

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO  
ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES IZTACALA  
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

BO 1285/96.  
Ej. 1

**ESTUDIO MORFOLÓGICO DEL OVARIO Y DE LA EXPRESIÓN DE  
LA ACTIVIDAD COPULATORIA DE RATONES DE LA CEPA  
CD-1 EXPUESTOS PRENATALMENTE A DIAZEPAM.**

## **T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

**MAESTRO EN CIENCIAS**

**(BIOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN)**

PRESENTA EL MÉDICO

LUIS ALFREDO IGNACIO HERNÁNDEZ ALVAREZ.

DIRECTOR:

M. EN C. MA. CRISTINA MÁRQUEZ OROZCO,



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.

## AGRADECIMIENTOS

Con profundo respeto, cariño y admiración a la Dra.

MA. CRISTINA MÁRQUEZ OROZCO,

ejemplo de honestidad y perseverancia.

Sus enseñanzas constituyen una piedra angular en mi formación y han dejado perenne huella en mi comportamiento.

Espero sea la presente un sencillo tributo a la dedicación y paciencia con que me ha distinguido.

Con gran afecto a la Maestra

Amalia Márquez Orozco,

en quien he encontrado siempre consejo, apoyo y aliento desinteresado en momentos críticos de mi formación.

## DEDICATORIA

A Blanca Verónica,  
esposa, compañera y cómplice  
en la breve aventura de la vida.  
Por tu presencia, por tu empatía.  
Por compartir conmigo la lágrima y el sueño.

A mis hijas,  
por enseñarme a crecer con sus albricias,  
por generar en mí el impulso preciso,  
por hacer mi vida plena.

A mis padres,  
por mostrarme que la vida  
sí es una entrega apasionada.

# ÍNDICE

Resumen.....	3
Introducción.....	6
Origen de las benzodiazepinas.....	6
Farmacología de las benzodiazepinas.....	10
Absorción.....	15
Concentración sanguínea.....	15
Distribución.....	16
Metabolismo.....	17
Excreción.....	18
Indicaciones.....	18
Mecanismo de acción.....	20
• Receptores benzodiazepínicos.....	20
• Relación con minerales.....	24
• Receptor periférico a benzodiazepinas.....	24
• Ontogenia de receptores benzodiazepínicos.....	26
Contraindicaciones.....	28
Dependencia.....	28
Precaución.....	30
Interacciones medicamentosas.....	31
Alteraciones de las pruebas de laboratorio.....	31
Reacciones adversas.....	32
Toxicidad.....	33
Justificación y Propósito.....	46
Material y Métodos.....	48
Animales de experimentación.....	48

Estudio morfológico del ovario.....	49
Estudio conductual.....	51
Resultados.....	53
Estudio morfológico.....	53
Estudio morfológico del ovario.....	53
Estudio conductual.....	73
Estadísticos.....	77
Discusión.....	79
Estudio morfológico del ovario.....	79
Estudio conductual.....	81
Conclusiones.....	85
Estudio morfológico del ovario.....	85
Estudio conductual.....	86
Referencias bibliográficas.....	87

## RESUMEN

El diazepam es una benzodiazepina de uso frecuente en la práctica gineco-obstétrica por sus propiedades anticonvulsivante, tranquilizante y miorrelajante. A pesar de haberse informado efectos deletéreos en la función cardiopulmonar de hijos de madres expuestos prenatalmente al fármaco, pocos estudios se han efectuado para conocer su toxicidad. En estudios experimentales se han observado alteraciones en diferentes tejidos fetales en los que se acumula este fármaco, por ejemplo en los testículos de ratones tratados *in utero* con diazepam. Estudios conductuales de animales semejantes han demostrado alteraciones en el patrón de nado, la actividad locomotora espontánea y la actividad copulatoria de los machos, que se han relacionado con una incapacidad en la coordinación motora persistente hasta la edad adulta. Los propósitos del presente trabajo fueron identificar la presencia de daños histológicos ováricos, en ratones tratados prenatalmente con diazepam, determinar el grado de lesión, si persisten postnatalmente e investigar si la exposición prenatal al fármaco modifica la conducta copulatoria espontánea de hembras de ratón adultas. Se aparearon 20 hembras y 7 machos de la cepa CD-1 en proporción 3 a 1, la presencia de tapón vaginal se tomó como inicio de la gestación, los animales que lo presentaron se distribuyeron al azar en dos grupos, el primero recibió por vía subcutánea

diazepam (Valium®), a una dosis de 2.7 mg/kg de peso corporal, diaria, del 6° al 17° días de la gestación, el segundo recibió volúmenes equivalentes de solución fisiológica de NaCl (0.09%) durante el mismo período. Las crías nacieron entre los días 18 y 19 y se transfirieron a hembras nodrizas en camadas de 3 animales experimentales (*E*) con 3 testigos (*T*). Para el estudio morfológico se sacrificaron animales recién nacidos, de 35 y de 63 días de edad, se extrajeron los ovarios, se fijaron, se cortaron, se tiñieron por los métodos de hematoxilina y eosina, tricrómico de Mallory y Gallego y se estudiaron en el microscopio fotónico (Polivar, American Optical®). Los cortes seriados de animales adultos se fotografiaron con el objeto de hacer una reconstrucción tridimensional del ovario y sobre el papel fotográfico se efectuó el recuento de las diversas clases de folículos y de los cuerpos lúteos. Para el estudio conductual se permitió el desarrollo de las crías hasta los 6 meses, en que se probó la conducta sexual espontánea de las hembras frente a machos de las mismas camadas, con esquema de apareamiento: machos *E* con hembras *T*, machos *T* con hembras *E*, machos *E* con hembras *E* y machos *T* con hembras *T*. Se verificó una prueba a cada pareja en la fase oscura del fotoperíodo bajo luz infrarroja (640nm) y se registró en videocinta. Los resultados se compararon con los obtenidos de la caracterización conductual de animales de la colonia de la misma cepa y edad. Los ovarios de los animales experimentales mostraron aumento del volumen nuclear, con patrón heterocromático constituido por grumos más densos y con mayor afinidad tintorial, también se encontró



modificada la organización y aumentado el número de células de los cuerpos lúteos, así como un incremento en el número de folículos atrésicos. Los resultados sugieren que las alteraciones ováricas, provocadas por la administración materna de diazepam, son permanentes, ya que los cambios en la afinidad tintórea y el aumento de volumen del núcleo persistieron hasta la edad adulta, en la que se encontró desorganización de la estructura de los cuerpos lúteos, atresia folicular más temprana e incremento en el número de folículos atrésicos. Estos hallazgos son consistentes con los que se han descrito anteriormente en retina, corazón, pulmones, riñones, cerebro, cerebelo y testículos. El estudio conductual mostró que la conducta precopulatoria fue semejante en ambos grupos, con una tendencia a ser más breve en las hembras *E*. Los índices de lordosis y la duración de los trenes de monta fueron mayores en las *E* en comparación con las *T*, lo que muestra una facilitación de la monta en las *E* y puede deberse a una modificación, desde la etapa prenatal, del sustrato químico de la neurotransmisión requerido para la expresión de la actividad copulatoria. Esta conducta facilitadora parece compensar el patrón copulatorio alterado observado en los machos<sup>118</sup>, estableciéndose un patrón conductual dimórfico sexual.

# INTRODUCCIÓN

## ORIGEN DE LAS BENZODIAZEPINAS

En los primeros años de la década de los 50 se generalizó el empleo de la fenotiazina y de la reserpina; habían transcurrido 200 años para que los efectos psicotrónicos de la *Rauwolfia serpentina* aparecieran nuevamente en la literatura occidental, pues en 1755 Rumpf ya había descrito sus propiedades tranquilizantes "...valet contra anxietatum..." en una publicación alemana titulada *Herbari Amboinensis Auctuarium*<sup>1</sup>. Hacia 1956, la evidencia epidemiológica y científica de la eficiencia antipsicótica de las fenotiazinas era contundente y un número considerable de enfermos mentales, en otras épocas confinados al cuidado hospitalario, regresaron a sus localidades y hogares como ciudadanos funcionales<sup>2</sup>.

Simultáneamente, aparecieron nuevas perspectivas prometedoras para las personas con neurosis de ansiedad y en 1955 se propuso al meprobamato como una droga que reducía específicamente la ansiedad y la tensión emocional sin producir somnolencia o sueño, un medicamento que representaría para el paciente neurótico lo que la fenotiazina al esquizofrénico<sup>3</sup>. Pero en 1958, algunos observadores críticos indicaron que no se justificaba un

exceso de entusiasmo<sup>4</sup>. Casi todos los informes favorables estaban basados en pruebas no controladas, pero los pocos que sí lo estaban demostraron que el meprobamato agregaba poco o ningún beneficio al que ya se disponía con el empleo de barbitúricos, por ello se considera al meprobamato como una droga que surgió como oportunista en la década de los tranquilizantes y a la cual se le recuerda con el hecho irónico de que para aquellos con un padecimiento "poco" severo existía "poca" ayuda medicamentosa<sup>5</sup>.

Sin embargo, aparecieron en el mercado otros medicamentos para el tratamiento de las neurosis con menor efecto psicotrópico, por lo que se les denominó tranquilizantes menores; a este grupo pertenecen las benzodiazepinas. La síntesis del clordiazepóxido, el primer tranquilizante benzodiazepínico utilizado, fue mas bien fortuito. Sternbach<sup>6</sup>, al trabajar con productos químicos con estructura de benzofenona a mediados de la década de los '30, había logrado sintetizar un grupo de compuestos conocidos como heptoxadiazinas, los cuales poseían anillos de 7 miembros. Su trabajo no prosperó hasta que en 1954 estudió algunos compuestos de este tipo y descubrió que la estructura postulada de las heptoxadiazinas era incorrecta, pues no se trataba de compuestos con anillos de 7 miembros sino de 6, que correspondían al grupo de los quinazolina-3-óxidos y al indagar su actividad farmacológica todos mostraron ser inertes. En 1955, Sternbach trató una de estas quinazolininas con metilamina, una amina primaria, mientras que otros 40

derivados los trató con aminas secundarias y terciarias. Supuso que el nuevo compuesto Ro 5-0690 también era inerte y no lo consideró para someterlo a pruebas.

Los exámenes farmacológicos de este compuesto tuvieron que esperar hasta 1957, en que Randall<sup>7</sup> encontró que tenía propiedades completamente insospechadas que le conferían un gran poder... "hipnótico, sedante y con efectos antiestricnínicos en ratones similares a los del meprobamato. En gatos es casi dos veces más potente como miorelajante y diez veces más potente como bloqueador del reflejo de flexión"... El análisis químico de este compuesto mostró que el tratamiento de la quinazolina-3-óxido con metilamina no había originado el compuesto esperado sino que había producido un reacomodo y agrandamiento del anillo heterocíclico formando una 1,4-benzodiazepina sustituida, específicamente un compuesto con un anillo de 7 miembros, la 2-metilamino-7-cloro-5-fenil-3H-1,4-benzodiazepina 4-óxido.

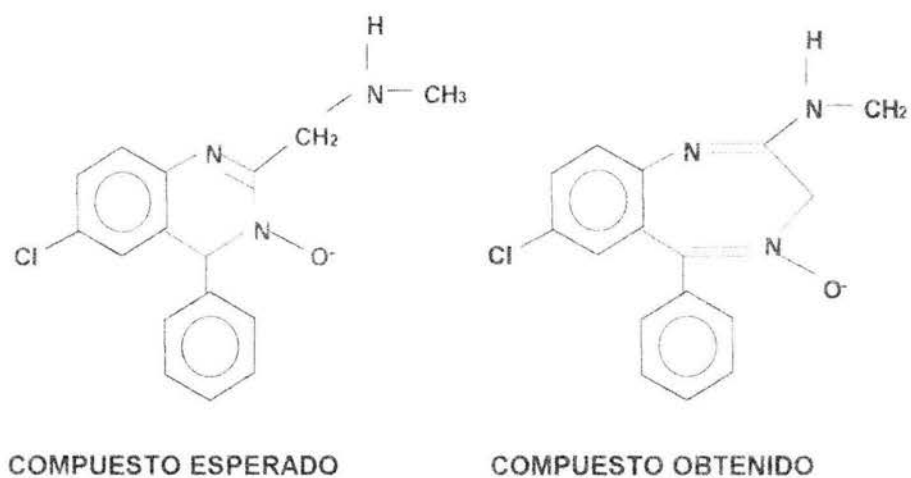
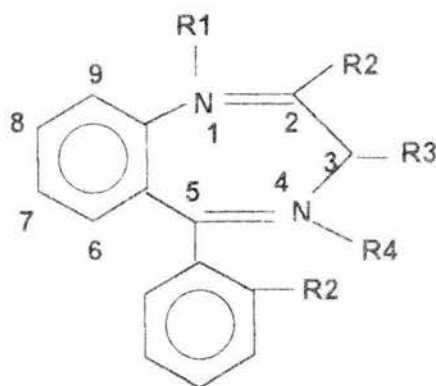


Figura 1. Origen de las benzodiazepinas. Comparación de las estructuras químicas de los compuestos esperado y obtenido.

Esta nueva droga inicialmente recibió el nombre genérico de metaminodiazepóxido pero posteriormente se le cambió por el de clorodiazepóxido<sup>8</sup>.

## FARMACOLOGIA DE LAS BENZODIAZEPINAS

Químicamente, el grupo de las benzodiazepinas (BDZ) poseén el núcleo denominado 1,4-benzodiazepina (Figura 2).



**Figura 2.** Configuración general de las benzodiazepinas: núcleo 1,4-benzodiazepina.

Poco después del clordiazepóxido aparecieron otras BDZ con utilidad clínica, por ejemplo el diazepam, que fué también sintetizado por Sternbach en 1959 y cuyas propiedades farmacológicas se describieron en 1961<sup>9</sup>. Su fórmula química se representa en la Figura 3.

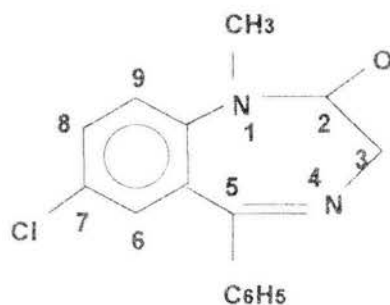


Figura 3. Fórmula química del diazepam (Cloro 1,3 dihidro-1-metil-5 fenil-2H-1,4-benzodiazepin-2-ona).

En el mercado nacional las BDZ de uso médico más frecuente se sintetizan en el Cuadro 1, junto con sus principales características fisicoquímicas<sup>1</sup>:

NOMBRE COMUN	PRINCIPIO QUIMICO	PROPIEDADES FISICAS
CLORODIAZEPOXIDO (CDZ)	7-cloro-2-metilamino-5-fenil-3H-1,4 benzodiazepina-4 óxido	FOTOSENSIBLE SOLUBLE EN AGUA. INESTABLE EN SOLUCION
DIAZEPAM (DZ)	7-cloro-1-metil-5-fenil-3-dihidro-2H-1,4 benzodiazepina-2-ona	SOLUBLE EN LIPIDOS
OXAZEPAM (OXA)	7-cloro-3-hidroxi-5-fenil-1,3 dihidro-2H-1,4 benzodiazepina-2-ona	SOLUBLE EN AGUA
NITRAZEPAM (NIT)	7-nitro-5-fenil-1,3 dihidro-2H-1,4 benzodiazepina-2-ona	SOLUBLE EN ALCOHOL

**CUADRO 1. CARACTERISTICAS FISICOQUIMICAS DE LAS BENZODIAZEPINAS DE USO MAS FRECUENTE.**

Fuente: Modificado de Greenblatt (1974)<sup>1</sup>

Las principales acciones farmacológicas de las BDZ se llevan a cabo sobre el sistema nervioso central y se traducen por efectos tranquilizantes (ansiolíticos), relajantes, anticonvulsivantes, sedantes e hipnóticos. Su efecto tranquilizante se debe a una inhibición de las estructuras del sistema límbico que se asocian con los estados emocionales<sup>1</sup>, por ello se aplican a gran variedad de trastornos emocionales y enfermedades neurológicas y mentales. La supresión de la ansiedad es el efecto de las BDZ que ha determinado su aplicación a diversos cuadros clínicos en donde este síntoma predomina<sup>10</sup>. En el cuadro 2 se comparan algunos efectos de las BDZ mas frecuentemente empleadas en nuestro medio.

COMPUESTO/EFEECTO	EEG	RELAJACION	EPISODIOS CONVULSIVOS
CLORDIAZEPOXIDO CDZ	↑ frecuencias con predominio de ondas de 14 a 24 Hz.	+++ Deprime fibras espinales $\gamma$ (acción primaria en formación reticular del tallo cerebral).	↑ umbral + a menor dosis que la necesaria para relajar o sedar. Inhibe postdescargas del hipocampo y del septum +. ↓ reacción de despertar (acción en hipocampo y amígdala) ++
DIAZEPAM DZ	mismo efecto	++ Deprime fibras espinales $\gamma$ (acción primaria en formación reticular del tallo cerebral).	↑ umbral ++ a menor dosis que la necesaria para relajar o sedar. Inhibe postdescargas del hipocampo y del septum +++ Inhibe postdescargas corticales. ↓ reacción de despertar (acción en hipocampo y amígdala) ++.
OXAZEPAM OXA	mismo efecto	1	2
NITRAZEPAM NIT	mismo efecto	++ Deprime fibras espinales $\gamma$ (acción primaria en formación reticular del tallo cerebral).	↑ umbral +++ a menor dosis que la necesaria para relajar o sedar. Inhibe postdescargas del hipocampo y del septum ++. Deprime ondas de 3 Hz de núcleos intralaminares talámicos semejantes a los del "petit mal".
MEDAZEPAM MED	mismo efecto	1	2

**CUADRO 2: EFECTOS COMPARADOS DE LAS BENZODIAZEPINAS SOBRE EL SISTEMA NERVIOSO.**

1.- HAY ACCION RELAJANTE PERO ES POCO SIGNIFICATIVA.

2.- HAY ACCION SOBRE CONVULSIONES A DOSIS ALTAS.



También se utilizan en alteraciones psicofisiológicas en donde la ansiedad se traduce en manifestaciones somáticas como sucede en la hiperquinesia, en diversas anomalías gastrointestinales y en dermatopatías; como auxiliares, ocasionalmente solos, en el control de algunos trastornos convulsivos y en padecimientos que se acompañan de un estado de ansiedad y agitación, como en la angina de pecho, en la enfermedad ácido péptica y en el asma<sup>7</sup>.

Como se puede apreciar en el cuadro 2, el NIT muestra mayor actividad anticonvulsiva que el DZ y éste que el CDZ. Los ataques mioclónicos ceden con el NIT, en tanto que el DZ da buen resultado en los ataques convulsivos menores y de pequeño mal, pero los ataques psicomotores (epilepsia del lóbulo temporal) suelen responder igualmente a ambas drogas. Además, las BDZ se aceptan como agentes de elección, por vía intravenosa, en casos de *status epilepticus*. Por último, el CDZ y el DZ se han empleado para disminuir los artefactos musculares y localizar un foco epiléptico primario durante la toma de electroencefalogramas<sup>7, 9, 10</sup>.

La administración repetida de dosis elevadas de estas sustancias puede inducir el desarrollo de dependencia psíquica y física. En los casos de dependencia física intensa el síndrome carencial se manifiesta por depresión,

agitación, insomnio, recrudecimiento de la alteración mental, pérdida del apetito y ocasionalmente convulsiones<sup>11</sup>.

Por otra parte, resulta interesante el hallazgo de De Blas et al. en 1987<sup>12</sup>, quienes han descrito la existencia de moléculas de BDZ y semejantes a BDZ en cerebros de ratas, de bovinos y de humanos. Existen diversas interpretaciones a este hecho. Sangameswaran et al. (1985,1986)<sup>13,14</sup>, indican que, aunque tales moléculas se podrían generar mediante un proceso biosintético, en el cerebro de bovinos, el aislamiento y la caracterización de N-desmetil-diazepam sugieren un origen exógeno de esta molécula, pues consideran que no es posible que los mamíferos sintetizen un anillo heterocíclico conteniendo un átomo de cloro en la posición 7. Otra posibilidad es que, sintetizados por microorganismos, sean ingeridos en la dieta y se acumulen en el cerebro y en otros tejidos.

Una tercera posibilidad es que el N-desmetildiazepam y las moléculas semejantes a BDZ procedan de fuentes distintas, el primero podría ser de origen exógeno, a partir de compuestos sintetizados artificialmente y las segundas productos formados por síntesis biológica<sup>14</sup>. Por lo tanto es preciso determinar si el N-desmetildiazepam aislado del cerebro de bovinos y de humanos es exógeno pues en caso de proceder de productos industriales, sería importante encontrar sus fuentes y cuantificarlo en el ambiente, pero si las

BDZ y las moléculas semejantes a BDZ fueran de origen biosintético endógeno, sería necesario identificar la función que desempeñan en la modulación de la neurotransmisión mediada por el ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA) así como su biotransformación, acumulación y eliminación<sup>15</sup>.

#### ABSORCION.

El DZ se absorbe rápida y completamente después de su administración por vía oral (VO). Por vía intramuscular (IM) la absorción es deficiente<sup>16,17</sup>, ya que se obtienen bajos niveles plasmáticos, comparados con la VO o endovenosa (IV)<sup>17,18</sup>.

#### CONCENTRACION SANGUINEA.

La administración por vía oral de 10 a 30 mg produce una concentración plasmática máxima de 130-500 ng/ml entre 0.5 y 4 horas después; por vía IM 20 mg originan de 35-290 ng/ml entre 1 y 1.5 horas, y la misma dosis por vía IV, produce 1.6-7mg/ml en 15 minutos. La concentración plasmática mínima efectiva es de alrededor de 400 ng/ml, siendo menor en alcohólicos.

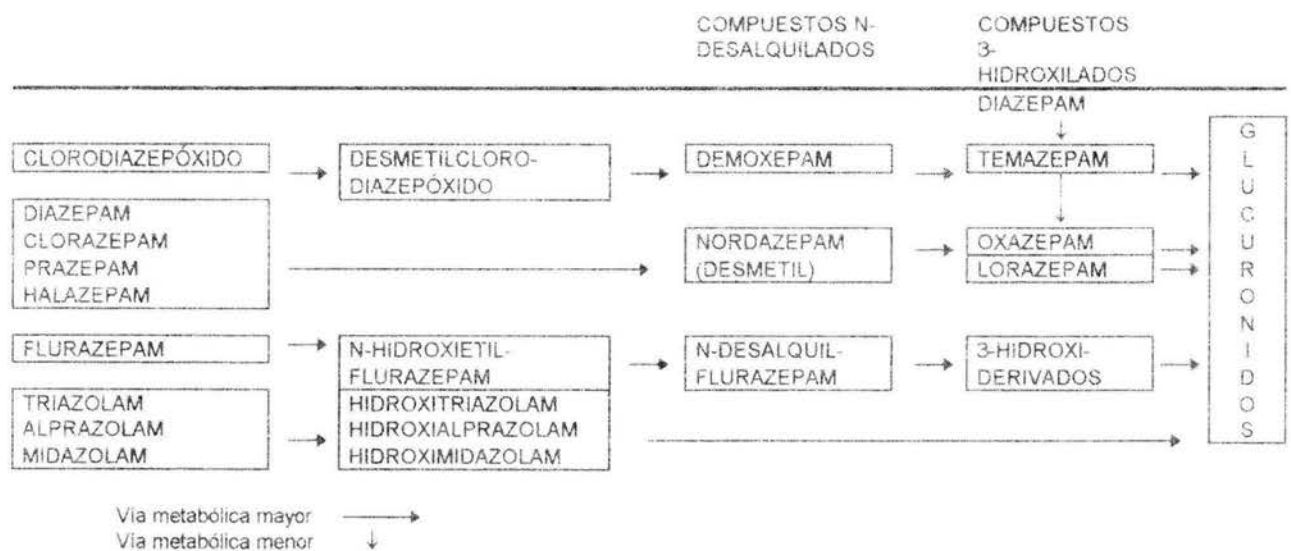
El fármaco se une a las proteínas plasmáticas en un 98-99% después de administrado<sup>16-19</sup>. Su vida media es bifásica, con una duración media para la Fase  $\alpha$  de 1 a 10 horas, y de 2 a 8 días para la Fase  $\beta$  ( algunos autores consideran un rango de 8 a 93 horas para ambas fases); ambas se prolongan con la edad, con la obesidad y en sujetos con daño hepático y renal<sup>16,17</sup>. La vida media del DZ es más larga en recién nacidos, que en lactantes; en niños de 3 a 7 años, es de 18 horas, y en prematuros de 54 horas<sup>20</sup>.

## DISTRIBUCION.

La alta liposolubilidad de las BDZ (dada por su estructura química), como la del DZ, permite su amplia distribución entre los tejidos corporales<sup>17</sup>, acumulándose preferentemente en tejidos ricos en lípidos, tales como el cerebro y el tejido adiposo<sup>21</sup>, y en menor cantidad en células sanguíneas. El DZ y su principal metabolito, el desmetildiazepam, atraviesan la barrera placentaria y son secretados en la leche materna; durante la terapia a largo plazo, el desmetildiazepam se acumula en el fluido cerebroespinal, uniéndose también a proteínas plasmáticas en un 97%<sup>16</sup>.

## METABOLISMO.

En el hígado humano, sufre un proceso de N-desmetilación (N-desalquilación), transformándose en N-desmetildiazepam o Nordazepam, sustancias farmacológicamente activas, después en hidroxidiazepam, y por último en oxazepam<sup>19</sup>, conjugándose posteriormente con ácido glucurónico<sup>16,22</sup>. Las vías para el metabolismo del DZ y principales BDZ se muestran en el Cuadro 3.



**CUADRO 3. METABOLISMO DE LAS BENZODIAZEPINAS:**

El proceso de desmetilación e hidroxilación del DZ disminuye en los recién nacidos a término y pretérmino, pues tienen una capacidad disminuida para metabolizar y excretar la droga. En el producto a término, los componentes

hidroxilados aparecen en la orina hasta dos o tres semanas después del nacimiento. La limitada capacidad para metabolizar y excretar el fármaco puede producir una larga persistencia del mismo en el organismo, y por lo tanto, de sus efectos farmacológicos<sup>17</sup>.

#### EXCRECION.

Alrededor del 70% del DZ se excreta en la orina<sup>16,17,19</sup>, el 10% en las heces, y ocasionalmente en la bilis<sup>16</sup>, donde se puede detectar aún dos semanas después de la ingestión del fármaco<sup>22</sup>.

#### INDICACIONES.

Las BDZ, y en particular el DZ, desde su introducción al mercado farmacéutico en 1963, han sido empleadas con éxito en el tratamiento de los trastornos psicofisiológicos, en donde la ansiedad se traduce en manifestaciones somáticas como hiperquinesia, alteraciones gastrointestinales y dermatopatías, en enfermedades orgánicas específicas como *angor pectoris*, úlcera gástrica, colitis o enfermedades funcionales del sistema digestivo y asma, que se acompañan de un estado de ansiedad, agitación.

También se utilizan en padecimientos que se acompañan de crisis convulsivas, en estado epiléptico y en el síndrome de abstinencia por alcohol (agitación, temblor, *delirium tremens* y alucinaciones). Como relajante muscular en espasmos musculares debidos a patologías locales como inflamación secundaria a trauma, espasticidad causada por desórdenes de neuronas motoras superiores, en atetosis y en el tratamiento del tétanos<sup>17,22</sup>. En la sedación basal antes de medidas terapéuticas o intervenciones, tales como cateterismo cardíaco, endoscopía, procedimientos radiológicos, intervenciones quirúrgicas menores, reducción de dislocaciones y fracturas, biopsias, etc.<sup>19</sup>.

El DZ, es quizá la BDZ más utilizada en Obstetricia para el tratamiento de la eclampsia, preeclampsia, amenaza de aborto, placenta previa, actividad prematura del útero, complicaciones psiquiátricas del embarazo y en el trabajo de parto<sup>21</sup>.

## MECANISMO DE ACCION

### a. RECEPTORES BENZODIAZEPINICOS.

Los primeros estudios sobre receptores de BDZ (R-BDZ), se realizaron utilizando diazepam- $^3\text{H}$ <sup>23,24</sup>. Los sitios de unión mostraron afinidad nanomolar y fueron identificados en las membranas del tejido cerebral. La relativa afinidad de las BDZ por los sitios permitió explicar sus efectos anticonvulsivantes y ansiolíticos. Este receptor "central" (RC-BDZ) ha sido purificado, conociéndose su secuencia y expresión funcional en el DNA de ovocitos de rana. El RC-BDZ, es un complejo macromolecular que incluye el sitio receptor para el neurotransmisor inhibitorio ácido  $\gamma$ -aminobutírico ó ácido 4-butanoico (GABA), y para otros compuestos como barbitúricos y posiblemente etanol. Aquí las BDZ facilitan el efecto del GABA en el SNC. Desde los estudios iniciales con el ligando diazepam- $^3\text{H}$ , los tejidos periféricos como riñón, hígado y pulmón que se utilizaron como controles, mostraron también elevadas densidades de diazepam- $^3\text{H}$ , con afinidad nanomolar semejante a la de los RC-BDZ<sup>23</sup>. Debido a su identificación fuera del SNC se les llamó receptores periféricos a BDZ (RP-BDZ)<sup>25,26</sup>. Investigaciones posteriores, revelaron varias diferencias entre los sitios receptores centrales y los periféricos<sup>27</sup>.



Los RC-BDZ fueron descritos por primera vez en 1977 por Squires y Braestrup<sup>24</sup>, y Möhler y Okada<sup>23</sup> en el SNC de la rata. Su localización fue, en orden de importancia, la membrana sináptica de neuronas de corteza cerebral, hipotálamo, cerebelo, mesencéfalo, hipocampo, cuerpo estriado, médula oblonga y médula espinal. Estos hallazgos en la rata corresponden al cerebro humano en especificidad y distribución regional<sup>23,24</sup>. Gavish y Snyder confirmaron estos hallazgos, encontrando además que los receptores GABA poseen R-BDZ<sup>28</sup>.

Además, Möhler y Okada<sup>23</sup>, y Braestrup y Squires<sup>29</sup> informaron de sitios receptores en riñón, hígado y pulmón, diferentes a los del cerebro<sup>23,24</sup>. Por su parte, Bossman y cols. comunicaron la existencia de un receptor nuclear, independiente al ya descrito en la membrana sináptica de neuronas<sup>30</sup>.

Los R-BZD se encuentran principalmente en el SNC. Están ligados al complejo macromolecular receptor GABA-BDZ-ionóforo del cloro en la membrana sináptica neural, relacionándose, por lo tanto, con efectos ansiolíticos, tranquilizantes y anticonvulsivantes. Sus ligandos más frecuentes son las BDZ<sup>22,23,31,32</sup>.

Estudios en gato, mostraron que el DZ puede potenciar la inhibición presináptica y postsináptica del GABA en la médula espinal, y posteriormente

en otras regiones como ganglios sinápticos, *nucleus cuneatus*, corteza cerebral, sustancia negra, hipocampo y células cerebelares de Purkinje, células del rafe dorsal, cultivo de células hipotalámicas y cultivos de médula espinal de rata fetal<sup>21</sup>.

De esta manera, en el SNC las BDZ facilitan y potencian los efectos inhibitorios del GABA a nivel de sus sitios receptores postsinápticos (R-GABA). Esta acción se debe a que incrementan la afinidad del neurotransmisor por sus receptores al competir con el factor endógeno denominado "GABA-modulina", el cual regula alostéricamente este proceso<sup>32,33</sup>, y producen una apertura de los canales de cloro. El RC-BDZ forma parte de la fracción protéica del complejo GABA-proteína-ionóforo de cloro<sup>21,32,33</sup>. El flujo de iones dentro de la célula, incrementa la polaridad de la membrana celular, de tal manera que cuando un estímulo llega, la neurona no puede despolarizarse. El peso molecular del RC-BDZ es de 200,000 daltones, la GABA-modulina es una proteína ácida termoestable de 15,000 daltones, mientras que el receptor GABA<sub>A</sub> tiene un peso molecular de 900,000 daltones<sup>21</sup>.

Se admite que las BDZ actúan a concentraciones nanomolares a través del complejo GABA receptor-ionóforo de cloro, incrementando la conducción de Cl<sup>-</sup> a través del canal. Además a concentraciones micromolares, las BDZ inhiben el voltaje dependiente de los canales de calcio en el cerebro, por lo que se ha

sugerido que las BDZ interactúan con sitios de reconocimiento específico asociados a canales dependientes de cambios de voltaje por calcio. Las concentraciones adecuadas para bloquear esos canales, son equivalentes a las anticonvulsivantes y comparables con las necesarias para producir sedación o hipnosis. Sugiriéndose, por lo tanto, que los efectos sedantes de las BDZ son debidas a una inhibición de la despolarización dependiente del consumo de calcio, cuando las acciones convulsivantes son el resultado de la potenciación de los efectos GABAérgicos<sup>34,35</sup>.

El ionóforo de cloro<sup>32,35</sup> es una molécula pequeña hidrofóbica, que se disuelve en la bicapa lipídica, aumentando la permeabilidad al ion. Existen dos clases de ionóforos, transportadores iónicos móviles y los formadores de canales. Ambos tipos actúan protegiendo la carga del ion transportado, de modo que éste puede entrar en el interior hidrofóbico de la bicapa lipídica. Puesto que no están acoplados a fuentes energéticas, permiten una difusión simple de los iones a favor de sus gradientes electroquímicos<sup>36</sup>.

La concentración de cloro es mucho más elevada fuera de la célula que dentro de ella, correspondiendo a un potencial de equilibrio para el cloro cercano al potencial normal de reposo ó incluso más negativo. Por consiguiente, la apertura de dichos canales de cloro, tiende a mantener el potencial de

membrana en un valor muy negativo o incluso hiperpolarizado, haciendo muy difícil la despolarización de la membrana y por ello la excitación de la célula<sup>36</sup>.

La GABA-modulina, es un polipéptido asociado con los receptores GABA, se localiza probablemente en la membrana postsináptica. Regula al GABA al competir con los sitios de reconocimiento de manera alostérica. De aquí que disminuye los efectos inhibitorios del GABA, y de manera indirecta, el efecto de las BDZ<sup>37</sup>.

#### b. RELACION CON MINERALES.

Se ha demostrado interacción entre los R-BDZ y algunos aniones. El cloro, bromo, yodo, nitrato y tiocianato incrementan la unión del DZ a su receptor, sugiriendo un papel importante en la regulación de la afinidad del sitio ligando de BDZ<sup>21</sup>.

#### c. RECEPTOR PERIFERICO A BENZODIAZEPINAS (RP-BDZ).

Los receptores periféricos, a diferencia de los centrales, no están ligados al complejo macromolecular<sup>25,26,27,38-42</sup>. Se distribuyen ampliamente en órganos

como riñón, corazón, pulmón, glándulas adrenales, testículos, pituitaria, hígado, bazo, epitelio nasal, glándula salival, lengua, mastocitos, plaquetas, médula espinal y cerebro<sup>25,38</sup>. Se les encuentra en grandes cantidades en las células del epéndimo, en el plexo coroideo y en el bulbo olfatorio<sup>25,26,27,38-42</sup>. A nivel celular se localizan principalmente sobre la membrana externa mitocondrial<sup>41,43,44,45</sup>, aunque también se han hallado en la membrana sináptica<sup>43</sup>, y en el núcleo<sup>46</sup>. El DZ se liga a los RP-BDZ de manera débil<sup>42</sup>, aunque se han observado uniones de alta afinidad<sup>46</sup>. Los principales ligandos son la BDZ Ro5-4864 (4-clorodiazepam) y la isoquinolona PK 11195<sup>29,40,41,46,47</sup>.

El DZ tiene afinidad a concentraciones nanomolares para los RP-BDZ, y a dosis terapéuticas, circula en el organismo a concentraciones micromolares, lo que podría ocasionar un gran número de efectos, entre ellos una alteración en la liberación de las hormonas del crecimiento, ACTH, prolactina y luteinizante producidas en la hipófisis anterior, así como en los niveles plasmáticos de hormonas adrenocorticales, testiculares y ováricas. También disminuye los niveles de glucocorticoides en períodos de estrés, e inhibe la producción de aldosterona en células adrenales de bovino. Se han informado otros efectos metabólicos, como el aumento de la melanogénesis en las células del melanoma, la inducción de la síntesis de hemoglobina en células eritroleucémicas Friend, la inhibición de la proliferación de células de timoma, la estimulación de la metilación fosfolipídica en C6 en el astrocitoma, como parte de

la respuesta inmune humoral en ovejas *in vivo*, y de la quimiotaxis en monocitos<sup>25,39,41-44,48</sup>.

Además juegan un importante papel como potenciales moduladores del metabolismo intermedio, así como en la regulación de la esteroidogénesis<sup>35,41,43,44,48</sup>.

#### d. ONTOGENIA DE RECEPTORES BENZODIAZEPINICOS (R-BDZ).

Los R-BDZ son detectables en el cerebro de rata 8 días antes del nacimiento, considerándose su aparición más temprana que la de otros receptores<sup>49</sup>, como los opioides<sup>50</sup>, colinérgicos, dopaminérgicos<sup>51,104</sup>, GABA<sup>51,52,53,104</sup> y muscarínicos<sup>49</sup>, aunque otros estudios los han detectado de manera paralela a los de GABA<sup>53</sup>.

El desarrollo de los receptores inicia aproximadamente del día 14 al 17 de la gestación (G14-G17), la concentración a esta edad es del 5% en relación a los niveles de adulto, 35% al nacimiento y 77% en el día postnatal 7 (P7). La densidad del adulto se alcanza a las 2 semanas<sup>49</sup>. Regan y cols. (en ratones

CD-1), encontraron pequeñas cantidades en el día G17, un 23% en el día P1, 47% en P7, 50% en P15 y los niveles del adulto en el día P21<sup>46</sup>.

La ontogenia de los receptores en la rata difiere solamente en días comparada con la del ratón (14 a 17 días, respectivamente), siendo el mecanismo de aparición el mismo<sup>46</sup>. Los RC-BDZ no son detectables en el día G16, ya que aparecen perinatalmente, aumentando su número en la primera semana postnatal. En el día P1, la cantidad de RC-BDZ es la tercera parte de la encontrada en el adulto<sup>49,53</sup>. En contraste, el número de los RP-BDZ en cerebros fetales en el día G16 es un poco menor que el del adulto. El número de RC-BDZ y RP-BDZ en el cerebro de rata es parecido en el primer día del nacimiento, pero en el adulto existe una proporción tres veces mayor de RC-BDZ<sup>25</sup>.

Similares observaciones han sido encontradas por Lippa y cols. en la corteza cerebral de ratas y en otras especies de vertebrados e invertebrados, lo que sugiere un origen filogénicamente remoto<sup>51,104</sup>.

De los dos tipos de receptores para BDZ, los periféricos aparecen tardíamente en la evolución y solo se detectan en mamíferos, en tanto que los centrales son demostrables en aves, reptiles y en algunas especies de anfibios (Bolger y cols. citado en ref. <sup>41</sup>).

## CONTRAINDICACIONES.

Las BDZ, y en particular el DZ, se encuentran contraindicadas en pacientes con antecedentes de hipersensibilidad, psicosis, glaucoma de ángulo cerrado (puede ser usado en pacientes con glaucoma de ángulo abierto que reciben terapia apropiada); pacientes con evidencia clínica o bioquímica de enfermedad hepática y/o renal, durante la lactancia, primer trimestre del embarazo (algunos autores la contraindican durante toda la gestación)<sup>17</sup>.

En miastenia grave, hipercapnia crónica severa, alteraciones cerebrales crónicas, insuficiencia cardíaca o respiratoria, en pacientes con enfermedad pulmonar obstructiva crónica o insuficiencia pulmonar<sup>19</sup>.

## DEPENDENCIA.

Con respecto a la psicofarmacología, el tratamiento a largo plazo con DZ es un tópico de interés pues, a pesar de que se ha informado que los derivados de las BZD tienen pocos efectos colaterales<sup>54</sup>, existen datos en la literatura que indican que su administración crónica puede producir tolerancia a sus



efectos sedantes y anticonvulsivantes<sup>55,56,57</sup> y al suspenderla propicia la aparición de un síndrome de abstinencia<sup>58</sup>.

Mazzi<sup>59</sup> llamó la atención sobre la existencia de un posible síndrome de abstinencia al DZ en un recién nacido, caracterizado por presentar marcada hipertonia e hiperreflexia después de un parto espontáneo a los 8 meses de gestación. Este caso parece ser el primero informado en la literatura, sin embargo, existen otros dos neonatos con cuadros clínicos similares debidos a clordiazepóxido. El primero, informado por Bitnum<sup>60</sup>, tuvo hipotonía seguida de hipertonia y el segundo<sup>61</sup> mostró síntomas neonatales tardíos de hipertonia notable. Aún cuando estas características también pueden encontrarse en prematuros, en niños de bajo peso o en neonatos con asfixia perinatal, en el caso informado por Mazzi no se observó ninguna de estas alteraciones<sup>59</sup>.

De aquí que el uso prolongado de dosis terapéuticas pueda llevar a la dependencia psíquica y física<sup>22</sup>. El síndrome de abstinencia suele ocurrir en pacientes después de tratamientos largos (de 4 a 6 semanas); por ello, la dosis debe disminuirse gradualmente de 4 a 8 semanas para evitar la aparición del mismo, especialmente en pacientes con historia de convulsiones o epilepsia<sup>17</sup>. En casos de dependencia física intensa, el síndrome carencial se manifiesta por depresión, agitación, insomnio, recrudecimiento de la alteración mental, pérdida del apetito y ocasionalmente convulsiones<sup>21,22</sup>. Este

síndrome, también se presenta en recién nacidos, de madres que fueron sometidas a tratamiento crónico con BDZ durante el embarazo<sup>20,22,59,62</sup> y se ha correlacionado con la capacidad del bebé para metabolizarlas<sup>63</sup>, en cambio el síndrome de abstinencia<sup>20,62</sup>, denominado "síndrome del niño de trapo" por la hipotonía, la hipotermia, la sedación y la dificultad para la succión, no ha sido asociado hasta la fecha con un mecanismo molecular definido, sin embargo, se ha tratado de relacionar con la presencia de RC-BDZ de las membranas plasmáticas sinápticas obtenidas del cerebro de distintos mamíferos<sup>41,42,64</sup>.

## PRECAUCION.

El DZ debe ser administrado con precaución en pacientes con depresión acompañados de ansiedad, ya que se pueden presentar tendencias suicidas. En pacientes que conducen o realizan tareas que requieren un buen estado de alerta. Debido al informe de algunos casos de neutropenia, daño en la función hepática (ictericia) y renal, así como disminución del hematocrito, se deben realizar conteos sanguíneos periódicos y pruebas de la función hepática y renal durante la terapia a largo plazo. En el lactante, puede producir letargia y pérdida de peso, debido a que el DZ y sus metabolitos se excretan por la leche materna. La administración endovenosa del DZ, deberá realizarse con mucha precaución, ya que se puede originar arterioespasmo, con la posible

producción de gangrena que requiera amputación. Cuando se realice deberá mantenerse al paciente en observación por lo menos tres horas<sup>17</sup>.

## INTERACCIONES MEDICAMENTOSAS.

La excreción de las BDZ puede disminuirse por drogas que interfieren con su metabolismo, las cuales pueden incrementar el efecto sedante, dañando más la función psicomotora. Las principales drogas son: cimetidina, anticonceptivos orales, disulfiram, fluoxetina, isoniazida, ketoconazol, metoprolol, propanolol, propoxifeno, ácido valproico. La digoxina puede incrementar las concentraciones, las teofilinas pueden antagonizar los efectos sedantes de las BDZ. La ranitidina disminuye la absorción gastrointestinal, al igual que los antiácidos<sup>17,19</sup>.

## ALTERACION DE LAS PRUEBAS DE LABORATORIO

El DZ raramente produce alteraciones como: elevación de las transaminasas y fosfatasa alcalina, modificación de los valores sanguíneos de  $\gamma$ -glutamil-transpeptidasa y glucosa, y pruebas de función tiroidea anormales<sup>19</sup>.

## REACCIONES ADVERSAS.

Se pueden citar principalmente: somnolencia, fátiga, resequeidad de la boca, debilidad muscular y reacciones alérgicas<sup>20</sup>. Otros efectos adversos menos frecuentes son, en el SNC: sedación y sueño, depresión, letargia, apatía, fátiga, hipoactividad, desorientación, amnesia anterógrada, confusión, llanto, delirio, cefalea, afonía, disartria, estupor, convulsiones, coma, síncope, temblor, distonía, vértigo, náusea, euforia, irritabilidad, dificultad en la concentración, agitación, incapacidad para realizar funciones mentales complejas, hemiparesia, hipotonía, ataxia, incoordinación, síntomas extrapiramidales. Psiquiátricas: histeria, psicosis, tendencias suicidas, y algunos problemas de comportamiento. Gastrointestinales: constipación, diarrea, resequeidad de la boca, náusea, anorexia, cambios en el apetito, vómito, incremento en la salivación, gastritis. Genitourinarias: incontinencia, cambios en la libido, retención urinaria, irregularidades menstruales. Cardiovasculares: bradicardia, taquicardia, colapso vascular, hipertensión, hipotensión, palpitaciones, edema, flebitis y trombosis en sitios de aplicación IV. Dérmicas: urticaria, prurito, lesiones maculopapulares, pérdida de pelo, hirsutismo, edema facial y de tobillos. Otras: elevaciones de LDH, fosfatasa alcalina; disfunción hepática (hepatitis reactiva), leucopenia, discrasias sanguíneas incluyendo agranulocitosis, anemia, trombocitopenia, eosinofilia, incremento del peso

corporal; deshidratación, linfadenopatía, dolor articular, ardor y enrojecimiento en el sitio de aplicación intramuscular<sup>10</sup>.

En casos de sobredosificación, se presentará intensificación de los efectos terapéuticos (sedación, relajación muscular, sueño profundo, etc), fatiga, ataxia, amnesia, depresión respiratoria. En tales casos se recomiendan medidas generales de apoyo, como la ventilación adecuada o el lavado gástrico. También se puede aplicar un antagonista de la benzodiazepinas, por ejemplo el flumazenil<sup>16-19</sup>.

## TOXICIDAD

Algunos estudios en animales han mostrado que la exposición prenatal a distintos neurolépticos y ansiolíticos origina alteraciones significativas del desarrollo y de la conducta detectadas algún tiempo más tarde. La administración oral de DZ durante la gestación originó retardo en la maduración sexual y daño en la adquisición de la respuesta condicionada de evasión en los hijos de ratas así tratadas<sup>65</sup>. También interfirió con el desarrollo de los procesos de excitación de las crías de ratas expuestas durante la última semana gestacional<sup>66</sup>. Esta droga lipofílica con bajo peso molecular, cruza la placenta rápidamente y, puesto que la capacidad del feto o del recién

nacido para eliminar la droga es muy pequeña<sup>67,68,69</sup>, se acumula en el feto junto con sus metabolitos farmacológicamente activos, permaneciendo en sus tejidos por períodos prolongados y excretándose con lentitud. Este hecho se sustenta en estudios que han mostrado que las concentraciones en plasma fetal son mayores que las encontradas en plasma materno<sup>70</sup> y que los metabolitos permanecen postnatalmente en altas concentraciones<sup>71,72</sup> (Cuadro 4).

TEJIDO	CONCENTRACIÓN DE LA DROGA (ng/g de tejido y ng/ml de sangre)		
	1 hr	2 hr.	6 hr
Sangre materna	25.6	18.0	11.3
Sangre de cordón umbilical	47.5	49.0	19.0
Cerebro fetal	29.0	14.5	21.5
Hígado fetal	31.0	13.5	13.9
Tracto gastrointestinal fetal	59.0	22.5	5.2
Feto (total)	16.5	9.3	3.9
Líquido amniótico	13.8	5.1	2.6
Placenta	39.0	9.3	4.9

**CUADRO 4. CONCENTRACIÓN DE DZ EN SANGRE MATERNA Y TEJIDOS FETALES**

Fuente: Erkkola et al. (1974)<sup>70</sup>, Wadell et al. (1981)<sup>71</sup> y Idánpään-Heikkilä et al. (1971)<sup>72</sup>

Saito et al.<sup>73</sup> y Zimmerman<sup>74</sup> efectuaron un estudio comparativo de la toxicidad fetal de las benzodiazepinas, nitrazepam (NIT), oxazepam (OXA), nimetazepam (NMZ), clonazepam (CLZ), diazepam (DZ) y clordiazepóxido (CDZ). El NIT y NMZ causaron un gran daño al feto comparado con otros análogos. La fetotoxicidad al NIT fue dependiente de la dosis (de 50 a 100 mg/kg) con una toxicidad incrementada en el grupo tratado del 8º al 10º días de

gestación. Las concentraciones en suero materno y la concentración fetal total fueron más altas que las del DZ, el cual mostró débil toxicidad en este estudio, concluyéndose que la intensidad de la fetotoxicidad inducida por las benzodiazepinas estaba relacionada con la cantidad de droga contenida en sangre.

La administración de NIT en hembras preñadas produjo resorciones, muerte fetal y malformaciones en un 44.5%, 1.3% y 15.5% respectivamente. Estas malformaciones incluyeron ectrodactilia, onfalocele, cola rizada y alteraciones en patas. Además se observó una de cada una de las siguientes malformaciones: hidrocefalia, hendidura facial, proboscis, labio leporino. La toxicidad fetal de NMZ fue más alta que la de NIT, pero todos los cambios se debieron a resorción. DZ y CLZ indujeron débil toxicidad para la misma dosis de NIT. Sólo se observó una muerte fetal en el grupo tratado por OXA. El número de resorciones aumentó gradualmente entre las dosis de 0 a 100 mg/kg, pero la incidencia de malformaciones no cambió en forma importante porque solo estuvo circunscrita a 7 sindactilias. Con la administración de NIT después del día 10, se observaron menos malformaciones, por el contrario antes del día 10 hubo muchas malformaciones<sup>73</sup>.

El DZ, en gineco-obstetricia, se ha usado con éxito como premedicación del parto, en el tratamiento de amenazas de aborto, en casos de actividad prematura del útero, de placenta previa, de eclampsia y pre-eclampsia, sin que a juicio de algunos autores<sup>1,10,16</sup> produzca efectos secundarios indeseables en la madre o en el producto. Sin embargo, desde 1969 Flowers et al.<sup>75</sup> observaron que los recién nacidos de mujeres tratadas con DZ durante el parto presentaban hiporreflexia, hipotonía, hipotermia, depresión neurológica y respiratoria y que el Apgar al minuto de nacimiento era de 5 a 6. La disminución del Apgar también fue observada por Scher et al.<sup>76</sup>, en hijos de madres que recibieron 20 mg. del fármaco durante el trabajo de parto y una disminución significativa de la frecuencia del ritmo cardíaco de la que se recuperaban a los 65 minutos. Los hijos de las mujeres con eclampsia o preeclampsia que recibieron durante el embarazo dosis de DZ de 1.5 a 14.7 mg/kg de peso corporal, presentaron depresión respiratoria y neurológica, hipotonía y ausencia de reflejos primitivos. La recuperación de los niños se produjo después de varias horas e incluso días.

Efectos adversos semejantes fueron informados por Mc.Carthy et al.<sup>77</sup>, Owen et al.<sup>78</sup>, Cree et al.<sup>63</sup> y Rowlatt<sup>79</sup>, cuyos resultados han mostrado consistencia externa a pesar de las diferencias en los diseños de estudio y en la validez interna (Cuadro 5). Haram<sup>80</sup> y Rementeria et al.<sup>20</sup> observaron además síntomas de intoxicación como sedación, depresión respiratoria, calificaciones



Apgar bajas, letargia, hipoactividad, hipotermia, distonía, irritabilidad, hipotonía, y síntomas extrapiramidales.

AUTOR	OWEN (1972) <sup>78</sup>	CREE (1973) <sup>83</sup>	Mc CARTHY (1973) <sup>77</sup>	WALSS (1992) <sup>124</sup>
TIPO DE ESTUDIO	Casos y controles	Casos y controles	Serie de casos	Prospectivo longitudinal
SELECCION DE LA MUESTRA	Mujeres con embarazo y TA elevada	Mujeres con preeclampsia	Mujeres con embarazo a término	Mujeres con embarazo y TA elevada
NUMERO DE PACIENTES	25	32	2	36
TIEMPO DE EXPOSICION	?	15 h antes del nacimiento	5 h	24 h antes del nacimiento
DOSIS (mg)	?	10-30 30-200	100 y 180	30
RESULTADOS	Hipotermia	↓ Apgar e hipotermia	↓ Apgar	Ninguno
VALIDEZ INTERNA	No desarrolla mecanismos para el control de sesgos	Parcial control de sesgos	No desarrolla mecanismos para el control de sesgos	Desarrolla mecanismos para el control de sesgos
VALIDEZ EXTERNA	Resultados no extrapolables	Resultados no extrapolables	Resultados no extrapolables	Resultados extrapolables

CUADRO 5. EFECTOS DEL DZ EN EL RECIEN NACIDO

Trabajos en fetos de ratón de 18 días de gestación demostraron que el DZ produce alteraciones histológicas en la retina<sup>81</sup>, el corazón<sup>82</sup>, los riñones<sup>83,84</sup> y los pulmones<sup>85</sup>. Estos últimos habían alcanzado la etapa alveolar del desarrollo pero presentaban zonas colapsadas, engrosamiento del epitelio y cantidades menores de secreciones, alteraciones que pueden ser las causales del color cianótico de la piel y, en parte, de la depresión respiratoria encontrada en estos fetos<sup>85</sup>.

En fetos de 16 días de gestación el DZ también altera la estructura histológica del estómago, del intestino, del páncreas y del mesencéfalo, donde se encontró aumento de la longitud de las células, aspecto vacuoiado del citoplasma y núcleos voluminosos con la cromatina atípicamente distribuída, según se sabe por comunicaciones formales<sup>126,127,128</sup>.

En el testículo de ratones de la cepa CD-1 de 35 días de edad, que recibieron DZ durante la gestación, se ha encontrado menor cantidad de espermatozoides en el lumen tubular, mayor cantidad de células de Leydig con núcleos mayores, cromatina distribuida en grumos gruesos y citoplasma vacuolar redundante, lo que se ha interpretado como un retardo en la espermatogenesis como resultado de la interferencia de la maduración testicular al interactuar el medicamento con los RP-BDZ o con la formación del uso acromático<sup>109</sup>. En el ratón adulto tratado de manera crónica con DZ, se ha encontrado adelgazamiento del tubo seminífero con incremento de la afinidad por colorantes ácidos principalmente en las células de Leydig y reorganización de la cromatina de las células de la estirpe germinal<sup>110</sup>, lo cual concuerda con los hallazgos histológicos en el testículo de ratones jóvenes<sup>109</sup>.

En la ultraestructura del corazón<sup>86</sup>, la placenta<sup>87</sup> y la célula de Sertoli<sup>112</sup> se ha demostrado que el DZ provoca un aumento en la cantidad de las cisternas y vesículas del complejo de Golgi, presencia de elementos membranosos, distensión del retículo endoplásmico rugoso, existencia de enormes vacuolas rodeadas por numerosos gránulos de glucógeno y núcleos voluminosos, con abundante cariolinfa, con la cromatina en grumos gruesos adheridos con frecuencia a la membrana nuclear.

Los estudios en fibroblastos cultivados realizados por Breen<sup>88</sup>, así como los de Stenchever<sup>89</sup> y Staiger<sup>90</sup> en leucocitos humanos sometidos a tratamientos *in vitro* con DZ, indican que el fármaco causa rupturas cromosómicas (Cuadro 6), aún cuando *in vivo* existen mecanismos homeostáticos que podrían modificar su acción, y es probable que el aspecto de la cromatina observado en los núcleos de las células del árbol respiratorio y de los fibroblastos se deba a este tipo de ruptura cromosómica<sup>85</sup> pues, por los trabajos de Idänpään-Heikkilä et al.<sup>72</sup> y los de Erkkola et al.<sup>70</sup>, se sabe que el DZ y sus metabolitos circulan en la sangre fetal en cantidades equivalentes a las que se agregaron a los cultivos de fibroblastos y de leucocitos humanos.

AUTOR	STENCHEVER (1969) <sup>89</sup>					STAIGER (1970) <sup>90</sup>		
TIPO DE ESTUDIO	Simple o bidimensional multivalente					Simple o bidimensional multivalente		
SELECCION DE LAS MUESTRAS	Sangre de 1 donador sano, una sola toma					Sangre de 4 donadores desconociéndose estado de salud, con tomas a diferentes tiempos.		
TIEMPO DE EXPOSICION	72 h					72 h		
NUMERO DE CARIOTIPOS	200		500			100		
CONCENTRACION DE DIAZEPAM ( $\mu\text{g/ml}$ )	0	0.1	10	20	50	0	10	20
NUMERO DE RUPTURAS CROMOSOMICAS	3	6	15	82	111	Se desconocen		
% DE RUPTURAS CROMOSOMICAS	1.5	3	7.5	16.4	12.2	4.6	5.1	2.4
EFFECTOS CITOTOXICOS	*	**		***		Se desconocen		
CONTROL DE VARIABLES EXTRAÑAS	Constancia de las condiciones					Se desconocen		
VALIDEZ EXTERNA	Resultados no extrapolables					Resultados no extrapolables		

**CUADRO 8. ESTUDIOS *IN VITRO* DEL EFECTO DEL DZ EN CROMOSOMAS DE LINFOCITOS HUMANOS.**

\* sin efecto. \*\* alteraciones leves \*\*\* daños importantes.

De acuerdo con estos estudios<sup>88</sup>, existe una correlación dosis-respuesta en cuanto al número de células alteradas, pero no en cuanto al tipo de daño celular, ya que este es el mismo en todas las células sometidas a diversas dosis.

Una probabilidad más para explicar la acción periférica de estos compuestos es que los RP-BZD que existen en el hígado, riñón, corazón, pulmón, placenta, cerebro y testículo<sup>25,29,30,64,91</sup> unan BZD en el núcleo o en la membrana nuclear, lo que podría aumentar los efectos tóxicos del fármaco al

formar complejos de macromoléculas intracelulares que modifiquen directamente el metabolismo de los ácidos nucleicos y, secundariamente, el de los organelos citoplásmicos<sup>92</sup>. Estas conclusiones se sustentan en los hallazgos de Andersson y cols.<sup>93</sup>, quienes encontraron que el DZ detiene la mitosis en la prometafase al inhibir la separación de los centriolos, y de Stenchever y Smith<sup>94</sup>, quienes consignaron en un estudio *in vitro* que, en los ovocitos de ratón, detiene la meiosis (profase I, Cuadro 7).

AUTOR	BREEN Y STENCHEVER (1970) <sup>88</sup>	STENCHEVER Y SMITH (1981) <sup>94</sup>	CLARK Y RYAN (1980) <sup>125</sup>	ANDERSON (1981) <sup>83</sup>
TIPO DE ESTUDIO	BIDIMENSIONAL SIMPLE MULTIVALENTE			Factorial
TIPO DE MUESTRA	Fibroblastos humanos	Ovocitos de ratón cepa CD-1	Células 3T3	Células JOK-1
TIEMPO DE EXPOSICIÓN	-----	17 h	26 h	6 h
CONCENTRACIÓN DE DZ (µg/ml)	10 y 20	1, 10, 20, 30, 50, 100 y 200	10-60	50
EFEECTO	Alteraciones citoplasmáticas	Detención de la meiosis	Bloqueo de la mitosis	Detención de la mitosis
CONTROL DE VARIABLES EXTRAÑAS	Constancia de las condiciones experimentales y grupo control	Constancia de las condiciones experimentales y grupo control	Constancia de las condiciones experimentales y grupo control	Constancia de las condiciones experimentales y grupo control
VALIDEZ INTERNA	Si	Si	Si	Si
VALIDEZ EXTERNA	Resultados extrapolables	Resultados extrapolables	Resultados extrapolables	Resultados extrapolables

**CUADRO 7. EFECTOS DEL DIAZEPAM EN LA ESTRUCTURA Y DIVISION CELULAR.**

Muchas drogas que se administran durante el embarazo, como los antihipertensivos, simpaticomiméticos, anticonvulsivos, antipsicóticos, antidepresivos y ansiolíticos, tienen como sitios blanco componentes críticos de neurotransmisión mediada químicamente<sup>95</sup>.

Estudios del desarrollo de la neurotransmisión han revelado que los componentes de la transmisión química en neuronas específicas aparecen muy temprano en el desarrollo del cerebro y que el desarrollo cerebral responde de una manera predecible a muchas drogas psicoactivas<sup>96</sup>. La interferencia con mecanismos específicos de la neurotransmisión química durante el desarrollo, se ha observado que altera el curso del desarrollo neural<sup>52</sup>.

En las últimas décadas, muchos informes han aparecido demostrando efectos duraderos en neuronas específicamente después de una exposición prenatal a varias drogas psicoactivas incluyendo al DZ<sup>97</sup>. Una pregunta generada por tales informes es si la inducción de alteraciones neurales depende de una dosis crítica. Sin embargo, mientras algunos estudios han revelado deficiencias funcionales en ratas adultas expuestas prenatalmente a DZ a dosis muy bajas, del orden de 1 a 2.5 mg/kg/día, los primeros estudios indicaron poco efecto en los hijos después de la exposición prenatal a DZ a dosis hasta de 200 mg/kg/día<sup>98</sup>.

Cuando se empezaron a identificar las consecuencias de la exposición prenatal a drogas terapéuticas, existía poca evidencia acumulada que analizaba los efectos de la exposición durante el desarrollo a neurotoxinas que destruyen selectivamente los sistemas neurotransmisores<sup>99,100,101</sup>. Este tipo de estudios puede proveer guías importantes para diseñar la búsqueda de los

efectos de la exposición en el desarrollo a drogas de acción central que interactúan con mecanismos relativamente selectivos (como las enzimas para la síntesis de neurotransmisores, los mecanismos de recaptura o los receptores de la transmisión). Por lo tanto, los efectos a largo plazo de la exposición a tales drogas se espera que sean totalmente selectivos y con una capacidad de respuesta del cerebro con daño farmacológico que refleje la afección de los mecanismos relacionados con el desarrollo normal<sup>95</sup>.

Al respecto, Kellogg et al<sup>102</sup> presentaron datos que demuestran que la exposición prenatal de ratas a DZ conduce a alteraciones en la respuesta central y periférica para mediar el estrés en las crías en edad adulta, así como alteraciones en el reflejo acústico y su modificación por estímulos subumbrales, a dosis de 1 mg/kg/día. La relación dosis-efecto para la respuesta alterada al estrés difirió de la observada en las funciones auditivas alteradas, lo cual indica que a través de la evaluación de las consecuencias de la exposición prenatal a drogas se necesitan utilizar varios métodos evaluativos de la funcionalidad. No obstante, lo más importante es que los resultados apoyan la hipótesis de que la exposición a drogas *in utero* puede inducir alteraciones a largo plazo en el sustrato nervioso de la regulación de distintas conductas de los hijos con las resultantes consecuencias funcionales.

Es interesante mencionar que los estudios de los efectos del tratamiento prenatal con DZ han encontrado alteraciones postnatales en la maduración de la actividad motora espontánea, en la actividad motora de campo abierto, en el de escape<sup>65</sup> y en el reflejo acústico<sup>102</sup>. No obstante, los trabajos neuroquímicos en los tejidos cerebrales en ratas afectadas conductualmente, no han podido identificar un mecanismo neuronal específico que pueda ser responsable de que las alteraciones funcionales inducidas por DZ persistan hasta la edad adulta<sup>103</sup>, pero sí se ha encontrado que la exposición pre y postnatal a DZ reduce el número de receptores opioides en la corteza y en el núcleo estriado en ratas de 14 días de edad. Esta evidencia apoya la existencia de una conexión funcional entre los sistemas opioides y los benzodiazepínicos - GABAérgicos, y sugieren que la exposición prenatal altera el desarrollo de la conducta que se relaciona con cambios en las características de los receptores opioides, ya que tanto éstos como los R-BZD aparecen en el SNC casi al mismo tiempo durante la gestación<sup>103</sup>. En apoyo de esta idea, existe evidencia de que la exposición prenatal a DZ puede influir funciones propias de la etapa adulta. En un estudio conducido en ratones machos adultos que recibieron dosis equivalentes a las terapéuticas humanas del G6 al G17, se encontró alteración de la conducta sexual, al incrementarse el número de pausas y de caídas durante los trenes de monta con intromisión peniana en la fase copulatoria, lo que se ha interpretado como una modificación permanente del sustrato GABAérgico de la



neurotransmisión, en el SNC y la médula espinal, que se requiere para la expresión de la conducta sexual<sup>118</sup>.

Finalmente, baste como corolario el decir que durante muchos años, el uso de distintos medicamentos durante la gestación estaba dirigido al tratamiento de diversos padecimientos maternos, pero ahora que se ha implementado la capacidad de diagnosticar padecimientos fetales, la prescripción de drogas a la mujer embarazada incluye también al paciente intrauterino. Por ello, el conocimiento de la farmacología fetal es un prerrequisito obligatorio que nos permitirá determinar cuáles agentes farmacológicos pueden producir efectos deletéreos y cuáles pueden emplearse con seguridad y beneficio tanto para la madre como para el feto.

## JUSTIFICACIÓN Y PROPÓSITO

Dado que la exposición prenatal a DZ produce cambios histológicos similares en la retina<sup>81</sup>, el corazón<sup>82</sup>, los riñones<sup>83,84</sup>, los pulmones<sup>85</sup>, el cerebelo<sup>92,122</sup>, la tibia<sup>107</sup>, el estómago<sup>126</sup>, el intestino<sup>127</sup>, el mesencéfalo<sup>128</sup> y el testículo<sup>109,110</sup>, así como cambios conductuales a largo plazo en la actividad motora espontánea, en la actividad motora de campo abierto, en el de escape<sup>65</sup>, en el reflejo acústico<sup>102</sup> y en la conducta sexual de machos de ratón<sup>118</sup>, se ha postulado que el fármaco ocasiona cambios celulares con repercusión funcional.

Sin embargo, no se cuenta actualmente con información sobre su influencia en la estructura y función del aparato reproductor femenino, por lo cual, los propósitos del presente estudio fueron:

- a) **Mostrar si existen alteraciones en la estructura microscópica ovárica de ratones expuestos a diazepam durante la gestación.**
- b) **Si tales anomalías son semejantes a las detectadas en otros órganos<sup>81-85,92,107,109,110,122,126,127,128</sup> de animales tratados con el fármaco.**
- c) **Si dichas anomalías se asocian a alteración de los patrones conductuales reproductivos, que son altamente sensibles a modificaciones de los niveles de hormonas.**

d) Si las alteraciones morfológicas y conductuales observadas persisten postnatalmente.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### a). ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN.

Se utilizaron ratones de la cepa CD1, 40 hembras vírgenes y 14 machos con pesos que fluctuaron entre 25-30 g y 30-35 g respectivamente, mantenidos a temperatura constante de 20° a 22°C, ambiente libre de patógenos, ciclos de iluminación de 12 por 12 h iniciando a las 7:00 AM, alimentación con Purina Chow ® y acceso al agua *ad libitum*. Los ratones se aparearon en una proporción de 3 hembras con 1 macho, de las 7:00 a las 7:30 AM, la presencia de tapón vaginal se tomó como el inicio de la gestación (día 1 o G1). Los animales gestantes se distribuyeron al azar en dos grupos con igual número de animales; el primero, se sometió a tratamiento subcutáneo (SC) con diazepam (Valium ®), a una dosis diaria de 2.7 mg/kg de peso corporal<sup>86,105</sup>, del 6° al 17° días de gestación<sup>106</sup>, y el segundo, recibió volúmenes SC equivalentes a los inyectados con el diazepam (16 µl) de solución salina isotónica durante el mismo período. Entre los días 18 y 19, las crías de ambos grupos nacieron espontáneamente. El parto se vigiló, se observaron sus características morfológicas externas, su conducta, y se reanimó y calentó a los neonatos. Todas las crías se pesaron y transfirieron con hembras nodrizas en una relación de 3

tratados o experimentales (*E*) y 3 controles (*T*) para ser amamantados hasta los 21 días. Los valores somatométricos se registraron semanalmente desde el nacimiento hasta la etapa adulta (63 días).

#### b). ESTUDIO MORFOLÓGICO DEL OVARIO.

De cada uno de los grupos de animales tratados y controles, 10 fueron sacrificados al nacimiento, un número igual a los 35 y a los 63 días de edad. En todos los casos se extrajeron los ovarios, se fijaron en formol amortiguado con fosfatos a pH de 7.0 y en líquido de Zenker, se deshidrataron y se hizo una doble inclusión en celoidina y parafina-parapiast. Los bloques se cortaron en un microtomo de parafina a 3  $\mu\text{m}$  de espesor en los de recién nacidos, y los de 35 días, y de 5  $\mu\text{m}$  en los de adultos (63 días), se tiñeron por los métodos de hematoxilina-eosina y el tricrómico de Mallory y se estudiaron en el microscopio fotónico (Polivar, American Optical®) con el fin de observar la morfología celular, la afinidad tintorial y la relación núcleo citoplásmica de las diversas estirpes celulares de los folículos y los cuerpos lúteos.

En los animales adultos se tomaron frotis vaginales antes de ser sacrificados para cerciorarse que todos estaban en la fase de estro vaginal (los frotis de exudado vaginal se tomaron a las 7:00 h), con lo que se permitió la

comparación en fases equivalentes. Una vez teñidos los cortes por el método de hematoxilina-eosina, se fotografiaron con el objeto de hacer una reconstrucción tridimensional del órgano y sobre el papel fotográfico se efectuó el recuento de las diversas clases de folículos, incluyendo los atrésicos y el de los cuerpos lúteos.

De otro grupo de 5 animales tratados y 5 controles adultos de 63 días de edad, los ovarios obtenidos se fijaron en una mezcla de glutaraldehído al 2.5% y paraformaldehído al 1% (v:v en agua bidestilada), se postfijaron con tetróxido de osmio al 1% diluido en amortiguador de cacodilato de sodio 1M a pH de 7.2, se incluyeron en resina epóxica, se cortaron a 300 nm de espesor, se tiñeron con azul de toluidina y se seleccionaron exclusivamente los que presentaban cuerpos lúteos recientes, en los cuales se determinó la cantidad de células luteínicas por  $\text{mm}^2$  y se observó su morfología.

Los datos obtenidos mediante el estudio morfométrico de los folículos y los cuerpos lúteos, se analizaron mediante las pruebas de  $\chi^2$  y *t* de Student a un nivel de significación ( $\alpha$ ) de 0.05. A los datos somatométricos de las crías, su distribución por sexos y el tamaño de las camadas, se les aplicó la prueba de regresión lineal y coeficiente de correlación de Pearson, lo que facilitó la comparación de su tasa de crecimiento.

### c). ESTUDIO CONDUCTUAL.

Se utilizaron 21 hembras y 7 machos de ratones de la cepa CD1, que fueron expuestas prenatalmente de manera simultánea e idéntica a la realizada en el estudio morfológico hasta el día 21 de edad, en el que se destetaron y se mantuvieron en las condiciones ambientales y de alimentación ya descritas desde esta edad hasta el 6° mes, en que se probó la conducta sexual espontánea de las hembras frente a machos procedentes de las mismas camadas con el siguiente esquema de apareamiento: hembras y machos *E*, hembras *E* con machos *T*, hembras *T* con machos *E* y hembras *T* con machos *T*. Cada apareamiento se consideró como prueba experimental y se llevó a cabo durante 30 min. de la fase oscura del fotoperíodo, entre las 4:00 y las 6:00 AM. La fuente de iluminación fue una fotalámpara infrarroja ( $\lambda = \geq 640$  nm). El registro se hizo en videocintas con el objeto de analizar de manera detallada las conductas precopulatoria y copulatoria de los animales de los grupos mencionados para establecer similitudes y diferencias entre ellos y con la observada en los ratones de la colonia bajo las mismas condiciones ambientales.

En la fase copulatoria de cada prueba se midieron:

- a) El índice de lordosis (IL) desarrollado por las hembras que al ser montadas fueron receptivas, dicho índice corresponde al número de montas en que las hembras tuvieron lordosis ( $n_{ML}$ ), entre el número total de montas con o sin lordosis ( $n_{Mt}$ ):  $IL = n_{ML}/n_{Mt}$
- b) La intensidad de la lordosis expresada en 3 grados de acuerdo a la posición del eje longitudinal de la cabeza en relación al dorso. Se consideró el grado I cuando la nariz del animal estaba dirigida hacia el piso de la caja, el II cuando la cabeza estaba en línea recta con respecto al dorso del animal y el III cuando la nariz se dirigía hacia el techo de la caja.
- c) La duración de los trenes de monta por hembra, expresada en segundos.

Los valores obtenidos en las variables "a" y "b" son discretas por lo cual fueron procesadas por la prueba de  $\chi^2$  para  $K$  muestras independientes con coeficiente de contingencia  $C$  a un nivel de significación de 0.05, en tanto que la variable "c" se analizó por una escala de intervalos, que se procesó con la prueba de "t" de Student, con un nivel de significación de 0.05.



# RESULTADOS

## 1. ESTUDIO MORFOLÓGICO.

Al observar las características morfológicas externas de las crías recién nacidas tanto de los ratones testigo como de los experimentales no se detectaron malformaciones congénitas, pero cabe aclarar que 3 neonatos experimentales machos (0.75%) murieron poco después de nacer, con francos signos de depresión neurológica y respiratoria refractarias a las maniobras de reanimación.

## 2. ESTUDIO MORFOLÓGICO DEL OVARIO.

Los ovarios de las crías *T* recién nacidas se localizaron en la pared dorsal de la cavidad abdominal, debajo de los riñones. Mostraron una cápsula fibrosa o túnica albugínea delgada, con escasas fibras de colágena, la cual estaba tapizada por un mesotelio plano, bien diferenciado. Su corteza ocupaba el 75% de la superficie total de los cortes (Figura 4); en ella se pudieron identificar abundantes folículos primordiales, organizados en nidos que formaban conglomerados celulares densos, en donde la pared de cada folículo estaba constituida por una capa de células epiteliales pavimentosas con un núcleo compacto, basófilo, que sobresalía de la superficie celular y escaso citoplasma débilmente acidófilo.

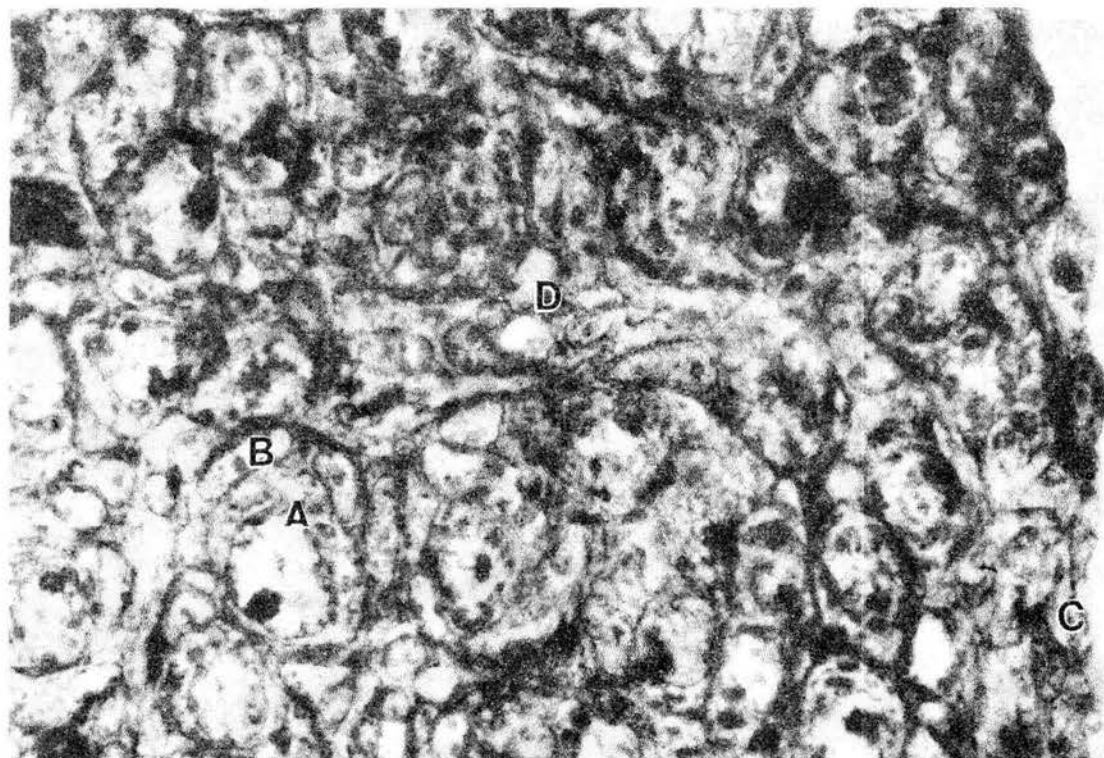


Figura 4. Ovario de ratón recién nacido que recibió solución fisiológica durante la gestación (T). Se muestra un corte de la región cortical. Ovocito dentro de un folículo primordial (A). Célula folicular (B). Túnica albugínea (C). Fibras de colágena (D). Espesor 3 $\mu$ m, ampliación 360x, tinción de Mallory.

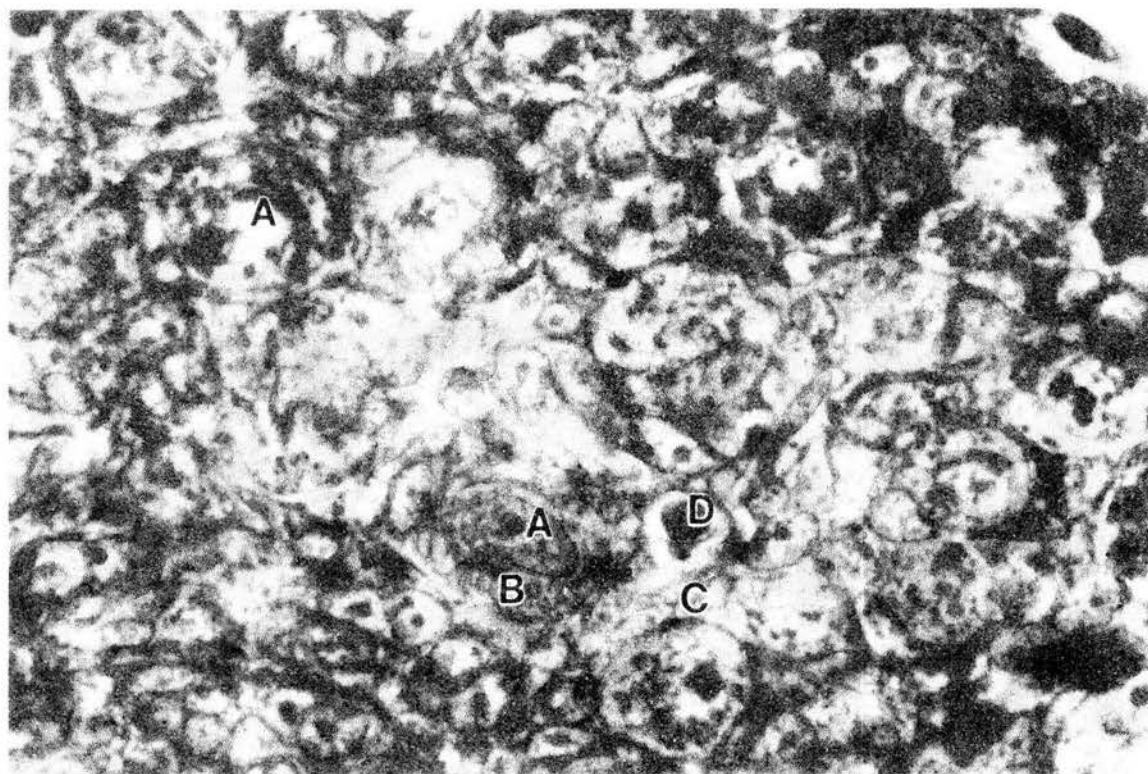


Figura 5. Ovario de ratón recién nacido T. Se muestra un corte de la región cortical, en el que se identifica al núcleo del ovocito (A) y su citoplasma (B), así como fibras de colágena perifoliculares (C) y un vaso sanguíneo (D). Espesor 3 $\mu$ m, ampliación 360x, tinción de Mallory.

El ovocito primario rodeado por las células foliculares, tenía un núcleo central, prominente, con un diámetro promedio de  $24 \pm 0.7 \mu\text{m}$ , cuya heterocromatina mostraba dos tipos de gránulos, unos finos homogéneos, basófilos, que se encontraban distribuidos entre otros de mayor tamaño con basofilia mas intensa, dispersos en la cariolinfa débilmente teñida. El citoplasma, que tenía una área de diámetro equivalente al del núcleo, mostró finas granulaciones acidófilas (Figura 5). Entre los nichos foliculares se encontraba el estroma con fibroblastos que formaban laxas fibras de colágena que ocupaban los intersticios, en las cuales también había abundantes vasos sanguíneos con paredes endoteliales típicas. La médula estaba constituida por un estroma con mayor cantidad de fibroblastos que formaban mas proporción de fibras, lo que lo hacía más compacto, entre este tejido había una red de vasos de mayor calibre que los observados en la región cortical los cuales se ramificaban de manera radial en esta zona.

En los ovarios de los animales *E* se encontró que la organización del tejido de la corteza y de la médula era similar a la observada en los animales *T*. La corteza ocupaba alrededor de las tres cuartas partes de la superficie de los cortes (Figura 6). El mesotelio plano y la túnica albugínea eran de estructura semejante a la de los órganos de los animales *T*, los nichos foliculares, también localizados en la corteza, eran abundantes y se encontraban separados por un estroma laxo, con menor proporción en fibras de colágena (Figura 7).

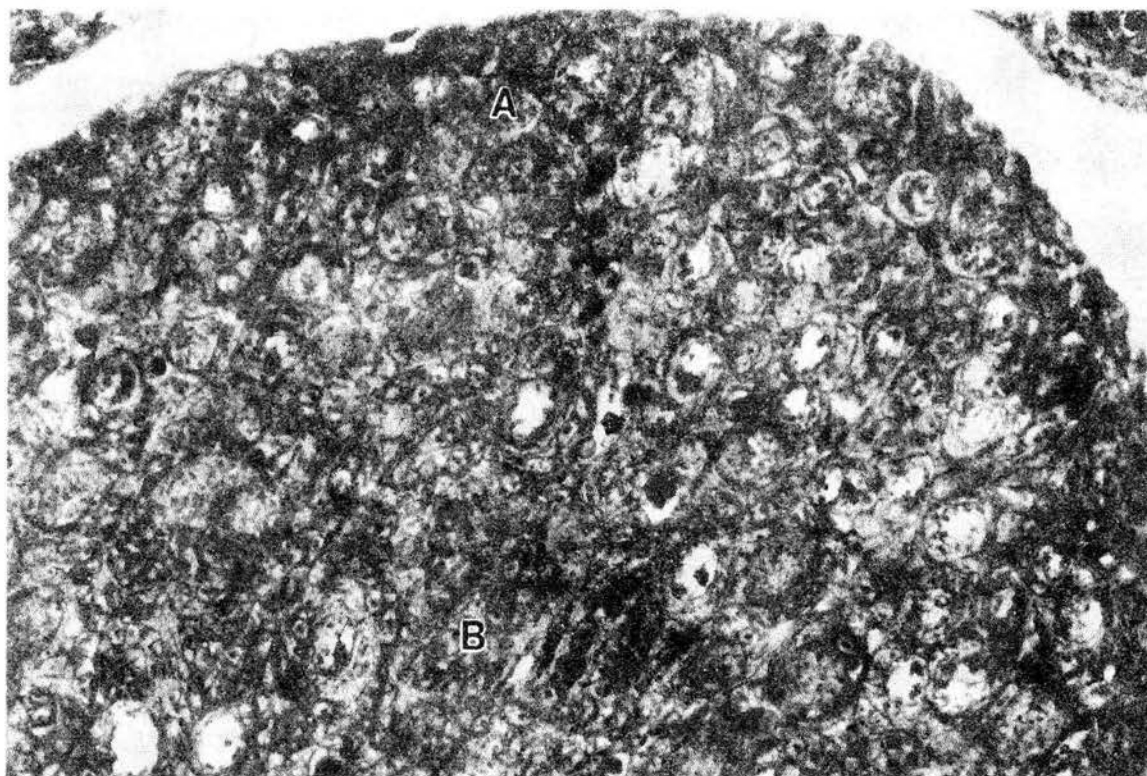


Figura 6. Ovario de ratón recién nacido tratado durante la gestación con diazepam (E). En el corte se puede distinguir la zona cortical (A) de la medular (B). Espesor 3 $\mu$ m, ampliación 200x, tinción de Mallory.

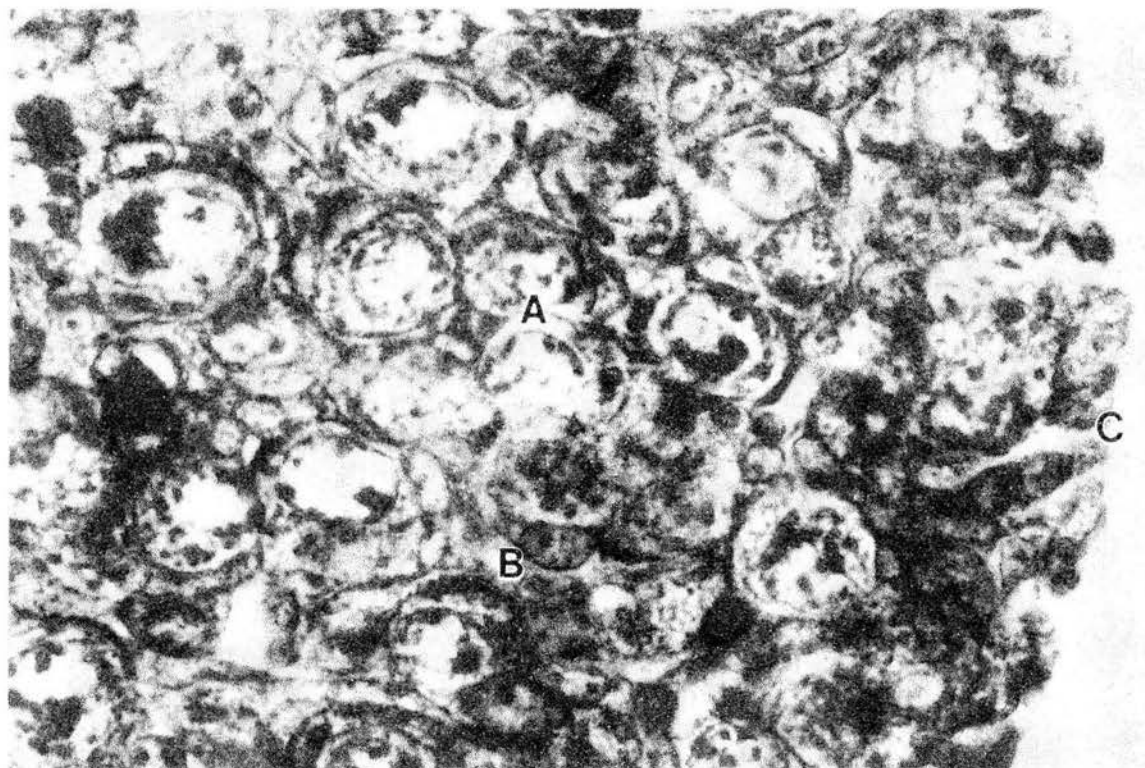


Figura 7. Ovario de ratón recién nacido E. Se muestra un corte de la región cortical en el que se aprecia un grupo de nichos foliculares (A), fibras de colágena del estroma (B) y la tunica albuginea (C). Espesor 3 $\mu$ m, ampliación 320x, tinción de Mallory.

El citoplasma de las células foliculares mostró mayor afinidad por los colorantes ácidos, el diámetro de sus núcleos fue significativamente mayor ( $p < 0.05$ ), con heterocromatina dispuesta en grumos gruesos, que con frecuencia estaban adheridos a la membrana nuclear.

Los ovocitos presentaron un incremento significativo ( $p < 0.05$ ) de diámetro nuclear ( $\bar{x} = 28 \pm 0.4 \mu\text{m}$ ), su heterocromatina se encontraba organizada de manera distinta, ya que se observó presencia de grumos de heterocromatina abundantes en la periferia, asociados a la membrana nuclear (Figura 8). El aspecto del estroma medular y el de los vasos era semejante al observado en los órganos provenientes de sus controles.

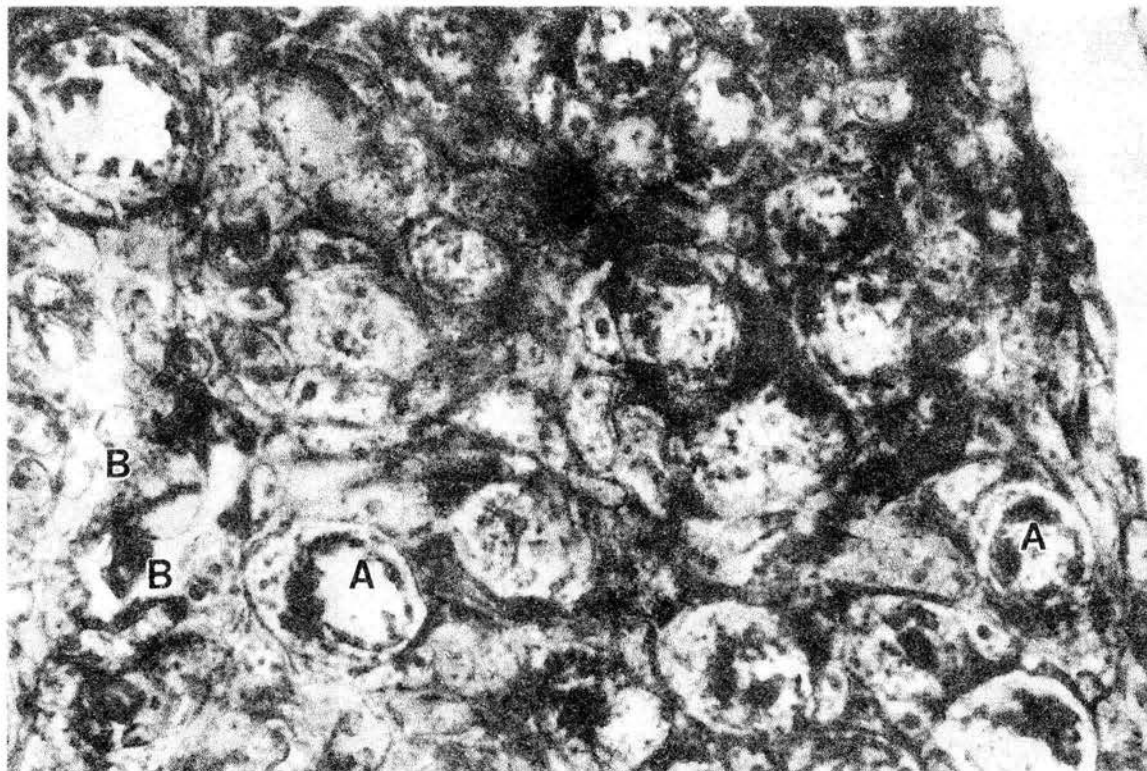


Figura 8. Ovario de ratón recién nacido *E*. En el corte se señalan algunos núcleos de ovocitos con grumos de heterocromatina abundantes en la periferia, asociados a la membrana nuclear (A) y una parte del estroma medular junto con un vaso sanguíneo (B). Espesor  $3\mu\text{m}$ , ampliación  $320\times$  tinción de Mallory.

En los animales *T* de 35 y 63 días, los ovarios se localizaron en la pared posterior abdominal, por debajo de los polos renales inferiores, eran de forma globular y coloración rosada y estaban cubiertos por un mesotelio delgado, bajo el cual se encontraba la túnica albugínea con estroma laxo. La zona cortical constituía la mayor parte del ovario, en la que se encontraban folículos ováricos en diferentes etapas de maduración y atresia, cuerpos lúteos activos y en fase de involución, cuerpos blancos y estroma con los vasos nutricios (Figura 9).

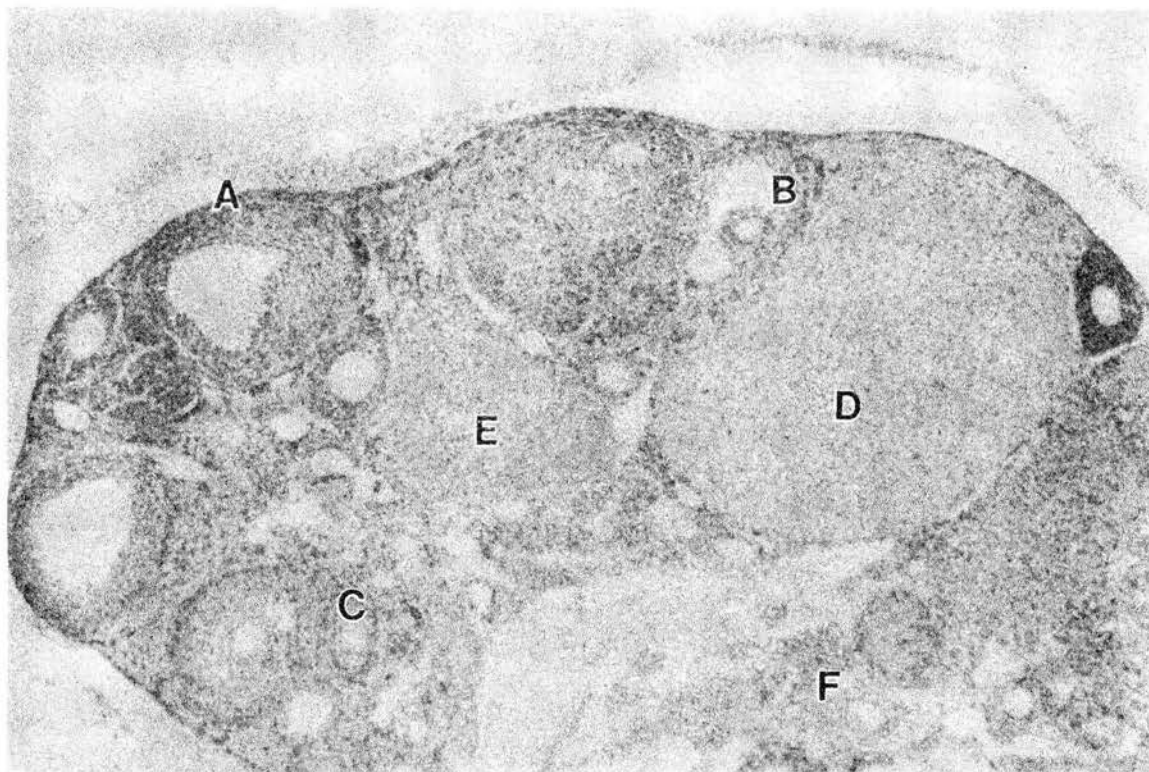


Figura 9. Microfotografía panorámica del ovario de un ratón de 35 días 7. La túnica albugínea (A) se ha separado del órgano por acción de los fijadores. Se pueden identificar un folículo secundario antral (B), otro preantral (C), un cuerpo lúteo activo (D), uno inactivo (E) y el estroma de la región medular (F). Espesor 3µm, ampliación 32x tinción de Mallory.

Los folículos primordiales eran escasos en relación con los observados en los ovarios de las hembras recién nacidas, y aún cuando ya no formaban nichos, su aspecto histológico era similar al de aquellos.

Los folículos primarios también se localizaron en la zona cortical, cercana a la túnica albugínea; estaban constituidos por una sola capa de células foliculares cúbicas, revestidas por una membrana basal teñida tenuemente, su citoplasma era acidófilo con granulaciones finas y su núcleo basófilo mostraba escasa heterocromatina distribuida de manera homogénea. La relación nucleocitoplásmica era de 1:1. En la parte central se localizaba el ovocito, con citoplasma granular acidófilo y núcleo ovoide basófilo con heterocromatina de aspecto reticular (Figura 10).



Figura 10. Microfotografía de un corte de ovario de ratón de 35 días *T*. Se señala un folículo primario en la zona cortical. Se distingue el núcleo del ovocito (A), las células foliculares (B), la teca aún no diferenciada (C) y un vaso sanguíneo (D). Espesor 3µm, ampliación 126x, tinción H-E.

Los folículos secundarios preantrales se encontraron dispersos en toda la corteza pero había una tendencia a ocupar el área mas superficial a medida que aumentaba su celularidad y talla. Su pared estaba constituida por una capa de células tecales parcialmente diferenciada, con escasas fibras laxas de colágena orientadas en sentido paralelo a la membrana basal y algunos vasos de pequeño calibre. Por dentro de la membrana basal se apreciaban numerosas células foliculares poliédricas, con citoplasma grumoso, levemente acidófilo, de límites bien definidos, con un núcleo central que ocupaba una superficie equivalente a la del citoplasma. La cariolinfa estaba constituida por gránulos finos de basofilia moderada y escasos gránulos heterocromáticos, característicos de esta estirpe de células. Otro grupo de células foliculares, formaban el esbozo de la corona radiada que rodeaban al ovocito y emitían delgadas prolongaciones citoplásmicas que atravesaban la zona pelúcida en desarrollo y establecían contacto con la superficie ovular; estos les conferían características diferentes a las de las granulosa aún cuando el citoplasma y núcleo eran similares. El ovocito de cada folículo ocupaba la región central de la corona radiada, su forma era esférica y el citoplasma abundante, finamente granular, acidófilo y estaba rodeado por una zona pelúcida delgada y basofilia. Su núcleo se encontraba discretamente excéntrico, limitado por una membrana gruesa, la cariolinfa tenía poca afinidad por los colorantes y la heterocromatina intensamente basófila se distribuía de acuerdo con un patrón radial (Figura 11).



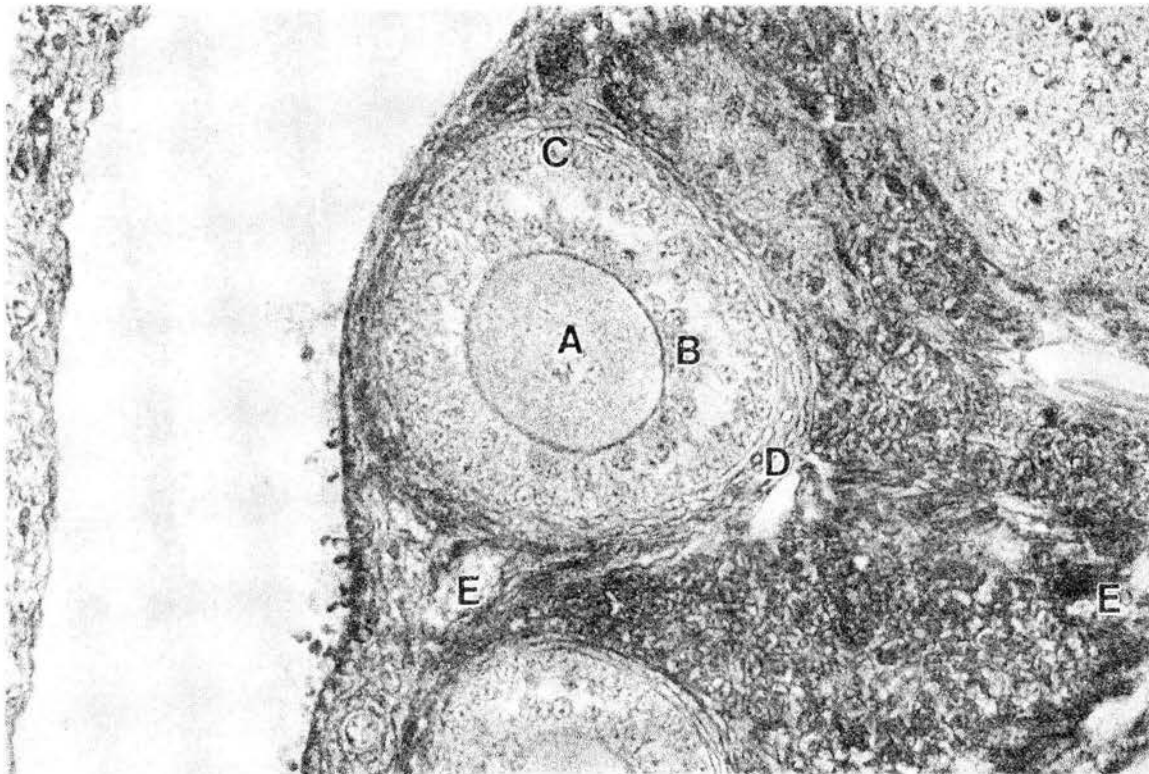


Figura 11. Microfotografía de un corte de ovario de ratón de 35 días *T*. Se señala un folículo secundario preantral en el cual se aprecian el ovocito bien delimitado por la zona pelúcida y en su interior el núcleo excéntrico (A), las células foliculares de la futura corona radiante (B), las de la granulosa (C), las tecales en diferenciación (D) y vasos sanguíneos (E). Espesor 3 $\mu$ m, ampliación 128x, tinción de Mallory

Los folículos secundarios antrales se localizaron en la parte mas externa de la corteza, separándolos del mesotelio una delgada capa de células granulosa y rodeados por tejido techal bien diferenciado, con fibras ordenadas de manera circular. La teca externa avascular, poseía

abundantes fibras y la interna, vascular, principalmente células tecales; éstas eran fusiformes con citoplasma ávido a colorantes ácidos y núcleo pequeño con moderada cantidad de heterocromatina. Las células foliculares se encontraron organizadas en el interior del folículo en sus tres variedades. El grupo mas numeroso lo constituían las granulosa, formando la pared del folículo con 3 o 4 capas de células poliédricas de límites bien definidos, con una relación nucleocitoplásmica de 1:1, de aspecto grumoso, con algunas gotas lipídicas y moderada afinidad por los colorantes ácidos; sus núcleos eran centrales, basófilos, con fragmentos heterocromáticos escasos y dispersos. Las células del cúmulo ovigero mostraron uniones mas laxas y su citoplasma era mas pálido. Las células periovulares (futuras células de la corona radiante) se hallaron formando una sola hilera compacta, con citoplasma y núcleo similares al de las granulosa, pero con prolongaciones citoplásmicas en dirección a la superficie ovular, atravesando la zona pelúcida, y confiriendo al ovocito un aspecto radiante. Este último se rodeaba de una gruesa zona pelúcida que teñía homogénea e intensamente con colorantes básicos; la membrana plasmática pudo apreciarse; el citoplasma era abundante en una proporción 4:1 en relación al núcleo, de apariencia granular fina y con afinidad moderada por los colorantes ácidos; el núcleo, discretamente excéntrico y de mayor tamaño que el de los ovocitos de folículos preantrales, contenía heterocromatina conformada por una serie de puentes gruesos que le conferían un aspecto reticular (Figura 12).

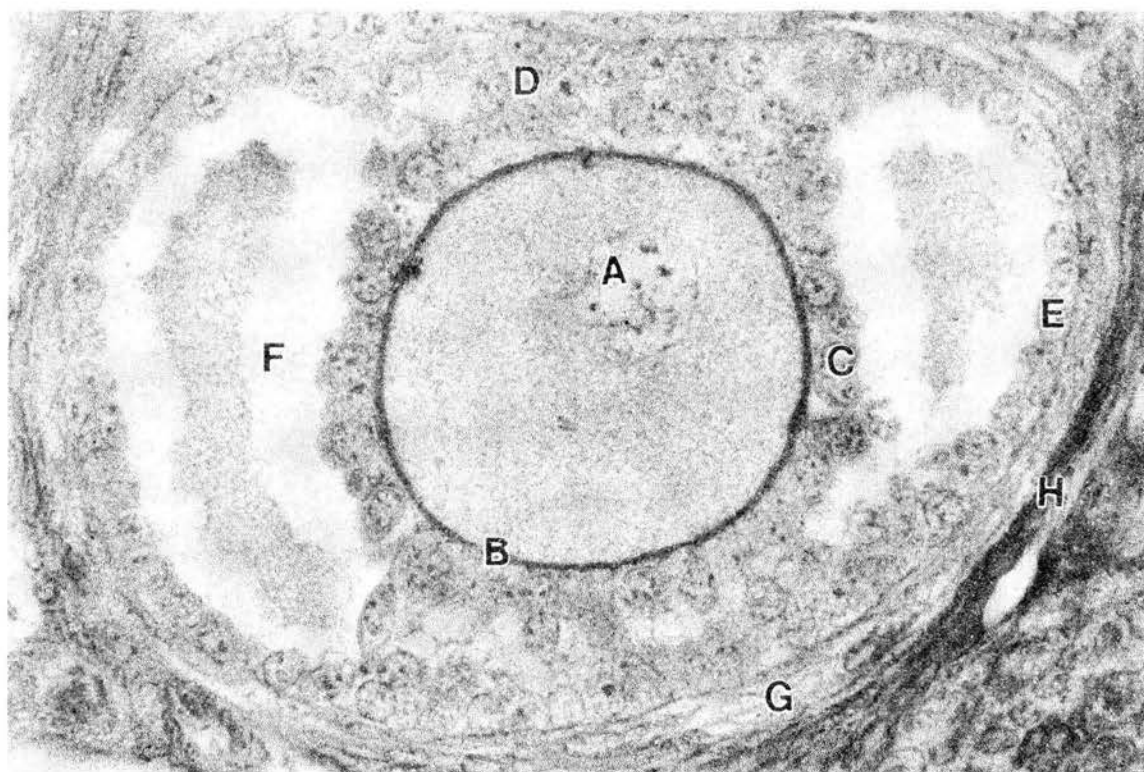


Figura 12. Microfotografía de un corte de ovario de ratón de 35 días T. Se muestra un folículo secundario antral en cuyo interior se halla el ovocito con su núcleo excéntrico (A) y una gruesa zona pelúcida teñida en azul (B). Alrededor de ésta se encuentran las células foliculares de la futura corona radiante bien diferenciadas (C), después las del cúmulo ovigero (D), y en la periferia las de la granulosa (E), separadas por el antro folicular (F). Por fuera de la membrana basal, que tiñe débilmente de azul, se localizan las de la teca interna (G) y, de una coloración más oscura por sus fibras de colágena, las de la teca externa (H). Espesor 3µm, ampliación 320x, tinción de Mallory.

Algunos folículos secundarios, principalmente antrales, se observaron en proceso de atresia, con adelgazamiento de su capa tecoluteínica, colapso parcial del antro, presencia de glóbulos lipídicos gruesos entre las células de la granulosa y vacuolas intracitoplásmicas, dando a esas células un aspecto grumoso grueso, pero sin cambiar su afinidad tintorial; algunos núcleos eran francamente picnóticos, en tanto que en otros se observó mayor proporción de heterocromatina; las células del cúmulo se hallaron dispersas, con características nucleocitoplásmicas semejantes a las de la granulosa, patrón que se presentó también en las células periovulares, las cuales además eran de menor tamaño. La zona pelúcida se encontró adelgazada y

deformada o totalmente plegada. El ovocito se observó colapsado, con el citoplasma más ávido por los colorantes ácidos y el núcleo denso y reducido de tamaño (Figura 13).

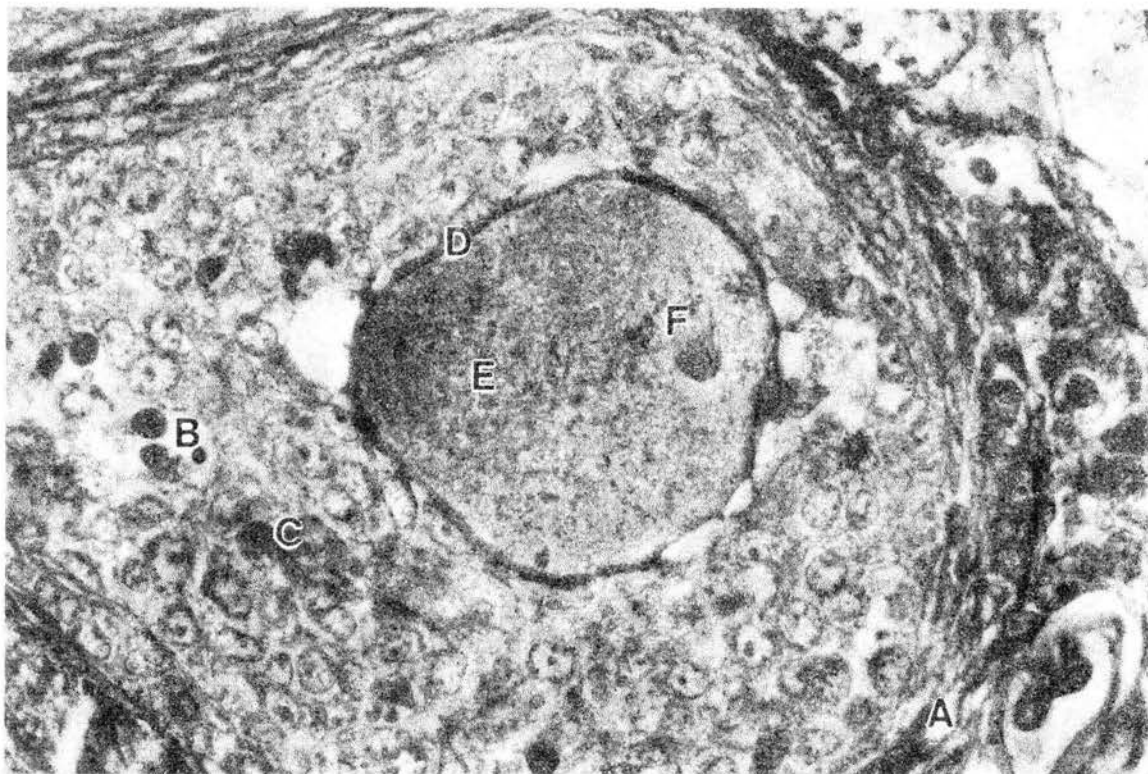


Figura 13. Microfotografía de un corte de ovario de ratón de 35 días *T* con un folículo secundario atresico. Las capas tecales se han adelgazado y desorganizado (A), el antro ha desaparecido casi en su totalidad (B), las células foliculares muestran diversos grados de pycnosis y granuleaciones lipídicas intracitoplásmicas (C). La zona pelúcida está deformada y de grosor irregular (D). El citoplasma del ovocito contiene granuleaciones gruesas (E) y es posible identificar un huso acromático (F). Espesor 3mm, ampliación 320x, tinción de Mallory.

Los cuerpos lúteos activos constituían estructuras voluminosas de forma variable, que ocupaban principalmente la región cortical. Estaban envueltos por una capa fibrosa y en el interior las células luteínicas, su elemento más abundante, se organizaban formando cordones que le conferían su arquitectura reticular. Éstas tenían forma poliédrica, contornos bien delimitados y citoplasma abundante y granular fino que teñía de manera homogénea con los colorantes ácidos, dando al cuerpo amarillo su carácter

distintivo. Su núcleo era ovoide basófilo, guardaba una relación 1:2 con el citoplasma y exhibía una cromatina granular finamente distribuida con uno o dos fragmentos heterocromáticos nucleolares al centro. En menor proporción, y generalmente adyacentes a los vasos, se identificaron a las células paraluteínicas de forma estelar o fusiformes, con citoplasma escaso también acidófilo y núcleo central pequeño condensado. Entre los cordones luteínicos se observaron vasos sanguíneos (Figura 14)

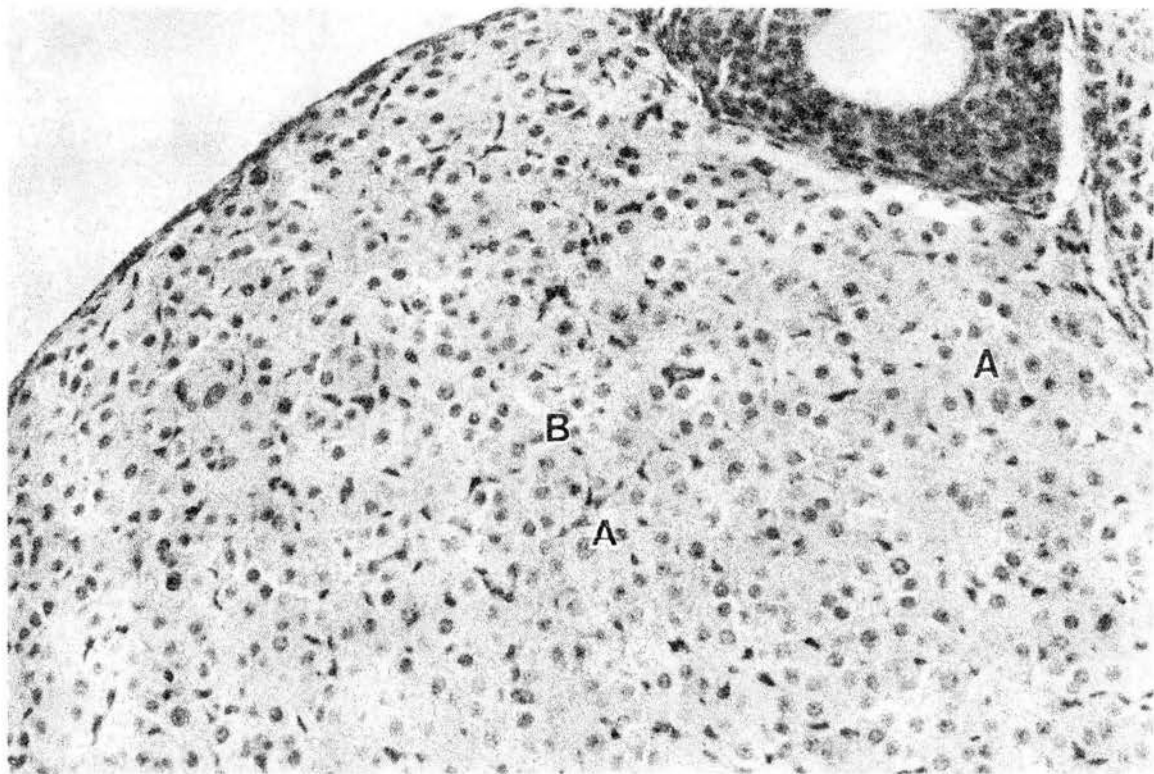


Figura 14. Microfotografía de un corte de ovario de ratón de 35 días T en la que se observa un cuerpo lúteo activo. Las células luteínicas están apiladas en forma de cordones (A), su citoplasma es abundante y tenuemente acidófilo, guardando una relación 1:2 con el núcleo. Entre los cordones luteínicos se observan algunos vasos (B). Espesor 3 $\mu$ m, ampliación 128x, tinción H-E

Los cuerpos lúteos en involución tenían paredes irregulares, mayor densidad celular pero con volúmenes celulares notablemente disminuídos. Las células luteínicas conservaban su caracter cordonal pero sus citoplasmas eran grumosos. Las paraluteínicas eran muy escasas, observándose solo esporádicamente, su morfología se conservaba en lo general con excepción de su núcleo que era francamente picnótico (Figura 15). Ocasionalmente se lograron identificar *corpus albicans* en la zona mas profunda de la región cortical.

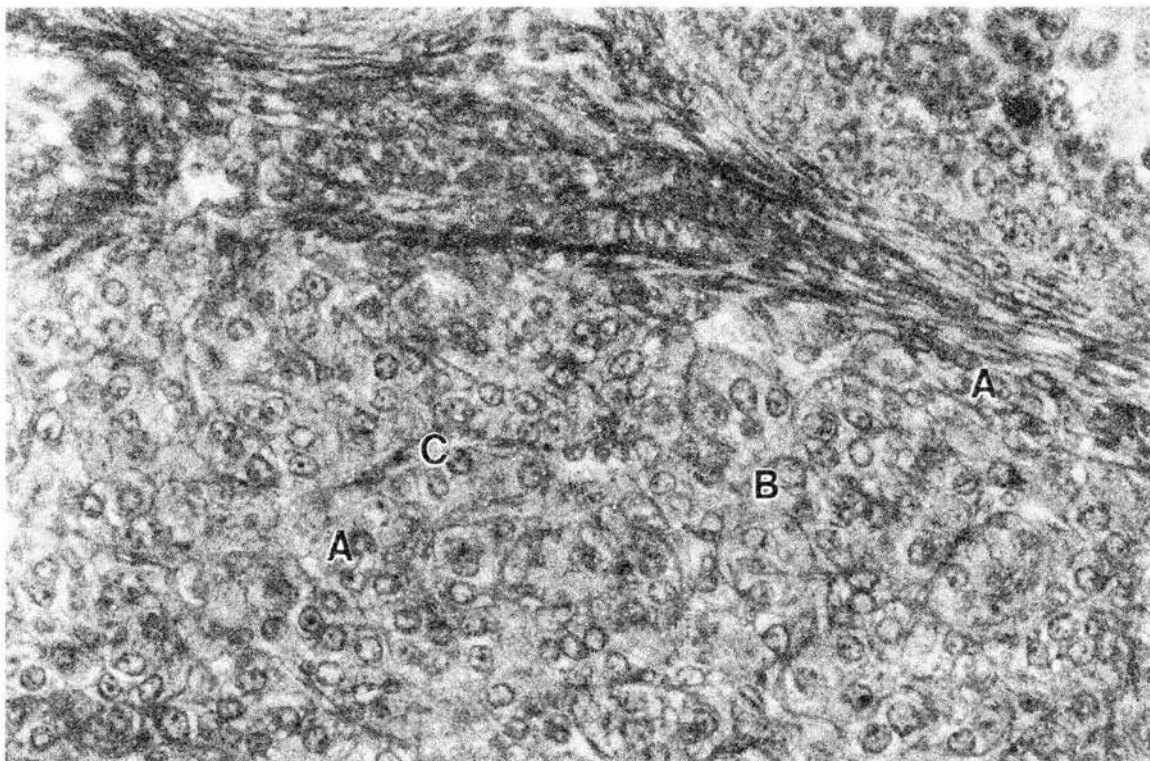


Figura 15. Microtografía de un corte de ovario de ratón de 35 días T en la que se observa un cuerpo lúteo en involución. Las células luteínicas están desorganizadas (A), su citoplasma es escaso y grumoso (B). Entre los cordones luteínicos se observan células paraluteínicas con núcleos picnóticos (C). Espesor 3 $\mu$ m, ampliación 200x, tinción de Mallory.

La zona medular abarcaba una pequeña proporción del territorio ovárico, situándose excéntricamente casi a manera de hilio. Estaba constituida por estroma denso con fibras arremolinadas y abundantes vasos (Figura 9).

Los órganos procedentes de los animales *E* tuvieron características morfológicas macroscópicamente similares. En las piezas procedentes de los animales de 35 y 63 días de edad, el mesotelio, la túnica albugínea, la zona medular y el estroma fueron también semejantes a las de los animales *T* (Figura 16).

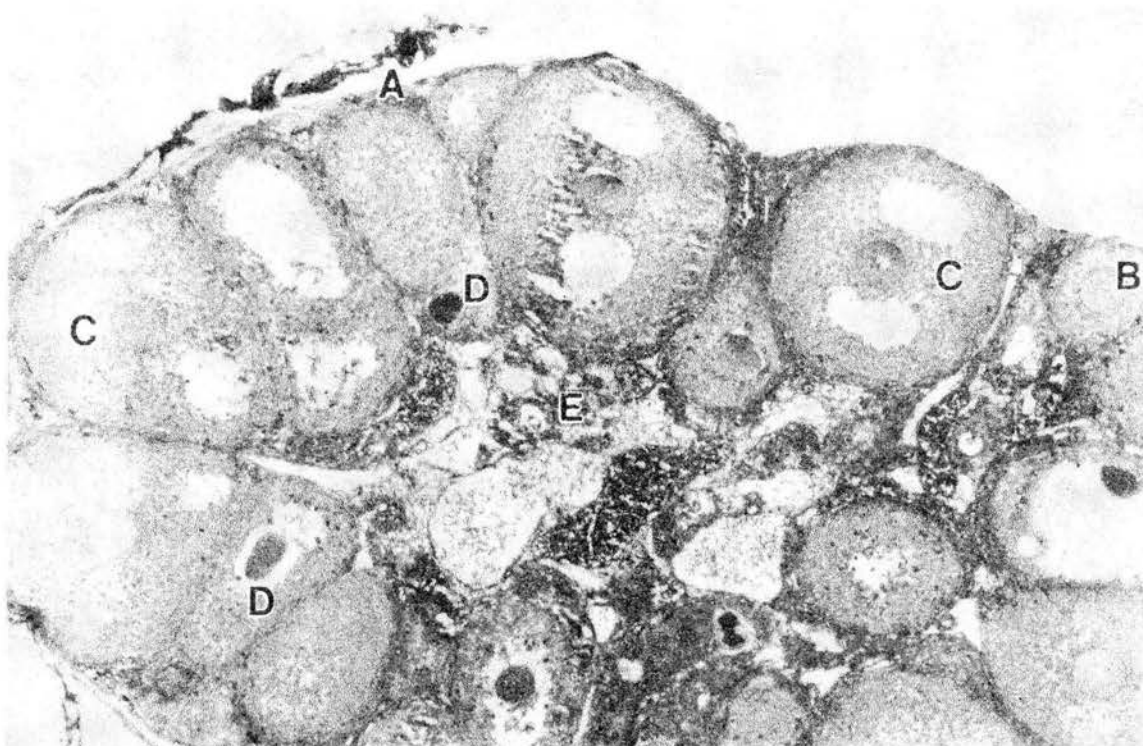


Figura 16. Microfotografía panorámica del ovario de un ratón de 35 días *E*. La túnica albugínea (A) se ha separado del órgano parcialmente por acción de los fijadores. Se pueden identificar folículos secundarios preantral (B), antrales (C), atrésicos (D), y el estroma de la región medular (E). Espesor 3µm, ampliación 32x tinción de Mallory.

Sin embargo, las estirpes tecales, las foliculares (Figura 17), de la línea germinal (Figura 18) y las luteínicas (Figura 19) demostraron patrones histológicos alterados, idénticos a los encontrados en los ovarios de los animales neonatos y que consistieron en mayor afinidad tintorial, principalmente por los colorantes ácidos, diferente distribución heterocromática nuclear, con presencia de grumos mas gruesos asociados preferentemente a la membrana nuclear e incremento del volumen nuclear y pérdida de la relación nucleocitoplásmica hallada en los animales *T*.

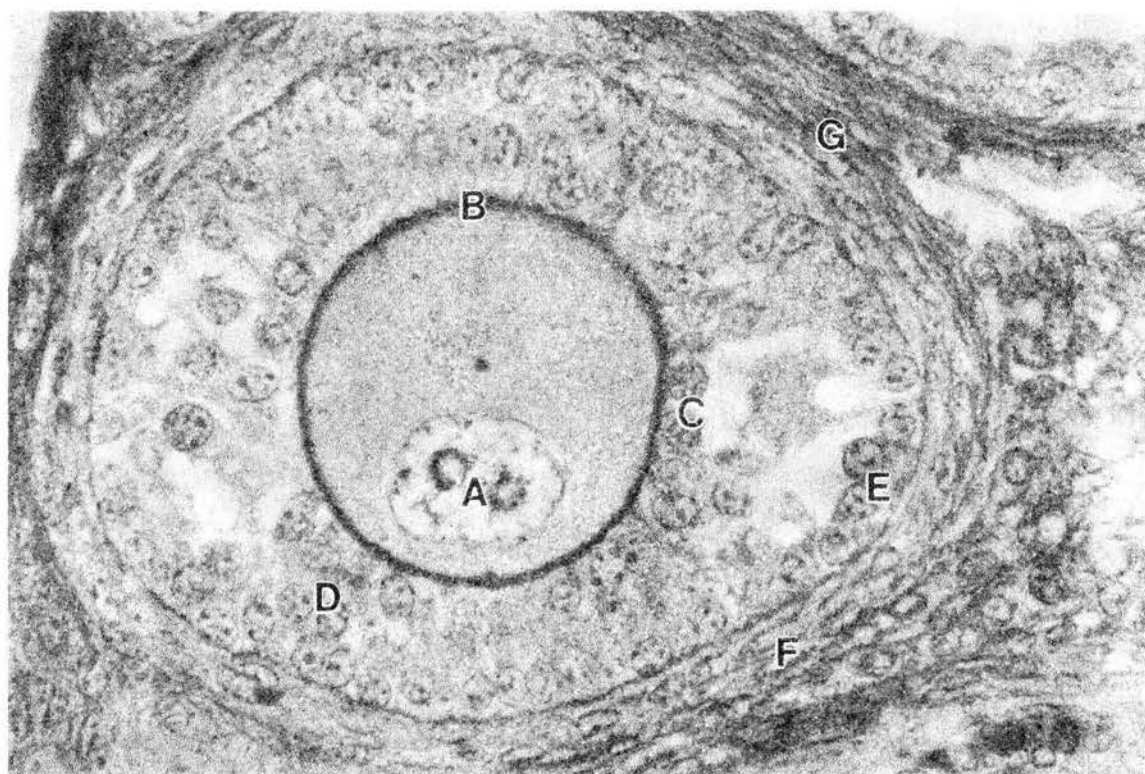


Figura 17. Microfotografía de un corte de ovario de ratón de 35 días E. En el folículo secundario antral, el núcleo del ovocito, aumentado de tamaño, contiene heterocromatina de distribución atípica con grumos asociados a la membrana (A). La zona pelúcida es de características idénticas a las de los animales *T* (B), pero las células foliculares de la futura corona radiante (C), las del cúmulo ovigero (D) y las de la granulosa (E) contienen núcleos voluminosos con heterocromatina también atípica, modificando su relación núcleo-citoplásmica, así como incremento de la afinidad tintorial. Por fuera de la membrana basal, que tinte débilmente de azul, las células de la teca interna (F) y externa (G) muestran los mismos cambios. Espesor 3µm, ampliación 320x, tinción de Mallory.



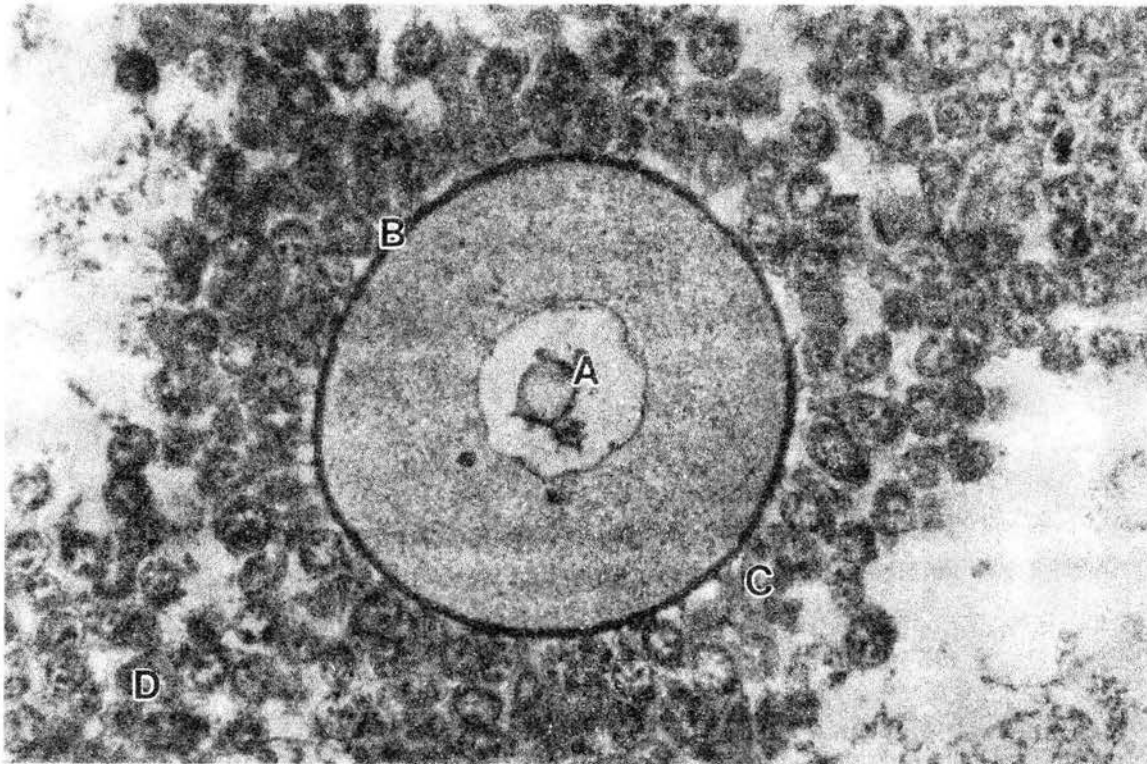


Figura 18. Microfotografía de un corte de ovario de ratón de 63 días E. Detalle de un folículo secundario antral en el cual el núcleo del ovocito se observa aumentado de tamaño y con heterocromatina de distribución atípica en grumos fuertemente teñidos (A). La zona pelúcida es de características idénticas a las de los animales 7 (B). Las células foliculares de la futura corona radiante (C) y las del cúmulo ovigero (D) contienen núcleos voluminosos que modifican su relación núcleo-citoplásmica y heterocromatina con grumos atípicos. Su patrón de afinidad tintorial también está modificada (acidofilia). Espesor 3 $\mu$ m, ampliación 320x, tinción de Mallory

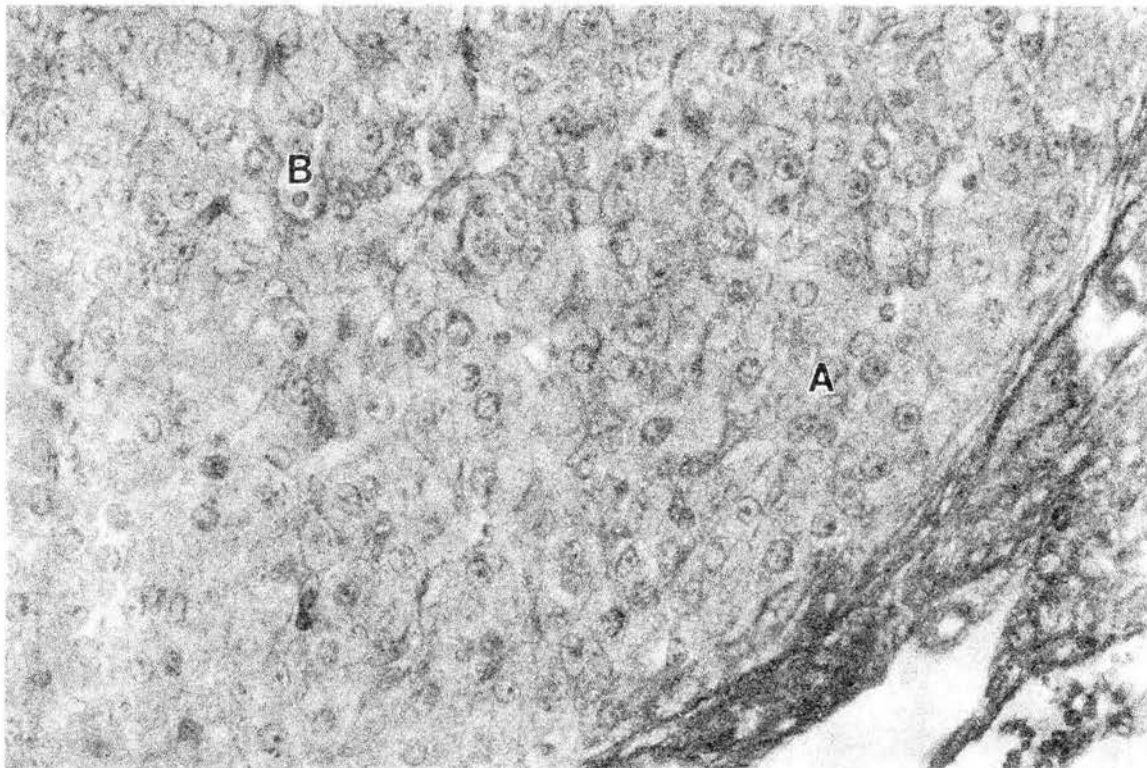


Figura 19. Microfotografía de un corte de ovario de ratón de 35 días E en la que se observa un cuerpo lúteo activo. Los cordones luteínicos están parcialmente organizados (A), sus células muestran incremento de la finidad tintorial y núcleos voluminosos con heterocromatina distribuida de manera atípica. Entre los cordones luteínicos se observan algunos vasos dilatados (B). Espesor 3 $\mu$ m, ampliación 200x, tinción de Mallory.

Por otra parte, los folículos atrésicos mostraron signos histológicos de que el proceso tuvo un inicio más temprano y más intenso en comparación con los de sus controles (Figura 20).

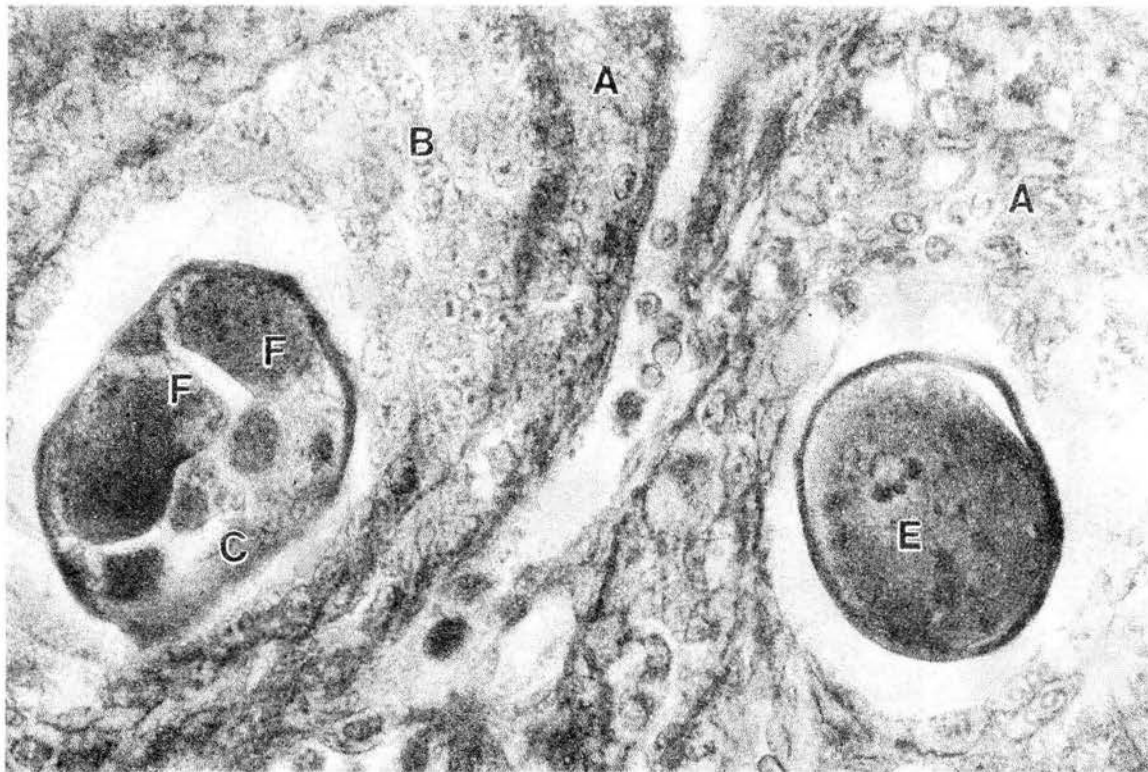


Figura 20. Microfotografía de un corte de ovario de ratón de 35 días E con folículos atrésicos. Las capas tecales se han adelgazado y desorganizado (A), las células foliculares se han disociado del ovocito y muestran diversos grados de pycnosis y degeneración vacuolar (B). La zona pelúcida está deformada y de grosor irregular (C). El citoplasma del ovocito contiene granulaciones gruesas (E) o está totalmente fragmentado (F). Espesor 3 $\mu$ m, ampliación 320x, tinción de Mallory.

Además, los cuerpos lúteos ofrecieron modificación en su histoarquitectura, con desorganización de los cordones luteínicos y lechos vasculares más dilatados (Figura 21).

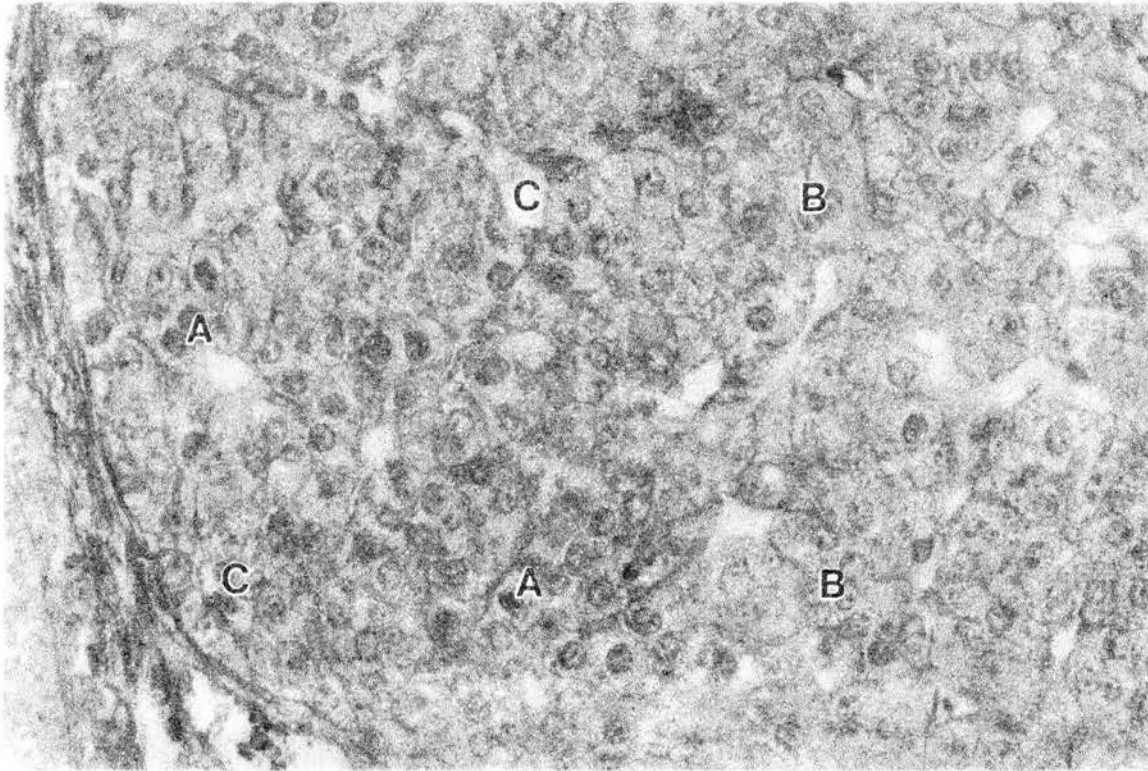


Figura 21. Microfotografía de un corte de ovario de ratón de 35 días *E* en la que se observa un cuerpo lúteo activo. Sus células muestran incremento de la finidad tintorial y núcleos voluminosos con heterocromatina distribuida de manera atípica (A); sus cordones luteínicos están desorganizados (B) modificando su arquitectura. Entre los cordones luteínicos se observan múltiples vasos dilatados (C). Espesor 3 $\mu$ m; ampliación 200x, tinción de Mallory

El estudio morfocitométrico comparativo que se llevó a cabo mediante la reconstrucción tridimensional de los órganos procedentes tanto de animales tratados como de sus controles, demostró un incremento en la cantidad de folículos primarios, secundarios, atresicos y de cuerpos lúteos. En los cortes semifinos, la densidad de células luteínicas por unidad de superficie ( $\text{mm}^2$ ) fue significativamente mayor en los cuerpos lúteos de los animales *E* (Cuadro 8)

ESTRUCTURA OVARICAS	CONTROLES	TRATADOS
FOLÍCULOS PRIMARIOS	35.00	44.19
FOLÍCULOS SECUNDARIOS PREANTRALES	7.50	13.95
FOLÍCULOS SECUNDARIOS PREANTRALES ATRÉSICOS	2.50	10.47
FOLÍCULOS SECUNDARIOS ANTRALES	40.00	9.30
FOLÍCULOS SECUNDARIOS ANTRALES ATRÉSICOS	15.00	22.09
CÉLULAS LUTEÍNICAS **	362.6 ± 137.4	412.2 ± 111.8 *

**CUADRO 8. ANALISIS PORCENTUAL DE ESTRUCTURAS EN CAMPOS EQUIVALENTES DE OVARIOS DE RATONES TRATADOS PRENATALMENTE CON DIAZEPAM Y DE RATONES CONTROL.**

\*.-  $P < 0.05$

\*\*.- Valores expresados por  $\text{mm}^2$ , obtenidos por recuento bajo ocular reticulado en 5 determinaciones por cuerpo lúteo.

### 3. ESTUDIO CONDUCTUAL.

La fase precopulatoria (proceptiva) de hembras no tratadas de la misma cepa, procedentes de la colonia y en las mismas condiciones ambientales, se caracterizó por los siguientes patrones:

- Movimientos lentos y conducta exploradora de la jaula.
- Interés, reconocimiento y olfacción del macho.
- Acicalamiento y autoexploración.
- Olfación de genitales del macho y frote corporal (escarceo precopulatorio).

La conducta precopulatoria de las hembras *E* y *T* se caracterizó por los mismos patrones, teniendo una duración promedio de  $14.5 \pm 1.34$  min. en las *E* y de  $15.8 \pm 1.71$  min. en las *T*, sin diferencias significativas. Las duraciones de la fase precopulatoria se correlacionaron positivamente con el desenlace de la fase copulatoria ( $r = 0.81$ ).

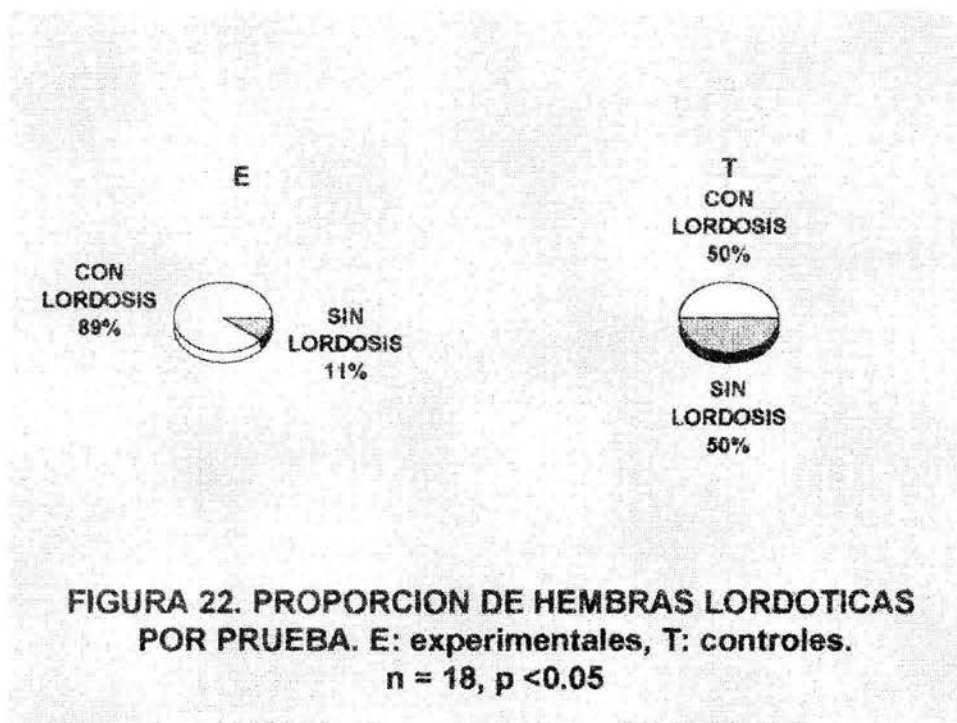
Durante la fase copulatoria, la duración de los trenes de monta mostró tendencia a ser más prolongado en las hembras *E*, sin embargo, no se encontraron diferencias significativas (Cuadro 9).

HEMBRAS TRATADAS	33 ± 18 *
HEMBRAS CONTROL	27 ± 12 *

CUADRO 9. DURACION DE LOS TRENES DE MONTA, EN HEMBRAS DE RATON TRATADAS PRENATALMENTE CON DIAZEPAM COMPARADAS CON HEMBRAS CONTROL. TIEMPO EXPRESADO EN SEGUNDOS.

\*.  $x \pm sd$  (p N.S.). n = 18

La proporción de hembras lordóticas por prueba fue de 88.9% en las E y de 50% en las T. Estos valores tuvieron diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) (Figura 1 y cuadro 11).



Además, el índice lordótico medio de las hembras *E* fue significativamente mayor ( $p < 0.05$ ) (Cuadro 10).

HEMBRAS TRATADAS	$0.7533 \pm 0.18^*$
HEMBRAS CONTROL	$0.4841 \pm 0.12$

CUADRO 9. INDICES LORDOTICOS DE HEMBRAS DE RATON TRATADAS PRENATALMENTE CON DIAZEPAM EN COMPARACION CON HEMBRAS CONTROL.

\*.  $\bar{x} \pm sd$  ( $p < 0.05$ ).  $n = 18$

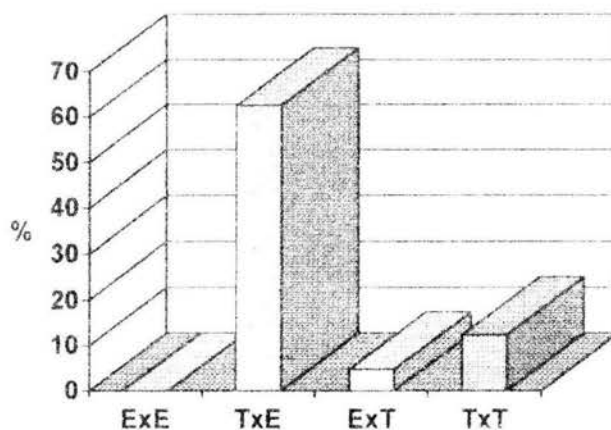
Las hembras *E* mostraron mayor proporción de grado III de lordosis, en tanto que las *T* tuvieron una proporción significativamente menor del grado III, predominando en ellas el grado II (Cuadro 11).

VARIABLE	<i>E</i>	<i>T</i>
INTENSIDAD DE LA LORDOSIS:		
GRADO I	38.15 %	33.25 %
GRADO II	14.85 %	65 % *
GRADO III	47 % *	1.75 %
	* $p < 0.05$	
HEMBRAS LORDOTICAS POR PRUEBA	88.9%	50%
	( $p = 0.034$ )	

CUADRO 11. FASE COPULATORIA DE HEMBRAS DE RATON TRATADAS PRENATALMENTE CON DIAZEPAM (*E*) EN COMPARACION CON SUS CONTROLES (*T*).

- Análisis estratificado:

En el grupo caracterizado de la colonia, el 16% de hembras mostró receptividad espontánea, pero se observaron montas sin exhibir patrón lordótico (33% del total de las pruebas). En el grupo de apareamiento de hembras *T* con machos *E*, no se presentó lordosis en el 62.5% de las pruebas, lo que es significativamente diferente tanto en relación con el grupo de hembras y machos *E* como con el de hembras *E* con machos *T*, donde la proporción de ausencia fue solo del 4.7% ( $p < 0.01$ ). Esta proporción fue del 12.3% para el grupo control (hembras y machos *T*), en tanto que el grupo de apareamiento de hembras y machos *E* no mostró ninguna prueba sin lordosis. (Figura 23).

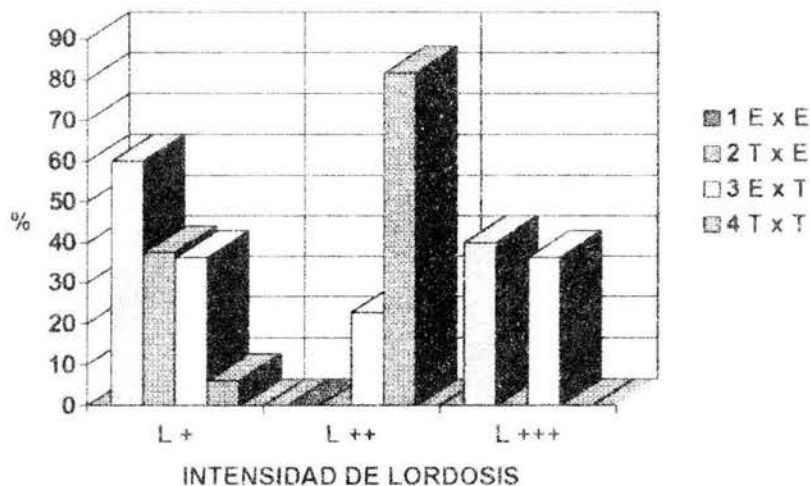


T: TESTIGOS  
E: EXPERIMENTALES

**FIGURA 23. PROPORCION DE MONTAS SIN LORDOSIS.  
(hembras x machos)**



La intensidad de la lordosis fue mayor en las hembras *E* que en las *T* (+++ y ++ respectivamente) durante las montas que precedieron la eyaculación, principalmente en el grupo de apareamiento de hembras *E* con machos *E* (Figura 24).



**Figura 24. Intensidad de la lordosis por grupos de cruce (hembras x machos).  
T: controles E: experimentales  
n = 18**

#### 4. ESTADÍSTICOS.

El tamaño de las camadas de los hijos de las hembras tratadas, en comparación con las controles, no mostraron diferencias estadísticamente significativas, no obstante que las experiencias previas<sup>84,85,86</sup> han mostrado una tendencia al incremento en el número de crías de las madres tratadas.

En este estudio el tamaño promedio de las camadas fue de  $9.75 \pm 1.3$  para las *E* y de  $8.82 \pm 1.1$  para las *T* (resultados sin diferencias significativas). La proporción de crías por sexos, fue de 1.6:1 para los animales tratados y de 1.2:1 para los control, en ambos casos en favor de los machos, los resultados mostraron una diferencia poco significativa mediante la prueba de *t* de Student ( $p = 0.065$ ).

El estudio somatométrico no mostró diferencias significativas entre ambos grupos al nacimiento, durante la etapa de crecimiento ni en la adulta, por lo cual las curvas de incremento ponderal fueron semejantes. El peso promedio a los 63 días fue de  $32.13 \pm 13.91$  g en los machos *E*,  $31.9 \pm 14.03$  g en los *T*,  $29.45 \pm 13.82$  g en las hembras *E* y  $29.56 \pm 13.04$  g en las *T*.

# DISCUSIÓN

## A. ESTUDIO MORFOLÓGICO DE OVARIO.

Las alteraciones consistieron principalmente en: mayor afinidad tintórea por los colorantes ácidos, diferente distribución heterocromática nuclear e incremento del volumen nuclear, que en los sujetos neonatos fue más evidente en las células de la línea germinal y en las foliculares que en las del estroma. Los mismos tipos de cambios persistieron en edades posteriores y se presentaron en los ovocitos, en las células foliculares y en las luteínicas. Estos hallazgos histológicos son semejantes a los descritos previamente en células de pulmón<sup>85</sup>, de riñón<sup>83</sup>, de hueso<sup>107</sup>, de corazón<sup>86</sup>, de placenta<sup>87</sup>, de hígado<sup>108</sup> y, particularmente, los encontrados en tejido testicular<sup>109,110</sup> procedentes de fetos y animales adultos tratados *in utero* con DZ. Lo anterior sugiere que la acción del DZ es sistémica y coincide con los resultados de los estudios farmacocinéticos por los que se ha demostrado su permanencia en diversos tejidos fetales<sup>69,72</sup>. Por otra parte, existen evidencias bioquímicas e

inmunohistoquímicas sobre la existencia de receptores de benzodiazepinas centrales y periféricas en el SNC y de las segundas en prácticamente todos los tejidos<sup>22,23,26,43</sup>.

El incremento en el número de cuerpos lúteos, con modificación de la organización de su estructura e incremento en el número de células luteínicas, es un hallazgo concomitante al incremento en el número de folículos atrésicos. La razón de la coexistencia de estos fenómenos se justifica ante la modificación de los patrones de reclutamiento folicular e hiperandrogenización ovárica, procesos que pudieran ser el resultado de efectos genómicos, mediados por hormonas o gonadocrininas secretadas *in situ*, hecho que se apoya en la evidencia reciente de la capacidad que poseen las benzodiazepinas de regular la síntesis esteroidea<sup>43</sup>. Por sus características farmacológicas, es probable que el DZ actúe a nivel central, modificando la secreción pulsátil del neuroeje, debido a la modificación de la neurogénesis en etapas críticas, lo que ha sido demostrado en diferentes especies<sup>92,111</sup>.

Otra posible explicación sería la interferencia "puntual" genómica de la droga por sí misma, como ha sido sugerido previamente<sup>92</sup>. También se ha demostrado una acción directa de la droga o de sus metabolitos sobre los organelos citoplásmicos como el retículo endoplásmico rugoso, los ribosomas, las mitocondrias y el complejo de Golgi, que al alterarse interfieren con la

morfogénesis y la maduración fisiológica de los animales tratados<sup>112</sup>. La acción podría ser mediada por segundos mensajeros, como resultado de la activación de canales de cloro en el sitio receptor de las benzodiazepinas<sup>113</sup>.

Los estudios realizados con las diferentes metodologías, permiten suponer que las alteraciones inducidas por el DZ se deben a que de manera simultánea interfiere con varios procesos (regulación de la síntesis de esteroides<sup>43</sup>, modificación de la neurogénesis en etapas críticas<sup>92,111</sup>, alteración en la estructura cromosómica<sup>88,89,90</sup>, alteración de los mecanismos de división celular<sup>93,94</sup> e interferencia con la morfogénesis y la maduración fisiológica<sup>112</sup>).

Los resultados del presente estudio no exploran la función hormonal reproductora de los animales sometidos a tratamiento prenatal con DZ, por lo que se precisa de evidencia experimental sobre las secreciones neuroendócrinas durante la etapa reproductiva de tales animales.

## B. ESTUDIO CONDUCTUAL.

Dado que el GABA es un neurotransmisor inhibitorio, que al incrementar la actividad del núcleo ventromedial hipotalámico facilita la lordosis<sup>114</sup>, puede suponerse que este efecto ocurre a través de la supresión de otro sistema

inhibidor. Se ha demostrado que el hipotálamo contiene tanto centros inhibidores como facilitadores, y que la excitación de algunas neuronas de la región medial hipotalámica, puede inhibir el reflejo lordótico. Esta hipótesis ha sido abordada por trabajos recientes<sup>115</sup>.

Puesto que las BZD incrementan la actividad GABAérgica sobre el ionóforo de cloro<sup>116</sup>, y desde el punto de vista ontogénico, la concentración máxima de receptores de DZ, en el cerebro de la rata, se alcanza durante el período perinatal, al administrar el fármaco durante períodos críticos del desarrollo, se han podido modificar conductas no reproductivas de manera dimórfica<sup>117</sup>.

Los resultados conductuales obtenidos en el presente estudio sugieren que la exposición prenatal al DZ no afecta significativamente la organización del sustrato neural requerido para la expresión de la conducta sexual, ya que los animales tratados presentan interés y escaqueo durante la etapa precopulatoria, características de la fase proceptiva, y llevan a cabo la fase receptiva de manera espontánea, sin que fuera necesaria la administración de esteroides para la copulación.

Por el contrario, la exposición prenatal a DZ produjo un incremento en la receptividad, hecho particularmente notable en las hembras *E* apareadas con machos *E*. Esta conducta facilitadora podría corresponder a un patrón dimórfico

sexual, dado que se ha encontrado interferencia con el patrón de monta en machos  $E^{118}$ , y puede deberse a una modificación de la acción de esteroides producida por el DZ, y mediada por el GABA en los núcleos mediales hipotalámicos, requeridos para la expresión de la actividad copulatoria. Este modelo conceptual implica que el GABA y las BZD interactúen a nivel central, durante los procesos de desarrollo y diferenciación neural, produciendo un efecto teratológico sobre las conductas sexuales, hecho que ya ha sido demostrado en conductas no sexuales como la actividad motora en campo abierto y el aprendizaje con reforzamiento continuo<sup>117</sup>.

Como es común para otros modelos de teratología conductual, muchas de las consecuencias de la exposición prenatal a DZ que involucran alteraciones en las respuestas a diferentes retos ambientales, sólo se hacen notables hasta que el organismo expuesto llega al final de la adolescencia o al principio de la etapa adulta<sup>119</sup>.

Los patrones conductuales atípicos son también congruentes con los hallazgos histológicos en el SNC, anteriormente referidos sobre la alteración de las neuronas del mesencéfalo<sup>120</sup>, la corteza cerebral<sup>121</sup> y el cerebelo<sup>92,122,123</sup>.

El presente estudio proporciona evidencia de que la exposición *in utero* a DZ afecta los patrones conductuales que se organizan a partir de la adolescencia

mediante la acción de hormonas gonadales, y muestra la expresión a largo plazo de los efectos de la exposición prenatal al fármaco.



# CONCLUSIONES

## A. ESTUDIO MORFOLÓGICO DE OVARIO.

1. Existen alteraciones histológicas en los ovarios de ratonas tratadas prenatalmente con DZ.
2. Las alteraciones se caracterizan por:
  - a) mayor afinidad tintórea a colorantes ácidos,
  - b) diferente distribución heterocromática nuclear,
  - c) incremento del volumen nuclear,
  - d) desorganización de la estructura de los cuerpos lúteos por pérdida del patrón reticular de los cordones luteínicos,
  - e) atresia folicular más temprana e
  - f) incremento en el número de folículos atrésicos.
3. Persisten hasta la edad adulta.
4. Los hallazgos del presente estudio son consistentes con los que se han encontrado en otros tejidos de ratones tratados prenatalmente con DZ en forma similar.

## B. ESTUDIO CONDUCTUAL.

1. El eje hipotálamo-hipófisis-ovario no parece alterarse significativamente por el tratamiento prenatal con DZ puesto que los animales no requirieron la administración de esteroides exógenos para expresar su actividad copulatoria espontánea.
2. Las hembras tratadas prenatalmente con DZ exhibieron mayor receptividad copulatoria que las testigo, particularmente al estar en contacto con machos tratados.
3. Esta conducta facilitadora parece compensar el patrón alterado de monta de los machos, estableciéndose un patrón conductual dimórfico sexual, por lo que es notablemente menor en las hembras *T* probadas con machos *E*.
4. El incremento selectivo en la receptividad, traducido como conducta facilitadora, puede deberse a una modificación del sustrato químico de la neurotransmisión requerido para el componente motor de la expresión de la actividad copulatoria de las hembras *E*.
5. Los resultados conductuales concuerdan con los hallazgos histológicos informados en este estudio y con la alteración de las neuronas del cuerpo estriado<sup>119</sup>, el meséncéfalo<sup>120,128</sup> y la corteza cerebral<sup>121</sup> hallada en estudios realizados anteriormente.

## REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Greenblatt DJ, Shader RI: Benzodiazepines in clinical practice, edited by Raven Press Books, New York, 1974, pp 116.
2. Berger FM: The tranquilizer decade. *J Neuropsychiat*. 5:410-30, 1964.
3. Berger FM: The pharmacological properties of 2-methyl-2-n-propyl-1, 3 propanediol dicarbamate (Miltown), a new interneuronal blocking agent. *J Pharmacol Exp Ther* 112:413-23, 1954.
- ✓4. Laties VG, Weiss B: A critical review of the efficacy of meprobamate (Miltown, Equanil) in the treatment of anxiety. *J Chronic Dis* 7:500-19, 1958.
5. Greenblatt DJ, Shader RI: Meprobamate: a study of irrational drug use. *Amer J Psychiat* 127:1297-1303, 1971.
6. Sternbach LH: The discovery of Librium ®. *Agents and Actions* 2:193-196, 1972.
7. Randall LO, Schallek W, Heise GA, Keith EF, Bagdon RE: The psychosedative properties of methaminodiazepoxide. *J Pharmacol Exp Ther* 129:163-171, 1960.
8. Sternbach LH, Koechlin BA, Reeder E: Quinazolines and 1,4-benzodiazepines. (VIII). The photoisomerization of 7-chloro-2-methylamino-5-phenyl-3H-1,4-benzodiazepine 4-oxide. *J Org Chem* 27:4671-4672, 1962.
9. Randall LO, Heise GA, Schallek W, Bagdon RE, Banziger R, Boris A, Moe RA, Abrams WB: Pharmacological and clinical studies on Valium ®, a new psychotherapeutic agent of the benzodiazepine class. *Curr Ther Res* 3:405-425, 1961.
- ✓10. Rojas-Ramírez JA: Benzodiazepinas. *Rev Fac Med Mex* 418(1): 32-35, 1975.

11. Covi L, Lipman R, Derogatis L and Uhlenhuth L: Length of treatment with anxiolytic sedatives and responses to their sudden withdrawal. *Acta Psych Scand* 49:51-64, 1973.
12. De Blas AL and Sotelo C: Localization of benzodiazepine-like molecules in the rat brain. A light and electron microscopy immunocytochemistry study with an antibenzodiazepine monoclonal antibody. *Brain Res* 413:285-296, 1987.
13. Sangameswaran L and De Blas AL: Demonstration of benzodiazepine-like molecules in the mammalian brain with a monoclonal antibody to benzodiazepines. *Proc Nat Acad Sci USA* 82: 5560-5564, 1985.
14. Sangameswaran L, Fales HM, Friedrich P and De Blas AL: Purification of benzodiazepines from bovine brain and detection of benzodiazepine-like immunoreactivity in human brain. *Proc Nat Acad Sci USA* 83: 9236-9240, 1986.
15. De Blas AL, Park D and Friedrich P: Endogenous benzodiazepine-like molecules in the human, rat and bovine brains studied with a monoclonal antibody to benzodiazepines. *Brain Res* 413:275-284, 1987.
16. The Pharmaceutical Codex: Diazepam, edited by The Pharmaceutical Press, London, 1979, 268-270.
17. Drug, Facts and Comparison: Benzodiazepines, edited by Facts and Comparison Inc, Missouri, 1990, 261-261K.
18. Goodman LS, Gillman YA: Benzodiazepinas. *Bases farmacológicas de la terapéutica médica*, Interamericana, México, 1992, 346-358.
19. Vandemecun Farmacéutico Valium, edited by Rezza, México, 1993, 1569-1570.
- ✓ 20. Rementeria JL and Rhatt K: Withdrawal symptoms in neonates from intrauterine exposure to diazepam. *J Ped* 90(1):123, 1977.
21. Tallman JF, Steven MP, Skolnick P, Gallager DW: Receptors for the Age of Anxiety: Pharmacology of the Benzodiazepines. *Science* 207 (18): 274-281, 1980.

- ✓ 22. Hernández LAI, Márquez-Orozco MC, Márquez-Orozco A, Hicks GJ: Efectos teratológicos de las benzodiazepinas. *Ginec Obstet Mex* 59: 195-201, 1991.
23. Möhler H and Okada T: Benzodiazepine receptor: demonstration in the central nervous system. *Science* 198: 849-851, 1977.
24. Squires R and Braestrup C: Benzodiazepines receptors in rat brain. *Nature* 266: 732-734, 1977.
25. Anholt R, De Souza EB, Oster-Granite ML, Snyder S: Peripheral Type Benzodiazepine Receptors. Autoradiographic Localization in Whole-Body Sections of Neonatal Rats. *J Pharm Exp Ther* 233 (2): 517-526, 1985.
26. Verma A, Snyder S: Peripheral Type Benzodiazepine Receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 29: 307-322, 1989.
27. Marangos PJ, Patel J, Boulanger JP and Rosenberg C: Characterization of peripheral type benzodiazepine binding sites in brain using (<sup>3</sup>H) Ro 54864. *Mol Pharmacol* 22:26, 1982.
28. Gavish M and Snyder SH: Benzodiazepine recognition sites on GABA receptors. *Nature* 287: 651-652, 1980.
29. Braestrup C, Squires RF: Specific benzodiazepine receptors in rat brain characterized by high affinity [<sup>3</sup>H]diazepam binding. *Proc Natl Acad Sci USA* 74:3805-3809, 1977.
30. Bossmann HB, Penney DP, Case KR and Averill K: Diazepam receptor: Specific nuclear binding of (<sup>3</sup>H) flunitrazepam. *Proc Nat Acad Sci USA* 77(2):1195-1198, 1980.
31. Lawrence LJ, Gee KW, Yamamura HI: Benzodiazepine Anticonvulsant Action: Gamma-Aminobutyric-Acid Dependent Modulation of the Chloride Ionophore. *Biochem Biophys Res Comm* 123 (3): 1130-1137, 1984.
32. Costa E and Guidotti A: Molecular mechanisms in the receptor action of benzodiazepines. *Ann Rev Pharm Tox* 19:531-545, 1979.
33. Grayson R, Schoch P, Haefely W: Receptores benzodiazepínicos: nuevos conceptos. *The Neurosciences* 3:191-203, 1991.

34. Allan M, Galiaher EJ, Gionet EJ, Harris RA: Genetic Selection of Benzodiazepine Ataxia Produces Functional Changes in the Gamma-Aminobutyric-Acid Receptor Chloride Channel Complex. *Brain Res* 452: 118-126, 1988.
35. Gee KW, Lawrence LJ, Yamamura HI: Modulation of the chloride ionophore by benzodiazepine receptor ligands: influence of  $\gamma$ -aminobutyric acid and ligand efficacy. *Mol Pharmacol* 30:218-225, 1986.
36. Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD: La membrana plasmática, en: *La Célula*, editado por Omega, Barcelona, 1990, 316-320.
37. Bowman, W. C.: GABA, in *Dictionary of Pharmacology*, edited by Blackwell Scientific, 1986, 2. 92-93.
38. De Souza EB, Anholt RR, Murphy KM, Snyder S, Kuhar M: Peripheral Type Benzodiazepine Receptors in Endocrine Organs: Autoradiographic Localization in Rat Pituitary, Adrenal, and Testis. *Endocrinology* 116 (2) : 567-573, 1985.
39. Anholt RR, Petersen PL, De Souza EB, Snyder S: The Peripheral-Type Benzodiazepine Receptor. *J Biol Chem* 261: 576-583, 1986.
40. Rampe D, Triggle DJ: Benzodiazepines and calcium channel function. *Trends Pharmacol Sci* 7:461-464, 1986.
41. Krueger KE, Papadopoulos V: Mitochondrial benzodiazepine receptors and the regulation of steroid biosynthesis. *Ann Rev Pharmacol Toxicol* 32:211-237, 1992.
42. Anholt RR: Mitochondrial Benzodiazepine Receptors as Potential Modulators of Intermediary metabolism. *Trends Pharmacol Sci* 7:506-511, 1986.
43. Muklin AG, Papadopoulos V, Costa E, Krueger KE: Mitochondrial benzodiazepine receptors regulate steroid biosynthesis *Proc Natl Acad Sci USA* 86:9813-9816, 1989.
44. Papadopoulos V, Nowzari FB, Krueger KE: Hormone-stimulated steroidogenesis is coupled to mitochondrial benzodiazepine receptors *J Biol Chem* 266:3682-3687, 1991.

45. Basile AS, Skolnick P: Subcellular Localization of "Peripheral-Type" Binding Sites for Benzodiazepines in Rat Brain. *J Neurochem* 46:305-308, 1986.
46. Regan JW, Roeske WR, Yamamura HI: The benzodiazepine receptor: its development and its modulation by  $\gamma$ -aminobutyric acid. *J Pharmacol Exp Ther* 212:137-143, 1980.
47. Barbaccia ML, Costa E, Guidotti A: Endogenous ligands for high-affinity recognition sites of psychotropic drugs. *Ann Rev Pharmacol Toxicol* 28:451-476, 1988.
48. Antkiewicz-Michaluk L, Guidotti A, Krueger KE: Molecular characterization and mitochondrial density of a recognition site for peripheral-Type benzodiazepine ligands. *Mol Pharmacol* 34:272-278, 1988.
- ✓ 49. Braestrup C, Nielsen M: Ontogenetic Development of Benzodiazepine Receptor in the rat Brain. *Brain Res* 147:170-173, 1978.
- ✓ 50. Shibuya T, Watanabe Y, Hill HF, Salafsky B: Developmental alterations in maturing rats caused by chronic prenatal and postnatal diazepam treatments. *Japan J Pharmacol* 40:21-29, 1986.
51. Coyle JT, Enna ST: Neurochemical aspects of the GABAergic neurons in the rat brain. *Brain Res* 111:119-133, 1976.
52. Rothe T, Middleton H, Bigl V: The ontogeny of GABA receptors and glutamic acid decarboxylase in regions of the rat brain. *Neuropharm* 27:661-667, 1988.
53. Massotti M, Alleva FR, Balaz T, Guidotti A: GABA and benzodiazepine receptors in the offspring of dams receiving diazepam: ontogenic studies. *Neuropharmacol* 19:951-956, 1980.
54. Covi L, Lipman R, Derogatis L, and Uhlenhuth L: Length of treatment with anxiolytic sedatives and responses to their sudden withdrawal. *Acta Psychiat Scand* 49:51-64, 1973.
55. Hillestad L, Hansen T, and Melson H: Diazepam metabolism in normal man II. Serum concentration and clinical effect after oral administration and cumulation. *Clin Pharm Ther* 16: 485-489, 1974.

56. Margules DL and Stein L: Increase of "antianxiety" activity and tolerance of behavior depression during chronic administration of oxazepam. *Psychopharm* 13: 17-80, 1973.
57. Aranda JV and Stern L: Clinical aspects of developmental pharmacology and toxicology. *Pharmac Ther* 20:1-51, 1983.
58. Kales A, Scharf MB and Kales JD: Rebound insomnia. A new clinical syndrome. *Science* 201: 1039-1041, 1978.
- ✓ 59. Mazzi E: Possible neonatal diazepam withdrawal: a case report. *Am J Obstet Gynecol* 129(5): 586-587, 1977.
- ✓ 60. Bitnum S: Possible effect of chlordiazepoxide on the fetus. *Can Med Ass J* 100: 351, 1969.
- ✓ 61. Athinarayanan P, Pierog SH, Nigam SK and Glass L: Chlordiazepoxide withdrawal in the neonate. *Am J Obstet Gynecol* 124: 212, 1976.
62. Gilberg C: "Floppy infant syndrome" and maternal diazepam. *Lancet II*: 244, 1977.
63. Cree JE, Meyer J and Hailey DM: Diazepam in labour: its metabolism and effect on the clinical condition: an thermogenesis of the newborn. *Brit Med J* 4: 251-255, 1973.
- ✓ 64. Aaltonen L, Erkkola R and Kanto J: Benzodiazepine receptors in the human fetus. *Biology of Neonate* 44:54, 1983.
65. Lyubimov BI, Smolnikova NM and Strekalova SN. Effect of diazepam on the development of progeny. *Bull EKSP Biol Med* 78: 1156-1158, 1974.
66. Kellog C, Tervo D, Ison J, Parisi T and Miller R. Prenatal exposure to diazepam alters behavioural development in rats. *Science* 204: 205-207, 1980.
- ✓ 67. Brinsmead M: Fetal and neonatal effects of drugs administered in labour. *Med J Austral* 146:481-486, 1987.
68. Perucca E: Drug metabolism in pregnancy, infancy and childhood. *Pharmac Ther* 34:129-143, 1987.



69. Mandelli M, Morselli PL, Nordio S, Pardi G, Principi N, Sereni F and Tognoni G: Placental transfer of diazepam and its disposition in the newborn. *Clin Pharm Ther* 17: 564-572, 1975.
70. Erkkola R, Kangas L and Pekkarinen A. The transfer of diazepam across the placenta during labour. *Acta Obst Gyn Scand* 52: 167-170, 1974.
71. Waddell WJ and Marlowe C: Transfer of drugs across the placenta. *Pharmac Ther* 14: 375-390, 1981.
72. Idänpään-Heikkilä JE, Jouppila PI, Poulakka JO and Vorne MS: Placental transfer and fetal metabolism of diazepam in early human pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 109: 1101-1116, 1971.
73. Saito H, Kobayashi H, Satoshi T and Sakai T: Fetal toxicity of benzodiazepines in rats. *Res Comm Chem Path Pharma* 46(3): 437, 1984.
74. Zimmerman EF: Neuropharmacologic teratogenesis and neurotransmitter regulation of palate development. *Am J Mental Def* 88(5): 548-558, 1984.
75. Flowers CF, Rudolph AJ, Desmond M: Diazepam (*Valium*) as an adjunct in obstetric analgesia. *Obstet Gynecol* 34:68, 1969.
- ✓ 76. Scher J, Hailey DM and Beard RM: The effects of diazepam on the fetus. *J Obstet Gyn Brit Comm* 79:635, 1972.
77. Mc Carthy GT, O'connell BO and Robinson AE. Blood levels of diazepam in infants of two mothers given large doses of diazepam during labour. *J Obstet Gyn Br Comm* 80:349, 1973.
78. Owen JR, Irani SF and Blair AW: Effects of diazepam administered to mothers during labour on temperature regulation of neonate. *Arch Dis Chil* 47: 107, 1972.
79. Rowlatt RJ: Effects of maternal diazepam on the newborn. *Br Med J* 4: 985, 1978.
80. Haram K: Floppy infants syndrome and maternal diazepam. *Lancet* 2(8038): 612, 1977.

81. Correa-García L, Márquez-Orozco MC, Márquez-Orozco A: Effects of administration of diazepam (Valium®) of fetal refine mice. Res Congr Int Anat 12: 165, 1980.
- ✓ 82. De la Fuente-Juárez G, Márquez-Orozco MC y Márquez-Orozco A. Alterations of fetal heart mice produced by treatment of diazepam (Valium®) during gestation. Res Congr Int Anat 12: 169, 1980.
- ✓ 83. Márquez-Orozco MC, Márquez-Orozco A y Sámano Bishop A: Efecto del diazepam (Valium®) en riñones fetales *in vivo*. Bol Soc Mex Cienc Fisiol 7(1): 16, 1984.
- ✓ 84. Márquez-Orozco A, Márquez-Orozco MC y Sámano Bishop A: Cambios histológicos del riñón fetal de ratones de madres tratadas durante la gestación con diazepam (Valium®). Bol Est Med Biol Mex 33(1-8):96, 1984-1985.
- ✓ 85. Márquez-Orozco, M.C., Márquez-Orozco, A. y Becker-Fincowsky, Z.B. Alteraciones histológicas del pulmón por administración prenatal de diazepam (Valium®) en fetos de ratón. Bol Soc Mex Cienc Fisiol 9(1):4-7, 1985.
- ✓ 86. Márquez-Orozco MC, Gazca-Ramírez V y Márquez-Orozco A. Ultrastructural alterations of fetal mice heart produced by treatment with diazepam during gestation. Proc West Pharm Soc 26: 83, 1983.
- ✓ 87. Alvarez-Fernández G, Márquez-Orozco MC, Márquez-Orozco A, y Sámano Bishop A: Efectos del diazepam (Valium®) sobre la ultraestructura de la barrera placentaria de fetos de ratón. Bol Est Med Biol Mex 33(1-8): 138, 1984-1985.
88. Breen PC and Stenchever MA: Some effects of diazepam on the fine structure of fibroblasts in tissue culture. Am J Obstet Gynecol 108:520, 1970.
89. Stenchever MA, Frankel RB, Jarvis JA and Veress K: Some effects of diazepam in human cells *in vitro*. Am J Obstet Gynecol 103: 836, 1969.
90. Staiger CR: Studies on The Chromosomes of Human Lymphocytes Treated With Diazepam In Vitro. Mut Res 10: 635-644, 1970.

91. Regan JW, Yamamura HI, Yamada S and Rooske WR: High affinity renal ( $^3\text{H}$ ) flunitrazepam binding: Characterization, localization and alteration in hypertension. *Life Science* 28(9):991, 1981.
92. Márquez-Orozco MC, Márquez-Orozco A y Escobar A: Diazepam induce long term delay in the migration of external granular layer of the cerebellum: an experimental study in the mouse. *Bol Est Med Biol Mex* 36(1-4): 19-24, 1988.
93. Anderson LC, Lehto VP, Stenman S, Bradley RA and Virtanen I: Diazepam induces mitotic arrest at prometaphase by inhibiting centriolar separation. *Nature* 291: 247, 1981.
94. Stenchever MA and Smith WD: The effects of diazepam on meiosis in the CF1 mouse. *Teratology* 23: 279, 1981.
95. Kellog CK, Simmons RD, Miller RK and Ison JR: Prenatal diazepam exposure in rats: long-lasting functional changes in the offspring. *Neurobehav Toxicol Ther* 7: 483-488, 1985.
96. Coyle JT and Yamamura HI: Neurochemical aspects of the ontogenesis of cholinergic neurons in the rat brain. *Brain Res* 118:429-440, 1976.
97. Simmons RD, Kellog CK and Miller RK: Prenatal diazepam exposure in rats: long-lasting, receptor-mediated effects on hypothalamic-norepinephrine containing neurons. *Brain Res* 293: 73-83, 1984.
98. Butcher RE and Vorhess CV: A preliminary test battery for the investigation of the behavioral teratology of selected psychotropic drugs. *Neurobehav Toxic Supp* 1: 207-212, 1979.
99. Sachs C and Jonsson G: Changes in central noradrenaline neurons after systemic 6-hydroxydopamine administration. *J Neurochem* 21: 1517-1524, 1973.
100. Kasamatsu T and Petigren JD: Depletion of brain catecholamines: failure of ocular dominance shift after monocular occlusion in kittens. *Science* 194: 206-209, 1976.
101. Deskin R, Mills E, Whitmore WL, Seidler FJ and Sitokin TA: Maturation of sympathetic neurotransmission in the rat heart. VI. The effect of

- neonatal central catecholaminergic lesions. *J Pharm Exp Ther* 215: 342-347, 1980.
102. Kellog CK, Isson JR and Miller RK: Prenatal diazepam exposure: Effects on auditory temporal resolution in rats. *Psychopharmacology (Berlin)*, 79: 332-337, 1983.
- ✓ 103. Shibuya T, Watanabe Y, Hill HF and Salafsky B. Developmental alterations in maturing rats caused by chronic prenatal and postnatal diazepam treatments. *J Pharmacol* 40:21-29, 1976
104. Lippa AS, Beer B, Sano MC, Vogel RA, Meyerson LR: Differential Ontogeny of Type I and type II Benzodiazepine receptors. *Life Sci* 28: 2343-2347, 1981.
105. Van der Kleijn E: Kinetics of distribution and metabolism of diazepam and chlordiazepoxide in mice. *Arch Int Pharmacodyn* 1178:193, 1969.
106. Stenchever MA, Parks KJ. Some effects of diazepam on pregnancy in the Balb/C mouse. *Am J Obstet Gynecol* 1121:765, 1975.
- ✓ 107. Márquez-Orozco MC, Márquez-Orozco A, Alvarez-Fernández G, Sámano-Bishop A. Acción del diazepam sobre la osteogénesis de la tibia fetal de ratón. *Bol Soc Mex Cienc Fisiol* 17(1):10, 1984.
- ✓ 108. Márquez-Orozco MC, Márquez-Orozco A: Cambios ultraestructurales de hepatocitos fetales causados por diazepam (Valium®). *Bol Soc Mex Cienc Fisiol* 18(3):7, 1985.
- ✓ 109. Mata-Santibañez MV, Márquez-Orozco MC, Márquez-Orozco A: Testicular histological changes in mice after prenatal administration of diazepam. *Proc West Pharmacol Soc* 36:117-121, 1993.
- ✓ 110. Ramos-Avila M, Márquez-Orozco MC, Márquez-Orozco A: Diazepam induced histological changes in the testes of adult mice. *Proc West Pharmacol Soc* 36:123-126, 1993.
111. Nagele RG, Bush KT, Hunter ET, Kosciuck MC, Lee H. Biomechanical basis of diazepam-induced neural tube defects in early chick embryos: a morphometric study. *Teratology* 40:29-36, 1989.

112. Gazca-Ramírez MV, Márquez-Orozco MC, Márquez-Orozco A, Ramos-Avila M: Ultrastructural alterations in the Sertoli cells of adult mice exposed to diazepam. *Proc West Pharmacol Soc* 37:113-114, 1994.
113. Kellog CK, Pleger GL: GABA-stimulated chloride uptake and enhancement by diazepam in synaptoneurosomes from rat brain during prenatal and postnatal development. *Dev Brain Res* 49:87-95, 1989.
114. Pfaff DW, Schwartz-Giblin S, McCarthy MM, Kow LM: Cellular and molecular mechanisms of female reproductive behaviors. In: Knobil E, Neill J, *The Physiology of reproduction*, Raven Press, New York, 1994, 2:107-220.
115. McCarthy MM, Malik KF, Feder HH: Increased GABAergic transmission in medial hypothalamus facilitates lordosis but has the opposite effect in preoptic area. *Brain Res* 507:40-44, 1990.
116. Tallman JF, Gallager DW: The GABA-ergic system: A locus of benzodiazepines action. *Annu Rev Neurosci* 8:22-24, 1985.
117. Guillamón A, Calés JM, Rodríguez-Zafra M, Pérez-Laso C, Caminero A, Izquierdo MaAP, Segovia S: Effects of perinatal diazepam administration on two sexually dimorphic nonreproductive behaviors. *Brain Res Bull* 25:913-916, 1990.
118. Márquez-Orozco A, Hernández-Álvarez LAI, Márquez-Orozco MC: Sexual activity in male mice treated prenatally with diazepam. *Proc West Pharmacol Soc* 37:65-68, 1994.
119. Kellog CK, Renee JP, Bitran D: Sexually dimorphic influence of prenatal exposure to diazepam on behavioral responses to environmental challenge and on  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA)-stimulated chloride uptake in the brain. *J Pharmacol Exp Ther* 256(1):259-265, 1991.
120. Márquez-Orozco A, Márquez-Orozco MC: Midbrain histological alterations in fetal mice produced by diazepam (Valium) administration during pregnancy. *Soc Neurosci Abstr* 12:324, 1986.
121. Márquez-Orozco A, Márquez-Orozco MC, Zarco de Coronado I, Gazca-Ramírez MV: Alteraciones histológicas y fisiológicas del cerebro de

ratones adultos expuestos prenatalmente a diazepam. *Bol Med Hosp Infant Mex* 49:129, 1992.

122. Andrade-Martinez R, Márquez-Orozco MC, Márquez-Orozco A: Cerebellar histological changes produced by diazepam. *Proc West Pharmacol Soc* 36:219-225, 1993.
123. Márquez-Orozco MC, Márquez-Orozco A, Gazca-Ramírez MV, Andrade-Martinez R: Cerebellar ultrastructural changes produced by diazepam. *Proc West Pharmacol Soc* 37:115-116, 1994.
124. Walss-Rodríguez RJ, Reyes-Levario A: Tratamiento anticonvulsivante de la preeclampsia severa. Comparación entre diazepam y sulfato de magnesio. *Ginec Obstet Mex* 60:331-335, 1992.
125. Clark GD, Ryan PJ: Tranquillizers can block mitogenesis in 3T3 cells and induce differentiation in Friend cells. *Nature* 287:160-161, 1980.
126. Márquez-Orozco MC, León-Manilla S, Márquez-Orozco A: Efectos de la administración de diazepam (Valium) sobre la histología del estómago fetal de ratón de la cepa CD-1. *Res Congr Nacl Anat* 9:24, 1982.
- ✓ 127. Márquez-Orozco MC, Dorantes-Sierra L, Márquez-Orozco A, Sámano-Bishop A: Alteraciones histológicas del intestino delgado de fetos de ratón, causadas por la administración materna de diazepam (Valium). *Res Congr Nacl Anat* 10:29, 1984.
128. Márquez-Orozco MC, Márquez-Orozco A: Efectos del diazepam sobre el mesencéfalo de fetos de ratón. *Res Congr Nacl Cienc Fisiol* 28:20-2C, 1985.