consecuencia, que el ABP no se produzca en cantidad adecuada, o no sea eficiente para unirse a la testosterona. En ambos casos, el diazepam podría inducir un aumento de la secreción de testosterona, similar al que han comprobado otros autores (Argüelles et al., 1975, Calvo et al., 1991; Ewing et al., 1979, 1983; Ritta et al., 1987 y 1989; Verhoeven, 1992; Wilkinson et al., 1980).

Por otra parte, la acción del fármaco sobre las células de Sertoli, podría modificar la secreción de inhibina, por lo cual, si esta señal supresora de la secreción de gonadotropinas hipofisarias y de la GnRH se modifica, posiblemente influiría sobre el eje hipotálamo-hipófisis-testículo. De esta manera,

podría alterarse la secreción de LH, que actúa en las células de Leydig, para la producción de testosterona, de los animales tratados. Existe la posibilidad de que el factor paracrino que estimula a las células de Leydig o LCSF, no se secretara, de manera normal, que en las células de Sertoli, de animales tratados (Ewing et al., 1979 y 1983; Verhoeven, 1992; Williams et al., 1981).

Por lo tanto la influencia del diazepam sobre las células de Sertoli, posiblemente favorecería las alteraciones de las células de Leydig (Ewing et al., 1979 y 1983; Verhoeven, 1992; Williams et al 1981).

El aumento en el tamaño citoplasmático y nuclear, de las células de Leydig, el incremento en el área ocupada por las células de Leydig y en el diámetro de los túbulos seminíferos, así como un decremento en el área ocupada por el epitelio germinal, son una evidencia más de que el diazepam modifica la morfología de las células de Leydig y la diferenciación de las células germinales, resultados que coinciden con la investigación realizada por Mata et al., (1993). Este autor reportó que en crías de ratones expuestas al fármaco "in útero", en las que se observó retardo en la espermatogénesis, alteraciones en el epitelio germinal, y un aumento del área ocupada por las células de Leydig, con inclusiones lipídicas (Mata et al., 1993).

El hallazgo de la disminución del área ocupada por el epitelio germinal, coincide con lo reportado por otras investigaciones realizadas en el testículo, con la aplicación de las benzodiazepinas, Sch-15698 y Sch-32855 administradas a ratas y a perros, en los cuales se presentaron alteraciones del epitelio

germinal (Arthaud et al., 1981; Means et al., 1982). Asimismo el incremento del diámetro de la luz de los túbulos seminíferos, de los ratones tratados, se podría relacionar con una menor área ocupada por el epitelio germinal. Lo anterior, coincide con los reportes de los trabajos citados por Arthaud et al., (1981), Means et al., (1982) y Ramos-Avila et al., (1993).

El decremento en el área ocupada por el epitelio germinal puede relacionarse con las alteraciones encontradas en las células de Sertoli. Estas células pudieran producir una cantidad insuficiente de ABP, o alteraciones en su sitio de unión a la testosterona, lo que impediría la formación adecuada del complejo ABP-testosterona, responsable de la estimulación de la espermatogénesis. Como se ha descrito, el espesor del epitelio germinal es menor en los túbulos seminíferos de los animales tratados "in útero" con diazepam y por los resultados de las características, de los túbulos seminíferos, de los animales tratados, parecen confirmar que también el diazepam modifica la espermatogénesis, sin que sea posible definir si la acción es directa o indirecta (Arthaud et al., 1981; Ewing, 1979 y 1983; Mata et al., 1993; Means et al., 1982; Ramos et al., 1993; Verhoeven, 1992; Williams et al., 1981).

La secreción de la LH y la de testosterona son moduladas por el factor estimulante de las células de Leydig (LCSF). Este factor podría desequilibrarse, tanto por el daño de estas células, así como el de las de Leydig, que podría alterar la espermatogénesis. A su vez, la hipoespermatogénesis puede estar relacionada por la modificación del espesor de la lámina propia de los túbulos seminíferos, como sucede en los ratones adultos tratados, sin y con reposo, ya que el

engrosamiento de la lámina propia posiblemente afecta la transferencia de los factores paracrinos de los túbulos seminíferos, la fisiología de las células intersticiales y por lo tanto, la secreción de testosterona (Arthaud et al., 1981; Means et al., 1982; Verhoeven, 1992).

Las alteraciones en el citoplasma de las células de Leydig, de las germinales y de las de Sertoli, pueden deberse a que el diazepam, tanto en cultivo de tejidos como "in vivo" en ratones y ratas, provoca un aumento de la cantidad de cisternas y vesículas del complejo de Golgi, distensión del retículo endoplásmico rugoso, incremento de polirribosomas, mitocondrias, elementos membranosos, cuerpos electrodensos y aparición de vacuolas y lisosomas rodeadas por abundantes gránulos de glucógeno (Arthaud et al., 1981; Calvo et al., 1990 y 1991; Mata et al., 1993; Márquez-Orozco et al., 1980, 1983, 1984, 1985, 1987, 1988 y 1991; Means et al., 1982; Ramos-Avila et al., 1993; Ritta et al., 1988 y 1989; Stenchever et al., 1969; Wilkinson et al., 1980).

Existen estudios que sugieren, que el diazepam puede causar posibles alteraciones cromosómicas en los animales tratados. Las modificaciones histológicas observadas con naranja de acridina y estimulada con luz ultravioleta, se pueden relacionar con otras evidencias experimentales, donde el diazepam forma aductos en el ADN, que podrían producir un efecto mutagénico de largo plazo, transmisibles a las crías. En investigaciones preliminares de Granillo-Núñez et al., analizar si el diazepam tiene efectos mutagénicos, contando micronúcleos en reticulocitos de sangre periférica de ratones macho tratados (Granillo-Núñez et al., 1989), y de hembras y de fetos expuestos al fármaco (Granillo-Núñez et al., 1991), se observó que éstos incrementaron con respecto a los de los controles.

Las probables alteraciones nucleicas de largo plazo, son mencionadas en un trabajo inédito realizado por Márquez et al., en el testículo de ratones sometidos al mismo tratamiento. Mediante métodos bioquímicos, se comprobó que en éste tejido había un aumento significativo de la cantidad de RNA y una disminución en la síntesis de proteínas, lo que coincide con lo observado en las preparaciones histológicas teñidas con naranja de acridina y estimulada con luz ultravioleta.

Las predicciones teóricas obtenidas por el sistema de "Silicon graphics", del Instituto de Química, de la U. N. A. M., apoyan la hipótesis, de que debido a su estructura molecular, el diazepam, podría interferir en la síntesis de proteínas, al inhibir la aminoacil-sintetasa.

Los trabajos anteriores aportan evidencias de que el diazepam es capaz de interaccionar y alterar las moléculas de DNA, lo que también coincide con los trabajos de Stenchever et al. (1969 y 1981), realizados "in vivo" e "in vitro", que permitirá explicar la persistencia de las alteraciones nueve semanas después de haber concluido el tratamiento, ya que éste período sería suficiente para que, de ser temporal el daño, hubiera desaparecido. Por otra parte, existen evidencias de que, el diazepam tiene efectos genotóxicos, porque en las crías descendientes de los machos tratados para la realización de éste estudio, se demostraron diferencias estadísticamente significativas en el desempeño de pruebas conductuales, como en la prevención pasiva y actividad locomotora, que pueden explicarse por alteración del genoma paterno (Stenchever et al., 1969 y 1981; Ramos-Avila et al., 1993) (Ramos-Avila et al., 1989).

El diazepam administrado a ratones, por vía subcutánea, en dosis únicas diarias de 2.7 mg/kg/de peso corporal, durante 60 días discontinuos/5 días a la semana, de los animales con y sin reposo, produjo en el testículo, los siguientes cambios:

1.- Se observó en las células de Leydig un incremento en el diámetro nuclear, y en la talla y en el área ocupada, de los ratones del grupo DZ, con respecto a los grupos de control (control salino y control no tratado). Mediante ANOVA y las pruebas de Dunn y de Student-Newman-Keuls, se demostró en los tres casos, las diferencias estadísticamente significativas y mayores en los grupos DZ ($p < 0.05$).

2.- Se observó en las células de Leydig, del grupo DZ, el citoplasma tenía abundantes vacuolas, gruesas y numerosas inclusiones lipídicas, que le daban un aspecto de encaje.

3.- En el tejido intersticial y en el localizado en el interior de los túbulos seminíferos, se observó un aumento en la amplitud del espacio intercelular, en comparación con el de los controles.

4.- La lámina propia y la membrana limitante de los túbulos seminíferos estaban engrosadas, en los ratones DZ.

5.- En general, el tejido testicular de los ratones de los dos grupos DZ, tenían una mayor afinidad tintoreal, tanto por los colorantes nucleares, como por los citoplásmicos.

6.- De los datos obtenidos por digitalización de las imágenes, del área ocupada por el epitelio germinal por área testicular, analizados por la prueba de Student-Newman-Keuls, se comprobó que el diazepam, produjo una disminución estadísticamente significativa, del área ocupada por el epitelio germinal de los túbulos seminíferos ($p < 0.05$).

7.- Por el mismo sistema de digitalización y el análisis por ANOVA y Dunn se comprobó que el diámetro de los túbulos seminíferos, de los ratones de los grupos DZ, eran mayores que los controles ($p < 0.05$).

8.- Probablemente, las alteraciones observadas en la morfología de las células de Leydig, están relacionadas con cambios fisiológicos.

9.- Al no encontrar diferencias en la morfología del tejido testicular, de los ratones sacrificados al término del tratamiento, con respecto a los sacrificados después de un periodo de reposo, en el que se pudo normalizar su estructura, se sugiere que las alteraciones producidas por el diazepam pueden ser permanentes.

Aaltonen L, Erkola R y Kanto J: Benzodiazepines receptors in the human fetus. *Biology of Neonate*. 44: p. 54, 1983.

Anderson L C, Letho V P, Stenman S, Bradley R A y Virtanen I: Diazepam induces mitotic arrest at prometaphase by inhibiting centriolar separation, *Nature*. 291: p. 247 - 248, 1981.

André M, Sibout M, Petry S M y Vert P: Depression respiratoire et neurologique chez le premature nouveau-ne de mere traitee par diazepam. *J. Gynecol. Biol. Repr.* 2: p. 357 - 366, 1973.

Anholt R R H: Mitochondrial benzodiazepines receptors as potential modulators of intermediary metabolism. *TIPS*. 7: p. 506 - 511, 1986.

Anholt R R H, De Sousa E B, Kuhar M J y Snyder S H: Depletion of peripheral type receptor after hypophysectomy in rat adrenal gland testis. *Eur. J. Pharmacol.* 110: p. 41 - 46, 1985.

Anholt R R H, De Sousa E B, Oster-Granit M L y Snyder S H: Peripheral type receptors. Autorradiographic localisation in whole-body sections of neonatal rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 233: p. 517 - 526, 1985.

Anholt R R H, Pedersen P L, De Sousa E B y Snyder S H: The peripheral type benzodiazepine receptor. Localisation to the mitochondrial outer membrane. *J. Biol. Chem.* 261: p. 576 - 511, 1986.

Antkiewicz M L, Guidotti A y Krueger K E: Molecular characterization and mitochondrial density of a recognition site for peripheral type benzodiazepines ligands. Mol. Pharmacol. 34: p. 272 - 278, 1988.

Argüelles A E y Rosner J: Diazepam and plasma testosterone levels. Lancet II: p. 607, 1975.

Arthaud L E, Davis G J, Black H E y Heller J: Effects of a single oral dose on testicular weight and morphology and on reproduction performance in rats. Toxicology. I: p. 105, 1981.

Bandman E, Walker C R y Strohman R C: Diazepam inhibits myoblast fusion and expression of muscle specific protein synthesis. Sci. 200: p. 559 - 561, 1978.

Barnea R E, Fares F y Gavish M: Modulatory action of benzodiazepine on human term placental steroidogenesis in vitro. Mol. Cell Endocrinol. 64: p. 155 - 159, 1989.

Beaumont K, Skowronski R y Vaughn D A: Interactions of lipids with peripheral type benzodiazepine receptor. Biochem. Pharmacol. 37 (6): p. 1009 - 1014, 1988.

Besman H B, Penney D P, Case K R y Averill K: Specific nuclear binding of H3 flunitrazepam. Proc. Natl. Acad. Sci. 77 (2): p. 1195 - 1198, 1980.

Besman M J, Yagagibashi K, Lee T D, Kawamura M, Hall P F y Shiveley J E: Identification of des-(gly-ile)-endozepine as an effector of corticotropine-dependent adrenal steroidogenesis: stimulation of cholesterol delivery is mediated by the peripheral benzodiazepine receptor. Proc. Natl. Acad. Sci. 86: p. 4897 - 4901, 1989.

Bowery N: GABA B receptors and their significance in mammalian pharmacology. *TIPS* 10: p. 401 - 406, 1989.

Calvo D J, Campos M B, Calandra R S, Medina J H y Ritta M N: Effect of long term diazepam administration on testicular benzodiazepine receptor and steroidogenesis. *Lif. Sci.* 49 (7): p. 519 - 525, 1991.

Calvo D J, Ritta M N, Calandra R S y Medina D H: Peripheral type benzodiazepine receptor are highly concentrated in mitochondrial membrane of rat testicular interstitial cells. *Neuroendocrinol.* 52: p. 350 - 353, 1990.

Candy J E y Martin L: The post-natal development of benzodiazepine receptor in the cerebral cortex and cerebellum. *J. Neuroendocrinol.* 32: p. 655 - 658, 1979.

Chang R S y Snyder S H: Benzodiazepine receptors: labeling in intact animals with H3 flunitrazepam. *Eur. J. Pharmacol.* 48: p. 213 - 218, 1978.

Clarke D C y Ryan P J: Tranquilizers can block mitogenesis in 3T3 cells can induce differentiation in friend cells. *Nature.* 297: p. 160 - 161, 1980.

Cree J E, Meyer J, Haile D M: Diazepam in labour: it's metabolism and effect on the clinical condition and thermogenesis of the newborn. *Brit. Med. J.* 44: p. 54, 1983.

Darney K J y Ewing L: Autorregulation of testosterone secretion in perfused rat testes. *Endocrinol.* 109 (3): p. 993 - 995, 1981.

De Blas A L, Park D y Friedrich P: Endogenous benzodiazepine-like molecules in the human, rat and bovine brains studied with a monoclonal antibody to benzodiazepines. *Brain Res.* 413 (2): p. 275 - 284, 1987.

De Blas A L y Sotelo C: Localisation of benzodiazepine-like molecules in the rat brain. A light and electron microscopy immunochemistry study with an anti-benzodiazepine monoclonal antibody. *Brain Res.* 413 (2): p. 285 - 296, 1987.

De Sousa E B, Anholt R R H, Murphy K N M, Snyder S H y Kuhar M: Peripheral type benzodiazepine receptors in endocrine organs: autoradiographic localisation in rat pituitary adrenal and testis. *Endocrinol.* 116 (2): p. 567 - 572, 1985.

Doble, A, Benavides J, Ferris O, Bertrannd P, Menager J, Vaucher N, Burgevin M C, Usan A, Gueramy F y Le Fur G: Dihidropyridine and peripheral benzodiazepine binding sites subcellular distribution and molecular site determination. *Eur. J. Pharmacol.* 119: p. 153 - 167, 1985.

Doble A, Ferris O, Burgevin G, Menager J, Usan A, Dubroscq M C, Renault C, Gueramy Z y Le Fur G: Photoaffinity labeling of peripheral type binding sites. *Mol. Pharmacol.* 31: p. 42 - 49, 1987.

Dym M: The male reproductive system. Weiss L.: Cell and tissue biology. 6 ed. Ed. Munchen: Urban & Schwarseberg, 1983: p. 931 - 972, 1983.

Erkkola R, Kanto J y Sellman R: Diazepam in early human pregnancy. *Acta Obstet. Gynecol. Scand.* 53: p. 135 - 138, 1974.

Ewing L L, Zirkin B R, Cochram R C, Kromann N, Peters C y Ruiz-Bravo N: Testosterone secretion by rat, rabbit, guinea pig, dog and hamster testes perfused "in vitro" : correlation with Leydig cell mass. *Endocrinol.* 105 (5): p. 1135 - 1142, 1979.

Ewing L L y Zirkin B: Leydig cell and steroidogenic function. *Rec. Prog. Horm. Res.* 39: p. 599 - 632, 1983.

Fares F, Bar-Ami S, Brandes J M y Gavish M: Gonadotropine and estrogen-induced increase of peripheral type benzodiazepine binding sites in the hypophyseal genital-axis of rats. *Eur. J. Pharmacol.* 133: p. 97 - 102, 1987.

Fisburne J I: Analgesia durante el parto. *Clinicas de Perinatologia.* Vol 1, Ed. Interamericana, p. 43, México, D. F., 1982.

Gazca-Ramirez M V, Márquez-Orozco M C, Márquez-Orozco A y Ramos-Avila M: Ultrastructural alterations in the sertoli cells of adult mice exposed to diazepam. *Proc. West Pharmacol. Soc.* 37: p. 113 - 114, 1994.

Gavish M, Okun F, Weizman y Youdin M B H: Modulation of peripheral binding sites following chronic estradiol treatment. *Eur. J. Pharmacol.* 127: p. 147 - 151, 1986.

Gijón E, García X, Márquez-Orozco M C y Márquez-Orozco A: *PRHSJ*, 7 (2): p. 199, 1988.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

Granillo-Nuñez R, Márquez-Orozco M C y Márquez-Orozco A: *Detección del efecto tóxico del diazepam, medido por la prueba de micronúcleos en sangre periférica de ratón. II Congreso Nacional de Mutagénesis, Carcinogénesis y Teratogénesis Ambiental. México, D.F. Feb 16 - 18, 1989.*

Granillo-Nuñez R, Márquez-Orozco M C y Márquez-Orozco A: *Inducción de micronúcleos en hembras y fetos tratados con diazepam durante la gestación. IX Reunión Nacional de Morfología. Morelia, Mich. Nov, 1991.*

Goodman G A, Goodman L S, Ralph T W y Murad F: *Las bases farmacológicas de la terapéutica. 7 ed. Ed. Médica Panamericana Mexicana, México, p. 335 - 363, 1989.*

Hernández A L A I, Márquez-Orozco M C y Márquez-Orozco A: *Effects of prenatal administration of diazepam on the ovary of mice. Proc. West. Pharmacol. Soc. 34 : p. 379 - 382, 1991.*

Hirata F y Axelrod J: *Enzymatic synthesis and rapid translocation of phosphatidilcoline by two metiltransferases in erythrocyte membrane. Proc. Natl. Acad. Sci. 75 (5): p. 2348 - 2352, 1978.*

Hirata F y Axelrod J: *Enzymatic metylation of phosphatidilcoline increases erythrocyte membrane fluidity. Nature. 275 (2): p. 219 - 220, 1978.*

Hirata F, Strittmatter W J y Axelrod J: *Beta-adrenergic receptors agonists increases the phospholipid metylation, membrane fluidity and beta-adrenergic receptor-adenylate ciclase coupling. Proc. Natl. Acad. Sci. 76 (1): p. 368 - 372, 1979.*

Hirata F, Viveros H D, Diliberto E J y Axelrod J: Identification and properties of two metiltransferases in conversion of phophatidiletanolamine to phosphatidilcoline. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 75 (4): p. 1718 - 1721, 1978.

Hutnaniemi I T, Nozu K, Warren D W y Catt K J: Acquisition of regulatory mechanism for maturing receptors and steroidogenesis in the maturing rat testis. *Endocrinol.* 111 (5): p. 1711 - 1718, 1982.

Idäpään Heikkilä J E, Jouppila P I, Poulaka y Vorne M S: Placental transfer of diazepam 14C in mice, hamster and monkeys. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 176(3): p. 752 - 757, 1971.

Janssen F H A, Cooke B A, Van Driel M J A y Van Der Molen H L: The effect of calcium ions on testosterone production in Leydig cells from rat testis. *Biochem. J.* 160: p. 433 - 437, 1976.

Katsung B G: *Farmacología básica y clínica*, 3 ed., Ed. El Manual Moderno. México, p. 249 - 261, 1987.

Kellogg C K, Crisholm J, Simmons R D, Ison J R y Miller R K: Natural and behavioral consequences of prenatal exposure to diazepam. *Monogr. Neural. Sci.* 9: p. 119 - 123, 1983.

Ketelslegers J M, Hetzel W D, Sherins R J y Catt K J: Developmental changes in testicular gonadotropins and plasma testosterone in the rat. *Endocrinol.* 103 (1): p. 212 - 222, 1978.

Kirkness E F: Steroid modulation reveals further complexity of GABA A receptors. *TIPS* 10: p. 6 - 7, 1989.

Kolata G B: Behavioral teratology: birth defects of the mind. *Sci.* 202 (17): p. 732 - 734, 1978.

McAllister C B: Placental transfer and neonatal effects of diazepam when administered to women just before delivery. *Br. J. Anaesthesiology.* 53: p. 423 - 427, 1980.

Mandeli M, Morselli P L, Nordio G, Principi N, Sereni F y Togonini G: Placental transfer of diazepam and its disposition in the newborn. *Cli. Pharmacol. Ther.* 17 (5): p. 564 - 572, 1985.

Marangos P J, Patel J, Boulenger J y Clark-Rosenberg: Characterization of peripheral type benzodiazepines binding sites in brain using (H) Ro5-4864. *Mol. Pharmacol.* 22: p. 26 - 32, 1982.

Márquez-Orozco M C y Márquez-Orozco A: Efectos del diazepam sobre el mesencéfalo de fetos de ratón. *Res. Congr. Nacl. Cienc. Fisiol.* 20 - 2C, 1985.

Márquez-Orozco M C y Márquez-Orozco A: Alteraciones ultraestructurales del pulmón fetal del ratón provocados con diazepam "in vivo". *Res. Congr. Nacl. Cienc. Fisiol.* 28: 31 - 2C, 1985.

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.

Márquez-Orozco M C y Márquez-Orozco A: Hallazgos histológicos en el pulmón de ratones adultos expuestos a diazepam durante la gestación. *Res. Congr. Nacl. Cienc. Fisiol.* 28: 31 - 3C, 1985.

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 (1): p. 10, 1984.

Márquez-Orozco M C, Márquez-Orozco A, Bouchot-Gamas E y Gabarrón-Fernández F: Increase of bone calcium by prenatal exposure to diazepam in mice. *Proc. West. Pharmacol. Soc.* 34: p. 383 - 385, 1991.

Márquez-Orozco M C, Dorantes-Sierra L, Márquez-Orozco A y Sámano-Bishop A: Alteraciones histológicas del intestino delgado de fetos de ratón, causadas por la administración materna del diazepam (valium). *Res. Congr. Nacl. Anat.* 10: 29, 1984.

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.

Márquez-Orozco M C, Márquez-Orozco A y Gazca-Ramírez V: Ultrastructural alterations of fetal mice heart produced by treatment with diazepam during gestation. *Proc. West. Pharmacol. Soc.* 26: p. 83 - 84, 1983.

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: 216 C, 1988.

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 de diazepam (valium). Arch. Mex. Anat. 20 (1): p. 21 - 30, 1983.

Márquez-Orozco M C, Márquez-Orozco A y Sámano-Bishop A: Alteraciones del hígado fetal causadas por la administración de diazepam (valium). Res. Rev. Nacl. Morfol. 5: 31, 1983.

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 (1): p. 16 - 20, 1984.

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.

Massotti M, Alleva F R, Balass T y Guidotti A: GABA and benzodiazepine receptors in the offspring of dams receiving diazepam: ontogenetic studies. Neuropharmacol. 19: p. 951 - 956, 1980.

Mata-Santibañes M V, Márquez-Orozco M C y Márquez-Orozco A: Testicular Histological Changes in Mice after Prenatal Administration of Diazepam. Proc. West. Pharmacol. Soc. 36: p. 117 - 121, 1993.

Matthew E, Laskin J D, Zimmerman E A, Weinstein I B, Hsu K C y Engelhart D L: Benzodiazepines have high affinity binding sites and induces melanogenesis in B 16/ C 3 melanoma cells. Proc. Natl. Acad. Sci. 78 (6): p. 3935 - 3939, 1981.

McAllister C B: Placental transfer and neonatal effects of diazepam when administered to women just before delivery. *Br. J. Anaesthesiol.* 52: p. 423 - 427, 1980.

Means S R, Chengelis C P y Jasty V: Testicular Toxicity induced by oral administration of Sch-32855, a 1,4-benzodiazepine, in the dog. *Res. Comun. Chem. Pathol. Pharmacol.* 37(2): p. 317 - 320, 1982.

Martin I L, Brown C L y Doble A: Multiple benzodiazepine receptors: structures in the brain or structures in the mind? A critical review. *Lif. Sci.* 32(17): p. 1925 - 1933, 1983.

Martin I L: The benzodiazepine receptor functionality complexity. *Elsevier Sci. Pub. B. V.* (6147) p. 343 - 347, 1980.

Mendelsson C, Duffau M y Catt K: Gonadotropine binding and stimulation of cyclic adenosine 3' 5' monophosphate and testosterone production in isolated Leydig cells. *J. Biol. Chem.* 250(22): p. 8818 - 8823, 1975.

Miernick A, Santa María A y Márano F: The antimitotic activities of some benzodiazepines. *Exp.* 42: p. 956 - 958, 1986.

Muckhim A G, Papadopulus V, Costa E y Krueger K E: Mitochondrial benzodiazepine receptor regulate steroid biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 86: p. 9813 - 9816, 1989.

Nagele R G, Pietrolungo J F, Kosciuk M C, Lee H y Roisen F J: Diazepam inhibits the spreading of chick embryo fibroblast. *Exp. Cell. Res.* 143: p. 153 - 162, 1983.

Olsen R W: GABA-benzodiazepine-barbiturate receptor interactions. *J. Neurochem.* 37(1): p. 1 - 13, 1981.

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: p. 107 - 110, 1972.

Paul S M, Kempner E y Skolnick P: In situ molecular weight determination of brain and peripheral binding sites. *Eur. J. Pharmacol.* 76: p. 465- 466, 1981.

Ramírez-Rojas J A: Benzodiazepines. *Rev. Fac. Med.* 18(1): p. 32 - 35, 1975.

Ramos-Avila M, Márquez-Orozco M C, Márquez-Orozco A y Prado-Alcáala R A: Aplicación a crías de ratones de macho tratados con diazepam sobre la prevención pasiva. *Congr. Nacl. Cienc. Fisiol.* 1988.

Ramos-Avila M, Márquez-Orozco M C, Márquez-Orozco A y Prado-Alcáala R A: Actividad Motora en crías de ratones macho tratados con diazepam. *Congr. Nacl. Cienc. Fisiol.* 1989.

Ramos-Avila M, Márquez-Orozco M C y Márquez-Orozco A: Diazepam induced histological changes in the testes of adult mice. *Proc. West. Pharmacol. Soc.* 36: p. 123 - 126, 1993.

Rementería J I y Rhyatt K: Withdrawal symptoms in neonates from uterine exposure to diazepam. *J. Pediat.* 90(1): p. 123 - 126, 1977.

Rampe D y Triggle D S: Benzodiazepines and calcium channel function. *Trends in Pharmacol. Sci.* 7: p. 461 - 464, 1986.

Resko J A, Feder H H y Goy R W: Androgen concentrations in plasma and testis of developing rats. *J. Endocrinol.* 40: p. 485 - 491, 1968.

Ritta M N y Calandra R S: Effect of GABA and benzodiazepine on testicular androgen production. *Lif. Sci.* 40: p. 791 - 798, 1987.

Ritta M N y Calandra R S: Testicular interstitial cells as targets for peripheral benzodiazepine. *Neuroendocrinol.* 49: p. 262 - 266, 1989.

Roche Scientific Service. Valium roche in obstetriche and gynecolgy. *Collective Abstract. Valium 212:* p. 552 - 556, 1970.

Ruff R M, Pert B C, Weber R J, Wahl S M y Paul S M: Benzodiazepine receptor-mediated chemotaxis of human monocytes *Sci.* 229: p. 1281 - 1283, 1985.

Sangameswaran L y De Blas A L: Demonstration of benzodiazepine-like molecules in the mammalian brain with a monoclonal antibody to benzodiazepines. *Proc. Natl. Acad. Sci.* p. 5560 - 5564, 1985.

Schoeffer P R, Darlison M G, Fujita N, Burt D R, Stephenson F A, Rodriguez H, Rhee L M, Ramachandran J, Reale V, Glencorse T A, Seeburg P H y Barnard E A: Sequential and functional expression of the GABA A receptors shows a ligand gated receptor super family. *Nature.* 328(16): p. 221 - 227, 1987.

Schaiger M, Herzog V y Neupert W: Characterization of translocation contact sites involved in the import of mitochondrial proteins. *J. Cell. Biol.* 105: p. 235 - 245, 1983.

Schwartz R D: The GABA A receptor-gated ion channel: biochemical and pharmacological studies on structure and function. Biochem. Pharmacol. 37(18): p. 3369 - 3375, 1985.

Sieghart W: Multiplicity of GABA A benzodiazepine receptors. TIPS. 10: p. 407 - 411, 1989.

Simmons R D, Miller R K y Kellogg C K: Prenatal diazepam distribution and metabolism in perinatal rats. Teratol. 28: p. 181 - 188, 1983.

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: p. 39 - 46, 1984.

Simmons R D, Miller R K y Kellogg C K: Prenatal exposure in rats. Long-lasting receptor mediated effects on hypothalamic containing neurons. Brain Res. 293: p. 73 - 83, 1984.

Staiger R C: Studies in the chromosomes of human lymphocytes treated with diazepam "in vitro". Mut. Res. 10: p. 635 - 644, 1970.

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: p. 836 - 842, 1969.

Stenchever M A y Smith W D: The effect of diazepam on meiosis in the CF-1 mouse. Teratol. 23: p. 279 - 282, 1981.

Sttrittmatter W J, Hirata F, Axelrold J, Mallorga P, Tallman J F y Hennebery R C: Benzodiazepine and beta-adrenergic receptors ligands independently stimulate phospholipid methylation. *Nature*. 282: p. 857 - 859, 1979.

Tallman J F y Gallager D W: The gabaergic system: a locus of benzodiazepine action. *Ann. Rev. Neurosci.* 8: p. 21 - 44, 1985.

Terlock J G, Gwan J M y Geber F W: Comparative study of the teratogenic effects of clordiazepoxide and diazepam in the fetal hamster. *Lif. Sci.* 29(21): p. 2141 - 2147, 1981.

Tsuruhara T, Dufau M L, Cigorrage S y Catt K J: Hormonal regulation of testicular luteinizing hormone receptors. *J. Biol. Chem.* 252(24): p. 9002 - 9009, 1977.

Valium Roche . Valium Diazepam. *The journal of family practice.* 6(1). 1978.

Van Der Klein E: Kinetics of distribution and metabolism of clordiazepoxide and diazepam on mice. *Arch. Int. Pharmacodynam.* 178(1): p. 193 - 215, 1969.

Verhoeven G: Local control systems within the testis. *Bailleres Clin. Endocrinol. Metab.* 6 (2): p. 313 - 333, 1992.

Verma A y Solomon H S: Peripheral type receptors. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 29: p. 307 - 322, 1989.

Walker C R, Bandman E y Strohman R S: Diazepam induces relaxation on embryo muscle fibers "in vitro", and inhibits myosin synthesis. *Exp. Cell Res.* 123: p. 285 - 291, 1979.

Wang J K T, Morgan I J y Spector S: Benzodiazepine that bind at peripheral sites inhibit cell proliferation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 81: p. 753 - 756, 1984.

Wang J K T, Morgan I J y Spector S: Differentiation of friend erytroleukemia cells induced by benzodiazepines. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 81: p. 3779 - 3772, 1984.

Wiebe P J, Salhanick A I y Myers K I: On the mechanism of action of lead in the supression of FSH receptor, cyclic AMP and steroidogenesis. *Lif. Sci.* 32: p. 1997 - 2005, 1983.

Williams R H: *Tratado de Endocrinología.* 6 ed. Ed. Interamericana, Madrid, España, p. 308 - 330, 1981.

Wilkinson M, Moger W H, Grovestine D: Chronic treatment with valium (diazepam) fails to affect the reproductive system on the male rat. *Lif. Sci.* 27: p. 2285 - 2291, 1980.

Sirkin B R, Ewing L L, Kromann N y Cochran R C: Testosterone secretion by rat, rabbit, guinea pig, dog and hamster testes perfused "in vitro": correlation with Leydig cell ultrastructure. *Endocrinol.* 107(6): p. 1867 - 1874, 1980.

Sirkin B R y Erwing L L: Leydig cell differentiation during maturation of rat testis: a stereological study for cell number and ultrastructure. *The Anat. Rec.* 219: p. 157 - 163, 1987.