



0038171

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS  
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

ACCIÓN TERATOGENICA DEL  
DIAZEPAM SOBRE EL ENCÉFALO  
DE RATÓN

T E S I S  
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

DOCTORA EN CIENCIAS  
(BIOLOGÍA)

P R E S E N T A  
MARÍA CRISTINA MÁRQUEZ OROZCO

DIRECTOR DE TESIS: DR. JESÚS MANUEL LEÓN CÁZARES  
MÉXICO D.F. 1997

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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.

**Resumen de la tesis doctoral Acción teratogénica del diazepam sobre el encéfalo del ratón**  
**María Cristina Márquez Orozco**

**Diazepam (DZ) accumulation during gestation in the brain of mice delayed cellular differentiation. The purpose of this work was investigate if DZ 2.7 mg/kg doses produces long-lasting histological and ultrastructural alterations in the cerebral and cerebellar cortices, the striatum and midbrain of mice treated *in utero*. Female mice CD-1, two months old were mated with males of the same strain and age, from 05:00h to 05:30 h, when a vaginal plug was found in the females were isolated and randomly assigned to three groups. Two gestating mice groups were injected daily sc from day 6 to 17. The first group (DZ) was treated with DZ doses 2.7 mg/kg/bw/day. The second group (S) with 0.9% saline solution. A third group (NT) was non-treated. Twenty females of each groups were killed in CO<sub>2</sub> atmosphere in gestation day 18, the cerebellum fixed in 2.5% glutaraldehyde, post-fixed in OsO<sub>4</sub>, and embedded in epoxy resin. The fine sections were contrasted and observed under a transmission microscope. The offspring's of 20 females of each groups, were born 19th day, it were wet nursed by non-treated mice weaned, and kept from 180 or 240 days. The adult offspring's were killed in CO<sub>2</sub> atmosphere, the brain fixed in 10% buffered formalin, embedded in paraffin-paraplast, and stained with hematoxylin eosin, the Klüver-Barrera technique for nerve cells and myelin fibers, and the Bodian technique for axons. Few blocks were impregnated with the rapid Golgi technique. The adult cerebellum of the 180 days offspring's were fixed, contrasted and the sections observed under transmission microscope. In all the brains tissues DZ group, was demonstrated delay in neural differentiation of the brains tissues, the presence of coarse and disoriented fiber bundles, few fibers in the with matter with irregular myelin sheath. Rough endoplasmic reticulum and Golgi complex were abundant, and cisterns frequently dilated. The dendrite tree and the neuropile were poorly differentiated. The polyribosomes were abundant and the mitochondriae swelling. Non histological or ultrastructural differences were found between S and NT groups. The results show a fetal and permanent effects of prenatal exposure of DZ in the cerebral and, cerebellar cortices, the striatum and the midbrain of mice.**

## **Dedicatoria**

**A mi familia  
A mis maestros  
A mis amigos**

## **Al Honorable jurado**

**Dr. Jesús Manuel León Cazares.  
Dra. María Luisa Fanjul Peña  
Dra. María del Carmen Uribe Aranzabal  
Dra. Patricia Ramos Morales  
Dr. Luis Felipe Jiménez García  
Dra. María Genoveva González Morán  
Dr. Germán Alberto Chamorro Cevallos**

# Contenido

<b>Introducción</b> .....	1
Antecedentes históricos .....	1
Características químicas de las benzodiazepinas .....	2
Benzodiazepinas y receptores GABA <sub>A</sub> * .....	3
Estructura del complejo receptor GABA <sub>A</sub> -benzodiazepínico central .....	6
Receptores GABA <sub>B</sub> centrales .....	13
Receptores GABA <sub>C</sub> .....	14
Receptores benzodiazepínicos periféricos .....	14
Mecanismos de acción de las benzodiazepinas .....	15
Acciones fisiológicas de las benzodiazepinas y principales usos .....	16
Reacciones secundarias y adversas de las benzodiazepinas .....	17
Vías de administración, absorción, concentración sanguíneas y distribución de las benzodiazepinas .....	17
Biotransformación de las benzodiazepinas .....	18
Benzodiazepinas endógenas .....	19
Ontogenia de los receptores benzodiazepínicos .....	22
Transferencia del diazepam por la placenta .....	22
Efectos del diazepam sobre el recién nacido .....	24
Efectos teratogénicos y tóxicos del diazepam y otras benzodiazepinas en animales de experimentación .....	25
<b>Planteamiento del problema</b> .....	31
<b>Hipótesis</b> .....	31
<b>Objetivo</b> .....	31
<b>Material y métodos</b> .....	31

<b>Resultados histológicos</b> .....	33
Corteza cerebral adulta .....	33
Cuerpo estriado .....	35
Mesencéfalo .....	36
Colículos .....	37
Superiores .....	37
Inferiores .....	37
Cerebelo .....	38
<b>Resultados ultraestructurales</b> .....	40
Cerebelo fetal .....	40
Cerebelo adulto .....	41
<b>Figuras de los resultados histológicos y ultraestructurales</b> .....	43
<b>Discusión</b> .....	118
<b>Conclusiones</b> .....	121
<b>Referencias</b> .....	123

## Resumen

El diazepam es una benzodiazepina, que por su acción sedante, hipnótica, anticonvulsivante y miorrrelajante, se emplea con mucha frecuencia en pacientes con eclampsia, preeclampsia, actividad prematura del útero y placenta previa. Atraviesa la barrera placentaria con rapidez, circula en mayor proporción en la sangre fetal que en la materna, se acumula en los tejidos fetales y por ser altamente lipofílico se acumula en los tejidos del sistema nervioso central en particular en la corteza cerebral, en la cerebelar y en el mesencéfalo fetales y permanece en éstos postnatalmente. Su acción es mediada por receptores benzodiazepínicos, centrales y periféricos. El propósito de este trabajo fue investigar si el diazepam produce alteraciones histológicas en la corteza cerebral, la cerebelar, el cuerpo estriado y el mesencéfalo. Como ejemplo se estudió el efecto del diazepam sobre la ultraestructura del cerebro fetal y adulto de ratones expuestos prenatalmente al fármaco, que persisten, postnatalmente.

Hembras de ratón de la cepa CD-1, de dos meses de edad fueron apareadas con machos de la misma cepa y edad, de las 5:00 a las 5:30 A.M. Las que presentaron tapón vaginal se distribuyeron en tres grupos. El primero fue tratado del 6° al 17° día de la gestación con dosis únicas diarias de diazepam de 2.7 mg/kg de peso corporal, administradas por vía subcutánea, el segundo recibió solución salina al 0.09%, en volúmenes equivalentes a los administrados con diazepam durante el mismo período y vía, el tercer grupo no fue tratado. Al 18° día de la gestación, 20 hembras de cada grupo se sacrificaron, se obtuvo el cerebro de los fetos que se fijaron por la técnica habitual de microscopía electrónica de

transmisión. Veinte hembras de cada grupo se conservaron hasta el día 19° en el que nacieron las crías, las de diazepam se reanimaron y se transfirieron con nodrizas no tratadas, a las que amamantaron junto con las del grupo control. Al 21° día se destetaron, se alimentaron *ad libitum* y tuvieron libre acceso al agua hasta la etapa adulta en la que se sacrificaron, se les extrajo el encéfalo el cual se fijó en formol al 10%, amortiguado se deshidrató, se incluyó, se cortó y se tiñó con hematoxilina-eosina. Parte del tejido cerebelar, fue procesado por la técnica habitual de microscopía electrónica.

En el encéfalo de los ratones adultos expuestos *in utero* a diazepam, al microscopio óptico se observó la persistencia del retraso en la diferenciación de todos los tejidos estudiados alteraciones en la neuronas, las fibras, espinas dendríticas, neuropilo y en la distribución de la cromatina. Al microscopio electrónico de transmisión se observó que el retículo endoplásmico rugoso estaba distendido, que había una mayor cantidad de polirribosomas, que las mitocondrias estaban hinchadas, el complejo de Golgi era más abundante y que la cromatina mostraba una distribución atípica. Los efectos producidos por el diazepam podrían deberse a rupturas cromosómicas, a la interferencia del fármaco en la división celular y a la formación de aductos. Es probable que los efectos sean mediados por receptores benzodiazepínicos centrales y periféricos. Los resultados demuestran que el diazepam administrado prenatalmente produce alteraciones de largo plazo sobre el encéfalo del ratón, en particular en la corteza cerebral, en la cerebelar, el cuerpo estriado y el mesencéfalo.

## Introducción

### Antecedentes históricos

Uno de los principales retos de los investigadores del área farmacológica ha sido el desarrollar fármacos que ayuden a los pacientes a tranquilizarse y a disminuir la ansiedad que generan las presiones de la vida moderna.

Entre este tipo de fármacos se encuentran las benzodiazepinas, que es un grupo de sustancias sintéticas relacionadas estructuralmente. El primero de estos compuestos fue el clordiazepóxido conocido comercialmente como Librium, mientras que en el laboratorio era el Ro5-0690 o metamiodiazepóxido. Este fármaco fue uno de las aproximadamente 40 sustancias tipo de las quinazolonas 3 óxidos, que Leo Sternbach y su grupo de químicos había sintetizado durante sus estudios postdoctorales en la Universidad de Cracow en Polonia, en la década de los 30's<sup>162, 203, 44</sup>.

En 1960, Sternbach<sup>203</sup>, en calidad de médico-químico de los laboratorios Hoffman-La Roche recibió la sugerencia de uno de los químicos de su grupo de investigación, de probar el Ro5-0690 por haberlo encontrado durante el asco del laboratorio, por lo que Sternbach<sup>203</sup>, en mayo de 1957 le pidió al grupo de farmacólogos de Roche, encabezados por Lowell O. Randall, que le aplicara una batería de pruebas, por las que, encontraron sus propiedades como potente sedante, miorrelajante, anticonvulsivante y en humanos se comprobó que tenía efectos ansiolíticos. Por estudios posteriores se demostró que era psicoestimulante, que favorecía la actividad social, la comunicación verbal y el apetito, a la vez que reducía la depresión<sup>44</sup>.

Un año después, el mismo grupo de investigadores desarrollaron el diazepam, cuya fórmula química es 7-cloro-1-metil-5-fenil-2-H-1, 4 benzodiazepina 2-ona, con peso molecular de 284.74, al que le encontraron mayor actividad sedante, miorrelajante, anticonvul-

sivante, ansiolítico, que disminuía la angustia, eliminaba el insomnio, aumentaba la tolerancia a la agresión física y era hipnótico. Debido a todas estas propiedades, en 1963 fue comercializado por los laboratorios Hoffman-La Roche, que lo lanzaron al mercado con el nombre de Valium, con el que se conoce prácticamente en todo el mundo<sup>161</sup>.

El mismo grupo de investigadores continuaron desarrollando otras benzodiazepinas, algunas como el oxazepam (bonare) que es un metabolito del diazepam, cuya vida media en el plasma sanguíneo es más corta que la del diazepam y el clordiazepóxido (librium), el nitrazepam (mogadón o pacidrim), el flunitrazepam (rohypnol) con marcadas propiedades hipnóticas, el lorazepam (ativán), el modazepam (emopan), el midazolam (dormicum), el triazolam (halción), y el alprazolam (tafil), que son sólo algunas de las aproximadamente 25 benzodiazepinas que tienen uso terapéutico en diferentes partes del mundo, aunque en la actualidad se han sintetizado más de tres mil de estos fármacos y se han probado las propiedades farmacológicas de alrededor de 120.

La popularidad del Librium y del Valium casi fue inmediata y su comercialización segura. En 1972 correspondieron al 49% de las drogas psicoactivas que se prescribieron en Estados Unidos y desplazaron a otros tipos de sedantes, hipnóticos y ansiolíticos. Únicamente de estos fármacos se elaboraron aproximadamente 100 millones de recetas por año, con un costo de 500 millones de dólares, que incluyó tres millones de recetas resurtidas de Valium por mes. En los cinco años siguientes se observó un descenso en su prescripción debido a que se controlaron más, y a partir de 1981 la Food and Drug Administration (FDA) reportó que se elaboraron aproximadamente 65 millones de recetas anualmente, cifra que se considera se



ha mantenido más o menos constante en los últimos años.

En los Estados Unidos, 11 a 13% de la población adulta ha consumido un fármaco ansiolítico, una o más veces al año, y entre el 2.3% y el 2.5% las toma a diario, por lo menos durante cuatro meses, aunque con frecuencia lo hacen por periodos más largos, cifras que resulta bajas si se compara con los datos de Europa, en donde el 7.2% de las personas las utilizan a diario, y el 18% lo hace una o más veces al año<sup>44</sup>.

Recientemente se ha calculado que en los Estados Unidos más de 500 millones de personas han tomado benzodiazepinas en los últimos 30 años por causas médicas, como ansiedad, insomnio, espasmos musculares, enfermedades en las que se producen convulsiones como la epilepsia o en premedicación preoperatoria. Aparentemente ha disminuido el número de prescripciones por escrito, a consecuencia de los efectos colaterales que

causan algunas y la dependencia física que provoca su uso crónico. En particular, los jóvenes las emplean solas o combinadas como estimulantes, con los que intentan sentirse bien y alejarse de una realidad que suele ser desalentadora o frustrante, aunque en ocasiones inician su consumo por curiosidad o por la presión que ejercen sobre ellas amistades adictas<sup>44</sup>.

Desafortunadamente, en México no se cuenta con estadísticas confiables sobre la frecuencia con la que se recetan o se administran las benzodiazepinas, pero se sabe que siguen siendo fármacos muy utilizados, debido a las propiedades terapéuticas que se han descrito con anterioridad. En los laboratorios farmacéuticos que las producen, se tienen evidencias del uso de recetas falsas, con los que tratan de conseguir las farmacodependientes, o las personas que las emplean como automedicación.

## Características químicas de las benzodiazepinas

Todas las benzodiazepinas sintetizadas, con o sin uso terapéutico, tienen en común estar constituidas por un anillo bencénico, un anillo diazepínico de siete miembros que se unen al bencénico, un anillo arilo que se une al carbono 5 del anillo diazepínico y un anillo 1,4-benzodiazepínico con átomos de nitrógeno en las posiciones 1 y 4, su nombre genérico completo es 5-aril-1,4-benzodiazepinas (figura 1). Se han unido a las posiciones 1 y 2 anillos del tipo imidazol o triazol (figura 2) y sustituidos sus radicales con bromo, cloro o flúor entre otros, para cambiar sus propiedades y principalmente para aumentar o disminuir su actividad, e incluso para desarrollar una gama de agonistas

y antagonistas como la imidazobenzodiazepina, Ro15-1788 o flumazenil<sup>44</sup>.

La estructura química de algunas de las principales benzodiazepinas con efectos terapéuticos se encuentran representadas en la figura 3. La mayoría son compuestos incoloros, cristalinos, solubles en agua y alcohol. El diazepam es liposoluble, soluble en propilenglicol y en un disolvente especial de los laboratorios Roche, que está constituido por 40% de propilenglicol, 10% de alcohol etílico, 5% de benzoato de sodio y 1.5% de alcohol bencénico<sup>213</sup>. El clordiazepóxido es fotosensible e inestable en solución.

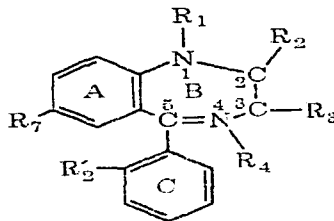


Figura 1. Estructura química de las benzodiazepinas A) anillo bencénico, B) anillo diazepina, C) anillo arilo. (Tomado de *Principles of Neuropsychopharmacology*: Feldman RS et al., Sinauer p 688, 1997).

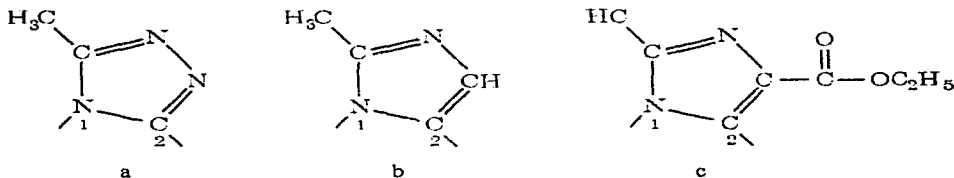


Figura 2. Anillos que se pueden unir al núcleo básico benzodiazepínico en las posiciones 1 y 2. a) anillo triazol, b y c) anillos imidazol. (Tomado de *Principles of Neuropsychopharmacology*: Feldman RS et al., Sinauer p 688, 1997).

### Benzodiazepinas y receptores GABA<sub>A</sub>\*

Las benzodiazepinas son tranquilizantes menores que tienen una gran importancia para los psicofarmacólogos teóricos y clínicos, por su efecto sedante, hipnótico, ansiolítico, anticonvulsivante y miorrelajante, cuyo mecanismo de acción primario involucra una modulación alostérica del complejo receptor GABA<sub>A</sub><sup>97</sup>.

\*GABA = ácido gamma-aminobutírico

El diazepam y el clordiazepóxido, son dos de las drogas psicotrópicas más conocidas y utilizadas, en las que se ha demostrado desde hace más de 20 años, que sus efectos guardan una relación muy importante con el GABA<sub>A</sub><sup>29,62</sup>.

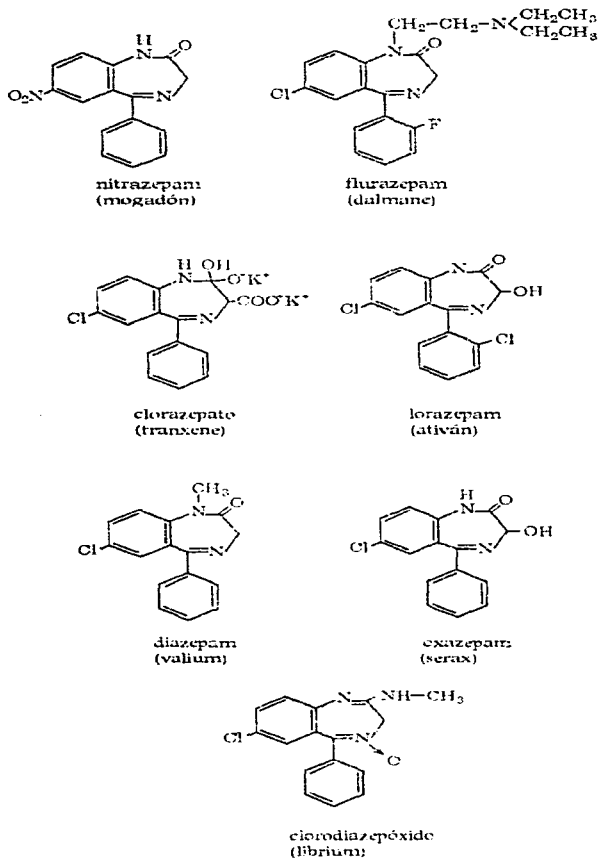


Figura 3. Fórmula química de siete de las principales benzodiazepinas con uso terapéutico. (Tomado de Principles of Neuropsychopharmacology. Feldman RS et al., Sinauer p 687, 1997).

La interacción del clordiazepóxido y el GABA se comprobó en cultivos de neuronas de embriones de pollo<sup>26</sup> y médula espinal de fetos de ratón<sup>96</sup>. En los dos tipos de cultivos se encontró que se potenciaba la respuesta postsináptica al GABA, pero no a la glicina. Las funciones mediadas por GABA, son potenciadas por las benzodiazepinas cuando la transmisión GABAérgica no se activa al máximo. Los efectos de estos fármacos dependen del aumento del estímulo del GABA que se produce cuando cruza la membrana celular a nivel postsináptico, en la que existe un complejo receptor de GABA, asociado a canales de  $Cl^-$ , que al abrirse y cerrarse de manera cíclica, permiten el paso de una corriente del ion, del exterior al interior de la célula o en sentido inverso<sup>126,12</sup>. Las benzodiazepinas aumentan la frecuencia de apertura de estos canales, aunque su acción es más compleja.

En 1977, Braestrup<sup>18</sup> por un lado y Squires<sup>197</sup> por otro, reportaron el descubrimiento de sitios de unión de benzodiazepinas en la corteza cerebral humana y en el cerebro de la rata. Poco después, en el mismo año Möhler y Okada<sup>140,141</sup> encontraron en membranas del cerebro de la rata sitios de gran afinidad al diazepam [ $H^3$ ], que tenían diferentes características de saturación y estereoespecificidad en cada región cortical estudiada. Los mayores niveles de unión se detectaron en la corteza cerebral y en el hipotálamo, seguidos por una unión ligeramente menor en el cerebelo, el mesencéfalo y el hipocampo. Los más bajos se localizan en el cuerpo estriado el puente y la médula espinal. Al hacer el fraccionamiento subcelular del cerebro, la mayor densidad de sitios de unión se localizó en los sinaptosomas, lo que es congruente si se toma en cuenta que en estos se encuentran los sitios receptores afines a los neurotransmisores. También se estableció una correlación positiva de 0.9, entre la capacidad que tienen las diferentes benzodiazepinas de desplazar al diazepam [ $H^3$ ] y su potencia farmacológica como relajante muscular, medida por una prueba diseñada para predecir la actividad ansiolítica y anticonvul-

sivante de una droga. La relación entre la afinidad de un ligando y la actividad conductual o fisiológica es crítica para comprobar que el sitio de unión que se investiga, actúa como mediador de las acciones relevantes de las drogas.

La alta densidad de receptores benzodiazepínicos en la corteza cerebral humana tiene una correlación positiva significativa entre la afinidad de los ligandos a benzodiazepinas y la potencia clínica, lo cual es útil para determinar la dosis diaria que se debe administrar. Estos hallazgos podrían establecer la proporción en la que están involucrados los receptores benzodiazepínicos, en la producción de los efectos clínicos de las drogas<sup>18</sup>.

Por la localización de este tipo de receptores en los tejidos del sistema nervioso central, se les dio el nombre de receptores benzodiazepínicos centrales y más adelante se identificaron sus principales características y propiedades<sup>196,65</sup>.

Cuando se agrega al medio de incubación un agonista de  $GABA_A$  aumenta la afinidad de los receptores de benzodiazepinas centrales por algunos de sus ligandos como el diazepam [ $H^3$ ]<sup>207,78</sup> y al flunitrazepam [ $H^3$ ]<sup>14</sup> medidos *in vivo*, este efecto puede ser producido por el GABA o por sus agonistas como el muscimol y antagonistas del  $GABA_A$  que compiten con éste, como la bicuculina, que lo bloquean.

Se sugirió que la modulación GABAérgica de estos receptores benzodiazepínicos podría ser mediada por un acoplamiento en sus sitios de unión de la membrana. Por homogeneizados de cerebro de ratas Sprague-Dowley se demostró la existencia de los receptores benzodiazepínicos centrales y de otros periféricos<sup>156</sup>. Más tarde se comprobó por técnicas inmunocitoquímicas y de autoradiografía, que la distribución de los receptores benzodiazepínicos y los de  $GABA_A$  tienen una correlación estrecha<sup>181</sup>.

Tallman y Gallager, en 1985 caracterizaron los receptores benzodiazepínicos en el

sistema GABAérgico, tanto desde el punto de vista molecular como de su configuración múltiple<sup>60</sup>.

El concepto de receptor agonista es el que estimula la función normal de un receptor cuando se unen a éste, lo que significa que tiene una eficiencia positiva para dicho receptor. En cambio el antagonista inhibe la influencia de un agonista al competir con éste por el sitio de unión, pero no tiene efecto en ausencia del agonista, por lo que se dice que tiene cero eficiencia. Un tercer tipo de interacción receptor-ligando es la de agonista inverso, que es un compuesto que interacciona con el receptor para producir efectos opuestos a los que produce un agonista típico, esto es, produce una eficiencia negativa. El primer agonista inverso se descubrió para un ligando en la entrada del canal del cloro a nivel del receptor benzodiazepínico del complejo receptor GABA<sub>A</sub><sup>44</sup>.

El diazepam y el clorodiazepóxido tienen eficiencia positiva, mientras que el flumazenil o Ro15-1788, una imidazepina, es un antagonista con poca eficiencia propia, que se usa en la clínica para contrarrestar los efectos de sobre-dosis de las benzodiazepinas y para acelerar la recuperación de los pacientes en los que se usaron estos fármacos antes de la anestesia<sup>62</sup>. Los primeros agonistas inversos que se descubrieron, fueron el metil-β-carbolina-3-carboxilato o β-CCM y el metil 1-6, 7-dimetoxi-4-etil-β-carbolina-

3-carboxilato o DMCM, que al administrarse solos producen ansiedad y convulsiones y bloquean la acción del flumazenil, lo que indica que actúan a nivel de los receptores benzodiazepínicos<sup>17,62</sup>. Por las investigaciones realizadas se considera que los agonistas benzodiazepínicos con eficiencia positiva y los inversos actúan sobre el receptor de GABA<sub>A</sub> por medio de una modulación alostérica para producir uno u otro efecto al potenciar la acción del GABA a nivel del receptor o produciendo un bloqueo de éste.

Por los estudios radiográficos con diazepam [<sup>3</sup>H] en las membranas de células del cerebro, se propuso que todos los receptores benzodiazepínicos eran iguales pero al investigar la afinidad de las benzodiazepinas en combinación con otras drogas, se caracterizaron dos subtipos de receptores benzodiazepínicos.

Los BZ<sub>1</sub>, que tienen una gran afinidad por las benzodiazepinas y las triazolopiridazinas, que son muy importantes en la determinación del efecto ansiolítico de las benzodiazepinas y los receptores BZ<sub>2</sub>, que presentan una gran afinidad por las benzodiazepinas, pero no por las triazolopiridazinas.

El subtipo BZ<sub>2</sub>, probablemente intervienen más en determinar la acción sedante e hipnótica de las benzodiazepinas, parece ser heterogéneo y tal vez está asociado estructuralmente con varias isoformas de una de las subunidades del receptor GABA<sub>A</sub><sup>92,40,178</sup>.

## Estructura del complejo receptor GABA<sub>A</sub>-benzodiazepínico central

Los receptores benzodiazepínicos centrales, forman parte de los complejos receptores GABA<sub>A</sub>, los cuales se localizan en las sinápsis GABAérgicas alrededor de los canales de Cl<sup>-</sup>, en donde el GABA, como neurotransmisor inhibitorio, produce un aumento de la conductancia del Cl<sup>-</sup> a través de la membrana, lo que induce una hiperpolarización de la neurona postsináptica<sup>64</sup>.

Los experimentos de permeabilidad fueron útiles para determinar que en el receptor GABA<sub>A</sub> existe un canal, que en condiciones normales conduce Cl<sup>-</sup> por un poro efectivo, con un diámetro aproximado de 0.5 nm.

El complejo receptor GABA<sub>A</sub> tiene cinco sitios efectivos para unir los ligandos que actúan sobre el canal de Cl<sup>-</sup>, los canales están

representados de manera esquemática en la figura 4<sup>188,189</sup> y son los siguientes:

El sitio receptor del GABA, sus agonistas y antagonistas (figura 4). El típico agonista es el muscimol, una sustancia tóxica, extraída del hongo venenoso *Amanita muscaria*, con efectos similares a los causados por drogas psicotrópicas como la dietilamida del ácido lisérgico o LSD. Probablemente su acción se debe a una inhibición de la liberación de la serotonina, que es mediada por el receptor GABA<sub>A</sub>. Otros agonistas son un análogo del muscimol, el 4,5,6,7-tetrahidroisoxazolo [5,4-C]pyridin-3-ol (THIP) y la isoguvacina. La bicuculina es un alcaloide antagonista competitivo del receptor GABA<sub>A</sub>, que se obtiene de la planta *Dicenta cucullaria*. La inhibición del GABA por la bicuculina se produce

principalmente sobre las neuronas de la corteza cerebral e induce potentes convulsiones, debido a la inhibición sináptica a nivel cerebral.

El sitio receptor de las benzodiazepinas, sus agonistas o depresores, sus antagonistas, agonistas inversos y probablemente, del alcohol etílico (figura 4).

El sitio receptor de esteroides, de anestésicos. Es probable que incluyan los de tipo volátil y algunos excitantes (figura 4).

El sitio receptor de barbitúricos depresores del sistema nervioso central, para otros fármacos no barbitúricos y tal vez otros excitantes (figura 4).

El sitio receptor de la picrotoxina, de otros convulsivantes y probablemente, de otros depresores del sistema nervioso central (figura 4).

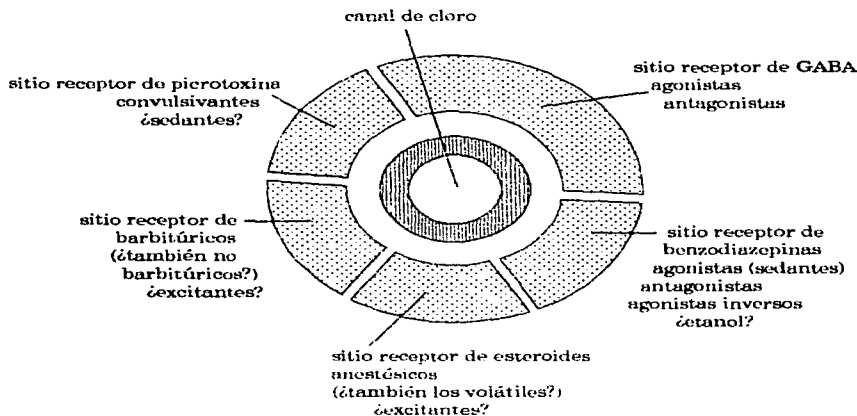


Figura 4. Modelo esquemático del complejo receptor GABA<sub>A</sub>, que se localiza alrededor de los canales de Cl<sup>-</sup>. El complejo tiene los cinco sitios de unión, uno para el GABA, uno para benzodiazepinas, uno para esteroides, el de los barbitúricos y el de la picrotoxina. (Tomado de Principles of Neuropsychopharmacology. Feldman RS et al.. Sinauer p 425, 1997).

Entre los convulsivantes que no actúan directamente en el sitio receptor de GABA<sub>A</sub>, se encuentra el pentilentertrazol o metrazol, utilizado como antidepresor en algunos padecimientos y para inducir convulsiones de manera experimental en animales. Otro es la picrotoxina, formada por la picrotina y el ingrediente activo o picrotoxinina, que se obtiene de las semillas del arbusto del este de la India, *Animirta cocculus*.

En la actualidad, tanto el musimol como la dihidropicrotoxinina marcadas con tritio y la t-butilciclofosforotionato [S<sup>35</sup>] o TBPS, se han utilizado como marcadores de los receptores GABA<sub>A</sub> en los estudios encaminados a determinar su estructura y sus funciones.

Al igual que las benzodiazepinas, los barbitúricos son sedantes, hipnóticos, ansiolíticos y anticonvulsivantes, los cuales potencian la transmisión GABAérgica por medio de receptores GABA<sub>A</sub>, al permitir la apertura de los canales de Cl<sup>-</sup> cuando actúan en el sitio receptor de barbitúricos<sup>150,97</sup>. Existe un coeficiente de correlación de 0.95 en los estudios de potenciación de la unión del diazepam [H<sup>3</sup>] por barbitúricos, lo que mejora su acción anestésica<sup>91</sup>.

En los 80's se describió que algunos esteroides y sus metabolitos producen efectos sedantes, hipnóticos y anestésicos cuando se administran sistemáticamente, debido a que modulan la actividad del complejo receptor GABA<sub>A</sub><sup>157,89</sup>. Los metabolitos de mayor interés son la 3α-hidroxi-dihidroprogesterona o 3α-OH-DHP y la 3α,21 dihidroxi-5α-pregnan-20-ona o THDOC, los cuales mejoran la unión de las benzodiazepinas [H<sup>3</sup>] al sitio receptor de las benzodiazepinas del receptor GABA<sub>A</sub>, e inhiben la unión del TBPS [S<sup>35</sup>] del sitio convulsivante. Favorecen la acción sináptica del GABA a nivel del hipocampo y la médula espinal, por el paso de Cl a nivel de los sinaptosomas. Otros esteroides como la dehidroepiandrosterona o el éster sulfatado de la pregnenolona, por el contrario tienen efecto convulsivante y excitante<sup>157</sup>. Es probable que

algunos esteroides y sus metabolitos sean moduladores endógenos del complejo receptor GABA<sub>A</sub>.

En ratas sometidas a estrés por natación, aumentan las concentraciones cerebrales de 3α-OH-DHP y de THDOC, que mejoran las funciones mediadas por los receptores GABA<sub>A</sub>, en cambio, la extirpación quirúrgica de las glándulas endocrinas no elimina la 3α-OH-DHP, pero sí la de la THDOC, lo que parece confirmar que las células gliales sintetizan la 3α-OH-DHP *de novo*, a partir de colesterol<sup>157,170</sup> y modula en forma de neuroesteroide, la actividad de las neuronas GABAérgicas, a nivel de sus receptores. Es posible que estos receptores tengan ligandos endógenos que forman una familia de péptidos, entre los que se encuentra el inhibidor de la unión del diazepam o DBI y un pequeño fragmento del mismo, llamado triacontatetraneuropéptido o TTN.

El etanol también produce un efecto sedante e hipnótico, debido a que a nivel del sitio receptor benzodiazepínico del complejo receptor GABA<sub>A</sub> incrementa la corriente de Cl<sup>-</sup> y por lo tanto, la inhibición sináptica<sup>154,155</sup>. El etanol aumenta la respuesta celular al GABA cuando se aplica a la neocorteza, el septum medial, los colículos inferiores, en la parte reticulada de la sustancia negra, el pallidum ventral, la banda diagonal de Broca, el cerebelo y la médula espinal, pero no provoca un aumento en el hipocampo ni en la parte ventral del tegmento<sup>153,32,195</sup>. Las diferencias en la respuesta se pueden atribuir a variaciones estructurales en el complejo receptor GABA<sub>A</sub>.

Por técnicas bioquímicas y de biología molecular se ha logrado analizar la estructura del complejo receptor GABA<sub>A</sub> y se han identificado cuatro familias de subunidades receptoras con varias isoformas:

- La α, con cuatro isoformas.
- La β, con cuatro isoformas.
- La γ, con tres isoformas.
- La δ, con una isoforma.

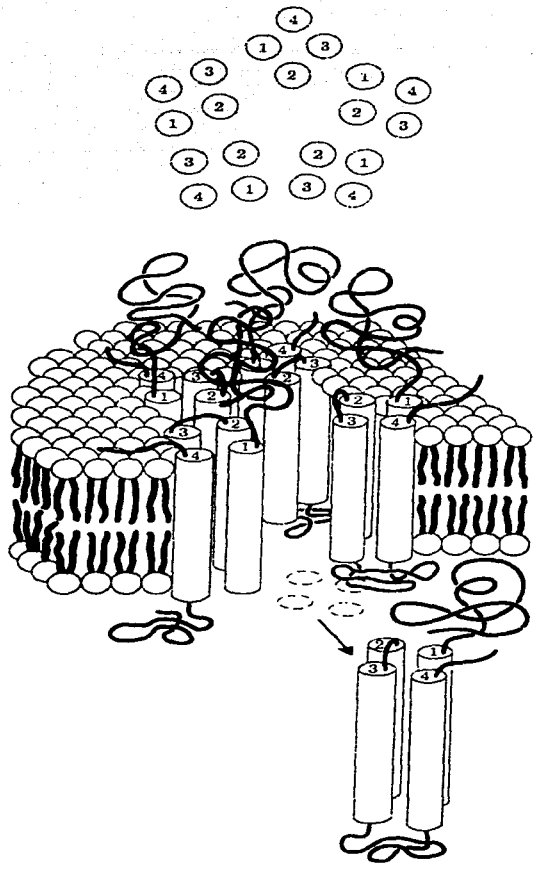


Figura 5. Estructura del complejo receptor GABA<sub>A</sub> insertado en la bicapa lipídica de la membrana neuronal, con sus cinco sitios receptores formado por cuatro dominios transmembranales que forman la pared del canal de Cl<sup>-</sup>. (Tomado de Principles of Neuropsychopharmacology. Feldman RS et al., Sinauer p 432, 1997).



Al purificar el receptor se le encontró una simetría pentamérica en la que cada una de las cinco subunidades asociadas al canal de Cl<sup>-</sup> constituyen los cinco sitios receptores descritos y representados de manera hipotética en las figuras 4 y 5. La proteína receptora es glicosilada y tiene un peso aproximado de 275 kDa<sup>145</sup>. El receptor GABA<sub>A</sub> presenta una gran heterogeneidad con respecto a las propiedades del canal iónico y a su modulación por las drogas. De esta manera, algunos no tienen el sitio receptor de las benzodiazepinas, y por lo tanto, no responden a éstas<sup>58</sup>. En cambio otras han perdido la sensibilidad al etanol<sup>22</sup>.

Se sugirió que la sensibilidad al GABA de los canales iónicos dependía solamente de uno de los tipos de subunidades del receptor, ya fueran las  $\alpha$ , las  $\beta$  o las  $\gamma$  y la respuesta de estos receptores homoméricos podrían ser bloqueados por bicuculina o picrotoxina y

potenciados por barbitúricos<sup>11,158,185</sup>. Sin embargo, en la actualidad se sabe que todos o por lo menos la mayoría de los receptores nativos son heteroméricos y tienen dos subunidades  $\alpha$ , una  $\beta$  y dos  $\gamma$ , estas últimas pueden ser sustituidas por una o dos subunidades  $\delta$ . La variabilidad de las subunidades de los receptores se podrían dar en diferentes tipos de células. Se ha calculado que la combinación de las subunidades podrían formar, en teoría, aproximadamente 850 tipos de receptores, con numerosas isoformas, aunque es probable que los naturales sean menos, debido a la preferencia en la combinación de las subunidades en algunas regiones o poblaciones celulares<sup>150</sup>. La combinación de las subunidades, la localización y su abundancia en el cerebro de la rata pueden observarse en la tabla 1.

Tabla 1. Localización de las subunidades del receptor GABA<sub>A</sub>, en el cerebro de rata

Combinación subunidades	Abundancia relativa 100%	Localización sin tomar subtipos muy específicos y poco frecuentes
$\alpha 1\beta 2\gamma 2$	43	En la mayoría de las áreas cerebrales y en tipos celulares específicos como los hipocámpales, las interneuronas corticales y las de Purkinje
$\alpha 2\beta 2/3\gamma 2$	18	Células piramidales del hipocampo y motoneuronas de la médula espinal
$\alpha 3\beta \chi\gamma 2/\gamma 3$	17	Neuronas colinérgicas y monoaminérgicas
$\alpha 2\beta \chi\gamma 2$	8	Estructuras del sistema límbico y glia radiada (de Bergmann) del cerebelo
$\alpha 5\beta 3\gamma 2/\gamma 3$	4	Principalmente en las neuronas piramidales del hipocampo
$\alpha 6\beta \gamma 2$	2	Gránulos del cerebelo
$\alpha 6\beta \delta$	2	Gránulos del cerebelo
$\alpha 4\beta \delta$	3	Tálamo y giro dentado del hipocampo
Otros subtipos menores	3	Distribución variable

(Tomado de Principles of Neuropsychopharmacology, Feldman RS et al., Sinauer p 433, 1997).

En el cerebro de la rata, la combinación más frecuente es  $\alpha 1\beta 2\gamma 2$ , en una proporción de dos  $\alpha 1$ , una  $\beta 2$  y dos  $\gamma 2$ . Las subunidades  $\gamma 1$  son poco frecuentes en los receptores GABA<sub>A</sub> nativos. La subunidad  $\alpha 6$  sólo se ha encontrado en los granos de la corteza cerebelar<sup>91</sup>.

La selectividad de los receptores GABA<sub>A</sub> a benzodiazepinas y compuestos relacionados, se puede deber a subunidades específicas. La alta afinidad de la unión a benzodiazepinas y su selectividad funcional a este grupo de drogas, se asocia con la presencia de subunidades  $\gamma$  en el receptor, en especial las  $\gamma 2$  con las  $\alpha$  y las  $\beta$ <sup>158</sup>.

La farmacología de los receptores benzodiazepínicos centrales depende principalmente de la combinación de las subunidades  $\alpha$  y  $\gamma$ . La expresión simultánea de las subunidades  $\alpha 4$  y

$\alpha 6$  (tabla 1), con las  $\gamma 2$  se produce en algunas neuronas talámicas y en las células granulosas de la corteza cerebral que tienen un nuevo receptor benzodiazepínico muy sensible al Ro15-4513, un agonista inverso parcial con baja sensibilidad al diazepam y a otros agonistas benzodiazepínicos típicos<sup>93</sup>.

Los receptores benzodiazepínicos sensibles a diazepam, que contienen subunidades  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$ , o  $\alpha 5$ , se han subdividido en dos subgrupos, de acuerdo a su sensibilidad al sedante e hipnótico imidazopiridina o zoldipem y su afinidad por el CL218,872. Muchos de los receptores sensibles a zoldipem corresponden a subtipos farmacológicamente definidos como BZ<sub>1</sub> y BZ<sub>2</sub>. Los otros subtipos tienen características farmacológicas atípicas y una distribución cerebral muy específica (figura 6).

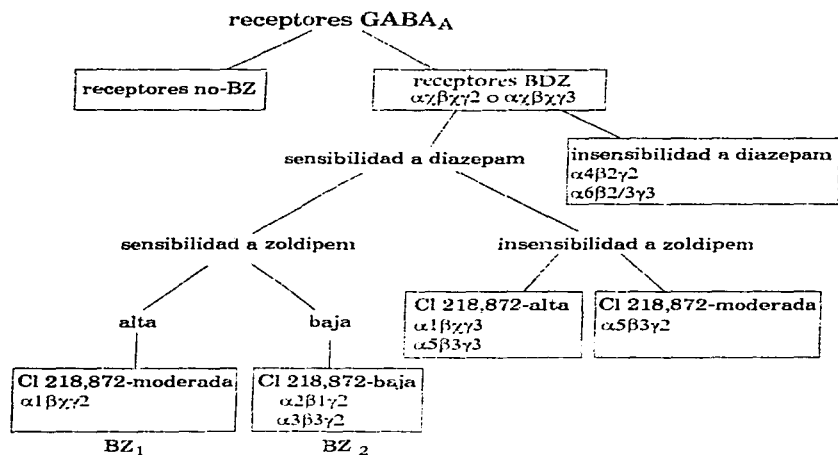


Figura 6. Composición propuesta para las subunidades del complejo receptor GABA<sub>A</sub> de acuerdo a su sensibilidad o no a benzodiazepinas y a zoldipem que las subdivide en los subtipos BZ<sub>1</sub> y BZ<sub>2</sub>. (Tomado de Principles of Neuropsychopharmacology, Feldman RS et al., Sinauer p 433, 1997).

Los receptores GABA<sub>A</sub> sensibles a etanol, prácticamente tienen la misma localización en el cerebro que los benzodiazepínicos muy sensibles a zoldipem o BZ, expresan de manera preferencial las subunidades  $\alpha 1$ ,  $\beta 2$  y  $\gamma 2$ , y es probable que el receptor sea sensible, tanto a etanol, como a benzodiazepinas<sup>32</sup>.

Por localización directa de los sitios de mutagénesis y por estudios de afinidad por marcadores, se han identificado los sitios de unión de las benzodiazepinas y el GABA del

complejo receptor GABA<sub>A</sub>, los cuales expresan las subunidades  $\alpha 1$ ,  $\beta 2$  y  $\gamma 2$ . Parece ser que los residuos de aminoácidos de las subunidades  $\alpha 1$  y  $\beta 2$ , son necesarios para la activación normal del receptor GABA, en cambio, los receptores benzodiazepínicos son modulados por regiones  $\alpha 1$  y  $\gamma 2$ , por lo que la subunidad que comparten es la  $\alpha 1$  (figura 7)<sup>194,193</sup>.

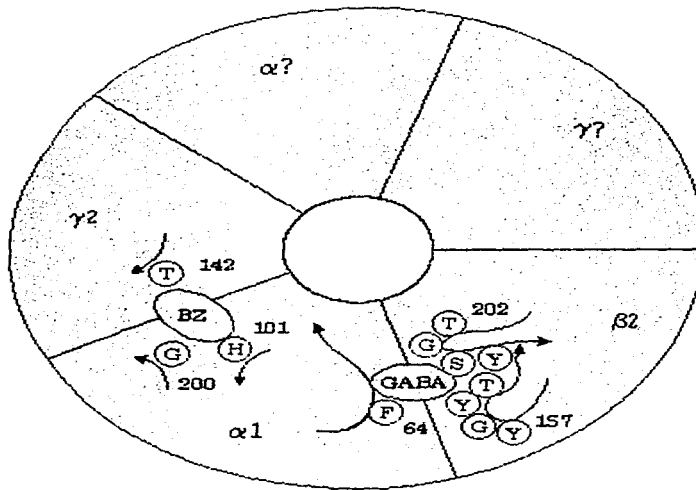


Figura 7. Subunidades que comparten los sitios receptores benzodiazepínicos con el de GABA y con el de esteroides. Las flechas indican la dirección de las cadenas polipeptídicas de cada subunidad. Los aminoácidos son la treonina (T), la glicina (G), la histidina (H), la fenilalanina (F), la serina (S) y la tirosina (Y). El número adjunto a los aminoácidos indican su posición en la secuencia de los polipéptidos. (Tomado de *Principles of Neuropsychopharmacology*, Feldman RS et al., Sinauer p 434, 1997).

Existen dos tipos de subunidades  $\gamma 2$ , que son sintetizados por un ARNm que difiere en cuanto a la presencia o ausencia de 24 nucleótidos que codifican para ocho aminoácidos localizados en el asa intracelular entre los dominios transmembranales tercero y cuarto. La  $\gamma 2S$ , que carece de estos nucleótidos y la  $\gamma 2L$  que los tiene<sup>220</sup>. La función receptora del GABA<sub>A</sub> a etanol mejora en presencia de  $\gamma 2L$ , pero no con la  $\gamma 2S$ <sup>214</sup>.

La subunidad  $\beta$  del receptor GABA<sub>A</sub> tiene sitios que son fosforilados por AMP<sub>C</sub> dependiente de proteína cinasa y por proteína cinasa

C o PKC, ésta última también se localiza, en  $\gamma 2L$ . En ambos casos, las subunidades para la fosforilación se asocian con la reducción en la amplitud del receptor activado por corrientes<sup>142,84</sup>. La fosforilación mediada por segundos mensajeros, aparentemente es muy importante en la regulación *in vivo* de la función del receptor GABA<sub>A</sub>. Es probable que la presencia de los sitios de fosforilación PKC en  $\gamma 2L$ , sean determinantes para que el receptor sea sensible a etanol<sup>144</sup>.

## Receptores GABA<sub>B</sub> centrales

Otro tipo de receptores localizados en el sistema nervioso central son los GABA<sub>B</sub>, que se identificaron cuando se descubrió que el GABA presináptico podía inhibir la liberación de otros neurotransmisores y que la respuesta no era bloqueada por bicuculina, pero sí por el baclofén o (-)- $\beta$ -p-clorofenil GABA que es poco potente en los sitios en los que abundan los receptores GABA<sub>A</sub> sensible a la bicuculina<sup>69,15</sup>.

Por métodos autorradiográficos se demostró que la distribución de ambos tipos de receptores es distinta en el cerebro y que los GABA<sub>B</sub> tienen una concentración mayor en la capa molecular del cerebelo, en las capas I-III de la corteza cerebral, en los colículos superiores y en el núcleo interpeduncular<sup>25,27</sup>. Con respecto a su localización celular es pre y post-sináptica.

Desde el punto de vista farmacológico, el baclofén se ha usado como relajante muscular y antiespasmódico, y al igual que el baclofén, el ácido 3-aminopropilfosfínico o 3-APPA es un agonista del GABA<sub>B</sub><sup>225</sup>. Los agonistas del GABA<sub>B</sub> son una familia de compuestos, formada por el baclofén y el hidroxibaclofén, que tienen poco efecto *in vivo*, debido a su dificultad para atravesar la barrera hematoencefálica y el CGP 35348, un derivado del 3-APPA, que antagoniza la respuesta

electrofisiológica de la aplicación sistémica del baclofén<sup>149,10</sup>.

El receptor GABA<sub>B</sub> no ha sido clonado, pero se tiene evidencia de que funciona por la activación de una o más proteínas G, por lo cual pertenece a la superfamilia de receptores acoplados a la proteína G. Se han logrado identificar algunos receptores relativamente insensibles a baclofén y otros con sensibilidad a baclofén y a CGP-35348, pero todos responden a 3-APPA. Su heterogenicidad se podrá demostrar al clonar sus genes<sup>19</sup>.

Se sabe que, el receptor GABA<sub>B</sub>, al menos activa cuatro mecanismos efectores, que son: la inhibición de la adenilciclasa; la estimulación de la fosfolipasa A<sub>2</sub>, que potencia la formación de AMPc de otros sistemas de receptores; el incremento de la conductancia de K<sup>+</sup> en la membrana celular, probablemente por la activación de canales de K<sup>+</sup>, y la inhibición de la conductancia de Ca<sup>2+</sup> voltaje-dependiente<sup>225</sup>. También estimulan la liberación de corticotropina y de la hormona luteinizante<sup>15</sup>.

Todas estas respuestas aparentemente son mediadas por el acoplamiento a una toxina pertussis sensible a una o varias proteínas G. La activación de los canales de K<sup>+</sup> por receptores GABA<sub>B</sub>, se ha detectado cuando se produce una hiperpolarización lenta, inducida por GABA de

las neuronas piramidales de las áreas hipocámpicas CA1 y CA3 y de las neuronas talamocorticales, de las del núcleo del rafe dorsal y de las astas posteriores de la médula espinal. Las neuronas talamocorticales disparan por un mecanismo complejo en el que se activan los receptores GABA<sub>B</sub> por medio de un potencial inhibitorio postsináptico, lo que es importante en la actividad oscilatoria de estas neuronas, que se presenta durante el sueño de ondas lentas<sup>32</sup>.

La activación de los receptores GABA<sub>B</sub> inhibe la liberación de neurotransmisores a nivel presináptico en el sistema nervioso central y periférico, lo que trae como consecuencia la reducción de los estímulos evocados de potenciales postsinápticos como las del hipocampo<sup>15,140</sup>. También el diazepam y el Ro5-4864 reduce la duración de los potenciales de acción en los cultivos de neuronas de los ganglios espinales, fenómeno que ha sido considerado

## Receptores GABA<sub>C</sub>

Existen evidencia de que en algunas neuronas, la acción del GABA es mediada por un tercer tipo de receptores GABA<sub>C</sub>, ya que el ácido cis-4-aminocrotónico, análogo al GABA, relativamente agonista selectivo, inhibe la respuesta de neuronas insensibles a bicuculina y a baclofén<sup>76</sup>. Estos receptores también son activados por el muscimol, un agonista no selectivo del GABA y su desensibilización es más lenta<sup>13</sup>. Aparentemente no son modulados por benzodiazepinas, barbitúricos o neuroesteroides.

## Receptores benzodiazepínicos periféricos

Otro tipo de receptores benzodiazepínicos son los periféricos (RBZDP), que recibieron este nombre por haberse encontrado además del sistema nervioso central<sup>101</sup> en tejidos que no son parte de éste, como el riñón<sup>182</sup>, en donde se descubrieron. Más adelante se localizaron en las glándulas suprarrenales y en los testículos<sup>8</sup> y se caracterizaron en el sistema nervioso central, en

como un modelo de inhibición presináptica, porque los mismos receptores se han encontrado en los axones terminales de las neuronas de los ganglios espinales, que en la médula espinal. Los receptores presinápticos GABA<sub>B</sub> de los ganglios espinales no influyen sobre la corriente de K<sup>+</sup>, pero inhiben la entrada de Ca<sup>2+</sup> en sus células<sup>146,223</sup>.

El diazepam y el flunitrazepam, a concentraciones 10<sup>-6</sup>M inhiben las contracciones del músculo liso y del cardíaco, inducidas por K<sup>+</sup> y Ca<sup>2+</sup>. Las concentraciones micromolares de diazepam inhiben la despolarización inducida por la captación de Ca<sup>2+</sup> a nivel de los sinaptonemas y la inducida por la liberación de dopamina en el cuerpo estriado, medida *in vitro*. El diazepam y el midazolam inhiben el potencial de acción mediados por Ca<sup>2+</sup> de las neuronas del plexo miéntérico<sup>160</sup>.

Es probable que tengan un canal de Cl, que es inhibido por la picrotoxina o el TBPS. Se les ha encontrado subunidades distintas, llamadas ρ1 y ρ2 detectadas en las células bipolares de la retina, las cuales responden a los receptores GABA<sub>A</sub> y GABA<sub>C</sub>. La subunidad ρ2 se ha encontrado en algunas poblaciones celulares del cerebro, lo mismo que varias formas homooligoméricas de los receptores GABA<sub>C</sub>. Las subunidades ρ1, no se han identificado en el cerebro<sup>13</sup>.

particular en la glía y en algunas neuronas corticales.

A diferencia de los receptores BZ<sub>1</sub> y BZ<sub>2</sub>, que están asociados a los receptores de GABA<sub>A</sub> y son receptores benzodiazepínicos centrales, los periféricos, no forman parte del receptor GABA<sub>A</sub> y su estructura es diferente<sup>8</sup>. Se unen de manera selectiva a una isoquinoleína llamada

PK11195, lo que ha sido útil para identificar a este tipo de RBZDP<sup>8,6</sup>, que están localizados en la membrana externa de las mitocondrias.

En particular, en los ovarios, en los testículos y en las glándulas suprarrenales intervienen en el transporte del colesterol de la membrana externa de las mitocondrias hacia la interna, por lo que es probable que intervengan en la regulación de la síntesis de hormonas esteroides<sup>50,43,42,16,7,27</sup>.

En el encéfalo, los RBZDP mitocondriales, probablemente participan en la síntesis de los neuroesteroides que están involucrados en diferentes funciones cerebrales, entre las que se encuentran las relacionadas con la conducta<sup>38,49,154</sup>.

Se ha propuesto que los esteroides producidos en la glía, en especial la pregnenolona, una vez transformada en la 3 $\alpha$ -hidroxiprogesterona o sulfato de pregnenolona, actúe sobre el sitio receptor de esteroides, del complejo receptor GABA<sub>A</sub> de las neuronas y abre los canales de Cl a nivel postsináptico para que entre este ion y se hiperpolaricen, cumpliendo con esto una función como neuroesteroide. Los probables ligandos endógenos de los RBZDP, son una familia de péptidos que incluyen un inhibidor de la unión del diazepam o DBI y un fragmento del mismo (DBI<sub>17,50</sub>) llamado triacontatetraneuropéptido o TTN<sup>102,168,70,98,135,167,21</sup>.

Anholt<sup>4</sup>, demostró que los RBZDP, sólo se encuentran en los mamíferos, aun cuando son de aparición ontogénica más temprana que los centrales, ya que se pueden identificar en el cerebro de la rata desde la etapa prenatal, mientras que las centrales aparecen en etapa perinatal y aumentan después del nacimiento.

## Mecanismos de acción de las benzodiazepinas

Las benzodiazepinas, y en particular el diazepam tienen efectos significativos sobre el sistema límbico, al cual deprime por facilitación de la

La localización de los RBZDP se ha podido hacer por autorradiografía, tanto con el PK11195[H<sup>3</sup>], como utilizando un derivado del diazepam el Ro5-4864[H<sup>3</sup>] que tiene una afinidad nanomolar por estos RBZDP<sup>101</sup>. Se detectaron en la rata, en el ratón y en el cuyo, en una distribución distinta a la de los centrales. En orden decreciente se ha encontrado una densidad relativa al 100% de las glándulas suprarrenales, en el epitelio nasal (83%), en las glándulas salivales (73%), en el pulmón (71%), en los conductos deferentes, el riñón y el corazón (40%), en los testículos (33%), en el bazo (29%), en la lengua (17%), en el hígado (12%), en la pituitaria (7%), en el páncreas (4%), en el intestino delgado (1%) y en el músculo esquelético (0.8%). En el cerebro (2.5%) sin tomar en cuenta los bulbos olfatorios, en donde la densidad es de 21%, en el tálamo y en el hipotálamo (5.7%), en el hipocampo, el cerebelo y el mesencéfalo (4%), en la corteza cerebral (3.4%) y en el cuerpo estriado (2.4%). Por los datos anteriores es evidente que la proporción de RBZDP es menor en los tejidos del sistema nervioso central que en las glándulas endocrinas, lo que confirma su participación en funciones neuroendocrinas<sup>50,42</sup> y en la modulación del metabolismo intermedio<sup>4</sup>.

Estos receptores se asocian a canales de K<sup>+</sup> y de Ca<sup>2+</sup> y a complejos transmembranales que constituyen los canales aniónicos dependientes de voltaje y a los de Ca<sup>2+</sup> dependiendo del voltaje. El poro tiene una apertura de 15 nm y su configuración probablemente es como la de los receptores GABA<sub>B</sub><sup>204,24</sup>.

Se han encontrado una serie de efectos de las benzodiazepinas mediados por RBZDP con respecto a crecimiento y diferenciación de distintos tipos de tejidos<sup>217,5,4,169,213</sup>.

transmisión GABAérgica mediada por los receptores benzodiazepínicos centrales, que como ya se describieron, forman parte de complejos

receptores GABA-BZ-iónóforo de  $\text{Cl}^{-}$ <sup>5,147,187,186</sup>. Este ionóforo de  $\text{Cl}^{-}$  es una molécula hidrofóbica empotrada en la bicapa lipídica de la membrana celular, que permite la entrada del ion en la célula, con lo que se produce la excitación de las neuronas, por hiperpolarización postsináptica, debida a que actúan a nivel de los receptores GABA<sub>A</sub> para aumentar su afinidad por el GABA<sup>34</sup>. Un hecho importante es que las benzodiazepinas ejercen parte de su actividad regulando la movilización de  $\text{Ca}^{2+}$  a nivel de canales de  $\text{Ca}^{2+}$  dependientes de voltaje, que se asocian, tanto a los receptores benzodiazepínicos centrales, como los RBZDP. Lo que es muy importante en la determinación de los efectos farmacológicos de éstos fármacos. A concentraciones micromolares las benzodiazepinas inhiben la despolarización inducida por la salida de  $\text{Ca}^{2+}$  hacia los sinaptosomas. El diazepam y el Ro5-4864 reducen el potencial de acción dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$  en las neuronas de los ganglios espinales en cultivo<sup>160</sup>.

Los receptores benzodiazepínicos centrales se han localizado, tanto en el cerebro humano, como en el de rata, a nivel de las membranas sinápticas de las neuronas de la corteza cerebral, el hipotálamo, el cerebelo, el mesencéfalo, el hipocampo, el cuerpo estriado, la médula oblongada y la médula espinal. Su ubicación explica sus efectos ansiolíticos, tranquilizantes, sedantes, hipnóticos, anticonvulsivantes y miorelajantes<sup>140,197,118,206,50,14,205</sup>.

Uno de los péptidos que parece ser un ligando para el receptor benzodiazepínico y

### Acciones fisiológicas de las benzodiazepinas y principales usos

Actúan sobre el sistema nervioso central, en particular a nivel del sistema límbico, sobre el que ejercen un efecto inhibitorio, que se traduce en su acción ansiolítica, sedante, hipnótica, anticonvulsivante y miorelajante, que ha traído por consecuencia su empleo en una gran variedad de padecimientos, como los trastornos emocionales, que se caracterizan por la

para el receptor de GABA es una proteína de peso molecular de 16,000, con el 90% de sus aminoácidos similares a los de un tipo de mielina del cerebro de rata, que por estas propiedades recibe el nombre de GABA-modulina, y otra proteína de peso de 11,000, que es inhibidora competitiva de los receptores benzodiazepínicos. Ambas parecen ser precursoras de moléculas más pequeñas, cotransmisoras con el GABA, junto con las  $\beta$ -carbolinas formadas por ciclización de l-triptofano, que probablemente son parte de ligandos benzodiazepínicos endógenos<sup>205</sup>.

La administración crónica, de benzodiazepinas, y en especial el diazepam produce tolerancia y reduce la respuesta en cuanto a sus efectos sedante, hipnótico, anticonvulsivante e incluso ansiolíticos, en el hombre y en animales<sup>70,85,166</sup>. También causa dependencia física, en los animales de laboratorio como la rata y el perro<sup>131,132</sup> y en el hombre<sup>174</sup>. Otro efecto secundario al uso crónico es el síndrome de abstinencia, demostrado clínica y experimentalmente<sup>72,166,193,118</sup>.

El síndrome de abstinencia provocado por supresión del uso crónico de dosis elevadas de benzodiazepinas, se caracteriza por la presencia de manifestaciones clínicas, entre las que se encuentran la agitación, el insomnio, la depresión, la reaparición o exacerbación de trastornos mentales, pérdida del apetito y en algunos casos se presentan convulsiones e intento de suicidio<sup>69</sup>.

presencia de ansiedad, tensión, excitación, irritabilidad, insomnio, estados represivos e hipocondríacos y en casos de neurosis, trastornos psicológicos. También se utilizan como premedicación e inducción a la anestesia, prácticamente para cualquier tipo de procedimiento quirúrgico<sup>27</sup>.

Por su acción miorrelajante se emplea para reducir la espasticidad de los músculos generada por alteraciones del sistema nervioso central como la epilepsia, lo mismo que las contracturas musculares provocadas por traumatismo y por problemas del sistema nervioso periférico como las lumbalgias, problemas de compresión radicular a nivel cervical o contractura causadas por reumatismo o tétanos<sup>71</sup>.

El clordiazepóxido, el diazepam, el oxazepam, el nitrazepam y el medazepam, en el electroencefalograma inducen el predominio de las ondas de 14 a 24 Hz<sup>66</sup>.

La eliminación de las convulsiones, se debe a que el clordiazepóxido, el diazepam y el nitrazepam inhiben las postdescargas a nivel del hipocampo y del septum, al mismo tiempo inhiben el despertar, al actuar sobre el hipocampo y la amígdala. En particular, el diazepam también inhibe postdescargas a nivel de la corteza, por lo que se utiliza en el pequeño mal<sup>66</sup>.

El clordiazepóxido, el diazepam y el nitrazepam producen una acción miorrelajante al deprimir las fibras espinales y al ejercer

una acción primaria sobre la formación reticular del tallo cerebral<sup>66</sup>.

En la tabla 2 están resumidas las principales características farmacocinéticas de las benzodiazepinas más utilizadas<sup>44</sup>.

En padecimientos en los que la ansiedad provoca trastornos como la hiperquinesia, alteraciones gastrointestinales y neurodermatitis son útiles las benzodiazepinas, lo mismo que en personas que desarrollan úlcera gástrica o duodenal y colon irritable causados por tensión emocional; en asma, angina de pecho y otros trastornos psicósomáticos. También se utiliza con éxito en pacientes sometidos a tratamientos dentales que generan ansiedad y miedo, lo mismo que en el cáncer o algunos trastornos cardiovasculares. Otra aplicación es en esclerosis múltiples, hemiplegias, paraplegias y en fracturas o traumatismos múltiples<sup>44</sup>.

Las benzodiazepinas se emplean en ginecoobstetricia en casos de eclampsia, preeclampsia, amenaza de aborto, placenta previa, actividad prematura del útero, padecimientos psiquiátricos durante el embarazo y en el trabajo de parto.

### **Reacciones secundarias y adversas de las benzodiazepinas**

En general, las benzodiazepinas deprimen al sistema nervioso central, y pueden producir confusión, apatía, somnolencia, mareo, náusea, vómito, debilidad muscular incoordinación de los movimientos, lo que incluye problemas locomotores; disartria, visión borrosa, diplopia, vértigo, ataxia y depresión respiratoria. La ingestión de alcohol u otras sustancias que deprimen al sistema nervioso central, como

los barbitúricos y los antihistamínicos, pueden provocar una sedación excesiva y manifestaciones que son graves, de acuerdo a la suma de los efectos, por esta razón no es conveniente utilizarlos. Si los pacientes están sometidos a tratamiento con este tipo de tranquilizantes, se recomienda que se abstengan de manejar instrumentos de precisión o automóviles para evitar accidentes<sup>71, 171</sup>.

### **Vías de administración, absorción, concentración sanguíneas y distribución de las benzodiazepinas**

La vía más frecuente de administración del diazepam y de la mayoría de las benzodiazepinas es la oral. Con rapidez pasan al torrente sanguíneo, por absorción intestinal, lo que

depende de la circulación sanguínea; de los gradientes de concentración y de la permeabilidad de las células. La absorción del diazepam es rápida, lo mismo que su llegada al sistema



nervioso central lo que ocurre en 5 minutos, debido a su gran liposolubilidad, en comparación con el clordiazepóxido y el lorazepam, que tienen una latencia de entrada en el sistema nervioso central, mayor<sup>71</sup>.

La vía endovenosa se utiliza relativamente poco y de hacerlo se debe aplicar con lentitud o disuelto en solución salina. Por estudios realizados en ratones machos adultos a los que se les aplicaron por vía endovenosa dosis únicas de diazepam [C<sup>14</sup>] de 3 mg/kg de peso corporal (12.3 microcuries/mg) o clordiazepóxido [C<sup>14</sup>] en dosis de 15 mg/kg de peso corporal (398 microcuries/mg), se demostró la presencia de los fármacos en los grandes vasos, en los músculos cervicales, en los riñones, en las glándulas suprarrenales y en el cerebro<sup>212</sup>.

Con respecto al diazepam, al minuto mostró afinidad por la sustancia gris de la corteza cerebral y cerebelar, la de los colículos y los núcleos talámicos y medulares, lo que sucedió a los 5 minutos con el clordiazepóxido. A los 30 minutos, el diazepam tenía una distribución heterogénea en el cerebro y en la médula y se localizó en la sustancia blanca del cuerpo calloso, la del mesencéfalo, el cerebelo y la médula espinal. A las 24 horas se localizó en el nervio óptico y en los nervios periféricos. Se encontró en tejidos ricos en lípidos y en especial en el adiposo<sup>212</sup>.

Cuando se administraron por vía intramuscular, la biodisponibilidad de las benzodiazepinas fue poco confiable, por lo que es poco recomendable su aplicación por esta vía<sup>71,171</sup>.

## Biotransformación de las benzodiazepinas

Las benzodiazepinas se biotransforman en el hígado, de manera similar en el humano, en la rata y el ratón. Los hepatocitos concentran el diazepam, en donde se desmetila y forma N-desmetildiazepam o nordiazepam, que es un metabolito con actividad farmacológica, éste se hidroxila a nivel del carbono 3, lo que lo transforma en hidroxidiazepam y después en el oxazepam y el temazepam, que conservan

Al administrar por vía oral el diazepam, en dosis de 10 a 30 mg, las concentraciones plasmáticas máximas varían entre 130 y 500 ng/ml dependiendo del tiempo (30 min a 4 horas posteriores a la aplicación). Por vía endovenosa, a los 15 minutos de la aplicación de 20 mg, se alcanzan concentraciones plasmáticas máximas de 1.6 a 7 mg/ml, en cambio al aplicar 20 mg por vía muscular se obtienen entre una hora y hora y media concentraciones con una variación de 35 a 290 ng/ml, que no son efectivas, pues al menos deben existir 400 ng/ml<sup>71</sup>.

El diazepam se une a proteínas plasmáticas en un 98 a 99%, lo que explica su velocidad de distribución tan rápida. Su vida media varía entre 20 y 96 horas, que es de 20 a 70 horas para el diazepam y de 36 a 96 horas para el N-desmetildiazepam, uno de sus principales metabolitos. Sin embargo, el diazepam puede durar hasta ocho días en el adulto joven y sano. Su vida media se prolonga en los ancianos y en las personas con daño hepático o renal. También se han encontrado variaciones en niños de tres a siete años de edad, en los que su vida media se acorta a 18 horas y en ocasiones produce excitación, en vez de sedación. En los recién nacidos de madres tratadas durante el embarazo se alarga su vida media, al igual que en los prematuros y en los lactantes, además de que en ellos se deposita en los tejidos, y permanecen en estos hasta por 10 días<sup>71</sup>.

acción terapéutica, el primero como ansiolítico con una vida media muy corta (5 a 15 horas) y el segundo como hipnótico, con una vida de 8 a 20 horas. Ambos metabolitos se conjugan con el ácido glucurónico y originan glucuronatos inactivos, que son eliminados en un 70% en la orina, 10% en las heces y en pequeñas concentraciones en la bilis, donde permanece por periodos de hasta dos semanas posteriores a

la administración del fármaco. También se excreta en la leche materna y se concentra en el líquido cerebrospinal. Por la inmadurez de los sistemas enzimáticos de los niños prematuros, los recién nacidos y los lactantes, el metabolismo es más lento, de manera que los metabolitos permanecen en los tejidos por periodos muy

largos y se eliminan en la orina durante 2 o 3 semanas posteriores al nacimiento. En la tabla 2 se encuentran las vías iniciales de biotransformación de las principales benzodiazepinas, la vida media en la sangre, tanto de los fármacos como la de sus principales metabolitos<sup>75,191,100,71,44</sup>.

### Benzodiazepinas endógenas

Quizá entre algunos de los hechos más sorprendentes con respecto a este grupo de fármacos, está la existencia de receptores benzodiazepínicos centrales, para una familia de compuestos sintetizados por el hombre, del que se ha podido demostrar su existencia en los peces, en los anfibios, en los reptiles, en las aves, y en los mamíferos, incluyendo el hombre, lo mismo que en el cerebro fetal, y por último la presencia de los de tipo periférico en los mamíferos<sup>4</sup>.

Con estos datos se investigaron las características de polipéptidos con una acción similar a las de las benzodiazepinas, que son sustancias endógenas del cerebro de los mamíferos, las cuales se unen a los receptores benzodiazepínicos y presentan una gran similitud con estos fármacos sintéticos<sup>177,160,55</sup>.

Más adelante se encontraron en proporciones menores en el riñón, el hígado, el bazo y el testículo. Las primeras sustancias se obtuvieron del cerebro de rata y se purificaron con el anticuerpo monoclonal mAb21-7F9, que es antibenzodiazepínico. Por inmunoreactividad cromatográfica se determinó que sus características químicas eran las del N-desmetildiazepam, un metabolito farmacológicamente activo del diazepam, del clorazepato y del prazepam. Los resultados fueron validados por medio del espectro de absorción y al compuesto se le llamó benzodiazepina endógena (BZDE). La aislada de la corteza cerebral y cerebelar de bovino tiene un espectro muy parecido al del N-desmetildiazepam, y al del diazepam. Por espectro de masa la BZDE se identifica al N-desmetildiazepam, el cual tiene prácticamente la misma afinidad por el mAb21-7FP, por el receptor

benzodiazepínico central que es potenciada por el GABA, e inhibe la unión del flunitrazepam [ $H^3$ ] a éste, pero no inhibe la unión del Ro5-4864 [ $H^3$ ] a los receptores benzodiazepínicos periféricos.

Teniendo en cuenta los datos anteriores, De Blas<sup>37</sup> comprobó que el N-desmetildiazepam era una BZDE, al encontrar que era idéntica su inmunoreactividad celular y su distribución en el cerebro de rata recién sacrificada, con respecto a la presente en los cortes de cerebelo de un niño y cuatro adultos, que permanecieron incluidos en parafina, desde 1940, 15 años antes de ser sintetizado el clorodiazepóxido y 20 años antes de que se comercializara. La inmunoreactividad se pudo bloquear con diazepam, flunitrazepam y Ro5-4864, pero no se logró inhibir con el Ro15-1788 o  $\beta$ -carbolina. Asimismo, por métodos que no requieren anticuerpos, se detectó el N-desmetildiazepam en el suero de investigadores que nunca habían tomado benzodiazepinas, lo que confirma su origen endógeno y no químico.

Se propuso que pudieran ser sintetizadas por microorganismos o plantas que ingiere el hombre, lo que explicaría la presencia en los cerebelos almacenados desde 1940. De la leche en polvo y en la fresca se aislaron sustancias con una afinidad por el mAb-27F9, semejante a la del diazepam<sup>133</sup>.

En el cerebro y en las glándulas suprarrenales de conejo se encontró diazepam y N-desmetildiazepam, que se propuso podrían derivar de plantas<sup>221</sup>. En la corteza cerebral y en la cerebelar, la hipófisis y las glándulas

suprarrenales de rata criadas en un ambiente convencional y en uno libre de patógenos, se detectaron las mismas sustancias en concentraciones capaces de inhibir la unión del Ro15-1788 a los receptores benzodiazepínicos de las membranas cerebrales<sup>210</sup>. Sustancias con la misma capacidad de inhibir la unión a benzodiazepinas, se obtuvieron del contenido intestinal y gástrico de ratas libres de patógenos. El diazepam y el N-desmetildiazepam también se detectaron en plantas que son ingeridas por el hombre como el trigo, la soya, el maíz y la papa; en los cereales utilizados en la elaboración del alimento de ratas, en la harina de pescado, lo mismo que en granos que no fueron tratados con herbicidas o fungicidas, pero no se detectaron en el agua que se les dio a beber a las ratas.

Las sustancias inhibidoras de la unión de benzodiazepinas se cuantificaron en el suero de personas que no habían ingerido benzodiazepinas y se encontraron niveles aproximados de 0.1 ng/ml. Se calculó que hombres que ingieren en la dieta diaria trigo, se encuentran de 3 a 7 µg/kg de estas sustancias, mientras que en las personas sometidas a tratamiento tienen niveles séricos que varían entre 1 y 20 ng/ml. De los datos anteriores se calcula que la concentración de benzodiazepinas en el cerebro humano, derivadas de los alimentos vegetales que ingiere, son mucho menores que los requeridos para producir efectos farmacológicos, por lo que los niveles encontrados en el cerebro podrían explicarse por el almacenamiento de estos productos en los tejidos, posterior a su ingesta crónica o a que provengan de biosíntesis en los animales, aunque es poco probable que los mamíferos los sinteticen<sup>211,221</sup>.

En la leche de 34 mujeres, obtenida durante cinco días posteriores al parto se detectaron sustancias similares a las benzodiazepinas en concentraciones que variaron entre 2 y 9.3 ng/ml y en una muestra más estuvieron ausentes, por lo que el promedio en las 35 muestras fue de  $4.3 \pm 1.2$  ng/ml. en leche no

sometida a un proceso de extracción y de  $2.6 \pm 1.5$  ng/ml. en la extraída. No se detectó ninguna de estas sustancias en el suero sanguíneo. No existió correlación entre la cantidad de sustancias similares a benzodiazepinas detectadas en la leche materna, con la edad, peso, masa corporal, número de partos de las madres ni con el peso, sexo o Apgar de los niños. Es probable que las glándulas mamarias puedan concentrar este tipo de sustancias, aunque no se detecten en el plasma sanguíneo, y que estas cantidades produzcan relajación y sueño a los niños alimentados con leche materna<sup>29</sup>.

Se ha llegado a la conclusión de que el diazepam y el N-desmetildiazepam son productos naturales, que pueden ser sintetizadas por hongos como el *Penicillium cyclopium*, que la antramycinina producida por la bacteria *Streptomyces refuineus* contiene la estructura básica de las benzodiazepinas-1-4, que están presentes en plantas o en sus productos y que llegan al cerebro por vía sanguínea cuando se consumen estos alimentos. Es probable que dependiendo de la cantidad de benzodiazepinas que se ingieren en los alimentos, puedan o no tener algún efecto sobre la regulación de los receptores y puedan modificar la ansiedad y los estados de vigilia. Sin embargo, hasta la fecha no se sabe el significado biológico de las benzodiazepinas endógenas<sup>221</sup>.

Probablemente el papel natural de los receptores benzodiazepínicos sea ansiogénico más que ansiolítico, si se toma en cuenta que la ansiedad es una respuesta natural ante los conflictos y el miedo que puede modificar la conducta de un individuo para su beneficio. Por ejemplo, en los animales un estímulo aversivo puede evitar que repita un tipo determinado de comportamiento, por lo tanto una respuesta ansiogénica puede ser útil en el aprendizaje y estimular el desarrollo de acciones correctivas<sup>90</sup>.

Tabla 2. Resumen de la farmacocinética de las benzodiazepinas

Druga administrada	Principal indicación	Biotransformación inicial	Sustancias presentes en la sangre (vida media usual, en horas)
Diazepam	Ansiolítico	Oxidación	Diazepam (20-70) Desmetil diazepam (36-96) Oxazepam* Temazepam*
Clorazepato <sup>b</sup>	Ansiolítico	Oxidación	Desmetildiazepam (36-96)
Prazepam <sup>b</sup>	Ansiolítico	Oxidación	Desmetildiazepam (36-96)
Oxazolam <sup>b</sup>	Ansiolítico	Oxidación	Desmetildiazepam (36-96)
Alprazolam	Ansiolítico	Oxidación	Alprazolam (8-15)
Lorazepam	Ansiolítico	Conjugación	Lorazepam (10-20)
Oxazepam	Ansiolítico	Conjugación	Oxazepam (5-15)
Bromazepam	Ansiolítico	Oxidación	Bromazepam (20-30)
Clobazam	Ansiolítico	Oxidación	Clobazam (20-30) Desmetilclobazam
Flurazepam	Hipnótico	Oxidación	Desalquilflurazepam (1-4) Hidroxietylflurazepam (1-4) Aldehido de flurazepam Flurazepam*
Temazepam	Hipnótico	Conjugación	Temazepam (8-20)
Lormetazepam	Hipnótico	Conjugación	Lormetazepam (8-20)
Triazolam	Hipnótico	Oxidación	Triazolam (1.5-5)
Nitrazepam	Hipnótico	Nitroreducción	Nitrazepam (20-30)
Flunitrazepam	Hipnótico perioperativo	Oxidación nitroreducción	Flunitrazepam (10-40) Desmetilflunitrazepam
Quazepam	Hipnótico	Oxidación	Quazepam (15-35) Oxaquazepam (25-35) Desalquilflurazepam (36-120)
Estazolam	Hipnótico	Oxidación	Estazolam (20-30)
Midazolam	Perioperativo hipnótico	Oxidación	Midazolam (1-4) 1-hidroxietyl midazolam* 4-hidroxietyl midazolam*
Clonazepam	Anticonvulsivante	Nitroreducción	Clonazepam (30-60)

<sup>b</sup>Precusores del N-desmetildiazepam.

\*Compuestos que se producen en menor cantidad y/o que tienen una actividad farmacológica reducida. (Tomado de Principles of Neuropsychopharmacology. Feldman RS et al., Sinauer p 690, 1997).

## Ontogenia de los receptores benzodiazepínicos

Por estudios realizados con benzodiazepinas [ $H^3$ ] se ha determinado que en la rata, y en el ratón, al día 17 de la gestación se determinó que la unión del flunitrazepam [ $H^3$ ] es de 11 fmol/mg de tejido cerebral. Al primer día neonatal existe 23% de los receptores con respecto al adulto, 47% al 7° día postnatal, 58% al día 15 y al 21 es igual a la adulta, el patrón de aparición de los receptores benzodiazepínicos es paralelo al de los receptores GABA<sub>A</sub>, que parecen modular su aparición. La incubación de las membranas neuronales del cerebro, con GABA, duplican la afinidad al flunitrazepam [ $H^3$ ], en cambio, se reduce con la bicuculina<sup>163</sup>.

Los estudios realizados en ratas para detectar los receptores benzodiazepínicos por medio de la unión a diazepam [ $H^3$ ], ha revelado que el día 15° de la gestación están presentes las neuronas GABAérgicas, al día 16 existen 2% de los receptores adultos y a los ocho días prenatales la unión a diazepam [ $H^3$ ] es de 5.2%, que corresponde a 1.49 pmol/g de tejido. Al nacimiento, dependiendo del autor que los ha medido, se calcula que existen entre el 20%, 35.8% y 50% con respecto al adulto, aunque del puente a la médula, es igual a la adulta. En el 7° día postnatal existe una concentración de 55 pmol/g de tejido cerebral. Los niveles adultos, de acuerdo con los diferentes investigadores, se alcanza entre la 3ª y 4ª semana postnatal. La presencia de GABA está atrasada con respecto a la aparición de la descarboxilasa del ácido glutámico, que se diferencia a nivel presináptico y es indispensable para la formación postsináptica del GABA. También se ha comprobado que la exposición a GABA aumenta el número de receptores benzodiazepínicos y de GABA en membranas de neuronas cerebrales<sup>17,30,99</sup>.

## Transferencia del diazepam por la placenta

Con diazepam marcado con  $C^{14}$  se demostró el paso de este fármaco a través de la placenta de

Los receptores benzodiazepínicos y los de GABA, son de aparición más temprana que los muscarínicos, dopaminérgicos y opioides<sup>17</sup>.

En homogenizados de membranas de neuronas obtenidas del cerebro y la médula de embriones de pollo de 7 a 20 días, se encontró una gran afinidad por los receptores GABA<sub>A</sub>, y una muy baja por los GABA<sub>B</sub>. También se bloquea el 75% de la unión de flunitrazepam en los receptores GABA<sub>A</sub>, pero no existen con respecto a los GABA<sub>H</sub><sup>24</sup>.

La exposición prenatal de rata a dosis únicas diarias de diazepam de 1 mg/kg, aplicadas por vía subcutánea, en periodos que fueron del 7° al 21° día de la gestación; del 15° día prenatal al 6° día postnatal o del 7° al 20° día postnatal, produjo diferentes efectos en la unión de flunitrazepam [ $H^3$ ] a los receptores benzodiazepínicos, en diferentes partes del cerebro. En la corteza frontal la exposición prenatal la aumentó en 20% en el adulto de 90 días y en 18% en el hipocampo. La perinatal no alteró la unión y produjo una disminución del 20% en el cerebelo, cuando se aplicó postnatalmente. Los incrementos provocados por la exposición prenatal son permanentes<sup>172</sup>.

La aparición de los receptores benzodiazepínicos periféricos en el cerebro de la rata es anterior a los centrales, ya que a los 16 días de la gestación se encuentran en una proporción equivalente a la que alcanzan al nacimiento los centrales, que es de aproximadamente el 20% en el adulto. Este dato es curioso si se toma en cuenta que sólo se encuentran en los mamíferos y por lo tanto son de aparición tardía, desde el punto de vista filogenético. En cambio los centrales aparecen tempranamente en la escala zoológica<sup>1</sup>.

ratón, hámster y mono, lo mismo que su distribución en los tejidos maternos y fetales. A

hembras de ratón de la primera y tercera semana de la gestación se les aplicó por la vena de la cola una dosis de diazepam [ $C^{14}$ ] de 10 mg/kg de peso corporal; 300 mc/kg y se sacrificaron a los 5 min y una, dos y seis horas después de la inyección, se hicieron cortes sagitales de todos los animales para observar la distribución del fármaco, también se midió la cantidad de diazepam y de N-desmetildiazepam por cromatografía de capa fina. En el hámster del último tercio de la gestación se hizo lo mismo, pero se sacrificaron a los 0.5, 2 y 24 h posteriores a la aplicación intravenosa. A los monos se les inyectaron 5 mg/kg; 150 mc/kg y se sacrificaron a las 0.5, 2, 6 y 24 h. En las tres especies, el diazepam [ $C^{14}$ ] pasó con mayor rapidez a los fetos al final de la gestación y se acumuló en sus tejidos con una marcada preferencia por el sistema nervioso central, los nervios periféricos, el hígado, el riñón, el pulmón, la grasa y el plasma. Lo que podría explicar la hipoactividad e hipotonía que presentan los recién nacidos de los animales y los niños de madres que son inyectadas con diazepam, durante el trabajo de parto<sup>74</sup>.

En mujeres gestantes a las que se les practicó aborto por histerectomía, entre la 12 y 16 semana, se aplicó una dosis de diazepam [ $C^{14}$ ] de 1 mg; 48.3 mc/mg y se obtuvieron los fetos, 1, 2 y 6 horas después de la administración del fármaco. Se obtuvieron muestras de sangre del cordón umbilical y del líquido amniótico durante la operación, de sangre materna, 5, 30, 60 min y 3, 6 y 24 horas y la orina se colectó durante dos días. El diazepam atravesó con rapidez la barrera placentaria. Los niveles en la sangre del cordón umbilical fue el doble de la materna a las 6 h. Una hora después de la aplicación, las concentraciones de diazepam fueron muy altas principalmente en el tracto gastrointestinal, el cerebro, el hígado, la placenta y el líquido amniótico y permanecieron sin modificación a las 6 horas, en el cerebro y el hígado, lo que se debe a su acumulación. El 86% se recuperó en la orina a las 48 h. El hígado fetal lo metaboliza<sup>74</sup>.

Mujeres con embarazos de 12 a 15 semanas fueron tratadas con diazepam de 9 a 30 días, a diferentes intervalos, antes de la histerectomía y en ellos se comprobó el paso rápido del diazepam, la mayor cantidad del fármaco en la sangre fetal que en la materna, lo que se revertió con el uso continuo. El diazepam se metabolizó en el hígado fetal y se acumuló en el cerebro y el hígado fetal y se encontró en el plasma sanguíneo fetal y en la placenta<sup>41</sup>.

La administración de diazepam por vía endovenosa o intramuscular, en dosis de 10 a 20 mg, 24 a 48 h antes del parto, permitió comprobar que atraviesa la barrera placentaria, su presencia en la sangre del cordón umbilical, que se metaboliza en los tejidos fetales, en especial en el hígado. La vida media en el plasma sanguíneo del recién nacido fue de  $31 \pm 2$  h. El N-desmetildiazepam se acumula en los tejidos fetales después de la administración crónica, en mayor proporción que el diazepam en el cerebro, corazón, hígado, riñón, pulmones y en la placenta<sup>100</sup>.

En mujeres que recibieron dosis de diazepam de 10 mg por vía endovenosa antes del parto, al medio minuto de la administración del diazepam, éste se detectó en la sangre fetal y mientras más altos fueron los niveles sanguíneos del fármaco, la temperatura rectal del feto fue más baja<sup>128</sup>.

La capacidad de unión del diazepam a las proteínas plasmáticas disminuye al aumentar la edad gestacional y es baja en el suero del cordón umbilical<sup>90</sup>.

Cuando se administró a madres con pre-eclampsia o eclampsia, se comprobó el paso rápido al feto y la persistencia del diazepam y el N-desmetildiazepam en él, durante siete días postnatales, en la sangre<sup>77,129</sup>.

En la oveja, cerca del término de la gestación, se inyectaron dosis de diazepam 0.1 a 0.5 mg/kg, con lo que se demostró que no produce alteraciones hemodinámicas uteroplacentarias, ni en el paso del oxígeno. Dosis mayores disminuyeron ligeramente la presión

arterial y el flujo sanguíneo uteroplacentario. Dosis de diazepam de 0.5 a 8 mg/kg inyectadas al feto no alteran la oxigenación, ni la función cardiovascular<sup>139</sup>.

Ratas gestantes fueron inyectadas por vía subcutánea, en dosis únicas diarias de diazepam [ $C^{14}$ ], 10  $\mu$ C/día, del 13° al 20° día de la gestación, las hembras se sacrificaron 24 horas después del parto y las crías al nacimiento. 10

### Efectos del diazepam sobre el recién nacido

En 1969, Flowers et al., observaron en los recién nacidos de mujeres a las que se les administró una dosis de diazepam de 20 mg, durante el trabajo de parto, la presencia de hipotonía, hipotermia, depresión neurológica y respiratoria y Apgar de 5, al minuto del nacimiento. Madres que recibieron diazepam en dosis de 20 mg durante el trabajo de parto, tuvieron recién nacidos con una disminución significativa de la fluctuación de la frecuencia cardíaca, de la que se recuperaron a los 65 min y un Apgar de 5 a 6 al minuto del nacimiento<sup>179</sup>. La pérdida de la fluctuación en el ritmo cardíaco también fue observada por Burn<sup>10</sup>.

En el hijo de una mujer con preeclampsia severa y otro de una paciente con eclampsia que recibieron antes del parto dosis de diazepam, de 180 mg y 100 mg respectivamente. En los dos niños, al minuto el Apgar fue de 5, presentaron apnea y cianosis, por lo que fue necesario intubarlos. También tuvieron bradicardia e hipotermia de 35.5°C, hipotonía y arreflexia, no lloraban y fueron alimentados por una sonda, al no tener el reflejo de succión. En la sangre venosa del cordón umbilical se cuantificó diazepam hasta 10 días postnatal, en que se recuperaron de la hipotonía<sup>129</sup>. El mismo tipo de alteraciones fueron observadas en recién nacidos de mujeres tratadas con diazepam durante el parto<sup>51,152,173</sup>.

La depresión respiratoria y neurológica, la hipotonía y la deficiencia severa de los reflejos primitivos también se observaron en 25

y 20 días después. El diazepam y sus metabolitos persistieron en el cerebro hasta 10 días postnatales y no a los 20. Los niveles fueron similares a los de la madre, 0 y 10 días  $3.4 \pm 0.3$ ,  $3.2 \pm 0.3$ , de diazepam y sus metabolitos/100 mg de tejido, respectivamente. La permanencia en los tejidos, fue similar a los 10 días, ya que se encontró en la corteza cerebral, y cerebelar, el tallo cerebral, los colículos y el diencéfalo<sup>151</sup>.

niños prematuros de seis y medio a ocho meses de gestación, que nacieron de madres tratadas con dosis de diazepam de 90 a 400 mg/60 kg, en 24h y una administración máxima de 800 mg. Los niños necesitaron reanimación y oxigenoterapia prolongada. Algunos niños se intubaron y se les perfundió suero glucosado. La recuperación varió de acuerdo a la gravedad de las afecciones, de unas horas hasta días<sup>3</sup>.

En recién nacidos de madres que tomaron diazepam durante la gestación, se ha descrito la existencia de un síndrome de abstinencia, caracterizado por hiperactividad, hipertonia muscular generalizada, hiperreflexia, tremor y movimientos bruscos semejantes a convulsiones generalizadas, taquipnea, irritabilidad y vómito. En la sangre persistió el diazepam hasta dos semanas postnatales<sup>63,127,164</sup>.

Se tienen evidencias de que un niño nacido de una mujer que recibió 90 mg de diazepam, en dosis diarias de 10 mg por vía oral, presentó letargo y pérdida de peso. Al ser alimentado por la madre, se interrumpió ésta y en la orina del niño se detectaron huellas de oxazepam, un metabolito activo del fármaco y en el electroencefalograma se observaron trazos compatibles con sedación por medicamentos<sup>155</sup>.

Entre 1987 y 1990 se publicaron tres artículos sobre la caracterización de un "síndrome benzodiazepínico" en niños nacidos de madres que ingirieron durante el embarazo grandes dosis de diazepam (30 a 50 mg) o de oxazepam (75 mg) y al momento del parto tenían en la sangre niveles altos o moderados de

estos fármacos. Los niños presentaron todas las alteraciones descritas en los casos anteriores, incluyendo el síndrome de abstinencia y un dismorfismo facial, consistente en telecanto, pliegues epicanáticos, fisura palpebral de tipo mongoloide, nariz pequeña y respingada, displasias auriculares, paladar alto y arqueado. El cuello era alado y presentaban telotelia. Otras anomalías fueron el síndrome de Möebius, convulsiones, retardo mental y psicomotor, diferentes grados de retardo en la migración y distorsión neuronal en el cerebro, heterotopias, lisencefalia, paquigiria, agenesia de la pared caudal del cerebelo, Dany-Walker, conducta autista, labio hendido, paladar hendido submucoso y malformaciones renales. Al menos seis de las anomalías faciales estuvieron presentes de manera simultánea y las otras no se encontraron en todos los pacientes. Los niños tuvieron problemas de aprendizaje y psico-

motores, que fueron más severos en los casos en que los niveles de benzodiazepinas en la sangre materna, durante el parto eran más altos y viceversa<sup>86,87,88</sup>.

La presencia de labios, con o sin paladar hendido, se ha asociado con la ingestión de benzodiazepinas durante el embarazo<sup>24,33</sup>. En un estudio posterior al de Laegreid se confirma que el consumo de benzodiazepinas, y en especial el diazepam, durante el embarazo, es muy frecuente en dosis que varían entre 10 y 150 mg diarios. De 80 mujeres estudiadas, al 73% se les recetó diazepam u otro tipo de benzodiazepinas durante el primer trimestre del embarazo, al 96% en el segundo y al 85% en el tercero. En total 40 mujeres fueron tratadas con este tipo de fármaco. Sin embargo, se considera que las alteraciones observadas podrían atribuirse no sólo a benzodiazepinas<sup>9</sup>.

## Efectos teratogénicos y tóxicos del diazepam y otras benzodiazepinas en animales de experimentación

En los primeros estudios que se realizaron para identificar la probable acción teratogénica del diazepam y otras benzodiazepinas, se administraron a ratón Swiss-Webster dosis muy altas de diazepam, de 50, 100, 140, 400 y 500 mg/kg que se administraron del 8° a 10° día, del 11° al 13°, del 11°, 14° o en un sólo día, del 8° al 15° día de la gestación, produjeron en el ratón Swiss-Webster reabsorciones, bajo peso fetal y paladar hendido<sup>137</sup>. Resultados similares en cuanto a la producción del paladar hendido se obtuvieron aplicando dosis de 400 mg/kg a los 13.5 días, 13 días y 20 h y 14.5 días en ratón Swiss-Webster y A/J<sup>208,218,226</sup>.

La producción de otros tipos de malformaciones en hámster, también se obtuvieron con dosis de 50 a 100 mg/kg, aplicadas entre el día 8 y 10 de la gestación; las alteraciones fueron: paladar hendido, exencefalia, anomalías de los miembros, hemorragias y reabsorciones<sup>183</sup> lo mismo se produjo en hámster, incluyendo la muerte materna al administrar dosis de diazepam de 120 a 980 mg/kg, que indujeron

hasta 58% de malformaciones y de 3.4 a 54.7% con dosis de clorodiazepóxido de 28 a 3,100 mg/kg, administrados al 8° día de la gestación. Las crías presentaron hipoxia e hipotermia al nacimiento<sup>56</sup>.

El nitrazepam y el nimazepam en dosis de 50 a 100 mg/kg en ratas Sprague-Dowley, produjeron efectos tóxicos y teratogénicos al ser aplicados del 8° al 10° día de la gestación. El oxazepam, el clonazepam, el diazepam y el clorodiazepóxido no indujeron el desarrollo de malformaciones<sup>176</sup>. Los mismos autores encontraron *in vitro*, que la afinidad de la droga por el feto tiene una correlación positiva con los niveles séricos de nitrazepam y nimazepam de la madre y que al aplicar 100 mg/kg de nitrazepam, nimazepam y diazepam, *in vivo*, el nitrazepam produjo toxicidad e *in vitro*, provocó tanto toxicidad como teratogenicidad<sup>178</sup>.

En ratas macho Sprague-Dowley, a las que se les aplicaron dosis únicas de diazepam (Valium) de 50 mg/kg, en el día 10 de la gesta-



ción, no se observaron malformaciones en el aparato reproductor, ni en los niveles de testosterona, HL, HFE y GnRH; pero sí se produjo la elevación de los niveles de receptores benzodiazepínicos en el cerebro<sup>22</sup>.

Dosis de diazepam de 10 mg/kg administrados, a ratas Long-Evans durante los días 6, 7, 9, 12, 15 y 18 de la gestación, por vía oral y de manera simultánea o independiente de la ingestión de dosis de etanol de 4 g/kg, produjeron disminución del peso cerebral y de la placenta. Los efectos del tratamiento combinado se acentuaron en la placenta. En el cerebro algunos aminoácidos libres disminuyeron en los animales tratados, solamente con etanol o sólo con diazepam, pero no con la combinación<sup>23</sup>.

Alargamiento de la gestación ( $p < 0.05$ ), retraso de la apertura del orificio vaginal e incremento en la actividad locomotora en campo abierto ( $p < 0.05$ ), se observaron en ratas tratadas con dosis orales de diazepam, de 10 mg/kg administradas a diario, durante toda la gestación<sup>24</sup>.

En ratones de la cepa Balb/C, a los que se les aplicó por vía oral dosis de diazepam de 1 mg, del 1° al 9° día de la gestación y de 5 mg/kg del 5° al 12° día, se encontró una disminución del número de hembras gestantes ( $p < 0.001$ ); aumento del peso corporal de las crías y malformaciones eventuales como focomelia, anoftalmia, anotia o anoftalmia y anotia simultánea<sup>201</sup>.

En un análisis crítico de los estudios realizados con diazepam, se pone en duda su acción teratogénica en cuanto a la producción de malformaciones, como paladar hendido a dosis terapéuticas, ya que efectivamente sólo se inducen con dosis muy elevadas<sup>209</sup>.

La administración de dosis de diazepam de 10 mg, durante 16 días, a ratas y ratones gestantes, produjo gliosis y cúmulos perivasculariales en el cerebro en los ratones de dos meses de edad. Al aplicar el fármaco sólo durante los últimos siete días de la gestación produjo el mismo efecto, aunque en menor

proporción. La liberación de colina en la corteza frontal disminuyó en la exposición postnatal al inyectar las mismas dosis a ratones de 60 días. Es probable que retrase la sinaptogénesis y que altere el sistema colinérgico y el adrenérgico<sup>50</sup>. Las gliosis y los cúmulos perivasculariales también fueron observadas en animales que recibieron diazepam a través de la leche materna<sup>47</sup>.

Un estudio realizado *in vitro* en embriones de pollo del estadio 8, con cuatro pares de somitas, que fueron incubados en un medio con dosis de diazepam de 400 µg/ml, tuvo como resultado, que el 80% de los embriones presentaron defectos en el desarrollo del tubo neural, en una proporción mayor a nivel del mesencéfalo. El rombencéfalo no se alteró. En el microscopio óptico se encontró que los pliegues neurales se retrasan en la flexión, hacia la línea media. En el microscopio electrónico se observó que las células neuroepiteliales del piso y de las paredes laterales que se flexionan, presentan una superficie apical lisa, engrosada y ancha en la que no están bien desarrollados los microfilamentos, que en condiciones normales se acumulan en ésta región apical, para constreñirla durante la formación del surco y del tubo neural<sup>143</sup>.

En el Departamento de Embriología de la Facultad de Medicina de la UNAM, por más de una década se ha trabajado sobre la acción teratogénica del diazepam (Valium<sup>®</sup>) en ratones de la cepa CD-1 (Charles-River), administrado a hembras gestantes, por vía intraperitoneal o subcutánea, del 6° al 15° o 17° día de la preñez dosis únicas diarias de diazepam (Valium<sup>®</sup>). De acuerdo al objetivo de cada parte del estudio, los animales fueron sacrificados el día 16 o el 18 de la gestación o se dejaron que nacieran y se sacrificaron al nacimiento o se transfirieron con nodrizas que los amamantaron y fueron sacrificados a diferente edad postnatal, hasta 180 días para ser procesados para estudios histológicos y ultraestructurales.

En algunos casos se efectuaron estudios conductuales de diferentes tipos y la determi-

nación de calcio, que a continuación se describen mencionando la edad de los fetos o de los ratones en la etapa postnatal.

En el pulmón de fetos de 16 días de gestación se observó que el árbol bronquial conservó un aspecto glandular, la producción de escasa cantidad de secreciones, la luz de los conductos era muy reducida, en contraste con el espesor del epitelio que estaba engrosado ( $p < 0.001$ ). Los núcleos eran voluminosos, con la cromatina en grumos gruesos, distribuidos atípicamente. Los fetos presentaron signos de hipoxia, cianosis e hipertermia<sup>119</sup>. En el pulmón de fetos de 18 días se observaron zonas colapsadas y hemorrágicas, engrosamiento de las paredes del árbol respiratorio, en especial de las alveolares, sus células tenían el citoplasma vacuolizado, con el borde apical engrosado, gránulos basófilos y núcleos voluminosos con la cromatina formando cúmulos densos. La pared de las arterias y de las venas estaban engrosadas. Los fetos estaban cianóticos, hipotérmicos y su actividad locomotora estaba disminuida<sup>118,120</sup>. El pulmón de los ratones expuestos *in utero* a diazepam, que se dejaron sobrevivir hasta la edad de 63 días conservaron engrosamiento de las paredes alveolares, en las que existían abundantes fibras elásticas burdas, las cuales se encontraron también en los bronquiolos y en la pleura visceral<sup>106</sup>.

En la tibia de fetos de 16 días se encontraron en los extremos proximal y distal, condrocitos hipertrofiados, con citoplasma vacuolizado, núcleo voluminoso, con la cromatina distribuida atípicamente. La matriz cartilaginosa era abundante. El centro de osificación diafisario, de mayor longitud, presentó trabéculas óseas engrosadas, con un número reducido de osteocitos rodeados por escasos osteoblastos voluminosos, con núcleo de mayor talla que las de los controles. En el periostio las células tenían un tamaño mayor, alteración que también se observó en los osteocitos. El tejido osteogénico era menos abundante y los vasos sanguíneos eran de un diámetro mayor que los del control<sup>105,107</sup>. En la

calota de los fetos de 16 días se comprobó la existencia de un incremento en la cantidad de calcio, medido en  $\mu\text{moles/mg}$  de tejido<sup>109</sup>.

En el riñón de los fetos de 18 días, la corteza era de menor grosor que la de los controles y tenía escasas nefronas en desarrollo. Las células de los túbulos contorneados, de las asas de Henle y de los túbulos colectores rectos, tenían un mayor espesor, su citoplasma era claro, su núcleo voluminoso, con cariolinfa abundante y la cromatina formaba grumos que se adherían a la envoltura nuclear. El número de corpúsculos renales era menor al normal<sup>121</sup>. Datos similares se obtuvieron en una relación dosis dependiente cuando se inyectaron dosis únicas diarias de diazepam de 0.17 mg/kg, 0.67 mg/kg, 1.35 mg/kg y 2.7 mg/kg; del 6° al 17° día de la gestación y se observaron los riñones de fetos de 18 días<sup>151</sup>. Las alteraciones persistieron en los ratones de 21 días de vida postnatal<sup>51</sup>.

Fetos de ratón de madres tratadas con las cuatro dosis de diazepam, que se aplicaron al hacer el estudio del riñón (0.17 mg/kg, 0.67 mg/kg, 1.35 mg/kg y 2.7 mg/kg), también fueron utilizados para investigar la acción sobre el corazón, en especial sobre el miocardio, en el que se observó que las dosis más altas provocaron un acortamiento acentuado de los músculos papilares, que parcialmente quedaron incluidas en el miocardio, de tal manera dan la impresión de haber desaparecido, dejando áreas lisas. Los miocitos, las células del endocardio y las del pericardio tenían un núcleo muy voluminoso, con la cromatina distribuida en grumos gruesos adheridos a la envoltura nuclear<sup>37</sup>.

Del corazón de los fetos de ratón de 16 días, expuestos prenatalmente a dosis de diazepam de 2.7 mg/kg, se obtuvieron muestras de miocardio, que fueron procesadas para ser analizadas en el microscopio electrónico, en el que se observaron miocitos voluminosos al igual que sus núcleos, con la cromatina formando cúmulos gruesos. En el citoplasma

había vacuolas grandes, rodeadas por abundantes gránulos de glucógeno. Las miofibrillas estaban desorganizadas y las bandas Z estaban engrosadas en numerosas células. El retículo endoplásmico rugoso tenía cisternas dilatadas, existían abundantes polirribosomas y cisternas del complejo de Golgi<sup>52,107</sup>.

El hígado de los fetos de 16 días tenía hepatocitos de mayor tamaño que los de los controles, al igual que su núcleo. En el microscopio electrónico de transmisión se comprobó la presencia de retículo endoplásmico rugoso desorganizado, con cisternas dilatadas, elementos membranosos, complejo de Golgi abundante, al igual que gránulos de glucógeno que rodeaban grandes vacuolas. Los polirribosomas formaban cúmulos y se observaban vacuolas limitadas por una membrana bien definida. El núcleo era voluminoso, con la cromatina distribuida atípicamente, con frecuencia adherida a la envoltura nuclear<sup>108,113</sup>.

El diazepam administrado durante la gestación, también altera el desarrollo del ovario de los ratones y los cambios persisten hasta la edad de 63 días, en que se sacrificaron durante el estro, época en la que se observó un aumento significativo del número de folículos primarios y secundarios y de folículos secundarios jóvenes y maduros atrésicos; en cambio disminuye el número de folículos secundarios maduros. Los cuerpos lúteos eran más numerosos, con mayor cantidad de células luteinas por área, las cuales se distribuían de manera atípica<sup>67</sup>.

El testículo de los ratones expuestos prenatalmente presentó alteraciones que se observaron en ratones recién nacidos, en los de 35 y en los de 63 días de edad. En los recién nacidos se observó aumento del diámetro de los túbulos seminíferos, retraso de la migración de las células indiferenciadas a la periferia del cordón, espermatogonias con núcleo voluminoso y aumento de la cantidad de células de Leydig ( $p < 0.05$ ). En los de 35 días se retrasó la aparición de la luz de los túbulos seminíferos y de las células germinales, menor cantidad de espermatozoides maduros y persistencia

del aumento del área testicular ocupada por las células de Leydig, que se encontró en los ratones de 63 días de edad, por lo que se considera un efecto permanente<sup>125</sup>.

El incremento del área ocupada por las células de Leydig en el testículo y un aumento del diámetro de los túbulos seminíferos se produjo en los machos de ratón tratados con la misma dosis de diazepam de 2.7 mg/kg de peso corporal, administrada en etapa adulta durante 60 días, cinco días de la semana, y persistió nueve semanas después de haber concluido el tratamiento<sup>159</sup>. En los mismos animales se encontraron alteraciones ultraestructurales en las células de Sertoli, consistentes en la presencia de retículo endoplásmico rugoso distendido, abundantes lisosomas, grandes gotas de lípidos, gran cúmulo de polirribosomas y de gránulos de glucógeno, mitocondrias desorganizadas, cuerpos multivesiculares y cuerpos electrodensos. El complejo de Golgi tenía numerosas vesículas y cisternas<sup>53</sup>.

La placenta de los fetos de ratón de 18 días, tratados *in utero* con dosis únicas diarias de diazepam de 2.7 mg/kg, tenía vasos coriales y espacios intervellosos dilatados. La barrera placentaria era delgada, sus células tenían núcleos voluminosos que sobresalían hacia el espacio intervelloso o hacia la luz de los vasos coriales. En estas células, al igual que en las células gigantes el citoplasma estaba vacuolizado, la cromatina formaba grumos gruesos, adheridos a la envoltura nuclear y presentaba dos o más nucléolos muy grandes<sup>112</sup>. El adelgazamiento de la barrera placentaria y la vacuolización del citoplasma de las células gigantes, que aumentaron su número por campo, se observaron al inyectar dosis más bajas<sup>114</sup>.

Del sistema nervioso central se ha estudiado la estructura histológica del cerebelo de fetos de ratón de 18 días, en el que se observó un engrosamiento de las capas nucleares interna y externa y adelgazamiento de la capa molecular. Las células migratorias localizadas en la sustancia blanca eran muy

abundantes, los surcos eran poco profundos, estaba retrasada la diferenciación de los granos, de las células de Purkinje y del neuropilo<sup>2</sup>.

La persistencia de las alteraciones en el cerebelo de ratones de 180 días expuestos *in utero* a diazepam fue observado al microscopio fotónico, consistieron en la presencia de neuroblastos en la capa granulosa externa, disminución de la densidad en la capa granulosa interna, retraso en el desarrollo de las fibras paralelas de la capa molecular y del neuropilo en general<sup>11</sup>.

En la retina de los fetos de ratón de 16 días, el retraso en la migración de las células de las capas neuroblásticas, trae como consecuencia el aumento del número de núcleos por campo en la capa neuroblástica externa, en la que los núcleos presentan un evidente retraso en la diferenciación, ya que permanecen alargados, en lugar de ser redondeados. El complejo de Golgi es muy abundante, al igual que las mitocondrias y los polirribosomas. El retículo endoplásmico rugoso presentó cisternas dilatadas, con material ligeramente electrodensso. Se encontraron cúmulos de gránulos de glucógeno, sobre todo en el epitelio pigmentario, en el que había vacuolas y fagosomas atípicos. En los fotorreceptores la diferenciación del segmento interno estaba retrasada<sup>114</sup>.

En la corteza cerebral de los ratones adultos expuestos prenatalmente a diazepam se observó una disminución de su espesor, la desorganización de las columnas motoras disminución del número de núcleos por área en las capas II y III y de las neuronas piramidales de la capa V<sup>104</sup>.

Efectos sobre la conducta de los ratones tratados *in utero* con diazepam han sido observados por nuestro grupo de investigación y por diferentes autores. En la conducta de natación de las crías del 5° al 12° día de vida postnatal, se detectó incoordinación en los movimientos, como la persistencia de la natación en círculos por un periodo más prolongado, dificultad para mantener la nariz fuera del agua, probablemente por hipotonía de los músculos cervicales.

Al terminar la prueba, las crías estaban fatigadas, su tono muscular estaba disminuido, mostraron signos de disnea, tiros intercostales, cianosis y fue necesario reanimarlas, aunque la prueba sólo duró de 15 a 30 segundos. Los ratones de control soportaron la prueba sin alterarse<sup>123</sup>.

En ratones lactantes y adultos expuestos prenatalmente a diazepam a dosis de 2.7 mg/kg de peso corporal se registró la actividad locomotora espontánea. A los 12 días, los ratones lactantes presentaron disminución en la frecuencia de los movimientos, de amplitud moderada en relación a la de los testigos, los movimientos de exploración eran vacilantes y lentos, acompañados con frecuencia por arrastre del tren posterior<sup>225</sup>. En los adultos de dos meses de edad, registrados en un cilindro, se conservó la disminución de la actividad locomotora observada en los ratones lactantes<sup>122</sup>.

La prevención pasiva de los ratones expuestos prenatalmente a diazepam, medida por la evitación a una descarga en las patas de ratones de 30 días de edad, se observó una tendencia a disminuir la retención en los machos, pero no fue muy clara la diferencia en las hembras<sup>119</sup>.

La actividad sexual se midió en ratones macho tratados prenatalmente con diazepam a los seis meses de edad, y se observó un aumento en la frecuencia de interrupciones en la penetración peneana y de los trenes de monta<sup>101</sup>. En las hembras el índice de lordosis aumentó, la intensidad de la lordosis grado 1 y 3 disminuyó, mientras que la de grado 2, aumentó significativamente<sup>58</sup>.

La disminución de la prevención pasiva fue observada por otros autores a los 60 días de edad, en ratas, a las que les administraron dosis de clordiazepóxido de 0.22 a 2.6 mg/kg durante la lactancia<sup>28</sup>. La corteza cerebral, la cerebelar y el hipocampo mostraron una disminución en su capacidad de unión a flunitrazepam [H<sup>3</sup>]. Los ratones expuestos *in utero* a difenilhidantoina presentaron una disminución en la unión del diazepam al sistema nervioso<sup>38</sup>.

En ratones de la cepa Swiss-Webster, la exposición prenatal a clordiazepóxido indujo hiperactividad postnatal medida en un laberinto en "Y", en los que disminuyó la latencia, en cambio el prazepam y el flurozepam aumentaron el promedio de la latencia, al igual que lo hizo el nitrzepam<sup>46</sup>.

La exposición pre y postnatal a diazepam a dosis de 1.25 y 2.5 mg/kg en la rata, disminuyó la latencia en la prueba en el modelo de apretón de la cola, que es una prueba de analgesia, abate la respuesta acústica, las crías no reconocen el olor del nido y retardan la succión, lo que podría influir en la eficiencia de la lactancia. Los receptores benzodiazepínicos aumentaron su densidad en la corteza cerebral, lo mismo que en el tallo cerebral, el mesencéfalo y el diencéfalo<sup>180,184</sup>.

La actividad locomotora en campo abierto registradas en ratas el día 14 al 16 postnatal, expuestas a dosis de 0.1 y 1.0 mg/kg, disminuyó, lo mismo que la duración de la emisión de sonidos ultrasónicos, de 22 kHz, en machos de 120 días, después de la eyaculación. Estos sonidos tienen por objeto alejar a otros machos que intentan aparearse con la misma hembra<sup>20</sup>.

Una serie de estudios sobre diferentes tipos de comportamiento que se alteran por la administración prenatal de diazepam, fueron realizados por Kellogg<sup>80</sup>, quien encontró que se altera la actividad locomotora, principalmente con la dosis de 2.5 mg/kg. El reflejo acústico de sobresalto o escape, que aparece normalmente durante la tercera semana postnatal estuvo ausente en las ratas expuestas en la tercera semana de la gestación, a dosis de diazepam de 2.5, 5 y 10 mg/kg. El ruido al que se expusieron fue de 70 dB, el efecto

persistió hasta los 90 días postnatales, lo que corrobora la existencia de un daño a largo plazo<sup>79,80,81,82</sup>.

La concentración y producción de catecolaminas se midieron en la corteza cerebral, el hipocampo y el hipotálamo de ratas expuestas *in utero* a dosis de diazepam de 1.0, 2.5 y 10.0 mg/kg/día del 13° al 20° día de la gestación. La administración prenatal de diazepam redujo en un 65% la liberación de norepinefrina y la producción en un 85% a nivel del hipotálamo de las ratas de 90 días. Cuando se aplicó la droga entre el 17° y el 20° de la gestación, el hipotálamo presentó una disminución mayor en los niveles de norepinefrina, que se evidenció a partir del día 28. Las alteraciones inducidas por la dosis de 2.5 mg/kg desaparecieron al utilizar el agonista benzodiazepínicos Ro15-1788, lo que comprueba la mediación de los receptores benzodiazepínicos<sup>190,192</sup>.

Un experimento similar se realizó sometiendo a las hembras a estrés, el cual también disminuye los niveles de norepinefrina hipotalámicos, mientras que eleva los de corticosterona y prolactina. Con dosis de diazepam de 2.5 mg/kg se contrarrestaron de manera significativa estos efectos, que son mediado por los receptores benzodiazepínicos<sup>82</sup>.

Los mismos animales fueron sometidos a pruebas conductuales entre los 90 y 100 días y se encontró una correlación positiva con respecto a los cambios bioquímicos que se producen a largo plazo en el sustrato neuronal de las ratas. Las pruebas conductuales de teratología funcional en animales, tienen relevancia para tratar de correlacionarlos con los detectados en humanos<sup>83</sup>.

## Planteamiento del problema

Como ha sido demostrado por diversos investigadores, el diazepam y sus metabolitos farmacológicamente activos, atraviesan la barrera placentaria, circulan en una proporción mayor en la sangre fetal que en la materna y por ser altamente lipofílico. Se acumula en los tejidos maternos y en los fetales con gran

contenido en lípidos, en especial en los del sistema nervioso central, en los que tiene preferencia por la corteza cerebral y cerebelar el mesencéfalo y el tallo cerebral, estructuras en las que persisten por lo menos durante 10 días postnatales.

## Hipótesis

La exposición del ratón *in utero* a diazepam produce alteraciones en la histogénesis del cerebro, que persisten en el adulto.

## Objetivo

Identificar los efectos del diazepam sobre la estructura histológica de la corteza cerebral, la cerebelar, el cuerpo estriado y el mesencéfalo de ratones adultos expuestos *in utero* a diazepam.

Ejemplificar en la corteza cerebelar fetal y adulta, las alteraciones ultraestructurales que causa el diazepam administrado durante la gestación.

## Material y métodos

Hembras vírgenes de ratón de la cepa CD-1, de dos meses de edad, con peso de 25 a 27 g importados a los laboratorios Charles River, fueron apareadas con machos de la misma cepa y edad, con un peso de 30 a 32 g, en una proporción de 3:1, de las 05:00 a las 05:30 h. Cinco días antes de realizar el apareamiento, con el fin de aumentar el número de hembras en estros, se colocaron a éstas en las jaulas de los machos durante una hora, evitando el contacto sexual o se les mantuvo en las jaulas en las que habían permanecido los machos, sin éstos, para que las feromonas masculinas sincronizaran el ciclo estral de los animales.

El apareamiento se realizó durante el periodo de oscuridad, y siempre a la misma hora (05:00 h) colocando a las hembras en las jaulas de los machos, sólo durante media hora para disminuir al mínimo la probabilidad de que los embriones iniciaran su desarrollo en

diferente horario. La hora de apareamiento (a las cinco de la mañana) se seleccionó tomando en cuenta que la ovulación de los ratones, se produce aproximadamente a las 03:00 h, en que la receptividad de las hembras es máxima, se conserva dos a tres horas después, en mayor proporción y se reduce al transcurrir más tiempo.

Los lotes de hembras utilizados en cada una de las cinco fases experimentales que se realizaron, estuvieron integrados por 60 a 100 individuos, para garantizar la obtención de grupos de hembras gestantes de un mínimo de seis, por día. El apareamiento se intentaba dos a tres días continuos, para obtener 20 animales de cada uno de los grupos que se formaron.

Las hembras en las que se observó la presencia de un tapón vaginal, signo de la cópula,

se aislaron y considerando a ésto como el inicio de la gestación que se dejó que continuara hasta el 6° día, en el que se distribuyeron en los tres grupos.

El primer grupo experimental o DZ, estuvo formado por hembras que se inyectaron del 6° al 17° día de la gestación, con dosis únicas diarias de diazepam de 2.7 mg/kg de peso corporal, aplicadas entre 08:00 y 09:00 h, por vía subcutánea, en un volumen de 16 µl. El fármaco se tomó directamente de ampollitas comerciales de dos mililitros, que contenían 10 mg del principio activo: adquiridas en una farmacia.

El segundo grupo o S, estuvo constituido por hembras que recibieron de 08:00 a 09:00 h, por vía subcutánea del 6° al 17° día de la gestación, dosis únicas diarias de 16 µl de solución salina al 0.9%, estéril, envasada en ampollitas de 10 mililitros, por un laboratorio farmacéutico.

El tercer grupo o NT, fueron hembras gestantes que no recibieron ningún tratamiento y se mantuvieron en las mismas condiciones experimentales en que permanecieron los ratones de los grupos DZ y S.

Los animales de todos los grupos, tanto adultos como las crías del grupo experimental, y los de control, se criaron en el bioterio del Departamento de Embriología de la Facultad de Medicina de la UNAM, en un ambiente con aire filtrado, temperatura constante de 20 a 22°C, período de 12 horas de iluminación por 12 de oscuridad, que se inicia a las 07:00 h. Las jaulas y los bebederos, al igual que la cama (Aspen bed) y el alimento MPI 5020, fueron esterilizadas en un autoclave. El agua se pasó por un filtro Millipore de poro 0.45 µm. Los animales tuvieron libre acceso al alimento y al agua.

Al día 16 de la gestación, se sacrificaron con CO<sub>2</sub>: 20 hembras de cada uno de los tres grupos, se obtuvieron por laparotomía los fetos a los que se diseccionó para extraer el cerebelo, que se fraccionó en solución

amortiguada de cacodilato de sodio al 0.16 M, pH 7.0, se fijó en glutaraldehído de sodio al 2.5%, disuelto en el amortiguador de cacodilato. La postfijación se hizo en OsO<sub>4</sub> al 1%, se deshidrató en alcoholes graduales, se sumergió en óxido de propileno, se incluyó en resina epóxica. Mediante un ultramicrotomo Reichert, se obtuvieron cortes finos que se contrastaron con acetato de uranilo y citrato de plomo y se observaron en un microscopio electrónico de transmisión Zeiss EM-10.

Un segundo lote de 20 hembras de cada grupo, en el que los animales DZ y S se inyectaron hasta el día 17 de la gestación se conservó para que entre el día 18 y el 19 parieran a sus crías al mismo tiempo que las NT; el parto fue vigilado para reanimar a las crías del grupo DZ, que nacieron hipotérmicas, hipotónicas y con la piel cianótica. Cuando se recuperaron se transfirieron con nodrizas no tratadas junto con las de los grupos S y NT, formaron camadas de seis crías, que fueron amamantadas hasta los 21 días en que se destetaron, se colocaron en jaulas en grupos de tres animales y se dejaron crecer hasta los 180 o los 240 días.

A las edades mencionadas se anestesiaron con pentobarbital (35 mg/kg), inyectado por vía intraperitoneal, los ratones se perfundieron con solución salina 0.9% y formol al 10% amortiguado a pH 7.0. Los animales se conservaron a 4°C durante 12 horas, para evitar artefactos, se extrajo el cerebro, se sumergió en formol al 10% amortiguado y se mantuvo en esta solución durante dos semanas. Posteriormente se procesó para ser incluido en parafina-paraplast 1:1, se hicieron cortes de 6 a 12 µm, que se tiñeron con hematoxilina de Harris y eosina, por la técnica de Kluver-Barrera para neuronas y fibras mielínicas se practicó la impregnación argéntica de Bodian. Algunos bloques se impregnaron por la técnica de Golgi rápido modificado. Los cortes se observaron en un microscopio fotónico de comparación Reichert-Jung.

Un tercer lote de 20 ratones adultos de 180 días de cada grupo se sacrificó con CO<sub>2</sub>, se

obtuvo el cerebelo que se procesó por la técnica descrita anteriormente para la obtención de cortes semifinos y finos los que se observaron en el microscopio fotónico de comparación y en el microscopio electrónico de transmisión EM-10 de

Zeiss respectivamente. Las fotografías se tomaron en un microscopio Polivar Reichert-Jung, con película Fujicolor 100 ASA. Los datos morfológicos se procesaron estadísticamente por ANOVA y la prueba de Scheffé.

## Resultados histológicos

Por trabajos previos se comprobó la presencia de alteraciones histológicas en la corteza cerebral y cerebelar, el cuerpo estriado y el mesencéfalo de fetos de ratón expuestos durante la gestación a dosis únicas diarias de diazepam (DZ) de 2.7 mg/kg. En general, las alteraciones consistieron en retraso en la diferenciación de los neuroblastos, en su morfogénesis como en su migración y en el desarrollo del neuropilo, lo

que dio como resultado que la densidad de los núcleos por campo microscópico fuera mayor que en los animales tratados con diazepam. Fue notable que prácticamente en todos los tejidos, los núcleos eran más voluminosos, la heterocromatina formaba grumos gruesos, muy teñidos, que con frecuencia se adherían a la envoltura nuclear y el nucléolo era más grande.

### Corteza cerebral adulta

En la corteza motora de los ratones de 180 días, tratados prenatalmente con DZ, se observó que el grosor en mm era menor que el de los animales de los grupos control, S y NT ( $DZ = 0.895 \pm 0.3$  mm,  $S = 1.06 \pm 0.4$  mm,  $NT = 1.03 \pm 0.3$  mm  $p < 0.05$ ) (cuadro 1). Entre los grupos S y NT no hubo diferencias, morfológicas, en el espesor ni en características de las células, por lo cual en la ilustración se utilizarán de manera indistinta como grupo control (figuras 8 y 9).

Las columnas motoras de los ratones tratados con DZ, estaban constituidas por neuronas piramidales e interneuronas que se distribuyeron de manera irregular, por lo cual, en pocas ocasiones fue posible identificar hileras de neuronas con una orientación normal (figuras 8 y 9). Los haces de fibras paralelas a las columnas motoras fueron escasas y difíciles de definir (figura 9). Los vasos sanguíneos con frecuencia estuvieron dilatados y presentaron células gliales alrededor, lo que fue más notable en las de la sustancia blanca (figura 9).

En la capa II-III las pirámides de la corteza de los animales DZ se distribuían en grupos o hileras irregulares, lo que era más

evidente en la cercanía de la capa IV. Las fibras formaban haces delgados y escasos. Los vasos sanguíneos estaban dilatados con respecto a los de los animales S y NT y estaban rodeados por numerosas células gliales. El neuropilo se teñía con menor intensidad, lo que es un indicador de una disminución de las ramificaciones de las neuronas y de las sinapsis. Los núcleos de las neuronas, interneuronas y células gliales presentan grumos gruesos de heterocromatina (figuras 10 y 11). El número de núcleos por campo en la capa II-III de los ratones DZ fue mayor ( $27.3 \pm 1.4$ ) que en los grupos S ( $21.4 \pm 1.2$ ) y NT ( $21.9 \pm 1.3$ ) ( $p < 0.05$ ) cuadro 1.

Las neuronas piramidales de Betz de los animales DZ, se agruparon sin la orientación típica en la capa V, de la IV y de la VI. Su talla aparentemente estaba disminuida al igual que su número por campo ( $DZ = 2.4 \pm 0.7$ ,  $S = 3.1 \pm 0.5$ ,  $NT = 3.3 \pm 0.6$ ,  $p < 0.05$ ). La glia rodeaba a los vasos sanguíneos en una proporción mayor de lo que se observan en los ratones S y NT. La trama del neuropilo presenta una menor densidad de fibras (figuras 12 y 13).



En la corteza de los ratones DZ, impregnadas por la técnica de Golgi rápido modificado, y observada por microscopía de interferencia según Nomarski, se apreció la pobre orientación de las columnas motoras, que están bien definidas en la corteza de los ratones S y NT. La distribución y la amplitud atípica de los vasos sanguíneos de los animales DZ también se apreció con claridad, al igual que la gran arborización de las numerosas células gliales (figuras 14 y 15).

Mediante la misma técnica, se destacó la presencia del menor desarrollo de espinas

dendríticas en las neuronas DZ (figuras 16 y 17) y de las ramificaciones dendríticas de las neuronas piramidales (figuras 18 y 19). Con ampliificaciones máximas con inmersión, se observó que los astrocitos protoplasmáticos de la corteza de los ratones DZ, eran más numerosas y tenían ramificaciones más desarrolladas y vigorosas (figuras 20 y 21).

Las características histológicas y morfométricas de la corteza cerebral están resumidas en el cuadro 1.

Cuadro 1. Características histológicas y morfométricas de la administración prenatal de dosis únicas diarias de diazepam, de 2.7 mg/kg sobre la corteza cerebral de ratones de 180 días

	CONTROLES S y NT	DIAZEPAM
Espesor de la corteza cerebral	S = $1.06 \pm 0.4$ mm NT = $1.03 \pm 0.3$ mm	$0.895 \pm 0.3$ mm* *p < 0.05
Columnas motoras	bien organizadas	desorganizadas
Haces de fibras paralelas a las columnas motoras	gruesos y bien orientados	delgados y escasos
Neuropilo	normal	poco denso
Vasos sanguíneos	normales	engrosados trayecto irregular
Neuronas piramidales	normales	retraídas
Diferenciación	normal	retrasada
Núcleo	normal	retraído
Distribución de la heterocromatina	normal	en grumos, más teñida, atípica
Número de núcleos por campo capa II-III	S = $21.4 \pm 1.2$ NT = $21.9 \pm 1.3$	$27.3 \pm 1.4$ * *p < 0.05
Número de núcleos por campo capa V	S = $3.1 \pm 0.5$ NT = $3.3 \pm 0.6$	$2.4 \pm 0.7$ * *p < 0.05
Axones y dendritas	normales	engrosados y sinuosos
Espinas dendríticas	abundantes	escasas
Glia	normal	muy ramificada y más abundante alrededor de los vasos

## Cuerpo estriado

En el cuerpo estriado de los ratones DZ, la densidad neuronal fue notablemente mayor, al igual que el menor desarrollo de los haces de fibras localizadas entre las neuronas, que son una característica típica del cuerpo estriado, a la que se debe su nombre. Las neuronas formaban cúmulos con un mayor número de células que las de los grupos S y NT (figuras 22 y 23) (DZ =  $14.8 \pm 2.1$ , S =  $8.72 \pm 3.2$  y NT =  $9.2 \pm 3.5$ ,  $p < 0.05$ ). Los haces de fibras eran más delgados en los animales DZ (figuras 22 y 23), lo que fue más evidente en la parte periférica del cuerpo estriado. Las fibras eran muy sinuosas y menos abundantes y estaban acompañadas por numerosas células gliales (figuras 24 a 27). Los núcleos de las células gliales eran voluminosos, con la heterocromatina formando grumos gruesos,

adheridos a la envoltura nuclear (figuras 28 y 29).

Los grupos de neuronas también tenían núcleos con la cromatina atípicamente distribuida. Las fibras del neuropilo y de los haces eran irregulares y estaban engrosadas (figura 28 y 29).

Las neuronas voluminosas desarrollaron una menor cantidad de dendritas y de espinas dendríticas, lo que se puede apreciar en las figuras 30 y 33, en donde el neuropilo es más rico en arborizaciones en los ratones S y NT, que en los DZ, en los que se nota que los axones y las dendritas están engrosadas, de la misma forma que están las de las neuronas piramidales de la corteza cerebral.

Las características histológicas y los datos morfométricos del cuerpo estriado están resumidos en el cuadro 2.

Cuadro 2. Características histológicas y morfométricas del cuerpo estriado de ratones de 240 días, tratados con DZ, comparados con los ratones S y NT

	CONTROLES S y NT	DIAZEPAM
Haces de fibras	gruesos	delgadas
Neuronas	normales	en cúmulos
Diferenciación neuronal	normal	retrasada
Núcleo	normal	menos voluminoso
Distribución de la heterocromatina	normal	en grumos gruesos adheridos a la envoltura nuclear
Axones y dendritas	normales	engrosados y sinuosos
Espinas dendríticas	abundantes	escasas
Neuropilo	bien diferenciado	con fibras sinuosas
Glía	normal	abundante en los haces de fibras
Núcleo	normal	voluminoso
Distribución de la heterocromatina	típica	en grumos gruesos adheridos a la envoltura nuclear
Número de núcleos de neuronas por campo	S = $8.72 \pm 3.2$ NT = $9.2 \pm 3.5$	$14.8 \pm 2.1^*$ $*p < 0.05$

**Colículos superiores**

Diferenciación neural	normal	retrasada
Neuronas	normales	retraídas
Núcleo	normal	menos voluminoso
Distribución de la heterocromatina	normal	grumos gruesos, adheridos a la envoltura nuclear
Citoplasma	abundante	escaso
Fibras paralelas a la superficie	normales, abundantes	sinuosas, escasas
Neuropilo	densidad normal	pobrementemente diferenciado
Número de núcleos por campo	S = 48.8 ± 2.8 NT = 49.6 ± 2.5	39.9 ± 1.9* *p < 0.01

**Colículos inferiores**

Diferenciación neuronal	normal	retrasada
Neuronas	normales	menos voluminosas
Núcleo	normal	retraído
Distribución de la heterocromatina	normal	en grumos gruesos, adheridos a envoltura nuclear
Citoplasma	normal	escaso
Fibras paralelas a la superficie	normales, abundantes	sinuosas, escasas
Neuropilo	bién desarrollado	pobrementemente diferenciado
Número de núcleos por campo	S = 49.1 ± 3.1 NT = 52.1 ± 3.3	28.46 ± 1.7* *p < 0.01

**Mesencéfalo**

En el mesencéfalo, las neuronas gigantes características de los núcleos rojos, en los ratones de 240 días, expuestos prenatalmente a diazepam aparentemente tenían una talla menor que las del grupo S y NT y se les encontraba en parejas, sin la presencia de neuropilo entre las dos (figuras 34 a 37). Los núcleos menos voluminosos tenían nucléolos grandes y grumosos de heterocromatina que se teñían con intensidad y con frecuencia se localizan adheridas a las envoltura nuclear. En el citoplasma se observaron gránulos basófilos (figuras 34 a 39).

Alrededor de las neuronas de los núcleos rojos de los ratones DZ, se observó el neuropilo constituido por una trama de ramificaciones

engrosadas e irregulares, que formaban una trama de menor densidad que la del neuropilo de los núcleos rojos del mesencéfalo de los ratones S y NT (figuras 34 a 37).

Los haces de fibras que se localizaban entre las neuronas eran más delgados, tenían fibras engrosadas e irregulares, menos numerosas, que las de los ratones de los grupos S y NT, lo que se destacó al ser teñidas con la técnica de Kluver-Barrera para mielina y con la impregnación argéntica de Bodian (figuras 34 a 39).

Las células gliales eran más abundantes en los ratones DZ que en los S y NT, localizados entre las fibras y alrededor de los vasos sanguíneos (figuras 34 a 39).

En el centro de los núcleos rojos la población de neuronas gigantes aparentemente eran de menos tamaño, pero más numerosas en los ratones de 240 días, tratados prenatalmente con DZ, con respecto a los S y NT. El número promedio de neuronas gigantes fue de  $35.7 \pm$

$1.5$  en los DZ, de  $26.1 \pm 1.5^*$  en los S y de  $25.8 \pm 1.6$  en los NT (\* $p < 0.01$ ). La diferencia entre el grupo DZ y los S y NT fueron estadísticamente significativos y no lo fue entre los S y NT ( $p < 0.01$ ) cuadro 3.

**Cuadro 3.** Características histológicas y morfométricas del mesencéfalo de ratones de 240 días, tratados con DZ, comparados con los ratones S y NT

	CONTROLES S y NT	DIAZEPAM
<b>Núcleos rojos</b>		
Diferenciación neuronal	normal	retrasada
Neuronas gigantes	normales, aisladas por neuropilo	retraídas, en pares sin neuropilo interneuronal
Núcleo	talla normal	menos voluminoso, en grumos gruesos, adheridos a la envoltura nuclear
Citoplasma	abundante, tinción normal	escaso, gránulos basófilos intensamente teñidos
Haces de fibras	gruesos	delgados
Fibras	normales, abundantes	engrosadas y sinuosas, escasas
Neuropilo	bien diferenciado	trama abierta, poco densa
Número de núcleos por campo	S = $26.1 \pm 1.5$ NT = $25.8 \pm 1.6$	$35.7 \pm 1.5^*$ * $p < 0.05$

## Colículos

En los mismos ratones DZ, en la región cortical de los colículos superiores e inferiores se observaron neuronas y células gliales agrupadas con el núcleo reducido de tamaño y con la heterocromatina en grumos muy densos e intensamente teñidos, adheridos a la envoltura nuclear. En cambio en los ratones S y NT la apariencia de la cromatina era típica, lo mismo que el tamaño de los núcleos (figuras 40 a 43).

### Superiores

Entre las neuronas de los colículos superiores de los ratones S y NT, se identificaron fibras organizadas en haces paralelos entre sí. El número de núcleos por campo era mayor que en

los ratones DZ\* (S =  $26.1 \pm 1.5$ , NT =  $25.8 \pm 1.6$ , DZ =  $35.7 \pm 1.5$  \* $p < 0.01$ ). En el neuropilo la trama de fibras era abundante y con las características normales, lo que contrastaba con el tejido de los ratones DZ, en el cual las neuronas estaban dispersas entre una trama de un número reducido de fibras engrosadas y tortuosas, que seguían trayectos en diferentes sentidos, sin que se distinguieran haces paralelos definidos (figuras 40 a 43 y cuadro 3).

### Inferiores

En los colículos inferiores de los ratones DZ, los núcleos de las neuronas y de la glia tenían

la heterocromatina condensada. El número de núcleos por campo era menor que en los ratones S y NT ( $S = 49.1 \pm 3.1$ ,  $NT = 52.1 \pm 3.3$ ,  $DZ^* = 28.46 \pm 1.7$ ,  $*p < 0.001$ ). Las fibras eran más gruesas, seguían trayectos irregulares y formaban un neuropilo con una densidad menor que la más compacta y de trama fina

## Cerebelo

Al observar los cortes histológicos del cerebelo de los ratones de 180 días, del grupo tratado prenatalmente con diazepam, fue notable que el espesor de la corteza estaba adelgazada con respecto a la de los controles. En la capa molecular persistían abundantes granos que no migraron a la capa granulosa interna. El número de granos por campo fue de  $23.4 \pm 1.4$  en  $DZ^*$ ,  $13.3 \pm 1.7$  en S y de  $12.7 \pm 1.5$  en NT ( $*p < 0.001$ ). En esta capa, por la impregnación argéntica de Bodian se pudieron distinguir las fibras paralelas de los granos que eran sinuosas y estaban engrosadas. El neuropilo era menos denso que en los ratones S y NT (figuras 48 a 53 y cuadro 4). Las células de Purkinje de los ratones DZ estaban retraídas, su núcleo era lobulado, era menos voluminoso, tenía la cromatina en grumos con frecuencia adheridos a la envoltura nuclear y un nucléolo de contorno irregular con respecto de S y NT (figuras 48 a 53). Su número por campo era menor ( $DZ = 5.9 \pm 1.3^*$ ,  $S = 8.2 \pm 1.0$ ,  $NT = 8.6 \pm 1.2$ ,  $*p < 0.01$ ) (cuadro 4). Las células de Purkinje estaban rodeadas por un reducido grupo de fibras procedentes de las células en canasta y de las de Golgi, que también mostraban signos de vacuolización (figuras 48 a 53).

La capa granulosa interna en los ratones DZ, estaba adelgazada, los núcleos de los granos se impregnaban con mayor intensidad que los de S y NT. Estaban agrupados en cúmulos densos, entre los que se encontraban áreas muy claras, en los que no se observaban granos, cuyo número por campo era menor ( $DZ = 44.6 \pm 4.2^*$ ,  $S = 57.9 \pm 2.3$ ,  $NT = 59.2 \pm 1.9$ , ( $p < 0.01$ )) figuras 48 a 53 y cuadro 4. La diferenciación del

característica de los colículos inferiores bien organizada de los ratones S y NT. La población de neuronas era menor en los ratones DZ que en los de control (figuras 44 a 47 y cuadro 3).

Las características histológicas y los datos morfométricos del mesencéfalo están resumidos en el cuadro 3.

neuropilo esa deficiente y las fibras eran sinuosas y engrosadas (figura 48 y 49).

En la sustancia blanca, de los ratones DZ, las fibras mielinizadas eran sinuosas, estaban engrosadas, tenían una afinidad mayor por la plata que las de S y NT, eran más escasas y estaban acompañadas por abundantes células gliales (figuras 48 y 49).

Al observar los cortes semifinos de la corteza cerebelar de los ratones DZ de 180 días, se puede comprobar que en la capa molecular había una trama abierta, formada por fibras engrosadas de las dendritas de las células de Purkinje, de las de Golgi, las de canasta, de las estrelladas, los axones de los granos que son las fibras paralelas y las trepadoras. Entre las fibras se observaron espacios tipo vacuolar, vasos sanguíneos, algunas células en degeneración, con el núcleo picnótico. Las células estelares con el núcleo más voluminoso y la persistencia de abundantes granos, con respecto a los de los controles S y NT (figuras 54 a 57 y cuadro 4).

En los mismos cortes semifinos de los ratones DZ fue más notable la retracción de las células de Purkinje, que tenían el núcleo lobulado, con la heterocromatina muy teñida y el citoplasma basófilo. Alrededor de estas células en canasta, las de Golgi y algunos granos en franca degeneración, mientras que en los ratones S y NT el aspecto era normal (figuras 54 a 57 y cuadro 4).

La disminución del espesor de la capa granulosa interna se corroboró en los cortes semifinos de la corteza cerebelar de los ratones

DZ con respecto al de los controles S y NT (figuras 54 y 55-58 y 59).

Los núcleos de los granos de los ratones DZ aparentemente eran más voluminosos, con grumos gruesos de heterocromatina, con frecuencia adheridos a la envoltura nuclear. Entre los núcleos las fibras del neuropilo eran menos abundantes en comparación con las de los ratones S y NT (figuras 56 a 59).

Las vainas mielínicas de las fibras de la sustancia blanca se veían engrosadas en las folias de los ratones DZ y se teñían con mayor intensidad que en los controles S y NT (figuras 54 y 55-58 y 59).

Las características histológicas y los datos morfométricos del cerebelo, están resumidas en el cuadro 4.

Cuadro 4. Características histológicas y morfométricas de la corteza cerebelar de ratones DZ de 180 días, comparadas con las de los ratones S y NT

	CONTROLES S y NT	DIAZEPAM
Capa molecular		
Granos persistentes por campo	S = 13.3 ± 1.7 NT = 12.7 ± 1.5	23.4 ± 1.4* *p < 0.001
Granos	normales	abundantes
Núcleo	normal	voluminoso, en cúmulos
Distribución de la heterocromatina	típica	en grumos gruesos, adheridos a la envoltura nuclear
Afinidad tintoreal	normal	aumentada
Células estelares	normales	voluminosas
Fibras paralelas	normales	engrosadas y escasas
Neuropilo	bien diferenciado	con una trama engrosada
Células de Purkinje	normales, con citoplasma abundante	retraídas y escasas
Número por campo	S = 8.2 ± 1.0 NT = 8.6 ± 1.2	5.9 ± 1.3* *p < 0.01
Núcleo	normal	lobulado
Heterocromatina	normal	en grumos gruesos
Nucléolo	normal	distorsionado
Fibras de células en canasta y de Golgi	abundantes, normales	escasas, sinuosas y engrosadas
Citoplasma células en canasta	normal	con signos de degeneración
Granulosa interna	bien diferenciada	adelgazada
Número de granos por campo	S = 57.9 ± 2.3 NT = 59.2 ± 1.8	44.6 ± 4.2* *p < 0.01
Núcleos	normales	voluminosos, en grupos densos
Heterocromatina	normal	en grumos adheridos a la envoltura nuclear
Neuropilo	bien desarrollado	pobremente diferenciado
Sustancia blanca		
Haces de fibras	abundantes	escasas
Fibras	abundantes, con glía normal	escasas, con abundantes células gliales
Vainas de mielina	espesor normal	engrosadas, mayor afinidad tintoreal

## Resultados ultraestructurales

### Cerebelo fetal

En el cerebelo de fetos de 18 días expuestos a diazepam del 6° al 17° día de la gestación, procesado para ser observado en el microscopio electrónico de transmisión, se comprobó la presencia de alteraciones ultraestructurales.

El núcleo de las células de Purkinje tenían un contorno irregular, con un nucléolo volumi-

noso. La heterocromatina formaba grupos gruesos adheridos a la envoltura nuclear, que tenía desprendida la capa externa de la interna. En los controles S y NT el aspecto de los núcleos, el nucléolo y el de la heterocromatina era normal (figuras 60 y 61, cuadro 5).

Cuadro 5. Características ultraestructurales de la corteza cerebelar de fetos de ratón DZ, de 18 días, comparadas con fetos de ratones DZ, de 18 días, comparados con los fetos S y NT

	CONTROLES S y NT	DIAZEPAM
<b>Células de Purkinje y granos</b>		
Núcleo	normal	retraído
Heterocromatina	normal.	en grupos gruesos, adheridos a la envoltura nuclear
Nucléolo	normal	irregular
Envoltura nuclear	normal	capa externa separada de la interna
Citoplasma	normal	retraído
Complejo de Golgi (cisternas)	paralelas	abundantes, dilatadas, con forma irregular
Retículo endoplásmico rugoso	normal	cisternas dilatadas
Polirribosomas	normales	más abundantes
Mitochondrias	normales	hinchadas con las crestas distorcionadas
Lisosomas	escasos	más frecuentes
Vacuolas	_____	limitada por una membrana
Neuroplio	normal	poco diferenciado
Botones cinápticos	abundantes	escasos
Dendritas	abundantes	escasas, con lisosomas grandes

El complejo de Golgi de las células de Purkinje de los fetos de los grupos S y NT estaban formados por cisternas paralelas, típicas al igual que las vesículas (figura 62). En

contraste las cisternas y las vesículas de los fetos DZ eran muy abundantes, estaban dilatadas y tomaban formas caprichosas (figuras 63 y 64, cuadro 5).

Las cisternas del retículo endoplásmico rugoso en los fetos DZ, estaban dilatadas, tenían alrededor ribosomas y en el citoplasma había polirribosomas grandes y más numerosos que en los controles S y NT (figuras 62 a 65).

Las mitocondrias en los fetos DZ también estaban hinchadas y con crestas distorsionadas en las células de Purkinje. También se observaron lisosomas (figuras 62 a 65).

En los granos, de los ratones DZ el núcleo estaba distorsionado y tenía la heterocromatina distribuida de manera atípica. Se encontró un aumento en la proporción de las cisternas y vesículas del complejo de Golgi, así como el retículo endoplásmico rugoso, que estaban dilatadas. En estas células se detectó

la presencia de vacuolas con membranas bien definidas y lisosomas que no se observaron en los controles S y NT (figuras 66 y 67).

En el neuropilo, las dendritas de los ratones DZ eran menos numerosas, pero más gruesas e irregulares, presentaba mitocondrias alteradas y lisosomas electrodenso. Los botones sinápticos diferenciados eran escasos, en comparación con los observados en los controles S y NT, en donde eran numerosos y bien desarrollados, lo mismo que las dendritas muy abundantes, de talla normal (figuras 68 a 71)

Las características ultraestructurales del cerebelo fetal están resumidas en el cuadro 5.

## Cerebelo adulto

En los ratones adultos de 180 días, expuestos prenatalmente a diazepam se observaron células de Purkinje en franca degeneración, en las que el núcleo estaba lobulado, tenían la heterocromatina en grumos gruesos dispersos entre el nucleoplasma denso, de aspecto muy distinto al de los controles S y NT. El nucléolo estaba retraído (figuras 72 y 73).

Las mitocondrias estaban hinchadas y las crestas mitocondriales rotas, que en algunos casos habían desaparecido. El complejo de Golgi era abundante, en los fetos DZ, estaba formado por cisternas y vacuolas dilatadas en franca degeneración (figuras 74 a 77). El retículo endoplásmico rugoso se había fragmentado y tenía cisternas dilatadas, rodeadas por una enorme proporción de polirribosomas (74 a 77).

En los ratones DZ el núcleo de los granos era lobulado, con la heterocromatina en grumos

gruesos, dispersos entre el nucleoplasma. La membrana externa de la envoltura nuclear estaba separada de la interna, lo que no ocurrió en los ratones S y NT (figuras 78 y 79).

La sustancia blanca de las folias del cerebelo de los ratones DZ, que mediante las técnicas histológicas se teñían intensamente, al ser observadas en el microscopio electrónico de transmisión mostraban las láminas de mielina disgregadas, engrosadas, hinchadas y con herniaciones. Las mitocondrias estaban hinchadas y sus crestas desorganizadas. En el interior de los axones los microfilamentos estaban engrosados en comparación con las de los controles, que tenían características normales (figuras 80 y 81).

Las características ultraestructurales del cerebelo de los ratones DZ de 180 días, comparadas con las de los ratones S y NT, están resumidas en el cuadro 6



**Cuadro 6. Características ultraestructurales de la corteza cerebelar de fetos de ratones DZ, comparados con las de los ratones S y NT**

	CONTROLES S y NT	DIAZEPAM
<b>Células de Purkinje</b>		
Núcleo	normal	lobulado
Heterocromatina	normal	grumos gruesos, nucleoplasma denso
Nucléolo	normal	retraído
Citoplasma	normal	en degeneración
Complejo de Golgi (cisternas y vesículas)	normales	abundantes, dilatadas
Reticulo endoplásmico rugoso	normal	dilatado
Polirribosomas	normales	muy abundantes
Mitocondrias	normales	hinchadas, con las crestas distorsionadas
<b>Granos</b>		
Núcleo	normal	lobulado
Heterocromatina	normal	grumos gruesos, adheridos a la envoltura nuclear
Envoltura nuclear	normal	capa externa separada de la interna
Neuropilo	normal	pobremente diferenciado
Láminas de mielina	normales	disgregadas, gruesas y con herniaciones
Mitocondrias	normales	hinchadas, con las crestas distorsionadas

## **Figuras de los resultados histológicos y ultraestructurales**

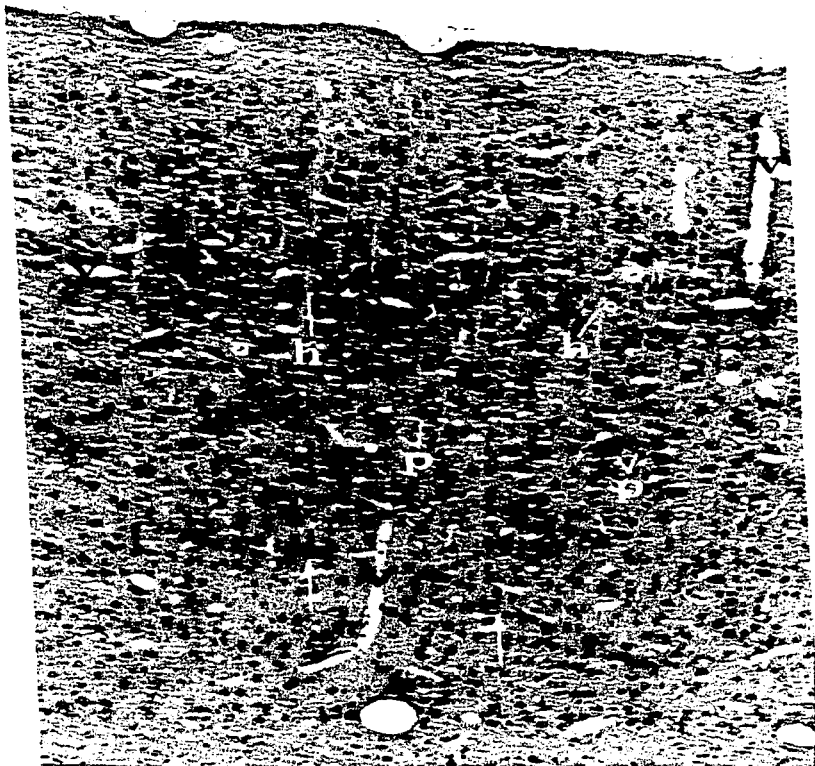
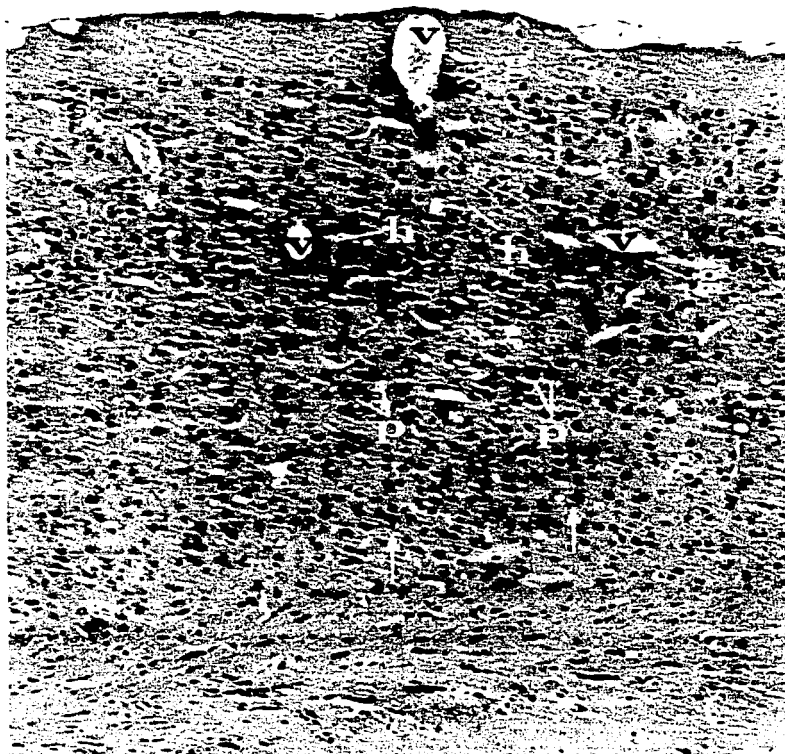
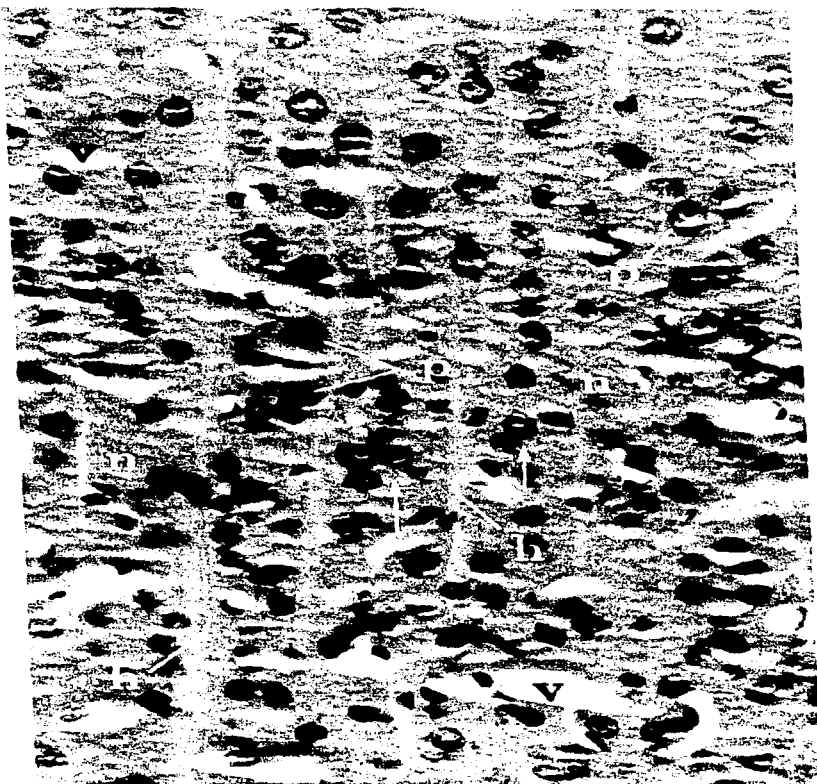


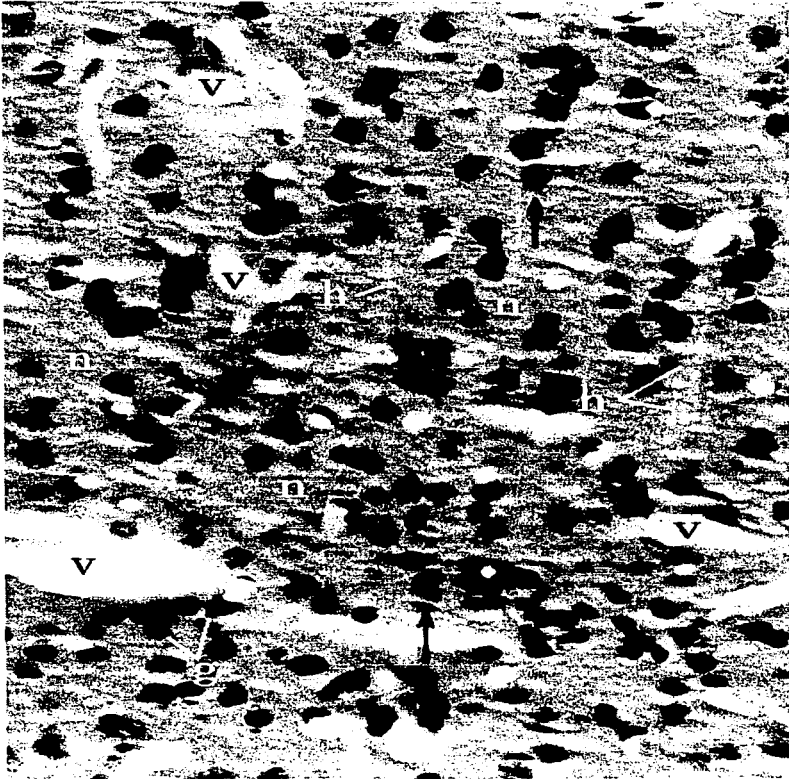
Figura 8. Corteza cerebral motora de un ratón control, de 180 días, de espesor normal, constituida por neuronas piramidales (p) organizadas en columnas motoras típicas (↑), entre las que se encuentran haces de fibras paralelas (h) a éstas. Los vasos sanguíneos (v) son de calibre normal. Hematoxilina-eosina. 385X.



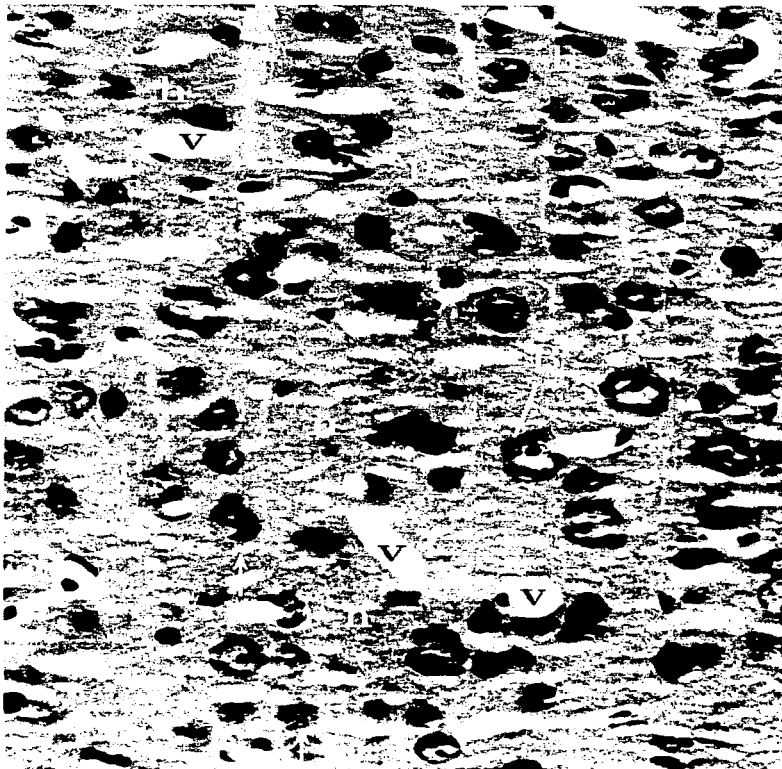
**Figura 9.** Corteza motora de un ratón DZ, de 180 días, en el que se aprecia su menor espesor. Sólo algunas neuronas piramidales (p), presentan la organización en columnas motoras (↑) característica de esta área cortical. Los haces de fibras (h) paralelas a las columnas son escasos. Los vasos sanguíneos (v) son de mayor calibre y están rodeados por abundantes células gliales (g), principalmente, los de la sustancia blanca. Hematxilina-cosina. 385X.



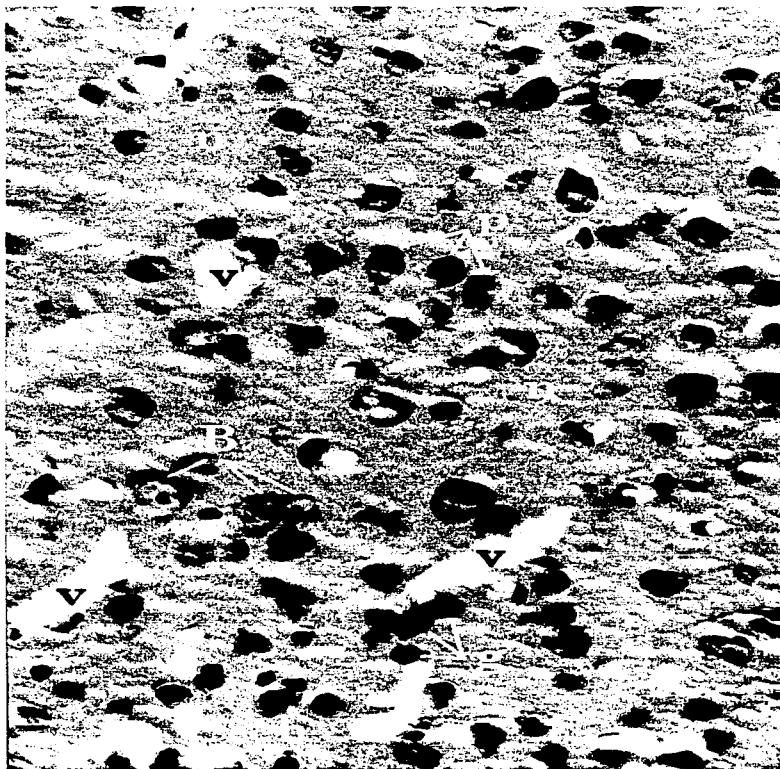
**Figura 10.** Detalle de la figura 8, a nivel de la capa II-III, en la que se aprecia la estructura normal de las pirámides medianas (p) que en este campo son las de talla mayor, por estar cerca de la capa IV. Los haces de fibras longitudinales (h) están bien desarrollados, al igual que las columnas motoras (↑) y los vasos sanguíneos (v). La cromatina de los núcleos de las pirámides (p) es normal y lo mismo que la apariencia del neuropilo (n). Hematoxilina-eosina 985X.



**Figura 11.** Detalle de la figura 9 a nivel de la capa II-III en la que se observan pirámides medianas (p), cercanas a la capa IV, las columnas motoras (↑) están poco definidas, y con frecuencia forman grupos irregulares, los haces de fibras longitudinales (h), son escasos. Los vasos sanguíneos (v) son de calibre amplio y están rodeados por numerosas células gliales (g). Los núcleos de las pirámides están contraindos y tienen la cromatina teñida intensamente. El neuropilo (n) presenta una menor densidad Hematoxilina-eosina. 985X.



**Figura 12.** Detalle de la figura 8 a nivel de las pirámides (p) de diferente talla en la capa IV, y las más grandes o de Betz (B), de la capa V, forman parte de las columnas motoras (↑) bien organizadas. Los haces de fibras longitudinales (h), el neuropilo (n) y los vasos sanguíneos (v), tienen una estructura normal, lo mismo que la heterocromatina de los núcleos. Hematoxilina-eosina. 985X.

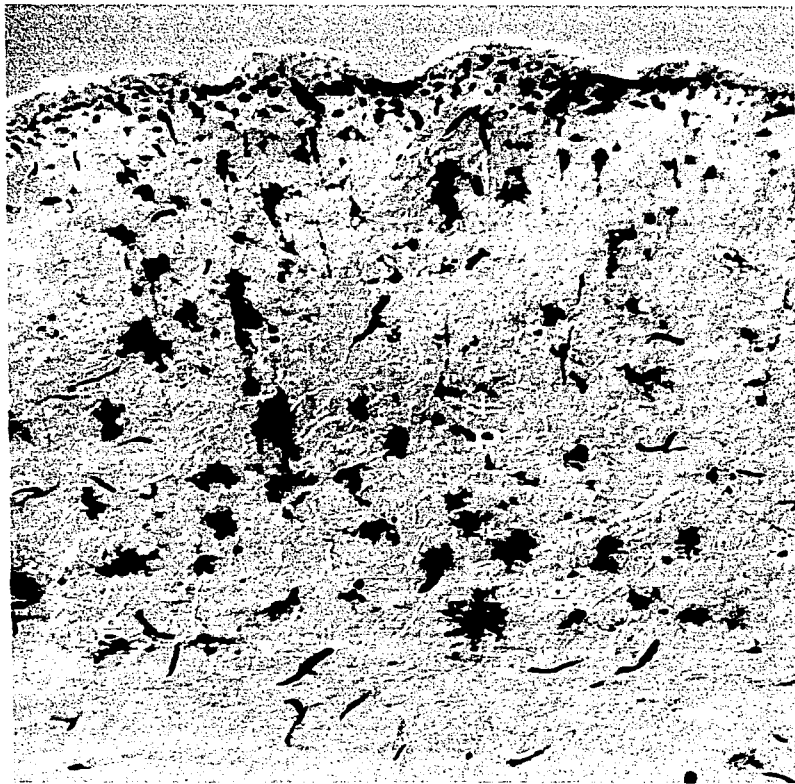


**Figura 13.** Detalle de la figura 9 en la que se observan escasas neuronas piramidales (p) de distinto tamaño, en la capa IV. En la capa V, las pirámides de Betz (B) son menos numerosas, con núcleo pequeño, las cuales forman cúmulos en lugar de columnas motoras bien definidas. Los haces de fibras longitudinales (h) son escasas, el neuropilo (n) es poco densa y la glía (g) se encuentra alrededor de los vasos sanguíneos (v), de gran calibre. La cromatina en general está más condensada. Hematoxilina-eosina. 985X.

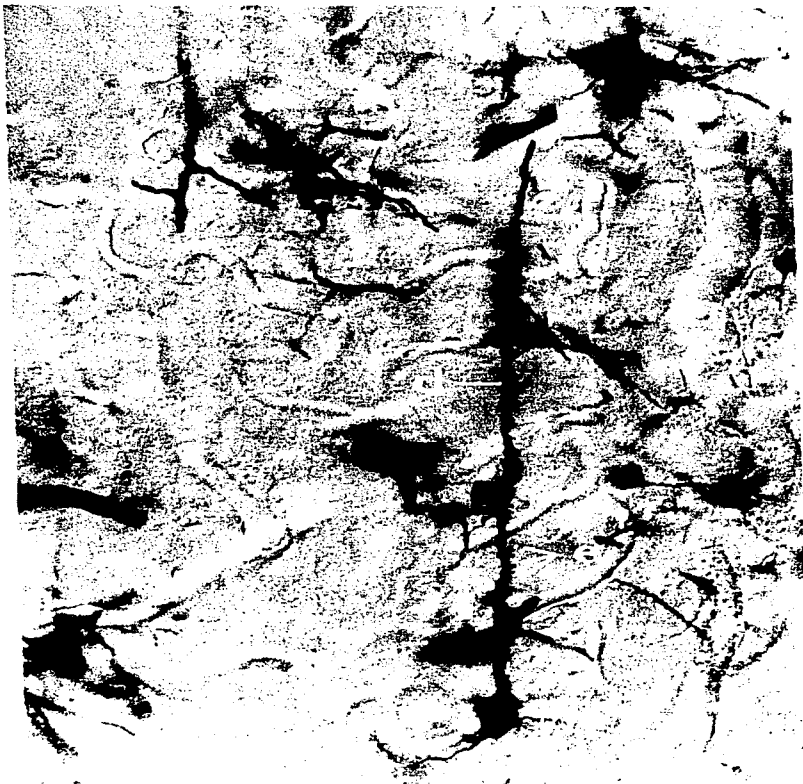




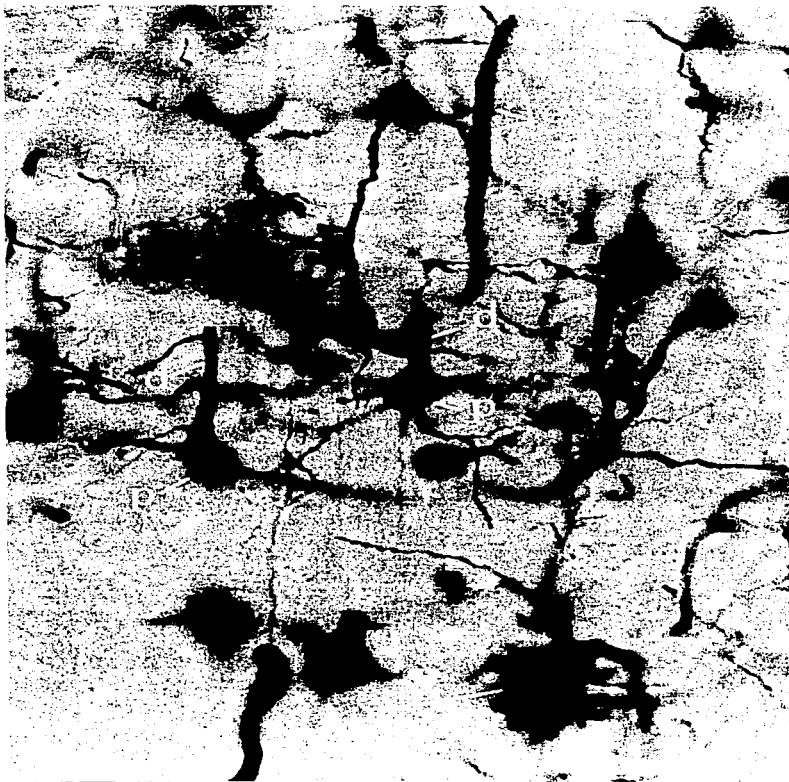
**Figura 14.** Corteza motora de un ratón control adulto, con la trayectoria normal de las columnas motoras (↑), al igual que las neuronas piramidales (p) de todas las capas, las células gliales (g) y el trayecto de los vasos sanguíneos (v). Golgi rápido modificado. Microscopía de interferencia según Nomarski. 385X.



**Figura 15.** Corteza motora de un ratón DZ, de 180 días, en el que se aprecia su menor espesor, la desorganización de las columnas motoras, la densidad menor de las neuronas piramidales (p), el aumento de la proporción de las células gliales (g) y el trayecto atípico de los vasos sanguíneos (v). Golgi rápido modificado. Microscopia de interferencia según Nomarski. 385X.



**Figura 16.** Corteza motora de ratón control de 180 días, en la que se observa una pirámide (p) con una dendrita apical larga (d), con espinas (e) abundantes y bien diferenciadas. Los vasos sanguíneos (v) tienen apariencia normal. Golgi rápido modificado. Microscopía de interferencia según Nomarski. 985X.



**Figura 17.** Corteza motora de un ratón DZ, de 180 días, en la que se encuentran cúmulos de pirámides (p) con dendritas apicales (d) engrosadas, y escasas espinas (e). Las células gliales (g), presentan ramificaciones gruesas y abundantes. Golgi rápido modificado. Microscopía de interferencia según Nomarski. 985X.

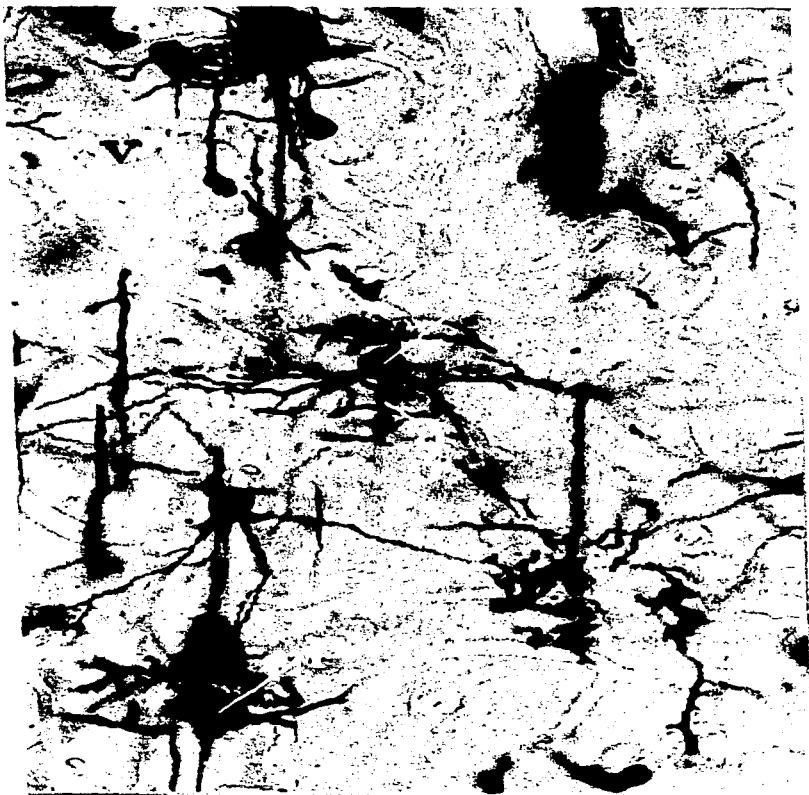
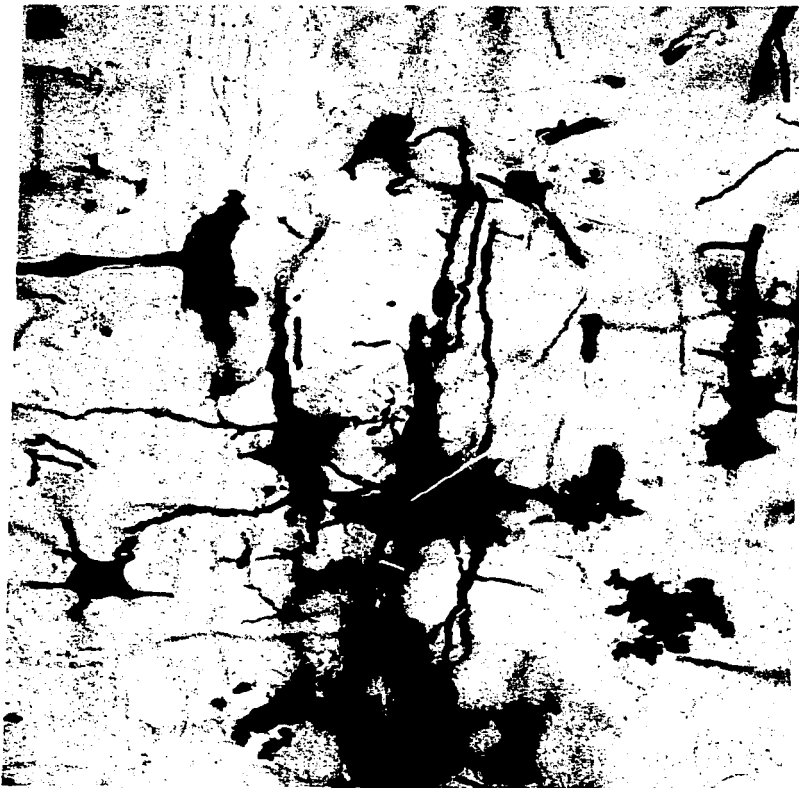


Figura 18. Corteza motora de un ratón control de 180 días, en la que se observan pirámides (p) con axones (a) y dendritas basales (d) muy ramificadas, con espinas dendríticas (e) numerosas, bien diferenciadas. Las células gliales (g) y los vasos sanguíneos (v) son normales. Golgi rápido modificado. Microscopía de interferencia según Nomarski. 985X.



**Figura 19.** Corteza motora de un ratón DZ, de 180 días, en el que se aprecia un grupo de pirámides (p) con dendritas basales (d) y apicales gruesas, al igual que el axón (a). Las espinas dendríticas (e) están pobremente desarrolladas. Los astrocitos protoplasmáticos (g) son grandes, con ramificaciones gruesas y cortas. Golgi rápido modificado. Microscopía de interferencia según Nomarski. 985X.

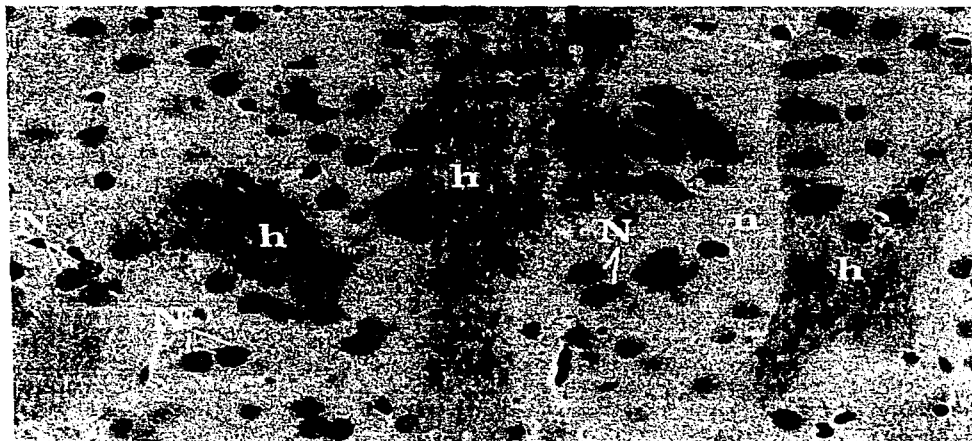


**Figura 20.** Astrocito protoplasmático de la corteza motora de un ratón control de 180 días, en el que se aprecia la arborización normal. Golgi rápido modificado. Microscopía de interferencia según Nomarski. 3,063X.

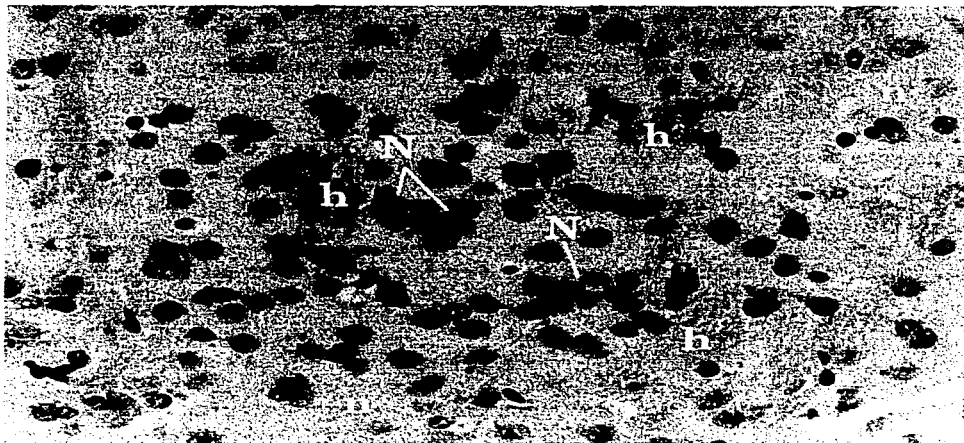


**Figura 21.** Astrocitos protoplasmáticos de la corteza motora de un ratón DZ, de 180 días, con ramificaciones muy abundantes y gruesas. Golgi rápido modificado. Microscopía de interferencia según Nomarski. 1,250X.





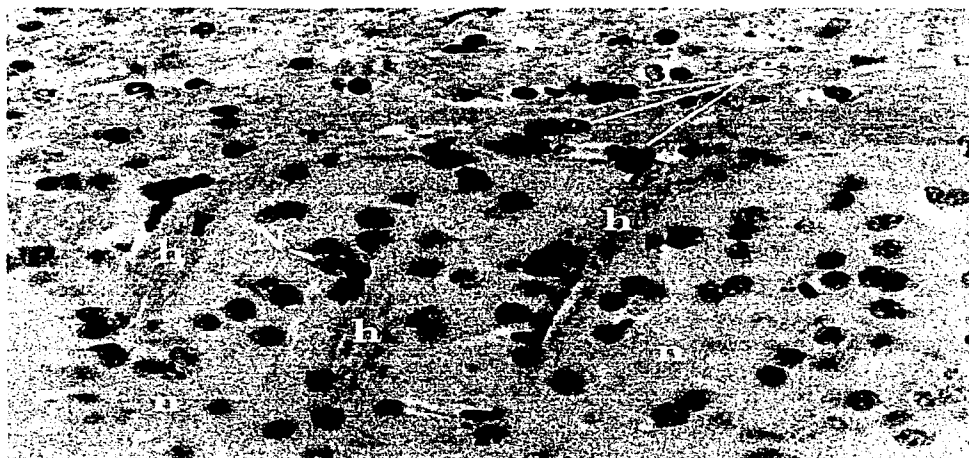
**Figura 22.** Cuerpo estriado de un ratón control de 240 días, en el que se observan neuronas (N) y neuropilo (n) con apariencia normal, dispersas entre haces de fibras gruesas (h). Hematoxilina-eosina, 510X.



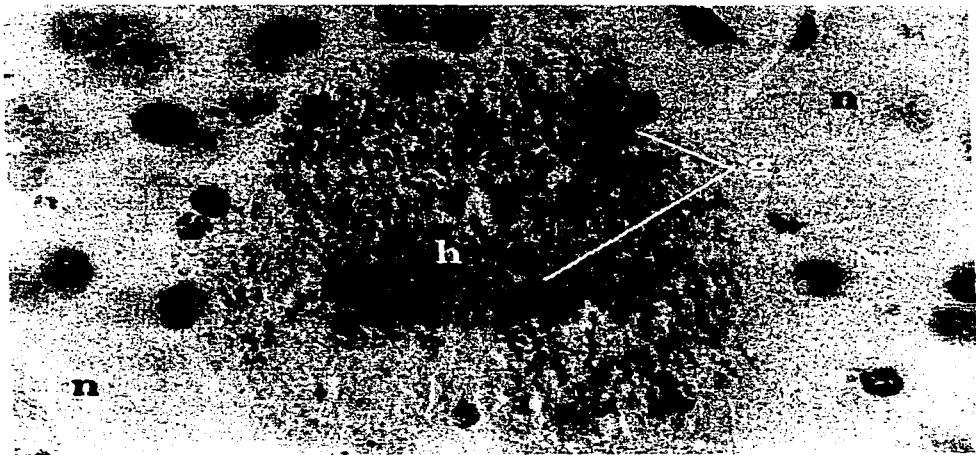
**Figura 23.** Cuerpo estriado de un ratón DZ, de 240 días, en el que se identifican neuronas (N) que forman cúmulos densos, dispersos entre el neuropilo (n) escaso. Los haces de fibras (h) son poco numerosas y delgadas. Hematoxilina-eosina. 510X.



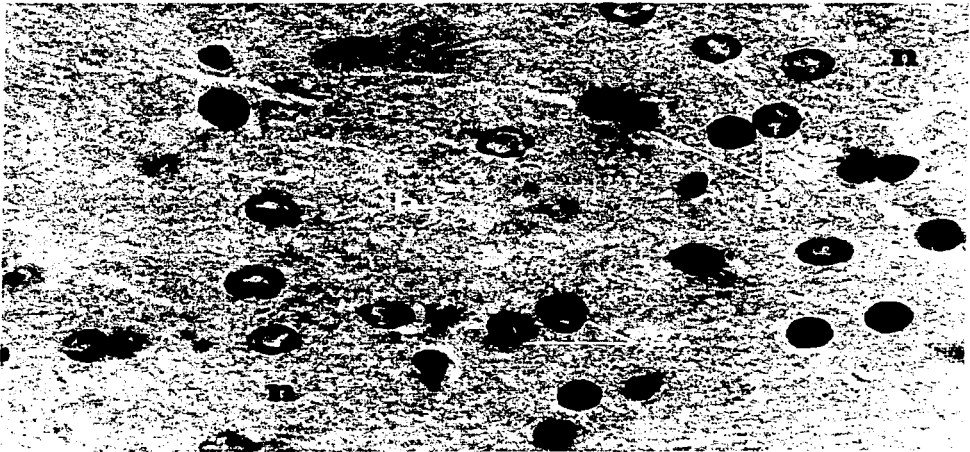
**Figura 24.** Cuerpo estriado de un ratón control de 240 días, en el que se observan las fibras (h) de la región periférica, con células gliales (g) colocadas en hileras paralelas a las fibras, algunas de las cuales forman haces entre las neuronas (N) y el neuropilo (n). La apariencia de las estructuras es normal. Hematoxilina-eosina. 510X.



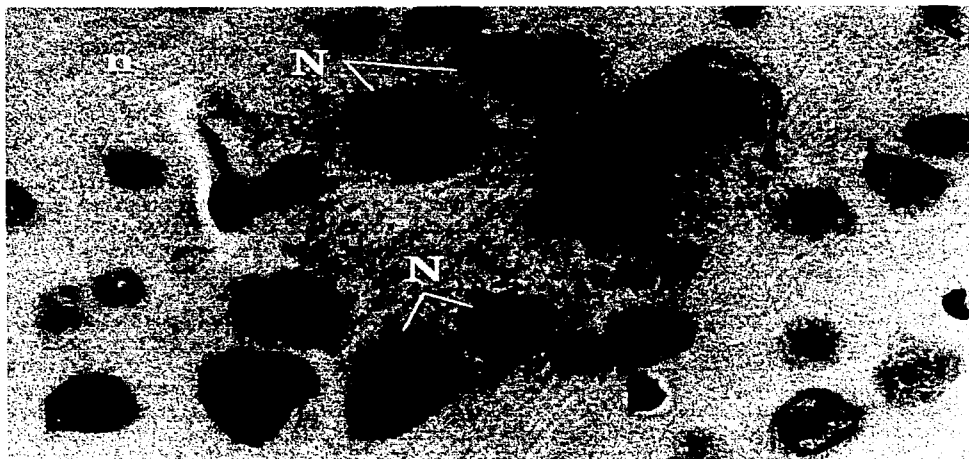
**Figura 25.** Cuerpo estriado de un ratón DZ, de 240 días, en el que se distinguen fibras (h) en la región periférica, localizadas entre las neuronas (N) y el neuropilo (n). Las fibras están acompañadas por abundantes células gliales (g) que forman hileras irregulares. Las neuronas se agrupan entre los escasos haces de fibras. El núcleo de estas células tienen la heterocromatina en grumos gruesos, intensamente teñidos. Hematoxilina-eosina. 510X.



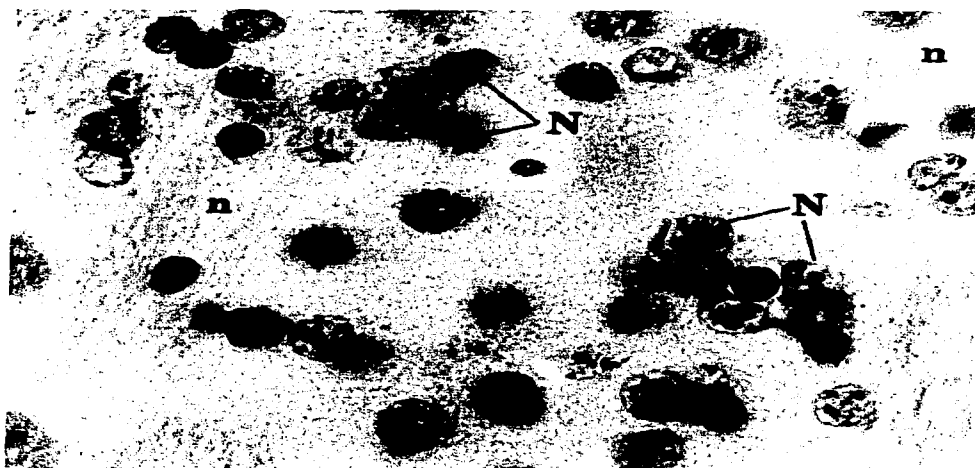
**Figura 26.** Cuerpo estriado de un ratón control de 240 día, en el que se observa un haz grueso de fibras (h) cortadas transversalmente, con células gliales (g) de forma, talla, distribución y heterocromatina de aspecto normal, al igual que lo es el neuropilo (n) y las neuronas (N). Hematoxilina-eosina. 985X.



**Figura 27.** Cuerpo estriado de un ratón DZ de 240 día, en el que se observa un haz de fibras (h) rodeado por abundantes células gliales (g), con núcleo voluminoso en el que la heterocromatina forma grumos muy gruesos distribuidos atípicamente, con frecuencia adheridos a la envoltura nuclear. El neuropilo (n) tiene una trama irregular. Hematoxilina-eosina. 985X.



**Figura 28.** Neuronas (N) del cuerpo estriado de un ratón control de 240 días, con la heterocromatina de apariencia normal, lo mismo que el neuropilo (n). Hematoxilina-eosina. 985X.



**Figura 29.** Grupos de neuronas (N) de un ratón DZ de 240 días, en la que los núcleos tienen heterocromatina formada por grumos gruesos. El neuropilo (n) presenta fibras irregulares. Hematoxilina-eosina. 985X.





**Figura 30.** Cuerpo estriado de un ratón control de 240 días, en el que se observan neuronas (N), con abundantes dendritas (d) y espinas (e) de apariencia normal. Golgi rápido modificado. 985X.



**Figura 31.** Neurona (N) del cuerpo estriado de un ratón DZ, de 240 días con dendritas (d) engrosadas, en las que no se observan espinas a lo largo de la superficie irregular. Golgi rápido modificado. 985X.



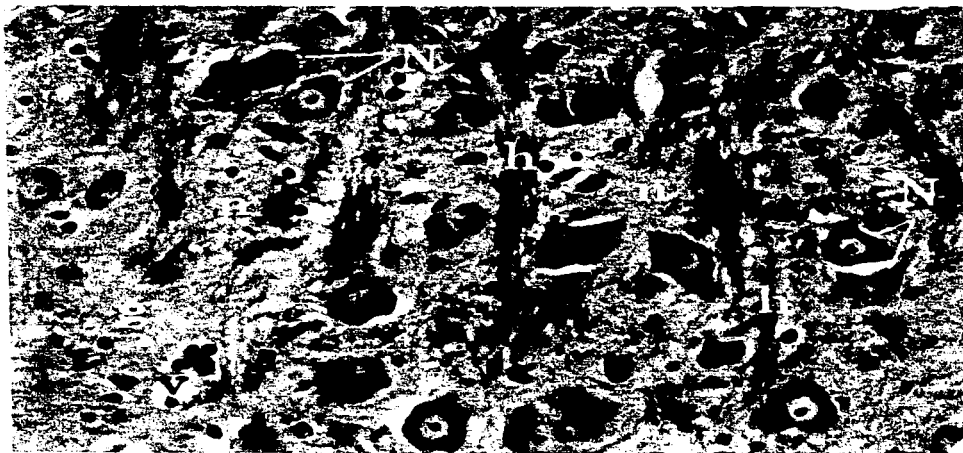
**Figura 32.** Cuerpo estriado de un ratón control de 240 días, en el que se observan abundantes dendritas (d) de las neuronas, con espinas (e) bien diferenciadas. Golgi rápido modificado. 985X.



**Figura 33.** Cuerpo estriado de un ratón DZ de 240 días, cuyas neuronas tienen dendritas gruesas (d) con espinas (e) poco desarrolladas. Golgi rápido modificado. 985X.



**Figura 34.** Núcleo rojo del mesencéfalo de un ratón control de 240 días, en el que se identifican neuronas gigantes (N) con citoplasma y núcleo característicos, al igual que las células gliales (g), los haces de fibras (h) y el neuropilo (n) con vainas de mielina de aspecto normal. Kluver-Barrera. 385X.



**Figura 35.** Núcleo rojo del mesencéfalo de un ratón DZ, de 240 días, en el que se observan las neuronas gigantes (N) de menor talla, con frecuencia en pares. Los haces de fibras (h) son irregulares y de poco grosor. El neuropilo (n) tiene vainas de mielina pobremente diferenciadas. Alrededor de los vasos sanguíneos (v) y asociados a las fibras, se encuentran cúmulos de células gliales (g). Kluver-Barrera. 385X.

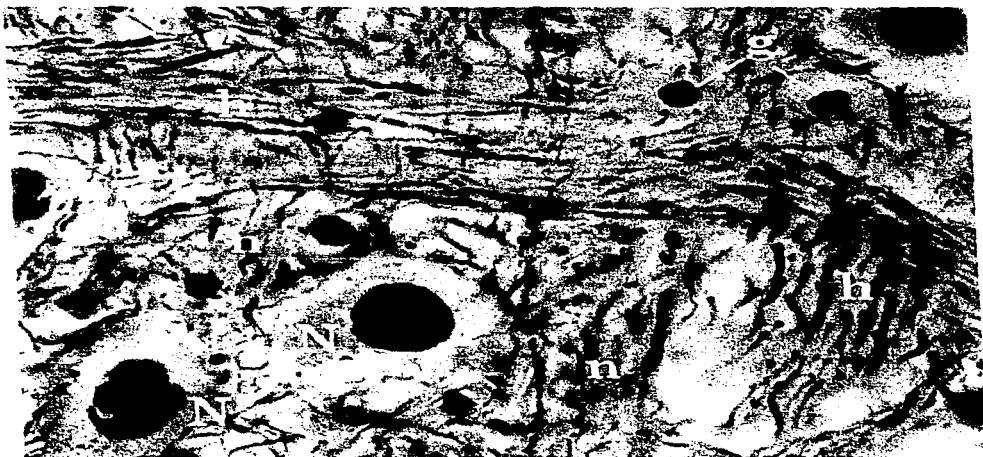


**Figura 36.** Detalle de la figura 32 en el que se observan neuronas gigantes (N) con el núcleo y el citoplasma de aspecto normal, lo mismo que las fibras de los haces (h), el neuropilo (n) y la glía (g). Kluver-Barrera. 2,042X.



**Figura 37.** Detalle de la figura 33, en el que se observan las neuronas gigantes (N) menos voluminosas que las de los ratones control. Alrededor se encuentran haces de fibras irregulares (h). El neuropilo (n) presenta vainas de mielina sinuosas. Kluver-Barrera. 2,042X.

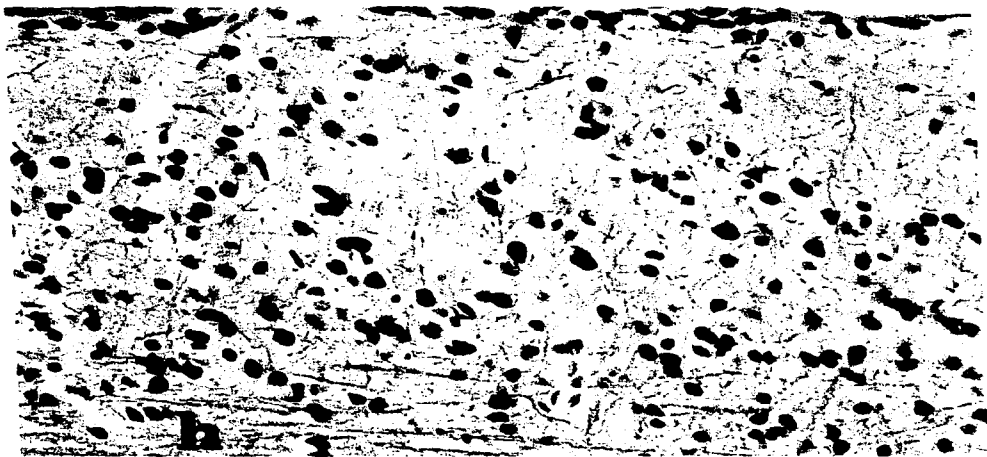




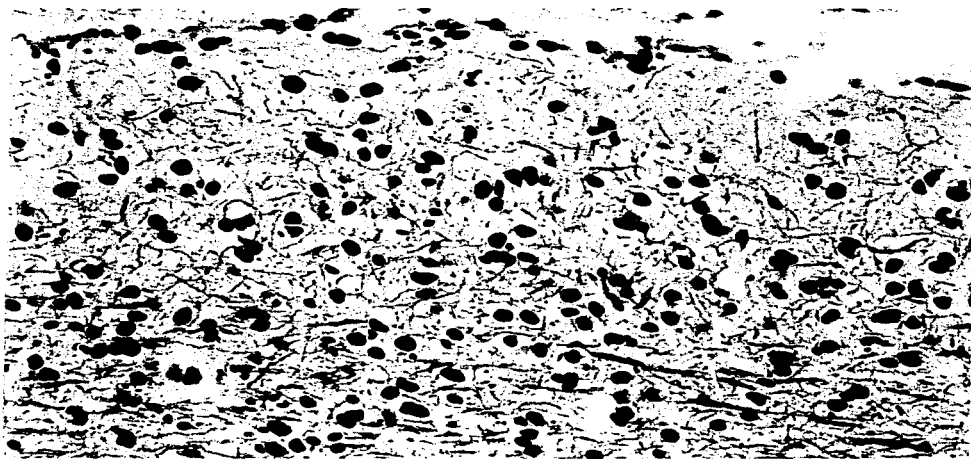
**Figura 38.** Núcleo rojo mesencefálico de un ratón control, de 240 días, en el que se observan neuronas gigantes (N) con el núcleo y la cromatina bien definida. Alrededor de las neuronas se encuentran haces de fibras (h), el neuropilo (n) y células gliales (g) con características normales. Bodian. 985X.



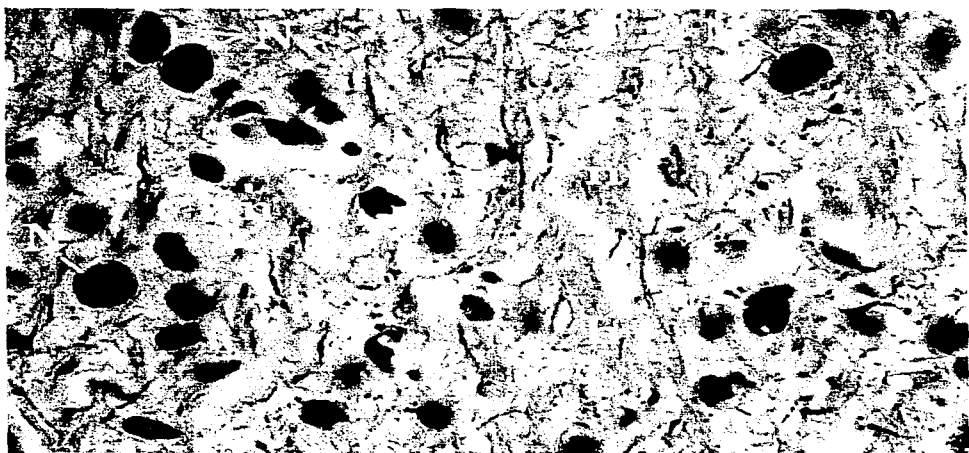
**Figura 39.** Núcleo rojo mesencefálico de un ratón DZ, de 240 días, en el que se observan las neuronas gigantes (N) en número mayor por campo de menor tamaño. El núcleo presenta la heterocromatina en grumos gruesos adheridos a la envoltura nuclear. Las fibras de los haces (h) y las del neuropilo (n) son escasas, engrosadas y sinuosas. Las células gliales (g) son más abundantes. Bodian. 985X.



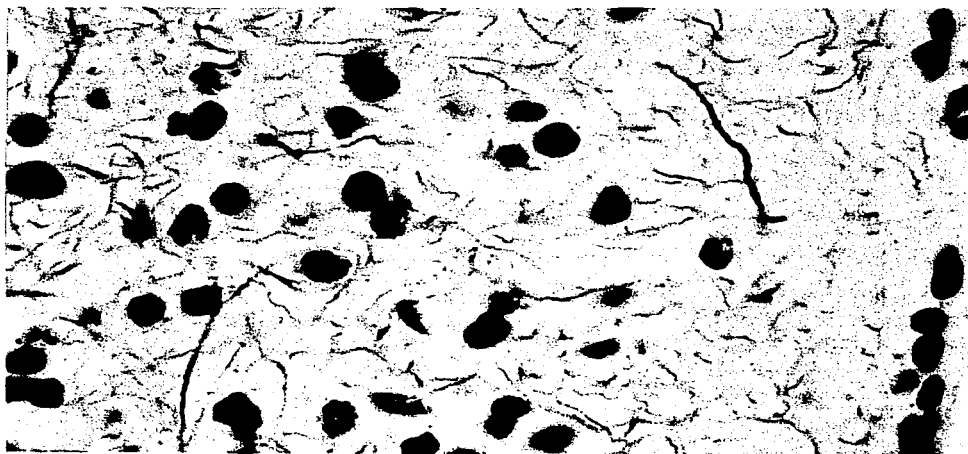
**Figura 40.** Región cortical del colículo superior de un ratón control de 240 días, con neuronas (N), células gliales (g) y fibras con características normales como las que forman haces con trayectos paralelos. Bodian. 194X.



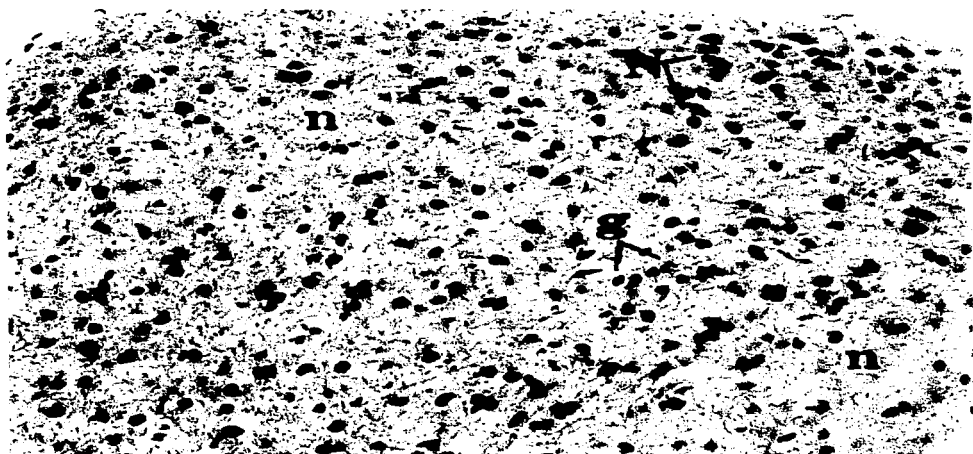
**Figura 41.** Región cortical de un colículo superior de un ratón DZ, de 240 días, con neuronas (N) y células gliales (g) en las que el núcleo tiene la cromatina intensamente teñida. Las fibras (f) son escasas, sinuosas, con un trayecto que no es paralelo como en el de los ratones del grupo control. Bodian. 194X.



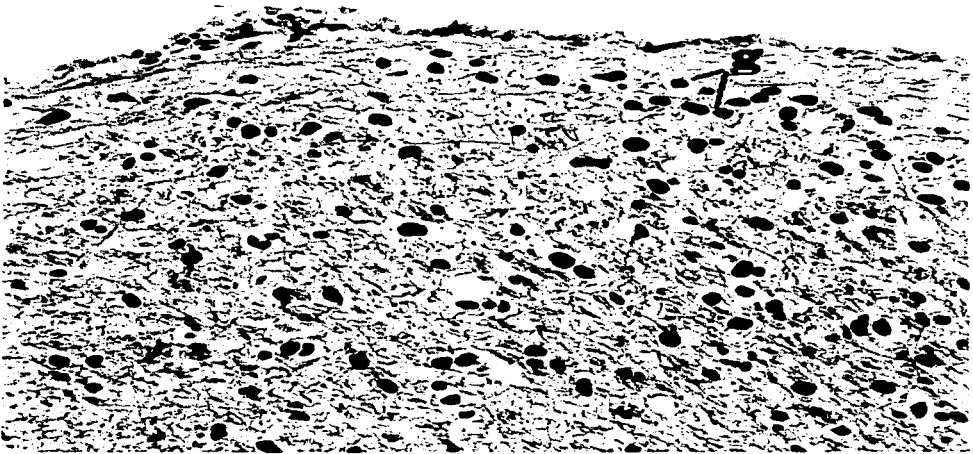
**Figura 42.** Coliculo superior de un ratón control de 240 días, en el que se observan las neuronas (N) células gliales (g) con el núcleo de talla y cromatina de aspecto normal. Los haces de fibras (h) son paralelas y el neuropilo (n), tienen una estructura típica. Bodian. 985X.



**Figura 43.** Colículo superior de un ratón DZ, de 240 días, en el que se identifican abundantes neuronas (N) y células gliales (g) con el núcleo menos voluminosos que los del control. La heterocromatina tiene grumos gruesos teñidos intensamente, distribuidos atípicamente. Las fibras del neuropilo (n) son sinuosas y forman una trama poco densa e intensamente argentafín. Bodian. 985X.

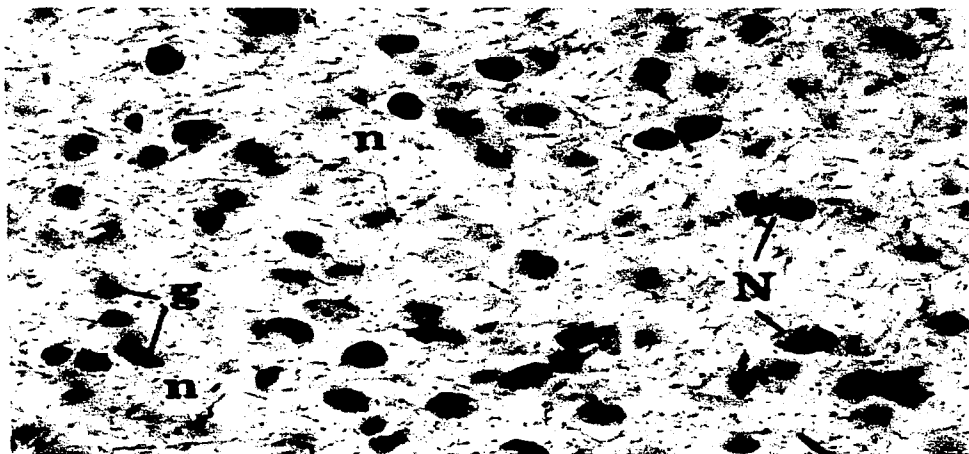


**Figura 44.** Colículo inferior de un ratón control de 240 días, en el que se aprecia la población normal de las neuronas (N), las células gliales (g) y las fibras que forman un neuropilo (n) de trama densa. Bodian. 194X.

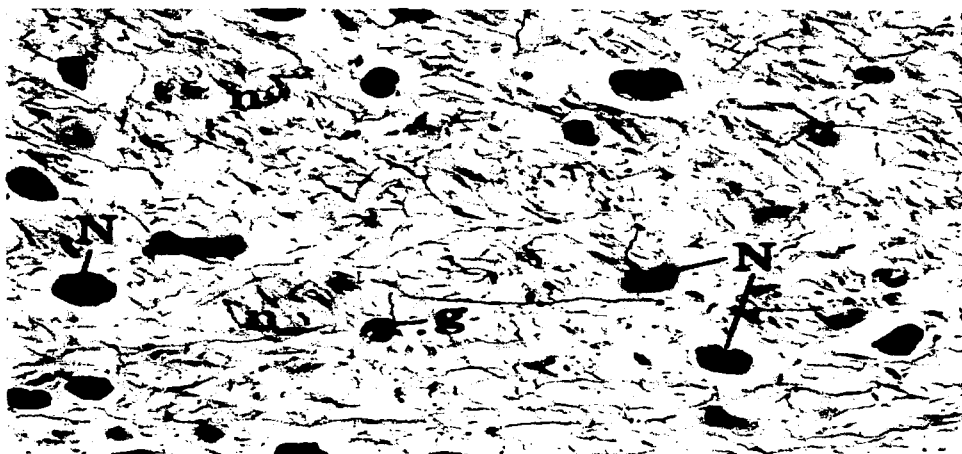


**Figura 45.** Colículo inferior de un ratón DZ, de 240 días, en el que se observa una reducción de la población neuronal (N) y de la glial (g), con núcleos intensamente teñidos. Las fibras engrosadas e irregulares forman un neuropilo (n) con una trama poco densa. Bodian. 194X.

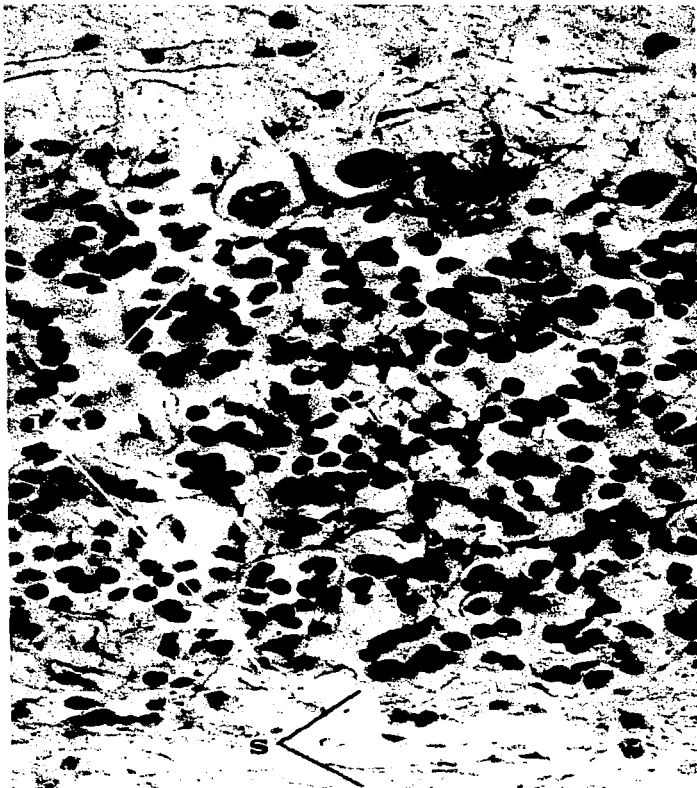




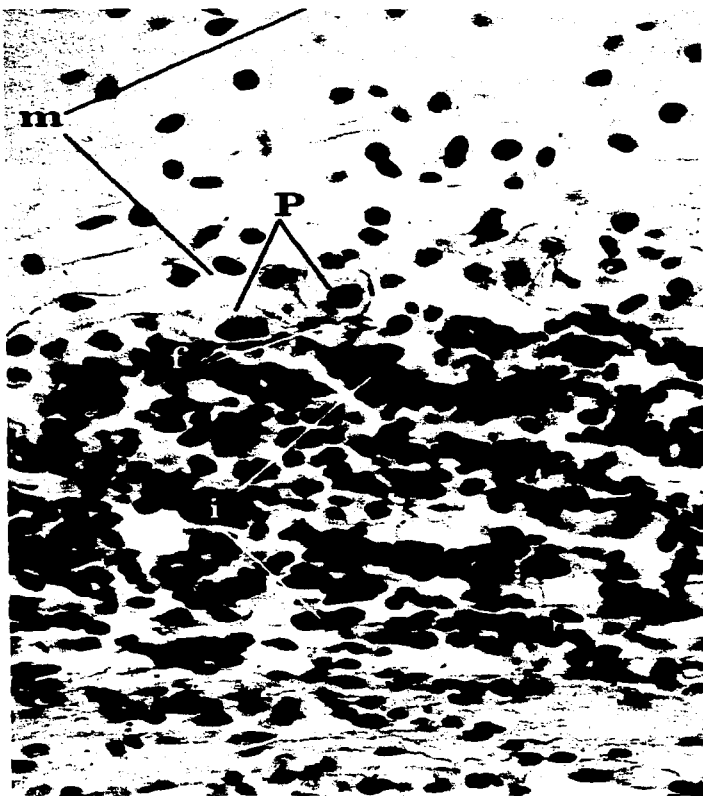
**Figura 46.** Colículo inferior de un ratón control de 240 días, que en la región superficial presenta neuronas (N), glía (g) y neuropilo (n) con características normales. Bodian. 985X.



**Figura 47.** Coliculo inferior de un ratón DZ, de 240 días, en el que se observan neuronas (N) y células gliales (g) escasas y con la cromatina en grumos gruesos. La trama del neuropilo (n) está formada por fibras irregulares y menos numerosas que las de los controles. Bodian. 9085X.



**Figura 48.** Corteza cerebelar de un ratón control, de 180 días, en el que se observan las características normales, de la capa molecular (m), de las células de Purkinje (P), la capa granulosa interna (i) y la sustancia blanca (s). Bodian. 385X.



**Figura 49.** Corteza cerebelar de un ratón DZ de 180 días, en el que se aprecia la capa molecular (m) con fibras paralelas y granos que no migraron a la capa granulosa interna (i) adelgazada y con los granos en cúmulos. Las células de Purkinje (P) son escasas, retraídas y están rodeadas por una canastilla de fibras (f) poco desarrollada. La sustancia blanca (s) tiene fibras irregulares acompañadas por células gliales (g) abundantes. Bodian. 385X.



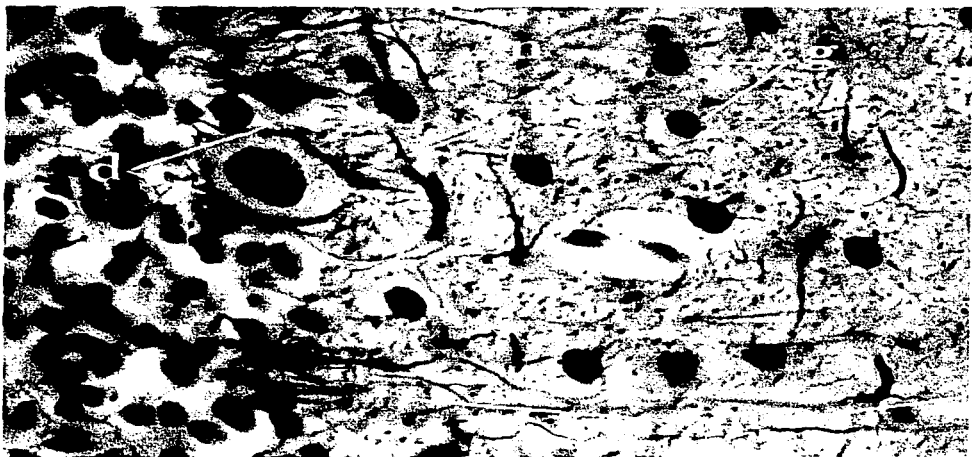
**Figura 50.** Detalle de la figura 46 en el que se observan las características normales de la capa molecular (m) con los árboles dendríticos de las células de Purkinje, las fibras paralelas (f) y las células estelares (e). Las células de Purkinje (P) en forma de botella, con el núcleo voluminoso, rodeadas por numerosas dendritas (d) de las células en canasta. En la capa granulosa interna (i) los núcleos están bien diferenciados. Bodian. 985X.



**Figura 51.** Corteza cerebelar de un ratón DZ, de 180 días, en el que se observan numerosos granos (g) que no migraron de la capa molecular (m) a su posición definitiva. En la misma capa se encuentran las fibras paralelas (f) y el neuropilo (n) con una trama engrosada e irregular. Las células de Purkinje (P) tienen el núcleo lobulado. Alrededor de estas células, se aprecian dendritas (d) gruesas y escasas. Los núcleos de los granos están muy teñidos. Bodian 985X.



Figura 52. Corteza cerebelar de un ratón control adulto de 180 días. Apariencia normal de la capa molecular (m), las fibras paralelas (f), las células de Purkinje (P), las dendritas (d) que las rodean y los granos (g). Bodian. 985X.

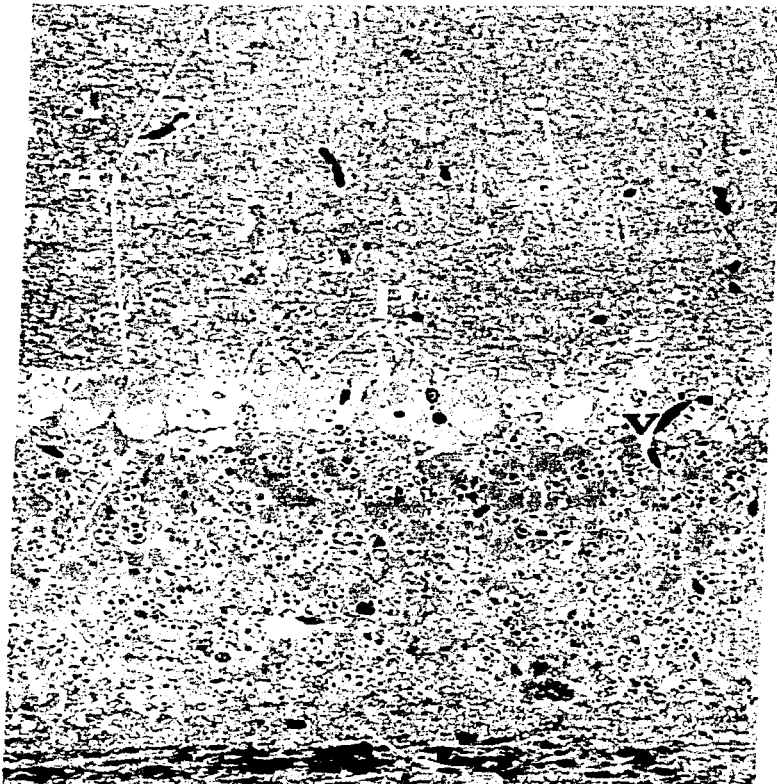


**Figura 53.** Corteza cerebelar de un ratón DZ de 180 días, en el que se observan numerosos granos (g) persistentes en la capa molecular (m), fibras paralelas (f) y neuropilo (n) con una trama sinuosa al igual que las dendritas (d) que las células en canasta que rodean a las células de Purkinje. Bodian. 985X.





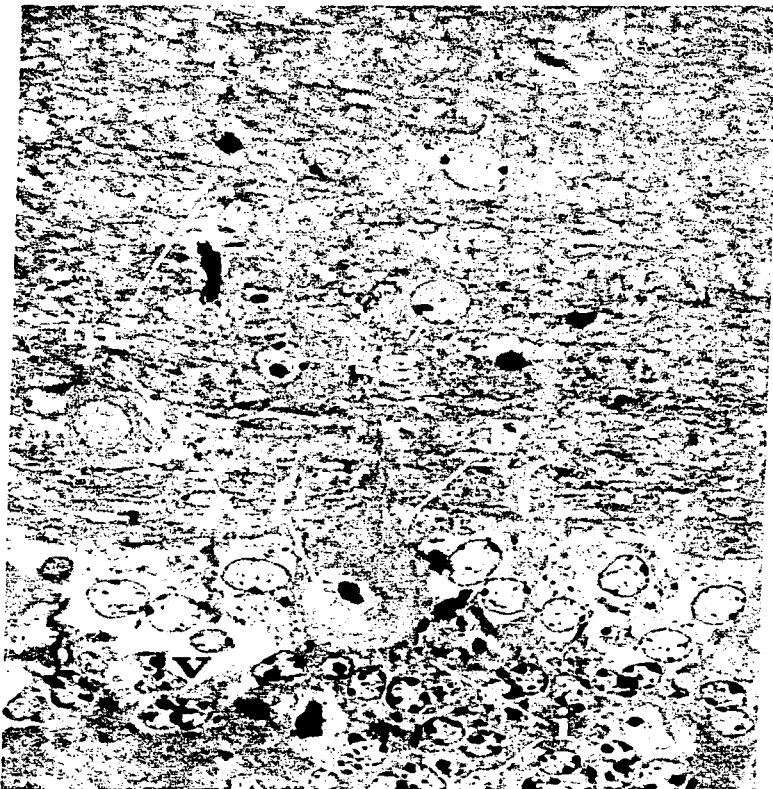
**Figura 54.** Corte semifino de la corteza cerebelar de un ratón control de 180 días, en el que se observa la estructura normal de la capa molecular (m), las células de Purkinje (P), la capa granulosa interna (i), la substancia blanca (b) con fibras mielinizadas y vasos sanguíneos (v). Azul de toluidina. 385X.



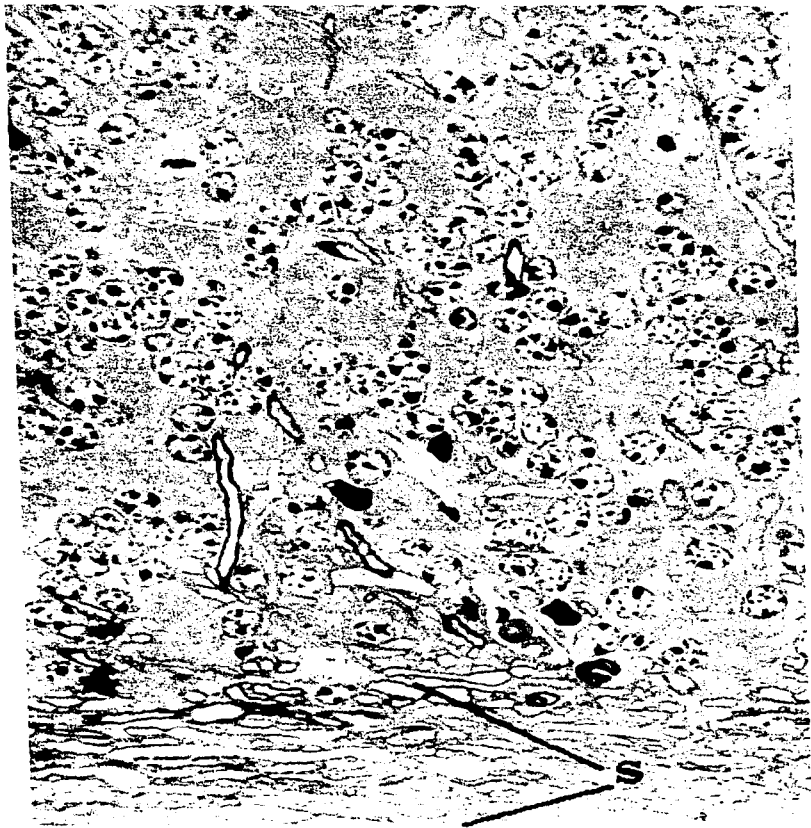
**Figura 55.** Corteza cerebelar de un ratón DZ, de 180 días, en el que se observa la capa molecular (m), con una trama reticular formada por fibras sinuosas. Se pueden identificar granos (g) que no migraron. Entre las células de Purkinje (P) y los granos (g) se encuentran espacios vacuolares (v). En la capa granulosa interna (i) y la sustancia blanca (b), las fibras tienen vainas de mielina engrosadas. Azul de toluidina 385X.



Figura 56. Detalle de la figura 52 en el que se aprecia el aspecto normal de la capa molecular (m), las células de Purkinje (P), la capa granulosa interna (i) y las fibras mielinizadas (f). Azul de toluidina. 985X.



**Figura 57.** Detalle de la figura 53 en el que se identifica la capa molecular (m) formada por fibras sinuosas y escasas, entre las que se encuentran núcleos voluminosos de granos (g). Las células de Purkinje (P) son escasas, su núcleo (n) es lobulado. En las células de la granulosa interna (i) los núcleos tienen grumos gruesos de cromatina. Las células que están en contacto con las de Purkinje están vacuolizadas (v). Azul de toluidina. 985X.



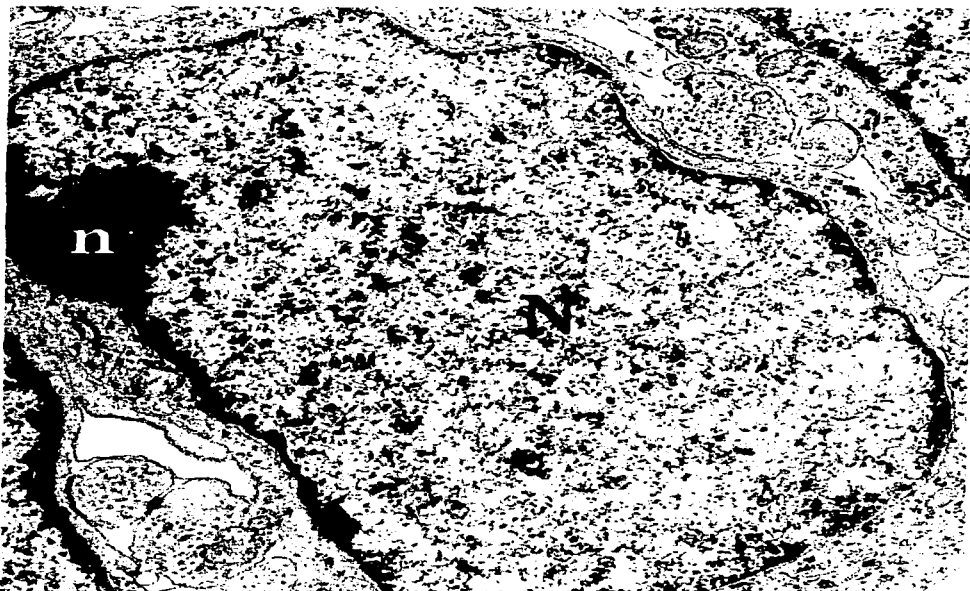
**Figura 58.** Corteza cerebelar de ratón control de 180 días, en el que se observan las características normales de los núcleos de los granos (g), de las células de Golgi (G) y de las fibras mielinicas (f) que atraviesan la capa granulosa interna y la sustancia blanca (s). Azul de toluidina. 985X.



**Figura 59.** Corteza cerebelar de ratón DZ de 180 días, en la que se observan los granos (g) de la capa granulosa interna y las células de Golgi (G) con núcleos voluminosos. Las fibras mielinizadas (f) de la sustancia blanca (s) tienen vainas con una capa de mielina gruesa e irregular. Azul de toluidina. 985X.

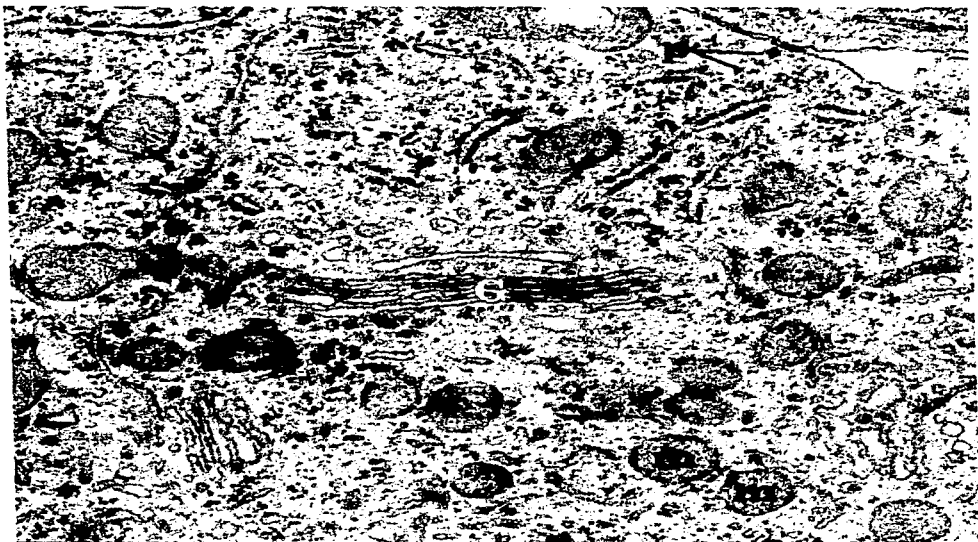


**Figura 60.** Cerebelo de un feto de ratón control, de 18 días, en el que se observan las características normales del núcleo (N) y del citoplasma de una células de Purkinje. Microscopía electrónica de transmisión. 28,750X.



**Figura 61.** Cerebelo de un feto de ratón DZ de 18 días, en el que se aprecia el Núcleo (N) irregular de una célula de Purkinje con nucléolo (n) voluminoso. Microscopía electrónica de transmisión. 28,750X.

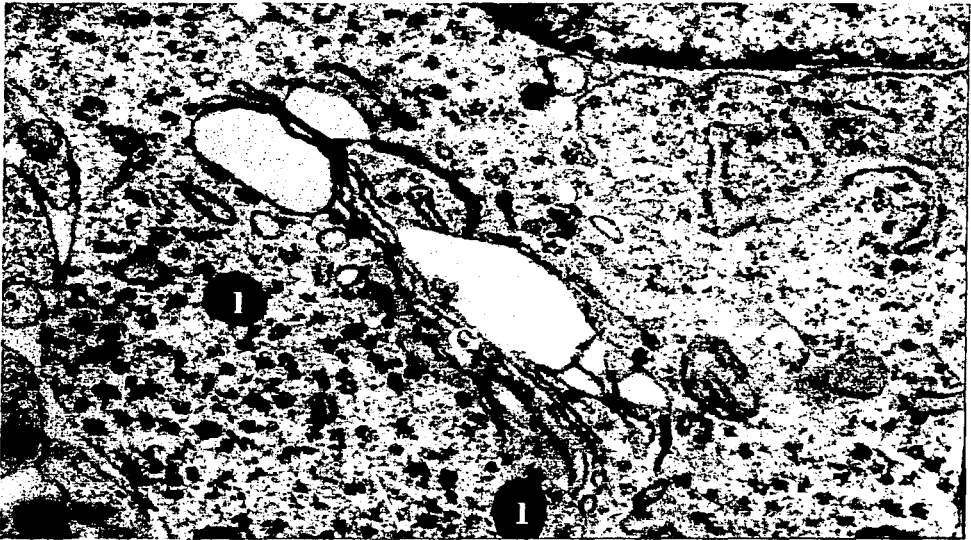




**Figura 62.** Cerebelo de un feto control de ratón de 18 días, en el que se observan las características normales del complejo de Golgi (G), el retículo endoplásmico rugoso (r), polirribosomas (p) y mitocondrias (m) de una célula de Purkinje. Microscopia electrónica de transmisión. 52,250X.



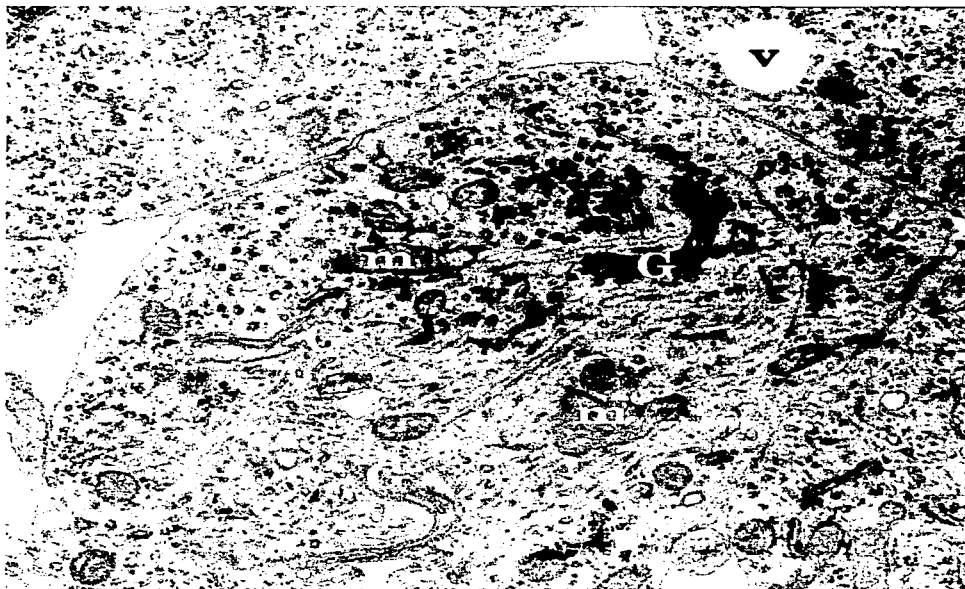
**Figura 63.** Cerebelo de un feto DZ de 18 días, en el que se aprecian las cisternas del complejo de Golgi (G) hinchadas y abundantes, polirribosomas (p) y lisosomas (l) del citoplasma de una célula de Purkinje. Microscopía electrónica de transmisión. 56,250X.



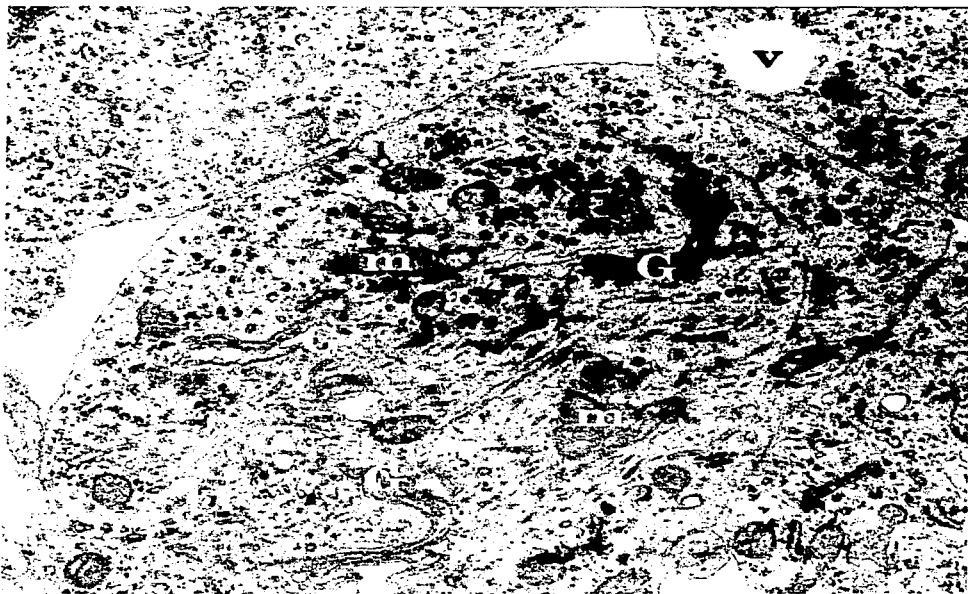
**Figura 64.** Cerebelo de un feto DZ, de 18 días, el que se observa el complejo de Golgi (G) con cisternas dilatadas de una célula de Purkinje, lisosomas (l), polirribosomas (p) abundantes y retículo endoplásmico rugoso (r) distendido. Microscopía electrónica de transmisión. 56,250.



**Figura 65.** Cerebelo de un feto DZ de 18 días en el que se observa el retículo endoplásmico rugoso (r) con cisternas dilatadas, mitocondrias (m) y polirribosomas (p) abundantes de una célula de Purkinje. Microscopía electrónica de transmisión. 28,750X.



**Figura 66.** Cerebelo de un feto DZ de 18 días, en el que se observan abundantes grupos de cisternas del complejo de Golgi (G), mitocondrias hinchadas (m), una vacuola (v) con membrana bien definida y el núcleo de un grano. Microscopía electrónica de transmisión. 28,750X.



**Figura 67.** Cerebelo de un feto DZ de 18 días, con grupos de cisternas y vesículas del complejo de Golgi dilatadas (G), mitocondrias hinchadas (m), polirribosomas (p) abundantes y una vacuola (v), en citoplasma de los granos. Microscopía electrónica de transmisión. 28,750X.



**Figura 68.** Cerebelo de un feto control de 18 días, en el que se aprecia el aspecto normal de los botones sinápticos (s) y de las dendritas (d) presentes entre los granos. Microscopía electrónica de transmisión. 50,000X.

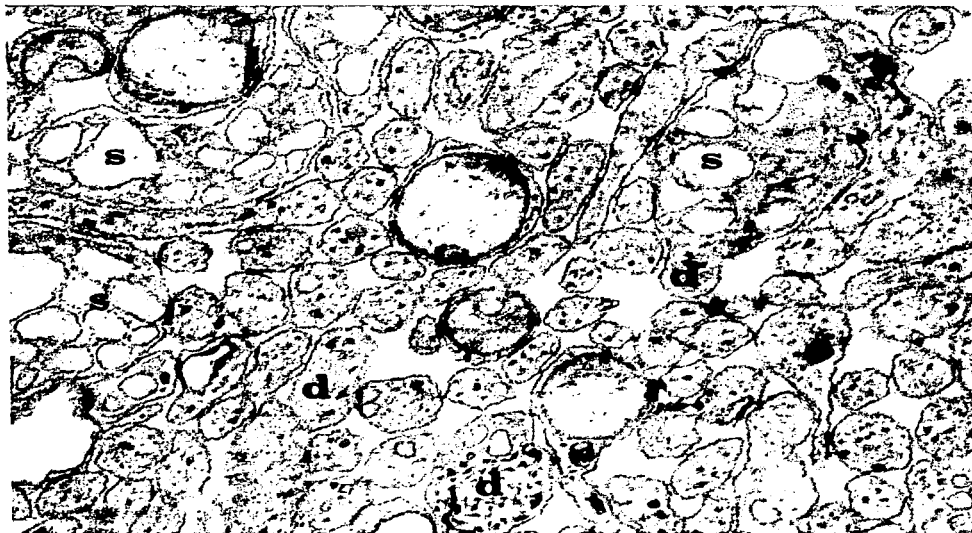


**Figura 68.** Cerebelo de un feto control de 18 días, en el que se aprecia el aspecto normal de los botones sinápticos (s) y de las dendritas (d) presentes entre los granos. Microscopía electrónica de transmisión. 50,000X.

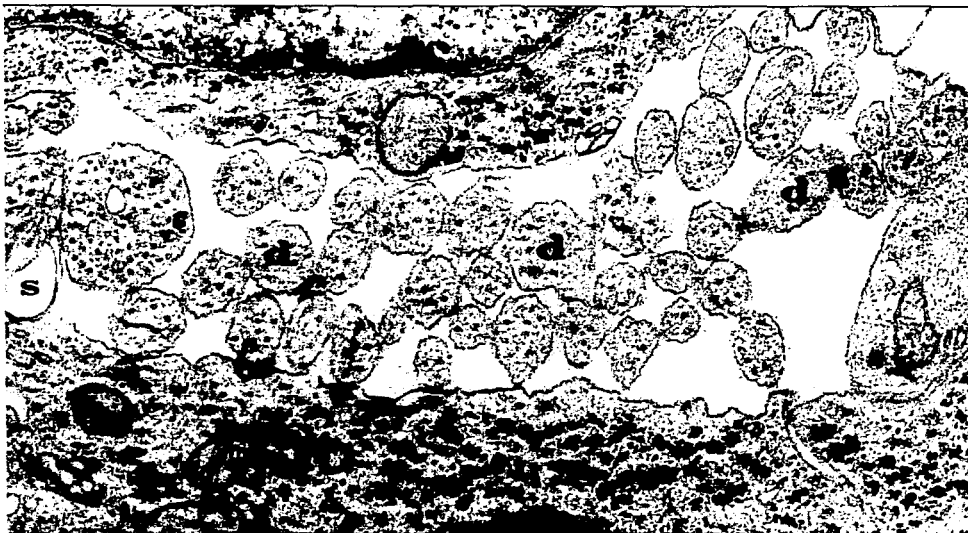




**Figura 69.** Cerebelo de un feto DZ de 18 días, en el que se observan algunos botones sinápticos (s) y dendritas (d) escasas, mitocondrias con crestas alteradas (m) y lisosomas (l) muy electrodenso localizados entre los granos. Microscopía electrónica de transmisión. 50,000X.



**Figura 70.** Cerebelo de un feto control de 18 días, con abundantes dendritas (d) y botones sinápticos (s) del neuropilo normal localizado entre los granos. Microscopía electrónica de transmisión. 50,000X.



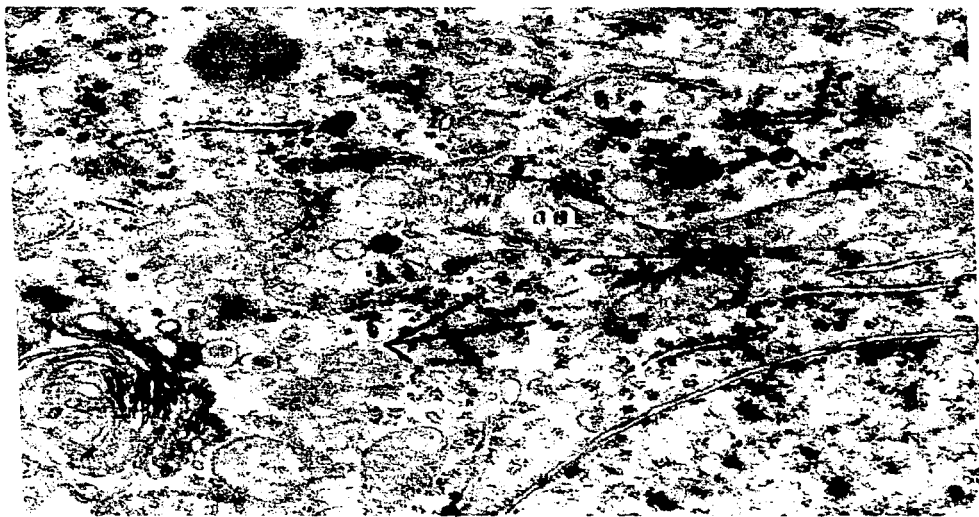
**Figura 71.** Cerebelo de un feto DZ de 18 días, con dendritas (d) escasas y algunos botones sinápticos (s) presentes entre los granos. Microscopía electrónica de transmisión. 50,000X.



**Figura 72.** Cerebelo de un ratón control de 180 días, en el que se observa una célula de Purkinje (P) con el núcleo (N) y citoplasma normales. Microscopía electrónica de transmisión. 9,250X.



**Figura 73.** Cerebelo de un ratón adulto DZ, de 180 días, en el que se observa una célula de Purkinje (P) con el núcleo (N) con la cromatina en grumos gruesos. Las mitocondrias (m) están hinchadas al igual que otros organelos. Microscopía electrónica de transmisión. 9,250X.



**Figura 74.** Cerebelo de un ratón control de 180 días, en el que se observan las características normales del citoplasma de una célula de Purkinje en la que se encuentra el complejo de Golgi (G), retículo endoplásmico rugoso (r), polirribosomas (p), mitocondrias (m). Microscopía electrónica de transmisión. 56,250X.

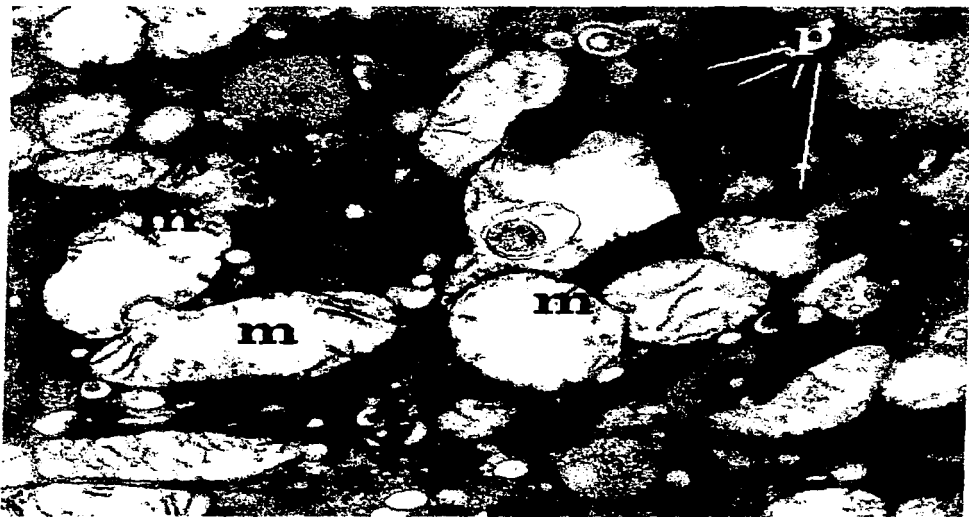


**Figura 75.** Cerebelo de un ratón DZ, de 180 días, en el que se observa el citoplasma de una célula de Purkinje en la que el retículo endoplásmico rugoso (r), al igual que las cisternas del complejo de Golgi (G). Las mitocondrias (m) están hinchadas y los polirribosomas (p) son abundantes. Microscopía electrónica de transmisión. 56.250X.

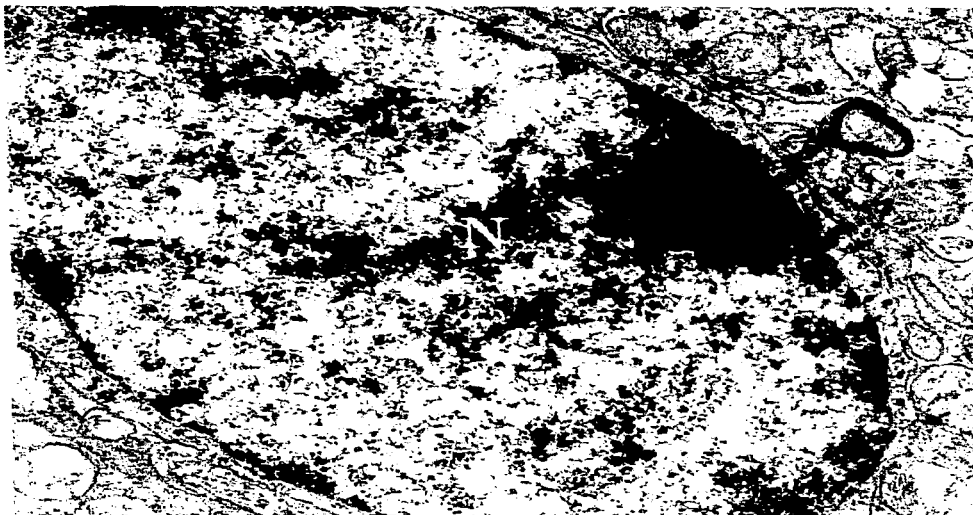


**Figura 76.** Cerebelo de un ratón control, de 180 días, en el que se observa el citoplasma de una célula de Purkinje con polirribosomas (p) mitocondrias (m) y retículo endoplásmico rugoso (r) de aspecto normal. Microscopía electrónica de transmisión. 56,250X.

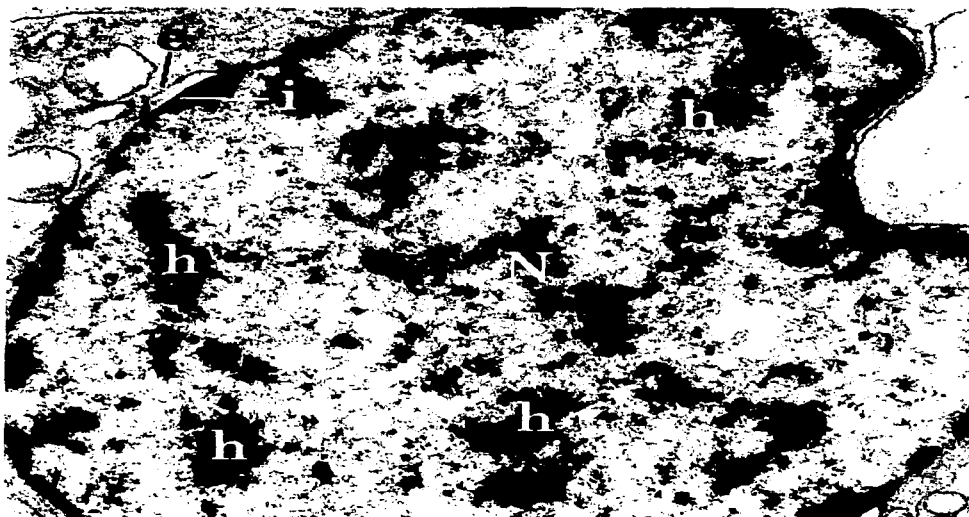




**Figura 77.** Cerebelo de un ratón DZ, de 180 días, en el que se observan el citoplasma de una célula de Purkinje en la que se observan abundantes polirribosomas (p) y mitocondrias (m) hinchadas y crestas alteradas. Microscopía electrónica de transmisión. 56,250X.



**Figura 78.** Cerebelo de un ratón control de 180 días, de edad en el que se observa el núcleo (N) de un grano de la capa granulosa interna con aspecto normal. Microscopía electrónica de transmisión. 31,250X.



**Figura 79.** Cerebelo de un ratón DZ de 180 días, en el que se observa el núcleo (N) lobulado de un grano de la capa granulosa interna con la heterocromatina (h) distribuida atípicamente y la capa externa (e) de la envoltura nuclear separada de la interna (i). Microscopía electrónica de transmisión. 31250X.



**Figura 80.** Cerebelo de un ratón control de 180 días, en el que se aprecian en la sustancia blanca las vainas de mielina (v) bien desarrolladas con microfilamentos (→) y mitocondrias (m) de aspecto normal. Microscopía electrónica de transmisión, 56,250X.



**Figura 81.** Cerebelo de un ratón DZ de 180 días, en el que se observa la sustancia blanca con vainas de mielina (v) con láminas desorganizadas, microfilamentos (→) engrosados y mitocondrias (m) hinchadas y crestas mitocondriales alteradas. Microscopía electrónica de transmisión. 56,250X.

## Discusión

Las alteraciones de la cromatina presentes en los fetos tratados *in utero*<sup>10a-12a</sup> con diazepam, que persisten en los ratones adultos, podrían deberse a que este fármaco produce rupturas cromosómicas, como las observadas *in vitro* en linfocitos a los que se les agregaron concentraciones de diazepam, de 0.1, 1.0, 10.0 y 20.0 µg/ml del medio de cultivo, en los que se encontró aumento de isocromosomas y rupturas, sobre todo en los cultivos a los que agregaron las dosis de 10 y 20 µg/ml de medio de cultivo<sup>10a</sup>.

Las rupturas que se observaron como brechas (gaps), fragmentación en los brazos de las cromátidas y a nivel de los telómeros de las isocromátidas, se presentaron con mayor frecuencia en algunos cromosomas como los del grupo C y el cromosoma X, después en los del grupo A, los del B y D, los E y en una proporción de 1% en los de los grupos F y G<sup>10a</sup>.

En un estudio *in vivo* realizado en 23 pacientes que tomaron diazepam en dosis de 4 a 40 mg diarios, durante periodos de 0.5 a 36 meses, como tranquilizante o miorrelajante, detectaron 15.3% de rupturas cromosómicas en uno de ellos, quién lo había ingerido en dosis de 30 mg durante 18 meses. Aunque en la sangre periférica desaparecieron las rupturas seis meses después de suspender el tratamiento<sup>20a</sup>; esto no significa que en otros tejidos del cuerpo en los que se acumula el diazepam, como son los ricos en lípidos, puedan persistir las aberraciones cromosómicas, y en particular en el sistema nervioso central.

En otros estudios realizados en ovocitos de ratón, tratados *in vitro* con dosis de diazepam de 1.0, 10.0, 30.0, 50.0, 100.0 y 200.0 µg/ml, se encontró que se detenía la meiosis en metafase I,

en un 18.1% de las células con la dosis de 30.0 mg/ml, de los que degeneraron el 1.5%. Con dosis de 50 µg/ml se detuvo el 26.6% y degeneró el 13.3%. Con la dosis de 100 µg/ml se detuvo el 7.7%, degeneró el 88% y no llegaron a la metafase II que en este caso fueron efectos tóxicos por ser dosis muy altas<sup>20a</sup>.

Sin embargo, en la actualidad se tiene un registro cada vez mayor de personas que utilizan dosis superiores a las terapéuticas, como es la de 50 mg/kg diarias utilizadas durante periodos de 10 o más años. Un ejemplo de lo anterior es el de un paciente depresivo, que falleció a los 50 años de edad. En este paciente en quien se estudió su corteza cerebral, la cerebelar y el cuerpo estriado a nivel histológico y ultraestructural, se comprobó que las neuronas tenían alteraciones semejantes a las de fetos y ratones adultos tratados prenatalmente con diazepam. Los grumos de cromatina eran gruesos, se dispersaban entre el nucleoplasma, y se adherían a la envoltura nuclear. Los organelos citoplásmicos presentaron signos de degeneración, ya que las mitocondrias estaban hinchadas, el retículo endoplásmico distendido, había aumento en la cantidad de cisternas del complejo de Golgi y las fibras mielínicas tenían láminas engrosadas y disgregadas en una forma similar a la observadas en los fetos y ratones adultos expuestos *in utero* al diazepam<sup>12a</sup>.

En otros estudios realizados para demostrar la acción mutagénica del diazepam sobre linfocitos, se administraron por periodos de 8 a 96 horas o de siete días el fármaco, en dosis de 12 a 50 mg/día, encontraron resultados negativos, lo que no significa que el diazepam no produzca aberraciones en otros tejidos

de los pacientes tratados, que por esta metodología no se pueden detectar<sup>193,219</sup>.

Por un estudio teórico (inédito) realizado con Silicon Graphics, en el Instituto de Química de la UNAM, se demostró la probabilidad de que el diazepam forme aductos con el ADN, que pueden romper sus cadenas, en sentido transversal. lo anterior podría ser una de las causas de las rupturas cromosómicas demostradas por otros autores, de la apariencia de la cromatina de la neuronas y glía de las zonas del encéfalo estudiadas, y la persistencia postnatal de estas alteraciones. El hecho de presentarse con mayor frecuencia en algunos cromosomas y sitios específicos de estos, probablemente sea la razón por la cual los resultados son altamente reproducibles en todos los experimentos realizados durante más de 10 años en el laboratorio de Embriología de la Facultad de Medicina de la UNAM.

El mismo estudio reveló la probabilidad de que el diazepam bloquee la síntesis de la aminoacilsintetasa, responsable de unir los aminoácidos al ARN, lo que sería una de las causas de interferencia de este fármaco en la síntesis de proteínas, en especial de la miosina pesada y de la actina, que son componentes del citoesqueleto de todas las células, incluyendo las del sistema nervioso central. En este sistema altera la migración de las células neuroepiteliales durante la neurohistogénesis, puesto que las células gliales forman la glía radiada, en especial la de Bergman del cerebelo, responsable de guiarlas hasta su posición definitiva, que en los ratones estudiados no se realizó en forma normal.

Las alteraciones de la glía radiada permiten explicar la falta de orientación de las neuronas e interneurona de las columnas motoras de la corteza cerebral: la persistencia de granos en la capa

molecular del cerebelo, originalmente ocupada por estos, que constituyen hasta el nacimiento la capa granulosa externa. Asimismo causaría en el cuerpo estriado, mesencéfalo, corteza cerebral y cerebelo el desarrollo atípico del neuropilo y de las fibras que forman los haces, que se presenta en los demás tejidos estudiados. También explica la irregularidad, tortuosidad y disminución del número y arborización de las dendritas y axones, que tienen alterado el citoesqueleto, lo que también fue observado por Nagele<sup>143</sup> en el tubo neural de embriones de pollo cultivados con diazepam, en los que los microfilamentos eran escasos y la superficie apical de las células lisa.

Otra posible explicación para el retraso de la diferenciación de las neuronas del sistema nervioso central, por el diazepam es que retrasa la sinaptogénesis y provoca la disminución de la liberación de acetilcolina en la corteza frontal, lo que fue comprobado por Grimm<sup>59</sup> en rata y ratón. La misma investigadora comprobó la interferencia con otros sistemas como el noradrenérgico, además del gabaérgico, que están ampliamente desarrollados en las regiones estudiadas.

La acción del diazepam sobre las neuronas y las células gliales; también fue observada por Grimm<sup>59</sup> y Frieder<sup>77</sup>, quienes encontraron cúmulos perivasculares de glía en ratas y ratones expuestos prenatalmente a diazepam y por la leche materna. La alteración glial está presente en la corteza cerebral, la cerebelo, el cuerpo estriado y el mesencéfalo, lo que apoya la posibilidad de que en estas células, ricas en receptores benzodiazepínicos periféricos de temprana aparición, influyan en la falta de migración o la migración errática de las células neuroepiteliales.

La alteración de la migración y el retraso en la diferenciación de la neuro-nas. también puede estar relacionada con la acción que tiene el diazepam sobre el ciclo meiótico, lo que se comprobó en la médula ósea del ratón<sup>137</sup>, al igual que su poder clastogénico<sup>224</sup>; el que cause aneuploidias en los espermatoцитos<sup>130</sup> y el que detenga la mitosis en prometáfase de los linfocitos al inhibir la separación de los centriolos, provoca el desarrollo de husos unipolares<sup>1</sup>.

El retraso en la migración y en la diferenciación de las células neuroepiteliales y la persistencia del daño, también se pueden deber a la alteración de la síntesis de proteínas mencionada, que en los mioblastos impiden su fusión, provocan relajación del músculo esquelético por modificación de los miotúbulos y causan anomalías del corazón, efectos observados en embriones de pollo<sup>7,195,216</sup>. La alteración de las miofibrillas del corazón y de las bandas Z también se observó en los fetos expuestos durante la gestación a diazepam<sup>52</sup>. También impide la expansión de los fibroblastos de embriones de pollo en cultivo, por alteración en todos los casos del citoesqueleto<sup>144</sup>.

La acción directa del diazepam sobre los organelos citoplásmicos o como consecuencia de las alteraciones a nivel de los ácidos nucleicos, fueron observadas por Stenchever<sup>199</sup>, en fibroblastos, en los que al agregar a los cultivos dosis de diazepam de 0.1, 1.0, 10.0 y 20.0 µg/ml, se encontró que la morfología celular se alteraba aparentemente poco. Sin embargo, con el microscopio electrónico de transmisión se demostró que al aumentar las dosis, los organelos citoplásmicos experimentaban cambios como fueron, la dilatación de las cisternas del retículo endoplásmico rugoso, que contenía un material ligeramente electrodensos; elementos vesiculares y membranosos del

retículo endoplásmico liso; abundantes grupos de cisternas y vesículas del complejo de Golgi, que estaba en tres o más grupos; cuerpos electrodensos; mitocondrias hinchadas, con las crestas mitocondriales alteradas; material fibroso burdo; disminución de la secreción de la matriz extracelular y de la colágena. Todos estos datos son coincidentes con los hallazgos de esta investigación y en lo observado en otros tejidos como el corazón, los hepatocitos, las células de Sertoli, la barrera placentaria, el cerebro y los fotorreceptores estudiados por nuestro grupo de trabajo, en el Laboratorio de Teratología y Toxicología del Departamento de Embriología de la Facultad de Medicina de la UNAM<sup>197,213,216,217</sup>.

Por otra parte, como ya fue descrito en la introducción, los receptores benzodiazepínicos tanto centrales como periféricos aparecen prenatalmente y su población aumenta por la exposición prenatal o perinatal al diazepam, lo que facilita su entrada a los neuroblastos y a las células gliales, sobre las que ejerce una acción tóxica y teratogénica, que persiste en el adulto<sup>56,79,81,180,181</sup>.

Quizá uno de los problemas más graves del diazepam, radica en que no modifica la morfología externa de los fetos o la de los adultos en forma fácil de identificar; sin embargo, las alteraciones histológicas y ultraestructurales son capaces de provocar incoordinación psicomotora, problemas en la locomoción espontánea, ontogenia del nado, la conducta copulatoria y la prevención pasiva<sup>79,81,89-92</sup>.

Con los datos descritos, se pone en evidencia que, a pesar de que en los laboratorios farmacéuticos se estudia la acción teratogénica y tóxica de los fármacos que se usan en el humano, éstos están encaminados a detectar alteraciones de tipo morfológico muy severas y evidentes en los fetos o en recién nacidos, pero no



las histológicas y menos aún las ultraestructurales. Tampoco se hacen estudios para identificar efectos de larga duración morfológicos en los diferentes tejidos y si tienen alguna repercusión fisiológica como las conductuales, que permitan prevenir cambios psicológicos o psicomotores en la descendencia.

Estos datos son desconocidos por los médicos, que siguen recetando el diazepam a la población general, que al causar dependencia física y fisiológica, se sigue usando como automedicación, hecho que facilita la exposición de los niños durante la gestación, puesto que si una paciente está sometida a tratamiento prescrito por el médico, lo toma por automedicación o por adicción. La suspensión de su uso en

caso de darse cuenta del embarazo, es en etapas tardías y algunas veces no se puede o no se debe suspender, lo que pone en peligro el desarrollo del sistema nervioso central y la de todos los tejidos durante los periodos críticos de la diferenciación y organización de los tejidos embrionarios, que se producen en una mayor proporción durante las ocho primeras semanas del desarrollo en el humano. En particular el sistema nervioso tiene un periodo tan prolongado de diferenciación que va desde la tercera semana del desarrollo hasta los tres años de la vida postnatal, lo que da oportunidad a ser expuesto a los teratógenos y a afectarse en mayor proporción.

## Conclusiones

El diazepam administrado por vía subcutánea, del 6° al 17° día de la gestación, a hembras de ratón de la cepa CD-1, en dosis únicas diarias de 2.7 mg/kg de peso corporal, provoca en el cerebelo de los fetos de 18 días, en la corteza cerebral, la cerebelar, el cuerpo estriado y el mesencéfalo en los ratones adultos de 180 a 240 días, las siguientes alteraciones:

En el cerebelo de los fetos de 180 días provoca la disminución del espesor de la corteza cerebelar, en especial en la capa granulosa interna.

Persistencia de granos en la capa granulosa externa.

Desarrollo de fibras del neuropilo y de la sustancia blanca engrosadas, irregulares y menos numerosas.

Disminución de la cantidad de células de Purkinje, que muestran signos de degeneración.

Distribución atípica de la heterocromatina de los núcleos de todas sus células, observadas a nivel histológico y ultraestructural.

Alteración de los organelos citoplásmicos, como la hinchazón de las mitocondrias, la distensión y el aumento del retículo endoplásmico rugoso y del complejo de Golgi.

En la corteza cerebral las columnas motoras no están bien diferenciadas, ni orientadas como las del de los ratones de los grupos N y NT.

Los haces de fibras paralelas a las columnas motoras y las de neuropilo están mal diferenciadas y están acompañadas por células gliales más numerosas.

Las neuronas piramidales de las capas II-III y IV son más abundantes por campo con respecto a los controles S y NT.

- Las pirámides de Betz de la capa V se encuentran reducidas en número y están retraídas.
- Las neuronas tienen menos ramificaciones y menor cantidad de espinas dendríticas.
- Las células gliales son más abundantes y más arborizadas. Forman cúmulos perivasculares.
- En el cuerpo estriado el número de células por campo aumentan y forman grupos dispersos entre el escaso neuropilo.
- Los haces de fibras y el neuropilo son delgados, con fibras sinuosas y menos abundantes.
- Las células gliales son más abundantes que las observadas en los grupos de los ratones de los grupos S y NT.
- Las fibras que forman los haces y el neuropilo son irregulares y menos desarrolladas, tanto en el mesencéfalo, como en el cerebelo fetal y en el adulto.
- Las neuronas de los núcleos rojos y de los colículos están retraídas y forman grupos con pares de neuronas.
- La disminución del espesor de la capa granulosa interna persiste en el cerebelo de los ratones adultos.
- La degeneración de las células de Purkinje, de las de Golgi y en canasta persiste en el cerebelo adulto.
- Las fibras mielínicas de la sustancia blanca tienen vainas con láminas desorganizadas y engrosadas, lo que se observa a nivel histológico y ultraestructural.
- Las células de la corteza cerebelar adulta presenta signos de degeneración en los ratones DZ, entre las que están el aumento de las vesículas y cisternas del complejo de Golgi, de los polirribosomas, dilatación de las cisternas del retículo endoplásmico rugoso, alteración de las crestas mitocondriales e hinchazón de las mismas.
- En todos los tejidos encefálicos de los ratones DZ estudiados la heterocromatina tiene grumos gruesos, con frecuencia adheridos a la envoltura nuclear con la membrana externa separada de la interna.
- Las alteraciones observadas pueden deberse a la formación de aductos en el ADN, a la inhibición de la síntesis de proteínas, e inhibición del ciclo mitótico.
- Los cambios histológicos y ultraestructurales producidos por el diazepam administrado prenatalmente, pueden ser mediados por los receptores benzodiazepínicos centrales y periféricos, que aparecen prenatalmente.
- Las alteraciones observadas provocan retraso psicomotor en las crías adultas, problemas de aprendizaje, del patrón de natación espontánea, de la actividad locomotora y de la copulatoria.
- Por las evidencias que se tienen en cuanto a la similitud de los efectos fisiológicos producidos por el diazepam en los niños nacidos de mujeres con altos niveles en la sangre durante el parto y los obtenidos experimentalmente en los ratones, sería recomendable restringir su uso durante el embarazo.

## Referencias

1. **Andersson LC, Lehto V-P, Stenman S, Badley RA, Virtanen I.** Diazepam induces mitotic arrest at prometaphase by inhibiting centriolar separation. *Nature*, 291:247-248, 1981.
2. **Andrada-Martínez R, Márquez-Orozco MC, Márquez-Orozco A.** Cerebellar histological changes produced by diazepam. *Proc West Pharmacol Soc*, 36:219-225, 1993.
3. **André M, Sibout M, Petry J-M, Vert P.** Depression respiratoire et neurologique chez le prématuré nouveau-né de mère traitée per diazepam. *J Gyn Obst Biol Repr* 2:357-366, 1973.
4. **Anholt RRH.** Mitochondrial benzodiazepine receptors as potential modulators of intermediary metabolism. *Trends Pharmacol Sci*, 7:506-511, 1986.
5. **Anholt RRH, De Souza EB, Kuhar MJ, Snyder SH.** Depletion of peripheral-type benzodiazepine receptors after hypophysectomy in the rat adrenal gland and testis. *Eur J Pharmacol*, 110:41-46, 1985.
6. **Antkiewicz-Michaluk L, Guidotti A, Krueger E.** Molecular characterization and mitochondrial density of a recognition site for peripheral-type benzodiazepine ligands. *Mol Pharmacol*, 34:272-278, 1988.
7. **Bandman E, Walker CR, Strohman RC.** Diazepam inhibits myoblast fusion and expression of muscle specific protein synthesis. *Science*, 200:599-561, 1978.
8. **Benavides J, Guilloux F, Rufat P, Uzan A, Renault C, Dubroeuq MC, Guerey C, Le Fur G.** In vivo labeling in several rat tissues of 'peripheral type' benzodiazepine binding sites. *Eur J Pharmacol*, 99:1-7, 1984.
9. **Bergman U, Rosa FW, Baum C, Wiholm B-E, Farch GA.** Effects of exposure to benzodiazepine during fetal life. *Lancet*, 34:694-696, 1992.
10. **Bittiger H, Froesth W, Mickel SJ, Olpe H-R.** GABA<sub>A</sub> receptor antagonists: From synthesis to therapeutic applications. *Trends Pharmacol Sci*, 14:391-394, 1993.
11. **Blair LAC, Levitan ES, Marshall J, Dione VE, Bernard EA.** Single subunits of the GABA<sub>A</sub> receptor from ion channels with properties of the native receptor. *Science*, 242:577-579, 1988.
12. **Bormann J.** Electrophysiology of GABA<sub>A</sub> and GABA<sub>B</sub> receptor subtypes. *Trends Neurosci*, 11:112-116, 1988.
13. **Bormann J, Feigenspan A.** GABA<sub>C</sub> receptors. *Trends Neurosci*, 18:515-519, 1995.
14. **Bosman HB, Penney DP, Case KR, Averill K.** Diazepam receptor: Specific nuclear binding of [<sup>3</sup>H] flunitrazepam. *Proc Natl Acad Sci USA*, 77:1195-1198, 1980.
15. **Bowery N.** GABA<sub>B</sub> receptors and their significance in mammalian pharmacology. *Trends Pharmacol Sci*, 10:401-407, 1989.
16. **Braestrup C, Albrechtsen R, Squires RF.** High densities of benzodiazepine receptors in human cortical areas. *Nature*, 269:702-704, 1977.
17. **Braestrup C, Nielsen M.** Ontogenic development of benzodiazepine receptors in the rat brain. *Brain Res*, 147:170-173, 1978.
18. **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.
19. **Burn JM.** Effect of maternal diazepam on the newborn. *Br Med J*, 1216-1217, 1978.
20. **Cagiano R, De Salvia MA, Persichella M, Renna G, Tattoli M, Cuomo V.** Behavioral changes in the offspring of rats exposed to diazepam during gestation. *Eur J Pharmacol*, 177:67-74, 1990.
21. **Calvo DJ, Campos MB, Calandra RS, Medina JH, Ritta MN.** Effect of long term diazepam administration on testicular benzodiazepine receptors and steroidogenesis. *Life Sci*, 49:519-525, 1991.
22. **Calvo DJ, Ritta MN, Calandra RS, Medina JH.** Peripheral-type benzodiazepine receptors are highly concentrated in mitochondrial membranes of rat testicular interstitial cells. *Neuroendocrinology*, 52:350-353, 1990.
23. **Canfield PR.** Teratogenic effects of drugs during pregnancy. *J Fam Prac* 6:653, 1978.

24. Cantor EH, Kenessey A, Semenuk G, Spector S. Interaction of calcium channel blockers with non-neural benzodiazepine binding site. *Proc Natl Acad Sci USA*, 81:1549-1552, 1984.
25. Chan CY, Gibbs TT, Borden LA, Farb DH. Multiple embryonic benzodiazepine binding sites: evidence for functionality. *33:2061-2069, 1983*.
26. Choi D, Farb DH, Fischbach GD. Chlordiazepoxide selectively augments GABA action in spinal cord cultures. *Nature*, 269:342-344, 1977.
27. Chu DCM, Albin RL, Young AB, Penney JB. Distribution and kinetics of GABA<sub>B</sub> binding sites in rat central nervous system: A qualitative autoradiographic study. *Neuroscience*, 34:341-357, 1990.
28. Coen E, Abbraccio MP, Balduini W, Cagnano R, Cuomo V, Lombardelli G, Peruzzi G, Ragusa MC, Cattabeni F. Early postnatal chlordiazepoxide administration permanent behavioral effects in the mature rat and possible involvement of the GABA-benzodiazepine system. *Psychopharmacology*, 81:261-266, 1983.
29. Costa E, Guidotti A, Mao CC. Evidence for involvement of GABA in the action of benzodiazepines: Studies on rat cerebellum. *Adv Biochem Psychopharmacol*, 14:113-130, 1975.
30. Coyle JT, Enna SJ. Neurochemical aspects of the ontogenesis of GABAergic neurons in the rat brain. *Brain Res*, 111:119-133, 1976.
31. Cree JE, Meyer J, Hailey DM. Diazepam in labour: metabolism and effect on the clinical condition and thermogenesis of the newborn. *Brit Med J*, 4:251-255, 1973.
32. Criswell HE, Simson PE, Duncan GE, McCown TJ, Herbert JS, Morrow AL, Breese GR. Molecular basis for regionally specific action of ethanol on  $\gamma$ -aminobutyric acid receptors: Generalization to other ligand-gated ion channels. *J Pharmacol Exp Ther*, 267:522-537, 1993.
33. Czeizel A. Diazepam, phenytoin and etiology of cleft lip and/or cleft palate. *Lancet*, 810, 1976.
34. De Blas A. Endogenous benzodiazepines in brain. *Trends Neurosci*, 11:486-490, 1988.
35. De Blas AI, Donggun Park, Friedrich P. Endogenous benzodiazepine-like molecules in the human, rat and bovine brains studied with a monoclonal antibody to benzodiazepines. *Brain Res*, 413:276-284, 1987.
36. De Blas AI, Sorola. Localization of benzodiazepine-like in the rat brain. A light and electron microscopy immunocytochemistry study with anti-benzodiazepine monoclonal antibody. *Brain Res*, 413:285-296, 1987.
37. De la Fuente-Juárez G, Márquez-Orozco MC, Márquez-Orozco A. Efecto del diazepam sobre el músculo cardíaco de fetos de ratones tratados durante la gestación con diversas dosis. *Bol Med Hosp Infant Mex*, 49:130, 1991.
38. De Souza EB, Anholt RHJ, Murphy KMM, Snyder SH, Kuhar MJ. Peripheral-type benzodiazepine receptors in endocrine organs: autoradiographic localization in rat pituitary, adrenal and testis. *Endocrinol*, 116:567-573, 1985.
39. Dencker SJ, Johansson G, Milsom I. Quantification of naturally occurring benzodiazepine-like substances in human milk. *Psychopharmacol*, 107:69-72, 1992.
40. Doble A, Martin IL. Multiple benzodiazepine receptors: No reason for anxiety. *Trends Pharmacol Sci*, 13:76-81, 1992.
41. Erkkola R, Kanto J, Selman R. Diazepam in early human pregnancy. *Acta Obstet Gynecol Scand*, 53:155-156, 1974.
42. Fare F, Bar-Ami S, Brandes JM, Gavish M. Gonadotropin and estrogen induced of peripheral-type benzodiazepine binding sites in the hypothysal-pituitary axis of rats. *Eur J Pharmacol*, 133:97-112, 1987.
43. Fare F, Gavish M. Characterization of peripheral benzodiazepine binding site in human term placenta. *Bioph Pharmacol*, 35:227-230, 1986.
44. Feldman RS, Meyers JS, Quinby J. Sedative-hypnotic and anxiolytic drugs. In *Principles of neuropsychopharmacology*, 1 ed. Sunderland: Sinauer, 1987:566-726.
45. Flower CE, Rodolph CE, Edmund W. Diazepam (Valium) as an adjunct obstetric analgesic. *Obstet Gynecol*, 34, 61, 1969.

24. **Cantor EH, Kenessey A, Semenuk G, Spector S.** Interaction of calcium channel blockers with non-neural benzodiazepine binding site. *Proc Natl Acad Sci USA*, 81:1549-1552, 1984.
25. **Chan CY, Gibbs TT, Borden LA, Farb DH.** Multiple embryonic benzodiazepine binding sites: evidence for functionality. 33:2061-2069, 1983.
26. **Choi D, Farb DH, Fischbach GD.** Chlordiazepoxide selectively augments GABA action in spinal cord cultures. *Nature*, 269:342-344, 1977.
27. **Chu DCM, Albin RL, Young AB, Penney JB.** Distribution and kinetics of GABA<sub>A</sub> binding sites in rat central nervous system: A qualitative autoradiographic study. *Neurosciences*, 34:341-357, 1990.
28. **Coen E, Abbracchio MP, Balduini W, Cagiano R, Cuomo V, Lombardelli G, Peruzzi G, Ragusa MC, Cattabeni F.** Early postnatal chlordiazepoxid administration permanent behavioral effects in the mature rat and possible involvement of the GABA-benzodiazepine system. *Psychopharmacology*, 81:261-266, 1983.
29. **Costa E, Guidotti A, Mao CC.** Evidence for involvement of GABA in the action of benzodiazepines: Studies on rat cerebellum. *Adv Biochem Psychopharmacol*, 14:113-130, 1975.
30. **Coyle JT, Enna SJ.** Neurochemical aspects of the ontogenesis of GABAergic neurons in the rat brain. *Brain Res*, 111:119-133, 1976.
31. **Cree JE, Meyer J, Hailey DM.** Diazepam in labour: its metabolism and effect on the clinical condition and thermogenesis of the newborn. *Brit Med J*, 4:251-255, 1973.
32. **Criswell HE, Simson PE, Duncan GE, McCown TJ, Herbert JS, Morrow AF, Breese GR.** Molecular basis for regionally specific action of ethanol on  $\gamma$ -aminobutyric acid receptors: Generalization to other ligand-gated ion channels. *J Pharmacol Exp Ther*, 267:522-537, 1993.
33. **Czeizel A.** Diazepam, phenytoin and etiology of cleft lip and/or cleft palate. *Lancet*, 810, 1976.
34. **De Blas A.** Endogenous benzodiazepines in brain. *Trends Neurosci*, 11:489-490, 1988.
35. **De Blas AL, Dongeun Park, 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.
36. **De Blas AL, Sotelo.** Localization of benzodiazepine-like in the rat brain. A light and electron microscopy immunocytochemistry study with anti-benzodiazepine monoclonal antibody. *Brain Res*, 413:285-296, 1987.
37. **De la Fuente-Juárez G, Márquez-Orozco MC, Márquez-Orozco A.** Efecto del diazepam sobre el músculo cardíaco de fetos de ratones tratados durante la gestación con diversas dosis. *Bol Med Hosp Infant Mex*, 49:130, 1991.
38. **De Souza EB, Anholt RRRH, Murphy KMM, Snyder SH, Kuhar MJ.** Peripheral-type benzodiazepine receptors in endocrine organs: autoradiographic localization in rat pituitary, adrenal and testis. *Endocrinol*, 116:567-573, 1985.
39. **Dencker SJ, Johansson G, Milson L.** Quantification of naturally occurring benzodiazepine-like substances in human milk. *Psychopharmacol*, 107:69-72, 1992.
40. **Doble A, Martin JL.** Multiple benzodiazepine receptors: No reason for anxiety. *Trends Pharmacol Sci*, 13:76-81, 1992.
41. **Erkkola R, Kanto J, Sellman R.** Diazepam in early human pregnancy. *Acta Obstet Gynecol Scand*, 53:135-138, 1974.
42. **Fare F, Bar-Ami S, Brandes JM, Gavish M.** Conadotropin-and-estrogen-induced of peripheral-type benzodiazepine binding sites in the hypophyseal-genital axis of rats. *Eur J Pharmacol*, 133:97-112, 1987.
43. **Fare F, Gavish M.** Characterization of peripheral benzodiazepine binding site in human term placenta. *Bioch Pharmacol*, 35:227-230, 1986.
44. **Feldman RS, Mayers JS, Quenzer LF.** Sedative-hypnotic and anxiolytic drugs. In *Principles of neuropsychopharmacology* 1st ed. Sunderland: Sinauer, 1997:686-729.
45. **Flowers CE, Rudolph CE, Seamond MM.** Diazepam (Valium) as an adjunct in obstetric analgesia. *Obstet Gynecol*, 34:68-81, 1969.

46. Fox LA, Abendschein DK, Labcen RB. Effects of benzodiazepines during gestation and infancy on Y-maze performance of mice. *Pharmacol Res Comm*, 9:325-339, 1977.
47. Frieder B, Meshoer A, Grimm VE. The effect of exposure to diazepam through the placenta or thorough the mothers milk:histological findings in slices of rat brain: *Neuropharmacology*, 23:1099-1104, 1984b.
48. Gallager DW, Tallman JF. Relationship of GABA<sub>A</sub> receptor heterogeneity to regional differences in drug response. *Neurochem Res*, 15:113-118, 1990.
49. Gavish M, Katz Y, Bar-Ami S, Weizman R. Biochemical, physiological, and pathological aspects of the peripheral benzodiazepine receptor. *J Neurochem*, 58:1589-1601, 1992.
50. Gavish M, Okun F, Weizman A, Youdim MBH. Modulation of peripheral benzodiazepine binding sites following chorionic estradiol treatment. *Eur J Pharmacol*, 126:147-151, 1986.
51. Gazca-Ramírez MV, Márquez-Orozco MC, Márquez-Orozco A. Histological alterations in kidney of 21-day old mice induced by prenatal exposure to diazepam. *Biol Estud Méd Biol Méx*, 44:104-110, 1996.
52. Gazca-Ramírez MV, Márquez-Orozco MC, Márquez-Orozco A. Modificaciones ultraestructurales del corazón de fetos de ratones expuestos *in utero* a diazepam. *Bol Med Hosp Mex*, 49:151, 1991.
53. 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.
54. Gee KW, Lawrence LJ, Yamamura HI. Modulation of the chloride ionophore by benzodiazepine receptor ligands:influence of  $\gamma$ -aminobutyric acid and ligand efficiency. *Mol Pharmacol*, 30:218-225, 1986.
55. Gehlert DR, Yamamura HI, Wamsley JK.  $\gamma$ -aminobutyric acid receptors in the rat brain. Quantitative autoradiographic localization using [<sup>3</sup>H]-(-)-baclofén. *Neurosci Lett*, 56:183-188, 1985.
56. Gill TS, Guram MS, Geber WF. Comparative study of the teratogenic effects of chlordiazepoxide and diazepam in the fetal hamster. *Life Sci*, 29:2141-2147, 1981.
57. Goodman LS, Gillman YA. Benzodiazepinas. En: *Bases farmacológicas de la terapéutica médica*. México: Interamericana, 1996:346-358.
58. Greizerstein HB, Aldrish LK. Ethanol and diazepam effects on intrauterine growth of the rat. *Pharmacol Ther*, 6:409-418, 1983.
59. Grimm VE. Effects of teratogenic exposure on the developing brain:research strategies and possible mechanisms. *Dev Pharmacol Ther*, 10:328-345, 1987.
60. Guidotti A, Corda MG, Costa E. Strategies for the isolation and characterization of an endogenous effector of the benzodiazepine recognition sites. *Adv Biochem Psychopharmacol*, 38:95-103, 1983.
61. Haefely W, Kulesar A, Möhler H, Piere L, Polc P, Schaffner R. Possible involvement of GABA in the central actions of benzodiazepines. *Adv Biochem Psychopharmacol*, 14:131-151, 1975.
62. Haefely WE. Pharmacology of the benzodiazepine receptor. *Eur Arch Psychiatry Neurol Sci*, 238:294-301, 1989.
63. Haram K. "Floppy infant syndrome" and maternal diazepam. *Lancet*, 612-613, 1977.
64. Harris RA, Allan AM. Functional coupling of  $\gamma$ -aminobutyric acid receptors to chloride channels in brain membranes. *Science*, 228:1108-1110, 1985.
65. Henn FA, Henke DJ. Cellular localization of [<sup>3</sup>H]-diazepam receptors. *Neuropharmacology*, 17:985-988, 1978.
66. Hernández-Alvarez LAI, Márquez-Orozco MC, Márquez-Orozco A, Hicks-Gómez JJ. Efectos teratogénicos de las benzodiazepinas. *Ginec Obstet Mex*, 59:195-201, 1991.
67. Hernández-Alvarez LAI, Márquez-Orozco MC, Márquez-Orozco A. Effects of prenatal administration of diazepam on the ovary of mice. *Proc West Pharmacol Soc*, 34:379-382, 1991.
68. Hernández-Alvarez LAI, Márquez-Orozco MC, Márquez-Orozco A. Mating behavior of female mice treated prenatally with diazepam. *Proc West Pharmacol Soc*, 37:68-71, 1994.
69. Hill DR, Bowery NG. <sup>3</sup>H-baclofén and <sup>3</sup>H-GABA bind to bicucullina-insensible GABA<sub>A</sub> sites in rata brain. *Nature*, 290:149-152, 1981.

70. **Hironaka T, Fuchino K, Fujii T.** The benzodiazepine receptor and receptor tolerance produced by chronic treatment of diazepam. *Jpn J Pharmacol.* 35:95-102, 1983.
71. **Hobbs WR, Rail TW, Verdoorn TA.** Hypnotics and sedatives; ethanol. In Goodman & Gilman's *The pharmacological basis of therapeutics*. United States of America. McGraw-Hill. 1996:361-480.
72. **Holliester LE, Motzenbacher FP, Degar RD.** With drawl drug reactions from: chlordiazepoxide (Librium). *Psychopharmacologia*, 2:63-68, 1961.
73. **Hu ZY, Borreau E, Jung-Testas I, Robel P, Baulieu EE.** Neurosteroids: oligodendrocyte mitochondria convert cholesterol to pregnenolone. *Proc Natl Acad Sci USA*, 84:8215-8219, 1987.
74. **Idänpään-Heikkilä JE, Joupila PI, Poulakka JD, Vorne MS.** Placental transfer and fetal metabolism of diazepam in early human pregnancy. *Am J Obstet Gynec.* 108:1011-1016, 1971.
75. **Idänpään-Heikkilä JE, Taska RJ, Allen HA, Schollar JC.** Placental transfer of diazepam: C<sup>14</sup> in mice, hamster and monkeys. *J Pharmacol Exp Ther* 176:752-757, 1971.
76. **Johnston GAR.** GABA<sub>A</sub> receptors. *Prog Brain Res.* 100:61-65, 1995.
77. **Joyce DN, Kenyon VG.** The use of diazepam and hydralazine in the treatment of severe pre-eclampsia. *J Obstet Gynecol Brith Common*, 79:250-254, 1972.
78. **Karobath M, Sperk G.** Stimulation of benzodiazepine receptor binding by  $\gamma$ -aminobutyric acid. *Proc Natl Acad Sci USA*, 76:1004-1006, 1979.
79. **Kellogg C, Ison JR, Miller RK.** Prenatal diazepam exposure: effects on auditory temporal resolution in rats. *Psychopharmacology*, 79:332-337, 1983b.
80. **Kellogg C, Tervo D, Ison J, Parisi T, Miller RK.** Prenatal exposure to diazepam alters behavioral development in rats. *Science*, 207:205-207, 1980.
81. **Kellogg CK, Chisholm J, Simmons RD, Ison JR, Miller RK.** Neural and behavioral consequences of prenatal exposure to diazepam. *Monog Neural Sci*, 9:119-129, 1983a.
82. **Kellogg CK, Retell TM.** Release of [3H] norepinephrine: alteration by early developmental exposure to diazepam. *Brain Res*, 366:137-144, 1985a.
83. **Kellogg CK, Simmons RD, Miller RK, Ison JR.** Prenatal diazepam exposure in rats: long-lasting functional changes of the offspring. *Neurobehx Tox Teratology*, 7:483-488, 1985b.
84. **Krishek BJ, Xie X, Blackstone C, Haganir RL, Moss SJ, Smart TC.** Regulation of GABA<sub>A</sub> receptor function by protein kinase C phosphorylation. *Neuron*, 12:285-292, 1994.
85. **Lader M, Petursson H.** Long-term effects of benzodiazepines. *Neuropharmacology*, 22:527-533, .
86. **Laegreid L, Olegård R, Conradi N, Hagberg G, Wahlström J, Abrahamsson L.** Congenital malformations and maternal consumption of benzodiazepines: a case-control study. *Develop Med Child Neuro*, 32:432-441, 1990.
87. **Laegreid L, Olegård R, Wahlström J, Conradi N.** Abnormalities in children exposed to benzodiazepines in utero. *Lancet*, 1:108-109, 1987.
88. **Laegreid L, Olegård R, Wahlström J, Conradi N.** Teratogenic effects of benzodiazepine use during pregnancy. *J Pediatr*, 114:126-131, 1989.
89. **Lambert JJ, Bellelli D, Hill-Venning C, Peters JA.** Neurosteroid and GABA<sub>A</sub> receptor function. *Trends Pharmacol Sci*, 16:295-303, 1995.
90. **Lee JN, Chen SS, Richens A, Menabawey M, Chard T.** Serum protein binding of diazepam in maternal and fetal serum during pregnancy. *Br J clin Pharmacol*, 14:551-554, 1982.
91. **Leeb-Lundberg F, Snowman A, Olsen RW.** Barbiturate receptor sites are coupled to benzodiazepine receptors. *Proc Natl Acad Sci USA*, 77:7468-7472, 1988.
92. **Lippa AS, Myerson LR, Beer B.** Molecular substrates of anxiety: Clues from the heterogeneity of benzodiazepine receptors. *Life Sci*, 31:1409-1407, 1982.
93. **Lüddens H, Korpi ER, Seeburg PH.** GABA<sub>A</sub>/benzodiazepine receptor heterogeneity: Neurophysiological implications. *Neuropharmacology*, 34:245-254, 1995.

94. **Lüddens H, Pritchett DB, Köhler M, Killisch I, Keinänen K, Monyer H, Sprangel R, Seeburg PH.** Cerebellar GABA<sub>A</sub> receptor selective for a behavioral alcohol antagonist. *Nature*, 346:648-651, 1995.
95. **Lyubimov BI, Smolnikova NM, Strekalova SN.** Effects of diazepam on the development of progeny. *Bull EKSP Biol Med* 78:1158-1158, 1974.
96. **Macdonald R, Barker JL.** Benzodiazepines specifically modulate GABA-mediated postsynaptic inhibition in cultured mammalian neurons. *Nature*, 271:563-564, 1978a.
97. **Macdonald RL, Olsen RW.** GABA<sub>A</sub> receptor channels. *Annu Rev Neurosci*, 17:569-602, 1994.
98. **Majewska MD, Mienville J-M, Vicini S.** Neurosteroid pregnenolone sulfate antagonizes electrophysiological responses to GABA in neurons. *Neurosci Letters*, 90:279-284, 1988.
99. **Mallorga P, Hamburg M, Tailman JF, Gallager DW.** Ontogenic changes in GABA modulation of brain benzodiazepine binding. *Neuropharmacol*, 19:405-408, 1980.
100. **Mandelli M, Morselli PL, Nardi S, Pardi G, Principi N, Sceni F, Tognoni G.** Placental transfer of diazepam and its disposition in the newborn. *Clin Pharmacol Ther*, 17:564-572, 1975.
101. **Marangos PJ, Patel J, Boulenger J-P, Clark-Rosenberg R.** Characterization of peripheral-type benzodiazepine binding sites in brain using [<sup>3</sup>H]Ro 5-4864. *Mol Pharmacol* 22:26-32, 1982.
102. **Marc V, Morselli PL.** Effects of diazepam on plasma corticosterone levels in the rat. *J Pharm Pharmacol*, 21:784-785, 1969.
103. **Márquez-Orozco A, Hernández-Alvarez LAI, Márquez-Orozco MC.** Sexual activity male mice treated prenatally with diazepam. *Proc West Pharmacol Soc*, 37:65-68, 1994.
104. **Márquez-Orozco A, Márquez-Orozco MC, Alcántara-Ortiz MA.** Effects of prenatal administration of diazepam on the cerebral cortex of adult mice. *Proc West Pharmacol Soc*, 35:47-52, 1992.
105. **Márquez-Orozco A, Márquez-Orozco MC, Bouchoit-Gamas E, Fernández-Gabarrón F.** Increase of bone calcium by prenatal exposure to diazepam in mice. *Proc West Pharmacol Soc*, 34:383-385, 1991.
106. **Márquez-Orozco A, Márquez-Orozco MC, Gazca-Ramírez MV, De la Fuente-Juárez G.** Lung alterations in adult mice prenatally exposed to diazepam. *Bol Estud Méd Biol Mex*, 44:108-110, 1996.
107. **Márquez-Orozco MC, Gazca-Ramírez MV, Márquez-Orozco A.** Ultrastructural alterations of fetal mice heart produced by treatment with diazepam during gestation. *Proc West Pharmacol Soc*, 26:83-84, 1983.
108. **Márquez-Orozco MC, Márquez-Orozco A.** Cambios ultraestructurales de hepatocitos fetales causados por diazepam (valium). *Bol Soc Mex Cienc Fisiol*, 8:7-11, 1985.
109. **Márquez-Orozco MC, Márquez-Orozco A, Álvarez-Fernández G, Samano Bishop A.** Acción del diazepam sobre la osteogénesis de la tibia de ratón. *Bol Soc Mex Cienc Fisiol*, 7:10-13, 1984.
110. **Márquez-Orozco MC, Márquez-Orozco A, Becker-Finkowsky ZB.** Alteraciones histológicas del pulmón por administración prenatal de diazepam (valium) en fetos de ratón. *Bol Soc Mex Cienc Fisiol*, 9:4-7, 1985.
111. **Márquez-Orozco MC, Márquez-Orozco A, Escobar A.** Diazepam induced long term delay in the migration of external granular layer of the cerebellum: an experimental study in the mouse. *Bol Estud Méd Biol Méx*, 36:19-24, 1988.
112. **Márquez-Orozco MC, Márquez-Orozco A, Gazca-Ramírez MV.** Diazepam effects upon the microscopic structure of the mouse placenta. *Bol Estud Méd Biol Méx*, 39:21-27, 1991.
113. **Márquez-Orozco MC, Márquez-Orozco A, Gazca-Ramírez MV.** Effects of diazepam on the ultrastructure of fetal mice hepatocytes. *Proc West Pharmacol Soc*, 36:113-116, 1993.
114. **Márquez-Orozco MC, Márquez-Orozco A, Gazca-Ramírez MV.** Histological changes in the tibia of the mouse fetus exposed to diazepam. *Proc West Pharmacol Soc*, 36:107-112, 1993.
115. **Márquez-Orozco MC, Márquez-Orozco A, Gazca-Ramírez MV.** Modificaciones de la estructura histológica de la barrera placentaria de ratones expuestos *in utero* a



- diazepam. *Bol Med Infant Mex*, 49:131-132, 1991.
116. **Márquez-Orozco MC, Márquez-Orozco A, Gazca-Ramírez MV.** Ultrastructural changes in photoreceptors and retinal layers of the mouse fetus exposed to diazepam. *Proc West Pharmacol Soc*, 35:43-46, 1992.
  117. **Márquez-Orozco MC, Márquez-Orozco A, Gazca-Ramírez MV, Andrade-Martínez R.** Cerebellar ultrastructural changes produced by diazepam. *Proc West Pharmacol Soc*, 37:115-116, 1994.
  118. **Márquez-Orozco MC, Márquez-Orozco A, Gazca-Ramírez MV, Hernández-Alvarez LAI, De la Fuente-Juárez G.** Histological alterations in fetal lung of mouse induced by exposition *in utero* to diazepam. *Bol Estud Méd Biol Mex*, 44:97-100, 1996.
  119. **Márquez-Orozco MC, Márquez-Orozco A, Prado-Alcalá R.** Effects of prenatal exposure to diazepam on avoidance conditioning. *Soc Neurosci Abstr*, 12:707, 1986.
  120. **Marquez-Orozco MC, Márquez-Orozco A, Sámano Bishop A.** Estudio de las alteraciones pulmonares de fetos de ratón de 18 días de gestación, producidas por la administración de diazepam (valium). *Arch Mex Anat*, 20:21-30, 1983.
  121. **Márquez-Orozco MC, Márquez-Orozco A, Sámano-Bishop A.** Efecto del diazepam (valium) en riñones fetales *in vivo*. *Bol Soc Mex Cienc Fisiol*, 7:16-20, 1984.
  122. **Márquez-Orozco MC, Márquez-Orozco A, Zarco de Coronado I.** Effects of prenatal diazepam on the running behavioral in adult mice. *Soc Neurosci Abstr* 18:361, 1992.
  123. **Márquez-Orozco MC, Márquez-Orozco A, Zarco de Coronado I.** Swimming behavioral alterations induced by prenatal administration of diazepam. *Soc Neurosci Abstr*, 14:521, 1988.
  124. **Márquez-Orozco MC, Pérez-Chavira ME, Gazca-Ramírez MV, Márquez-Orozco A.** Histological and ultrastructural brain alterations of a man chronically exposed to high doses of diazepam. *Soc Neurosci Abstr*, 20:657-3, 1605, 1994.
  125. **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.
  126. **Mathers DA.** The GABA<sub>A</sub> receptor. New insights from single-channels recording. *Synapse*, 1:96-101, 1987.
  127. **Mazzi E.** Possible neonatal diazepam withdrawal: a case report. *Am J Obstet Gynecol*, 129:586-587, 1977.
  128. **McAllister CB.** Placental transfer and neonatal effects of diazepam when administered to women just before delivery. *J Anesth*, 52:423-427, 1980.
  129. **McCarthy GT, O'Connell BD, Robinson AE.** Blood levels of diazepam in infants to two mothers given large doses of diazepam during labor. *J Obstet Gynecol Brith Common*, 80:349-352, 1973.
  130. **McKernan RM, Whiting PJ.** Which GABA<sub>A</sub>-receptor subtypes really occur in the brain? *Trends Neurosci*, 19:139-143, 1996.
  131. **McNicholas LF, Martin WR.** The effects of a benzodiazepine antagonist, Ro 15-1788, in diazepam dependent rats. *Life Sci*, 31:731-737, 1982.
  132. **McNicholas LF, Martin WR, Cherian S.** Physical dependence on diazepam and lorazepam in dog. *J Pharmacol Exp Ther*, 226:783-789, 1983.
  133. **Medina JH, Pena C, Piva M, Paladini AC, De Robertis E.** Presence of benzodiazepine-like molecules in mammalian brain and milk. *Biochem Biophys Res Commun*, 152:534-539, 1988.
  134. **Mehta AK, Ticku MK.** Ethanol potentiation of GABAergic transmission in cultured spinal cord neurons involves  $\gamma$ -aminobutyric acid-gated chloride channels. *J Pharmacol Exp Ther*, 264:558-564, 1988.
  135. **Mienville J-H, Vicini S.** Pregnenolone sulfate antagonizes GABA<sub>A</sub> receptor-mediated currents via a reduction of channel opening frequency. *Brain Res*, 489:190-194, 1989.
  136. **Miller BM, Adler I-D.** Aneuploidy induction in mouse spermatocytes. *Mutagenesis*, 7:69-76, 1992.
  137. **Miller BM, Adler I-D.** Suspect spindle poisons: analysis of c-mitotic effects in mouse bone marrow cells. *Mutagenesis*, 4:208-215, 1989.
  138. **Miller RP, Becker BA.** Teratogenicity of oral diazepam and diphenylhydantoin in mice. *Toxicol Appl Pharmacol*, 32:52-61, 1975.

139. **Mofid M, Brinkman CR, Assali NS.** Effects of diazepam on uteroplacental and fetal hemodynamics and metabolism. *Obstet Gynecol*, 41:364-368, 1973.
140. **Möhler H, Okada T.** Benzodiazepine receptor. Demonstration in the central nervous system. *Science*, 198:849-851, 1977a.
141. **Möhler H, Okada T.** Properties of [<sup>3</sup>H] diazepam binding of benzodiazepine receptors in rat cerebral cortex. *Life Sci*, 20:2102-2110, 1977b.
142. **Moss SJ, Smart TC, Blackstone CD, Huganir RL.** Functional modulation of GABA<sub>A</sub> receptors by cAMP-dependent protein phosphorylation. *Science*, 257:661-665, 1992.
143. **Nagele RG, Bush KI, Hunter ET, Kosciuk MC, Lee H.** Biomechanical basis of diazepam-induced neural tube defects in early chick embryos: a morphometric study. *Teratology*, 40:29-36, 1989.
144. **Nagele RG, Pietrolungo JF, Kosciuk MC, Lee H, Roisen FJ.** Diazepam inhibits the spreading of chick embryo fibroblasts. *Exp Cell Res*, 143:153-162, 1983.
145. **Nayem N, Green TP, Martin IL, Barnard EA.** Quaternary structure of the native GABA<sub>A</sub> receptor determined by electron microscope image analysis. *J Neurochem*, 62:815-818, 1994.
146. **Nicoll RA, Malenka RC, Kaver JA.** Functional comparison of neurotransmitter receptor subtypes in mammalian central nervous system. *Physiol Rev*, 70:513-565, 1990.
147. **Nielsen M, Honore T, Braestrup C.** Radiation inactivation of brain [<sup>35</sup>S] t-butylbicyclophosphorothionate binding sites reveals complicated molecular arrangements of the GABA/benzodiazepine receptor-chloride channel complex. *Biochem Pharmacol*, 34:3633-3642, 1985.
148. **Nutt DJ.** Pharmacological mechanisms of benzodiazepine withdrawal. *J Psychiatr Res* 24:105-110, 1990.
149. **Olpe H-R, Karlsson G, Pozza MF, Brugger F, Steinmann M, Van Riezen H, Fagg G, Hall RC, Frestli W, Bittiger H.** CGP 35348: A centrally active blocker of GABA<sub>A</sub> receptors. *Eur J Pharmacol*, 187:27-38, 1990.
150. **Olsen RW.** GABA-benzodiazepine-barbiturate receptor interactions. *J Neurochem*, 37:1-13, 1981.
151. **Ortega RM, Márquez-Orozco MC, Márquez-Orozco A.** Cambios histológicos del riñón de fetos de ratón tratados durante la gestación con diversas dosis de diazepam. *Bol Med Hosp Infan Mex*, 49:129-130, 1991.
152. **Owen JR, Irani SF, Blair AW.** Effects of diazepam administered to mothers during labour on temperature regulation of neonate. *Arch Dis Child*, 47:251-255, 1972.
153. **Palmer MR, Hoffer BJ.** GABAergic mechanism in the electrophysiological actions of ethanol on cerebellar neurons. *Neurochem Res*, 15:145-151, 1990.
154. **Papadopoulos V.** Peripheral-type benzodiazepine/diazepam binding inhibitor receptor: Biological role in steroidogenic cell function. *Endocrinol Rev*, 14:222-240, 1993.
155. **Patrick MJ, Tylstone WJ, Reavey P.** Diazepam and breast-feeding. *Lancet*, 542-543, 1972.
156. **Paul SM, Kemper ES, Skolnick P.** In situ molecular weight determination of brain peripheral benzodiazepine binding sites. *Euro J Pharmacol*, 76:465-466, 1981.
157. **Paul SM, Purdy RH.** Neuroactive steroids. *FASEB J*, 6:2311-2322, 1992.
158. **Pritchett DB, Sontheimer H, Gorman CM, Kettenmann H, Seeburg PH, Schofield PR.** Transient expression shows ligand gating and allosteric potentiation of GABA<sub>A</sub> receptor subunits. *Science*, 242:1306-1308, 1988.
159. **Ramos-Avila M, Márquez-Orozco MC, Márquez-Orozco A.** Testicular histological changes in mice after prenatal administration of diazepam. *Proc West Pharmacol Soc*, 36:122-126, 1993.
160. **Rampe D, Trigle DS.** Benzodiazepines and calcium channel function. *Trends Pharmacol Sci*, 7:461-464, 1986.
161. **Randall LD, Heise GA, Schallek KW, Bagdon RE, Banzinger R, Boris A, Moe R, Abrams WB.** Pharmacological and clinical studies on valium a new psychotherapeutic agent of the benzodiazepines class. *Curr Ther Res Clin Exp*, 3:405-425, 1961.
162. **Randall LD, Schallek W, Heise GA, Keith EF, Bagdon RE.** The psychozedative properties of methaminodiazepoxide. *J Pharmacol Exp Ther*, 129:163-171, 1960.
163. **Regan JW, Roeske WR, Yamamura HI.** The benzodiazepine receptors: development

- and its modulation by  $\gamma$ -aminobutyric acid. *J Pharmacol Exp Ther*, 212:137-143, 1980.
164. **Rementeria JL, Bhatt K.** Withdrawal symptoms in neonates from intrauterine exposure to diazepam. *J Ped*, 90:123-126, 1977.
165. **Reuehan WR, Kulikowski RR.** Abnormal heart development in valium-treated embryos. *Biophysical J*, 33:244a, 1981.
166. **Rickels K, Case W, Downing E, Winokur A.** Long-term diazepam therapy and clinical outcome. *JAMA*, 250:767-771, 1983.
167. **Riond J, Vita N, Le Fur G, Ferrara P.** Characterization of a peripheral-type benzodiazepine-binding site in the mitochondria of chinese hamster ovary cells. *FEB letters*, 245:238-244, 1989.
168. **Ritta MN, Calandra RS.** Testicular interstitial cells as targets for peripheral benzodiazepines. *Neuroendocrinol*, 49:262-266, 1989.
169. **Ritta MN, Campos MB, Calandra RS.** Effects of GABA and benzodiazepines on testicular androgen production. *Life Sci*, 40:791-798, 1987.
170. **Robel P, Baulieu E-E.** Neurosteroids: Biosynthesis and function. *Trends Endocrinol Metab*, 5:1-8, 1994.
171. **Rojas-Ramírez JA.** Benzodiazepinas. *Rev Fac Med Mex* 418:32-35, 1985.
172. **Rothe T, Bigl V.** The ontogeny of benzodiazepine receptors in selected regions of the rat brain: effect of perinatal exposure to diazepam. *Neuropharmacol*, 28:503-508, 1989.
173. **Rowlatt R.J.** Effect of maternal diazepam on the newborn. *Brit Med J*, 3:985, 1978.
174. **Ryan G, Boisse N.** Experimental induction of benzodiazepine tolerance and physical dependence. *J Pharmacol Exp Ther*, 226:100-107.
175. **Saito H, Kobayashi H, Takeno S, Sakai T.** Fetal toxicity of benzodiazepines in rats. *Res Comm Chem Pathol Pharmacol*, 46:437-447, 1984.
176. **Saito H, Kobayashi H, Takeno S, Sakai T, Ishii H.** In vivo and in vitro studies on fetal toxicity of benzodiazepines in rats. *Res Comm Chem Patol Pharmacol*, 52:295-304, 1986.
177. **Sangameswaran L, De Bias AL.** Demonstration of benzodiazepine-like molecules in the mammalian brain with a monoclonal antibody to benzodiazepines. *Proc Natl Acad Sci USA*, 82:5560-5564, 1985.
178. **Sanger DJ, Benavides J, Perrault G, Morel E, Cohen C, Joly D, Zivkovic B.** Recent developments in the behavioral pharmacology of benzodiazepine (w) receptors: Evidence for the functional significance of receptor subtypes. *Neurosci Biobehav Rev*, 18:355-372, 1991.
179. **Scher J, Hailey DM, Beard RW.** The effects of diazepam on the fetus. *J Obstet Brit Comm*, 80:349-352, 1973.
180. **Schlumpt M, Ramseier H, Abriel H, Youmbi M, Baumann JB, Lichtensteiger W.** Diazepam effects of the fetus. *Neurotoxicology*, 10:501-516, 1989.
181. **Schoch P, Richards JG, Häring P, Takaes B, Stähli C, Stachelin T, Haefely W, Möhler H.** Co-localization of GABA<sub>A</sub> receptors and benzodiazepine receptors in the brain shown by monoclonal antibodies. *Nature*, 314:168-171, 1985.
182. **Schoemaker H, Boles RG, Horst WD, Yamamura H.** Specific high-affinity binding sites for [<sup>3</sup>H] Ro5-4864 in rat brain and kidney. *J Pharmacol Exp Ther*, 225:61-69, 1983.
183. **Shah RM, Donaldson D, Burdnett D.** Teratogenic effects of diazepam in the hamster. *Can J Physiol Pharmacol*, 57:556-561, 1978.
184. **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.
185. **Shivers BD, Gillis I, Sprengel R, Sontheimer H, Köhler M, Schofield PR, Seeburg PH.** Two novel GABA<sub>A</sub> receptor subunits exist in distinct neuronal subpopulations. *Neuron*, 3:327-337, 1989.
186. **Shwartz RD.** The GABA<sub>A</sub> receptor-gated ion channel: biochemical and pharmacological studies of structure and function. *Biochem Pharmacol* 37:3369-3375, 1988.
187. **Shwartz RD, Suzdak PD, Paul SM.**  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA)- and barbiturate-mediated <sup>36</sup>Cl uptake in rat brain

- synaptoneurosome: evidence for rapid desensitization of the GABA receptor-coupled chloride ion channel. *Mol Pharmacol*, 30:419-426, 1987.
188. Sieghart W. Multiplicity of GABA-benzodiazepine receptors. *Trends Pharmacol Sci*. 10:407-411, 1989.
189. Sieghart W. Structure and pharmacology of  $\gamma$ -aminobutyric acid receptor subtypes. *Pharmacol Rev*. 181-234, 1995.
190. Simmons RD, Kellogg CK, Miller RK. Prenatal diazepam exposure in rats: long-lasting, receptor-mediated effects on hypothalamic norepinephrine-containing neurons. *Brain Res*. 293:73-83, 1984b.
191. Simmons RD, Miller RK, Kellogg C. Prenatal diazepam: distribution and metabolism in perinatal rats. *Teratology*. 28:181-186, 1983.
192. Simmons RD, Miller RK, Kellogg CK. Prenatal exposure to diazepam alters central and peripheral responses to stress in adult rat offspring. *Brain Res*. 307:39-49, 1984a.
193. Smith DE, Landry MJ. Benzodiazepine dependency discontinuation: focus on the chemical dependency detoxification setting and benzodiazepine-poly-drug abuse. *J Psychiat Res*, 24:145-156, 1990.
194. Smith GB, Olsen RW. Functional domains of GABA<sub>A</sub> receptors. *Trends Pharmacol Sci*. 16:162-168, 1995.
195. Soldo BL, Proctor WR, Dunwiddie TV. Ethanol differentially modulates GABA<sub>A</sub> receptor-mediated chloride currents in hippocampal, cortical and septal neurons in rat brain slices. *Synapse*, 18:94-103, 1994.
196. Speth RC, Wastek GJ, Johnson PC, Yamamura HI. Benzodiazepine binding in human brain: characterization using [<sup>3</sup>H]flunitrazepam. *Life Sciences*. 22:859-866, 1978.
197. Squires RF, Baerstrup C. Benzodiazepine receptors in rat brain. *Nature*. 268:732-734, 1977.
198. Staiger GR. Studies on the chromosomes of human lymphocytes treated with diazepam in vitro. *Mutation Res*. 10:635-644, 1970.
199. Stenchever MA, Frankel RB, Jarvis JA, Veress K. Some effects of diazepam in human cells in vitro. *Am J Obstet Gynec*. 103:836-842, 1969.
200. Stenchever MA, Frankel RS, Jarvis JA. Effects of diazepam on chromosomes of human leukocytes in vitro. *Amer J Obstet Gynec*. 107:456-450, 1970.
201. Stenchever MA, Parks KJ. Some effects of diazepam on pregnancy in the Balb/C mouse. *Am J Obstet Gynec*. 121:765-770, 1975.
202. Stenchever MA, Smith WD. The effects of diazepam on meiosis in the CF-1 mouse. *Teratology*. 23:279-281, 1981.
203. Sternbach LH, Koechlin BA, Reeder E. Quinazolines and 1,4-benzodiazepines (VII). The photoisomerization of 7-chloro-2-methylamino-5-phenyl-3H-1,4 benzodiazepine 4-oxide. *J Org Chem*. 27:4671-4672, 1962.
204. Taft WC, De Lorenzo RJ. Micromolar-affinity benzodiazepine receptors regulate voltage-sensitive calcium channels in nerve terminal preparations. *Proc Natl Acad USA*. 81:3118-3122, 1984.
205. Tallman JF, Gallager DW. The GABA-ergic system: a locus of benzodiazepine action. *Ann Rev Neurosci*. 8:21-44, 1985.
206. Tallman JF, Thomas JW, Gallager DW. Identification of diazepam binding in intact animals. *Life Sciences*. 24:873-880, 1979.
207. Tallman JF, Thomas JW, Gallager DW. GABAergic modulation of benzodiazepine binding site sensitivity. *Nature*. 274:383-385, 1978.
208. Tocco DR, Renskers K, Zimmerman EF. Diazepam-induced plate in mouse and lack of correlation with the H-2 locus. *Teratology*. 35:439-445, 1987.
209. Tucker JC. Benzodiazepines and the developing rat: a critical review. *Neurosci Biobehav Rev*. 9:101-1011, 1985.
210. Undseld E, Klotz U. Benzodiazepines: are they of natural origin? *Pharmacol Res*. 1:1-3, 1989.
211. Valium Roche. Valium diazepam. The journal of family practice 6, 1978.
212. Van der Kleijn E. Kinetics of distribution and metabolism of diazepam and chlordiazepoxide in mice. *Arch Int Pharmacodyn*. 178:193-215, 1969.
213. Verma A, Snyder SH. Peripheral type benzodiazepine receptor. *Ann Rev Pharmacol Toxicol*. 23:307-322, 1989.

214. **Wafford LA, Burnett DM, Leidenheimer NJ, Burt DR, Wang JB, Kofajji P, Dunwiddie TV, Harris RA, Sikela JM.** Ethanol sensitivity of the GABA<sub>A</sub> receptor expressed in *Xenopus* oocytes requires 8 amino acids contained in the  $\alpha 2$  subunit. *Neuron*, 7:27-33, 1991.
215. **Wali FA.** Effects of diazepam at the neuromuscular junction. *Life Sciences*, 76:1004-1006, 1985.
216. **Walker CR, Bandam E, Strohman RC.** Diazepam induces relaxation of chick embryo muscle fibers in vitro and inhibits myosin synthesis. *Exp Cell Res*, 123:285-291, 1979.
217. **Wang JK, Morgan JI, Spector S.** Benzodiazepines that bind at peripheral sites inhibit cell proliferation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 81:753-756, 1984.
218. **Wee EL, Zimmerman EF.** Involvement of GABA in palate morphogenesis and its relation to diazepam teratogenesis in two mice strains. *Teratology* 28:15-22, 1983.
219. **White BJ, Driscoll EJ, Tjio J-H, Smlack ZH.** Chromosomal aberration rates and intravenously given diazepam. *JAMA*, 230:414-417, 1974.
220. **Whiting P, McKernan RM, Iversen LL.** Another mechanism for creating diversity in  $\gamma 2$  subunit, one of which contains a protein kinase C fosforilation site. *Proc Natl Acad Sci USA*, 87:9966-9970, 1990.
221. **Wildmann J, Möhler H, Vetter W, Ranaider, Schmidt K, Maures R.** Diazepam and N-desmethyldiazepam are found in rat brain and adrenal and may be of plant origin. *J Neurol Transm*, 70:383-398, 1987.
222. **Wilkinson M, Moger WH, Grovestine D.** Chronic treatment with Valium (diazepam) fails to affect the reproductive system of the male rat. *Life Sci*, 27:2285-2291, 1980.
223. **Wojeik WJ, Holopainen I.** Role of central GABA<sub>A</sub> receptors in physiology and pathology. *Neuropsychopharmacology*, 6:201-214, 1992.
224. **Xu W, Adler I-D.** Calstogenic effects of known and suspect spindle poisons studies by chromosome analysis in mouse bone marrow cells. *Mutagenesis*, 5:371-374, 1990.
225. **Zarco de Coronado I, Márquez-Orozco MC, Márquez-Orozco A.** Efectos del diazepam sobre la actividad motora espontánea de ratones lactantes. *Res I Cong Natl Asoc Mex Car Teratogenesis Amb*, 4:737, 1986.
226. **Zimmerman EF.** Neuropharmacologic teratogenesis and neurotransmitter regulation of palate. *Am J Mental Def*, 88:548-558, 1984.