

00346



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

"CAMBIOS HISTOLOGICOS OVARICOS EN CRIAS DE
RATON DE MADRES EXPUESTAS DURANTE LA
GESTACION A FLUNITRAZEPAM"

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE:

**MAESTRA EN CIENCIAS
(BIOLOGIA CELULAR)**

P R E S E N T A :

BIOL. ANA JULIA AGUIRRE SAMUDIO

28/1/99

DIRECTOR DE TESIS: DRA. MARIA CRISTINA MARQUEZ OROZCO



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.

Esta tesis corresponde a los estudios realizados con una beca otorgada por el Gobierno de México, a través de la Secretaría de Relaciones Exteriores.

Fue dirigida por la Dra. María Cristina Márquez Orozco, profesor titular en el Dpto. de Embriología de la Facultad de Medicina de la UNAM.

Agradecimientos

A mis padres por haberme brindado la oportunidad de venir a este maravilloso país.

A la Dra. María Cristina Márquez Orozco por todo el apoyo brindado desde que llegué a México hasta el término de este trabajo.

A los miembros del Jurado. A la Dra. María del Carmen Uribe y a la Dra. María Cristina Revilla Monsalve ya que con sus observaciones hicieron crecer mi sentido crítico.

Al Dr. Alejandro Reyes y M en C. Isaura Sojo, quienes enriquecieron este trabajo al apoyar y realizar las técnicas de radioinmunoensayo.

Al Delmar, Dionisio y Juan Manuel por haberme prestado sus computadoras, lo cual agilizó el trabajo escrito durante la vacaciones y en la huelga.

A Graciela de la Fuente, Verónica Gazca y Marcelino Esparza por sus ayudas y apoyo en la parte técnica de este trabajo y por su amistad.

Al Dr. Mario Cásares por el tiempo que dedicó a introducir y perfeccionar técnicas alternantes aplicables a las muestras. Por su apoyo y amistad incondicional.

Al Dr. Próspero Aguirre, a Ladie, a mis hermanos: Luis Carlos, Próspero,
Leidy Maximina, Gaudencio y a Francisca Silvera.

CONTENIDO

Resumen.....	1
Introducción.....	2
Benzodiazepinas.....	2
Síntesis de esteroides a partir de colesterol.....	5
El receptor benzodiazepínico y el colesterol.....	6
Relación del receptor GABA _A con las hormonas esteroides.....	8
Estrés y el receptor benzodiazepínico	8
Sistema de respuesta al estrés.....	12
Desarrollo del ovario	16
Foliculogénesis.....	17
Atresia folicular.....	21
Planteamiento del problema.....	25
Hipótesis.....	25
Objetivos.....	26
Material y métodos.....	26
Resultados.....	31
Aspectos morfológicos.....	31
Folículos, controles.....	31
Folículos, grupos experimentales.....	34
Cuerpo lúteo, controles.....	36

Cuerpo lúteo, grupos experimentales.....	37
Aspectos estadísticos.....	38
Determinación hormonal.....	39
Tablas y figuras de los resultados.....	40
Discusión.....	41
Conclusiones.....	48
Perspectivas.....	50
Referencias	51
Anexo.....	58
Indice de abreviaturas.....	59

RESUMEN

En este trabajo se investigó el efecto del flunitrazepam (FNZ), administrado prenatalmente a ratones de la cepa ICR, en la histología y el número de folículos primordiales, primarios, secundarios, atrésicos primarios y secundarios, células lúteas y paralúteas, en la etapa adulta de las crías de ratón. Se utilizaron ratones a los que se le administró una dosis de FNZ de 2.5mg/kg de peso, el segundo grupo de estrés por inmovilización durante tres horas (E), el tercero a una dosis de FNZ de 2.5 mg/kg de peso corporal después de haber sido sometido a estrés (FNZE). Dos grupos fueron utilizados como control de los tratamientos anteriores que son: ratones a los que se le administró solución salina (S) y los no tratados (NT) y el grupo E fue control positivo del grupo FNZE. Todas las aplicaciones fueron en el sexto día de la gestación. Se encontró que en los grupos FNZ, FNZE y E hubo un aumento de la atresia de folículos primarios y secundarios. La zona pelúcida estaba contraída, las células de la granulosa presentaron núcleo picnótico, había macrófagos en el antro folicular y los ovocitos tenían inclusiones citoplásmicas. En el grupo FNZ el número de folículos primordiales y primarios normales, disminuyeron y aumentó el de atrésicos primarios en relación a los del grupo NT ($p < 0.01$) y en los grupos FNZE y E se duplicó la frecuencia ($p < 0.001$). Los folículos secundarios de los grupos FNZ, FNZE y E tienen la proporción tres veces mayor a la del grupo NT ($p < 0.01$). En los grupos FNZE y E los folículos atrésicos secundarios incrementaron ($p < 0.001$). El número de cuerpos lúteos por ovario disminuyó en los grupos FNZE y E. Al contar las células lúteas y paralúteas por campo, se encontró que el FNZ y el E disminuyeron ($p < 0.01$) y en el FNZE disminuyeron las células paralúteas ($p < 0.01$); igual que la concentración de progesterona en el FNZE ($p < 0.01$). Los resultados comprueban que la administración prenatal de FNZ provoca, a nivel histológico, alteración en los folículos ováricos y en el cuerpo lúteo, que persisten hasta la etapa adulta, lo mismo sucede con E y la combinación de FNZE.

INTRODUCCIÓN

Benzodiazepinas

Las benzodiazepinas (BDZ) son tranquilizantes menores que tienen una gran importancia para la psicofarmacología. Se emplean por su efecto sedante, hipnótico, ansiolítico, anticonvulsivo y miorrelajante, cuya acción primaria involucra una modulación alostérica del complejo receptor GABA_A. El diazepam (DZ) es la BDZ más utilizada para el tratamiento de ansiedad, como premedicación psicosedante, miorrelajante, en la cardioversión, gastroscopía, broncoscopía y métodos odontológicos, así como en la práctica obstétrica en casos de preclampsia y eclampsia, aborto inminente, placenta previa, actividad prematura del útero (Hernandez y cols., 1991).

Se ha demostrado que en humanos, monos, hámster, ratas y ratones, el DZ atraviesa la barrera placentaria, se acumula en los tejidos fetales en grandes cantidades y circula en una proporción mayor en la sangre fetal que en la materna. En los neonatos cuyas madres fueron tratadas con DZ, se produce la disminución de los valores del Apgar, hipotonía, depresión respiratoria, y neurológica (Flowers y cols., 1969) y bajos reflejos en el recién nacido de madres tratadas con DZ durante el embarazo (André y cols., 1973). Se ha descrito un incremento en el peso fetal y presencia de focomelia en la cepa de ratón Balb/C tratado con DZ (Stenchever y cols., 1975). Igualmente, se han reportado cambios en la estructura celular del hígado, riñón, retina, tibia, placenta, cerebelo, corazón, testículos y ovario fetales (Márquez Orozco y cols., 1984, 1993, 1994, 1997, Mata Santibañez y cols., 1993.) y la persistencia postnatal de las alteraciones en el ovario (Hernandez y cols., 1991), el testículo (Ramos Avila y cols., 1993), el hueso (De La Fuente Juárez y cols., 1998) y el sistema nervioso central en la cepa CD1 (Márquez Orozco y cols., 1998).

El flunitrazepam (FNZ) es otra benzodiazepina, cuyas propiedades químicas la hacen una droga con altas propiedades sedantes e hipnóticas. El potencial hipnótico fue evaluado en humanos en dosis de 0.25, 1 y 2.0 mg, el cual fue efectivo para la conciliación del sueño en pacientes jóvenes y adultos (Bixler y cols., 1977; ST Hilaire-Kafi y Gayllard, 1988). Mediante análisis de cromatografía de gas acoplado a espectrometría de masas, se determinó que el principal metabolito activo es el 7- amino – flunitrazepam, que es eliminado en la orina

(Cirimele, 1997). El FNZ es, ampliamente, metabolizado por reducción del grupo nitro, sufre acetilación, hidroxilación en la posición tres, glucoronidación y N – desmetilación, en humanos (Salamone y cols., 1997).

El FNZ es un ligando del receptor benzodiazepínico periférico (RBP), el cual tiende a unirse con gran afinidad, y del receptor benzodiazepínico central (RBC) asociado al ácido gamma aminobutírico o GABA, cuya acción primaria es modular la actividad de este receptor. Es en el sistema nervioso central, donde se ha encontrado una gran afinidad por los sitios de unión para las benzodiazepinas, debido a su relación con el GABA; sin embargo, tanto el FNZ como otras BDZ tienen la capacidad de unirse a órganos como el riñón, el pulmón, el corazón, la placenta, el ovario y la corteza suprarrenal (Parola y cols., 1993; Zisterer y Williams, 1997). Atraviesa la barrera placentaria, se concentra en la sangre de la arteria umbilical y en el líquido amniótico (Kanto y cols., 1987). El FNZ cuando se administra a mujeres embarazadas, tiene una lenta eliminación, debido a su vida media tan larga (20 h). En tratamientos prolongados, tiende a acumularse tanto en el feto como en la madre y se puede encontrar en la leche (Kanto y cols., 1987), debido a que todos los metabolitos de las BDZ son lipofílicos, atraviesan fácilmente las membranas; aunque el oxazepam, lorazepam, nitrazepam y en especial, el FNZ atraviezan la membrana más lentamente que el DZ (Kanto, 1982). Los niños cuyas madres recibieron en el primer trimestre BDZ, presentaron paladar hendido, malformaciones cardíacas y otras malformaciones; pero en el último trimestre, los recién nacidos presentaban el síndrome de niños hipotónicos (floppy infant syndrome), producto de las altas dosis de BZ; sin embargo, su uso crónico durante todo el período de gestación afecta el desarrollo neural, el comportamiento de los infantes y el IQ (McELHatton, 1994).

En algunos fetos de las mujeres con incompetencia cervical, que fueron intervenidas quirúrgicamente y se les aplicó FNZ en dosis de 0.05 mg/kg, administrado entre la 11ª y 17ª semanas de gestación, se produjo la disminución de los movimientos, 30 a 90 segundos después de la administración a la madre. En otros, se manifestaron movimientos fetales hipercinéticos similares a convulsiones, situación que en ambos casos, se mantuvo por lo menos 15 minutos, lo cual se interpreta como un signo de sufrimiento fetal (Amoia y cols., 1987).

En ratas macho, cuyas madres recibieron una dosis de DZ (50 mg/kg) en el día diez de la gestación, no tuvieron malformaciones en el sistema reproductor o alteraciones en los niveles de testosterona, LH, FSH y GnRH; pero aumentó la densidad de los receptores benzodiazepínicos en el cerebro (Wilkinson y Moger, 1980).

La ontogenia del receptor benzodiazepínico central fue estudiada en embriones y fetos humanos de la 7^a hasta 26^a semanas, utilizando FNZ^[3H]. En dicho estudio, se observó que la unión variaba de acuerdo con la etapa del desarrollo, ya que el receptor aumenta su densidad en el tejido cerebral entre las ocho y las once semanas de la gestación y en la corteza frontal entre la 12 y 26 semanas (Hebebrand y cols., 1988). Mediante transferencias se observó la alta unión del FNZ^[3H] a las 24 semanas postconcepción en médula oblongada y el tálamo, y a las 26 semanas en el cerebelo (Reichelt y cols., 1991).

En cerebro de ratón se ha demostrado que la unión del FNZ^[3H] es reversible, esteroespecífica, saturable y con alta afinidad (Whitaker y cols., 1984). En el lóbulo occipital de pollo se identificaron sitios de unión para el FNZ al día 12 de desarrollo, con una densidad del receptor del 30.9% con respecto a los medidos en el pollo de 16 días en el que alcanza la densidad adulta. La máxima expresión de unión al receptor benzodiazepínico se encontró entre el día de la eclosión y el día dos postnatal, y fue el doble del encontrado al día 16 lo que es un desarrollo precoz al receptor GABA (Gravielle y Fiszler de Plazas, 1991).

La concentración de neuroesteroides en el plasma y el comportamiento de plasticidad del GABA_A y del RBP en las ratas varía durante la gestación y la lactancia (Weisman y cols., 1997). El GABA_A aumenta su densidad, y la unión del FNZ^[3H] en el día 19 de gestación a nivel del hipocampo y de la corteza cerebral de rata (Concas y cols., 1999). La densidad de los RBP incrementa en el ovario y el útero durante la gestación; en cambio en la corteza suprarrenal disminuye durante la gestación y en la lactancia (Weisman y cols., 1997).

Los neuroesteroides se unen específicamente al complejo GABA_A y modulan su función. Los receptores GABA_A están localizados en las sinapsis GABAérgicas, rodeando los canales de cloro, que al aumentar su conductancia producen una reacción inhibitoria. El receptor GABA_A tiene sitios de unión para sustancias como los barbitúricos, sedantes, hipnóticos, ansiolíticos y otros anticonvulsivantes, y de esteroides. Tienen cuatro familias de

subunidades con varias isoformas α , β , γ , y δ . Algunos esteroides que se unen al receptor GABA_A actúan como sedantes, hipnóticos y anestésicos en dosis sistémicas. La unión del FNZ^[3H] a este receptor en el cerebro de rata, puede ser estimulado por dos metabolitos de la progesterona, la 3 α hidroxí-5 α -pregnenolona (3 α -OH-DHP) y la 3 β -OH-DHP, que provoca baroreflejos y modulan la regulación autonómica de la presión sanguínea durante la gestación (Garrett y cols., 1997).

En el ovario los RBP, se localizan específicamente, en las células de la granulosa, en las del cuerpo lúteo y en el tejido esteroideogénico (Toranzo y cols., 1994). Los RBP están colocalizados en la membrana externa de las mitocondrias de las células de estos órganos (Anholt y cols., 1985; Barnea y cols., 1989; Papadopoulos, 1991).

Síntesis de esteroides a partir del colesterol

El colesterol es el principal sustrato para la formación de las hormonas esteroides sintetizadas en el ovario y en la corteza suprarrenal; sus precursores son metabolizados en el hígado en donde ocurre la síntesis de acetil Co A. Es durante la biotransformación de glúcidos, ácidos grasos y aminoácidos a partir de la cual se forma la hidroximetil glutaril Co A, que a su vez origina cuerpos cetónicos y acetogéninas que son las precursoras del colesterol (figura 1).

En el ovario, los principales andrógenos sintetizados son la dehidroepiandrosterona, la androstenodiona y la testosterona, precursores de los estrógenos. Dentro del grupo de estas hormonas están la estrona y el 17 β estradiol, los cuales se forman en el folículo ovárico. Las células foliculares pueden captar el colesterol a partir de las lipoproteínas circulantes en la sangre o por la hidrólisis de los ésteres de colesterol almacenados en forma de gotas lipídicas dentro de la célula, y sintetizarlo *de novo*, de los acetatos.

Las hormonas esteroides se clasifican de acuerdo a su estructura química o su fisiológica. Las hormonas sexuales son las progestinas, los andrógenos y los estrógenos. Las progestinas tienen una estructura pregnano C₂₁, los andrógenos, androstanos C₁₉ y los estrógenos, estrano C₁₈. En el folículo se produce en su mayoría la progesterona C₂₁. El complejo multienzimático que cataliza los cortes de las cadenas a partir de colesterol consta

de tres partes: el citocromo p450_{scc} (side chain cleavage) aceptador de electrones, una flavoproteína dependiente de NADPH, y la ferrosulfoproteína luteoxidina, que transporta electrones. Estas reacciones se activan por estímulo de la hormona luteinizante.

La progesterona adquiere su estructura a partir de una reacción catalizada por la isomerasa 3 β hidroxisteroide deshidrogenasa / Δ^{5-4} isomerasa (3 β HSD), que convierte la pregnenolona y la androsterona en progesterona y androstenodiona, respectivamente. La síntesis de andrógenos requiere de la p450_{scc}, la 3 β HSD, la 17 α hidroxilasa / C17-20 liasa que posee citocromo p450_{C17}, la cual requiere de NADPH y oxígeno, y la 17- quelosteroide reductasa (Greco y Payne, 1994).

El receptor benzodiazepínico periférico y el colesterol

La proteína RBP difiere del receptor RBC, en que el segundo está acoplado al canal aniónico del GABA_A; el primero es una proteína relacionada con un canal aniónico dependiente de voltage (CADV) asociado a un acarreador adenina nucleótido (ANC) (McEnery y cols., 1992) y a canales de K⁺ y Ca²⁺ o a canales de Ca²⁺ dependientes de voltaje (Tabla1). Las diferencias entre el RBC asociado al GABA_A y el RBP se resumen en la tabla 1 (Parola y cols., 1993; Drugan, 1996; Zisterer y Williams, 1997).

El aislamiento de RBP como un complejo asociado a CADV de 34kd, está ubicado en la membrana mitocondrial, lo que sugiere la existencia de un complejo multimérico, que puede funcionar como un poro y modular la unión de drogas y ligandos endógenos de forma alostérica (Zisterer y Williams, 1997).

Se ha descrito que el RBP es el principal regulador del transporte de colesterol en los órganos esteroideogénicos (Mukin, 1989; Papadopoulos, 1991, 1997; Riond, 1991; Toranzo y cols., 1994). Las cantidades de colesterol fuera de la membrana mitocondrial después del tratamiento con los ligandos del RBP fueron menores y produjo la inducción de la síntesis de

pregnenolona en las células adrenocorticales (Krueger y cols., 1990) y en las células intersticiales (Papadopoulos y cols., 1997).

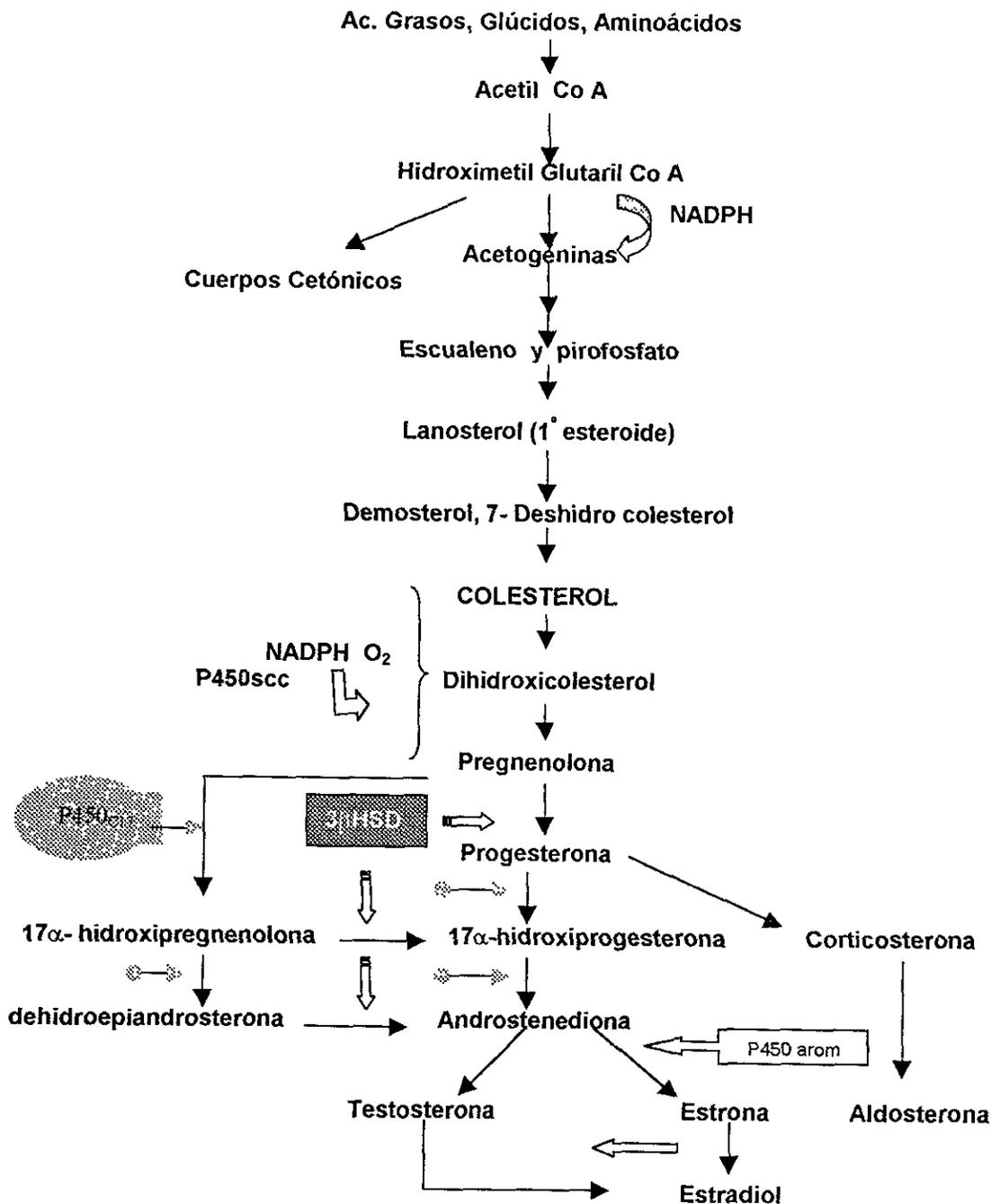


Figura 1. Biosíntesis *de novo* de colesterol y hormonas esteroideas en células esteroideas. Modificado de Lehninger, 1988.

Utilizando la secuencia de aminoácidos de la proteína RBP humana y de ratón se construyó un modelo tridimensional de este receptor con simulaciones dinámicas moleculares, con los que se identificaron cinco dominios transmembranales α hélice en la membrana externa de la mitocondria y una molécula como el colesterol localizada en el canal. Este modelo teórico soporta los datos experimentales antes mencionados (citado en Papadopoulos y cols., 1997) (figura 2).

Relación del receptor GABA_A con las hormonas esteroides

Las neuronas del hipotálamo sensibles a esteroides tienen altas densidades de receptores para andrógenos y estrógenos, y en el hipocampo para esteroides adrenocorticales. Algunos esteroides y sus metabolitos tienen efecto sedante e hipnótico, porque modulan la actividad del complejo receptor GABA_A, como el metabolito de progesterona 3 α hidroxí-5 α -pregnan-20-ona (3 α -OH-DHP) y el metabolito de deoxicorticosterona 3 α ,21-dihidroxí-5 α -pregnan-20-ona (THDOC). Ambos amplifican la unión de las BDZ^[3H] al receptor, el cual inhibe la unión del [35S]-t-butilciclofosforotionato (TBPS), ésta es una droga convulsivante que potencia la sinapsis GABAérgica del hipocampo, el cordón espinal, al estimular el flujo del Cl dentro de los sinaptosomas. El patrón de acción del flujo de Cl, es similar a la acción de barbitúricos.

Los neuroesteroides son sustancias esteroideas neuroactivas sintetizadas en el cerebro, que modulan la actividad neuronal. En particular la de los receptores GABA_A, como se muestra en la figura 3 (Feldman y cols., 1997, Papadopoulos, 1993).

El estrés y el receptor benzodiazepínico periférico

El RBP se ha localizado, a nivel del sistema nervioso central, en la corteza cerebral, en la médula oblongada y en la médula espinal (revisado en Drugan, 1996). En las células de las glándulas reproductoras y en otros tejidos como los de la corteza adrenal, hipófisis y testículos,

1997), las glándulas salivales, el epitelio nasal, las plaquetas, los eritrocitos, los monocitos, los macrófagos (Anholt y cols., 1985). Y usando autorradiografía de la unión específica de Ro5-4864^[3H] o de metilclonazepam^[3H] en cortes enteros de ratas fetales logran identificar el RBP, que en el día 16 de gestación estaba a los niveles de una rata adulta (Anholt y cols., 1985).

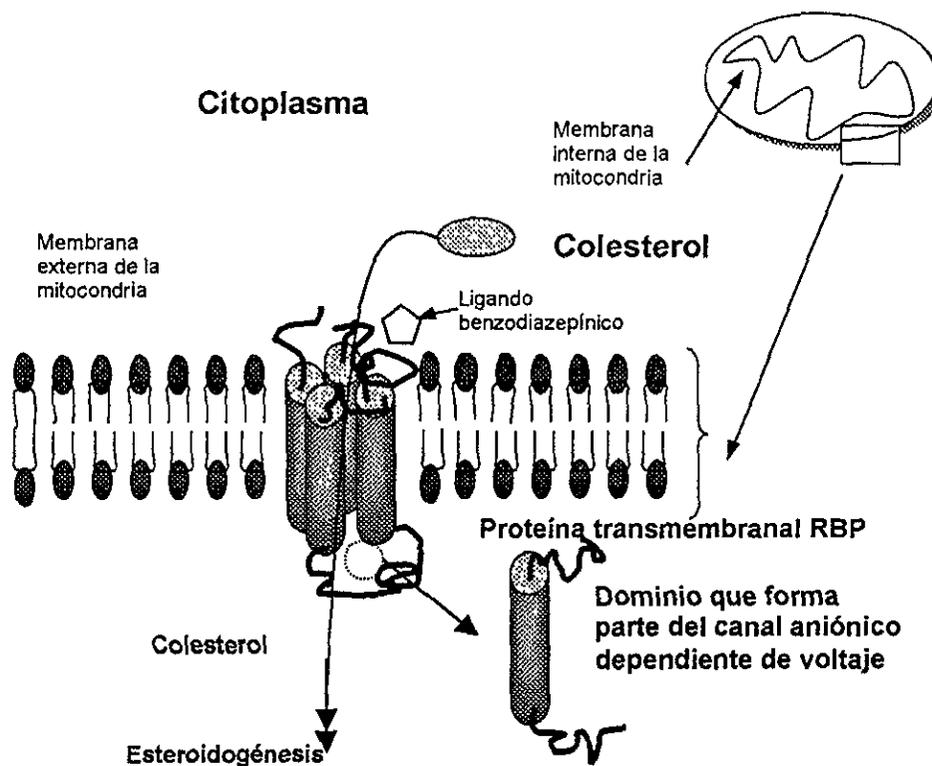


Figura 2. Representación del paso de colesterol a través de la proteína transmembranal RBP. Este se encuentra en la membrana externa de la mitocondria, es un canal aniónico dependiente de voltaje, con un sistema acarreador adenina nucleotico (McEnery y cols., 1992). Su estructura secundaria es de tipo α hélice con 5 dominios. Tiene un extremo carboxílico terminal, con dos sitios de proteína cinasa, que se proyecta en el citoplasma (Parola y cols., 1993). El diagrama es la interpretación de los estudios hechos por varios autores (Parola y cols., 1985 y McEnery y cols., 1992).

En ratas de un día de nacidas, el RBC y el RBP tenían niveles similares en el cerebro; además la autorradiografía localizó el RBP en cartílagos sacrales, discos intervertebrales y cartílagos traqueales, en el timo y en células formadoras de linfocitos (Anholt y cols., 1985).

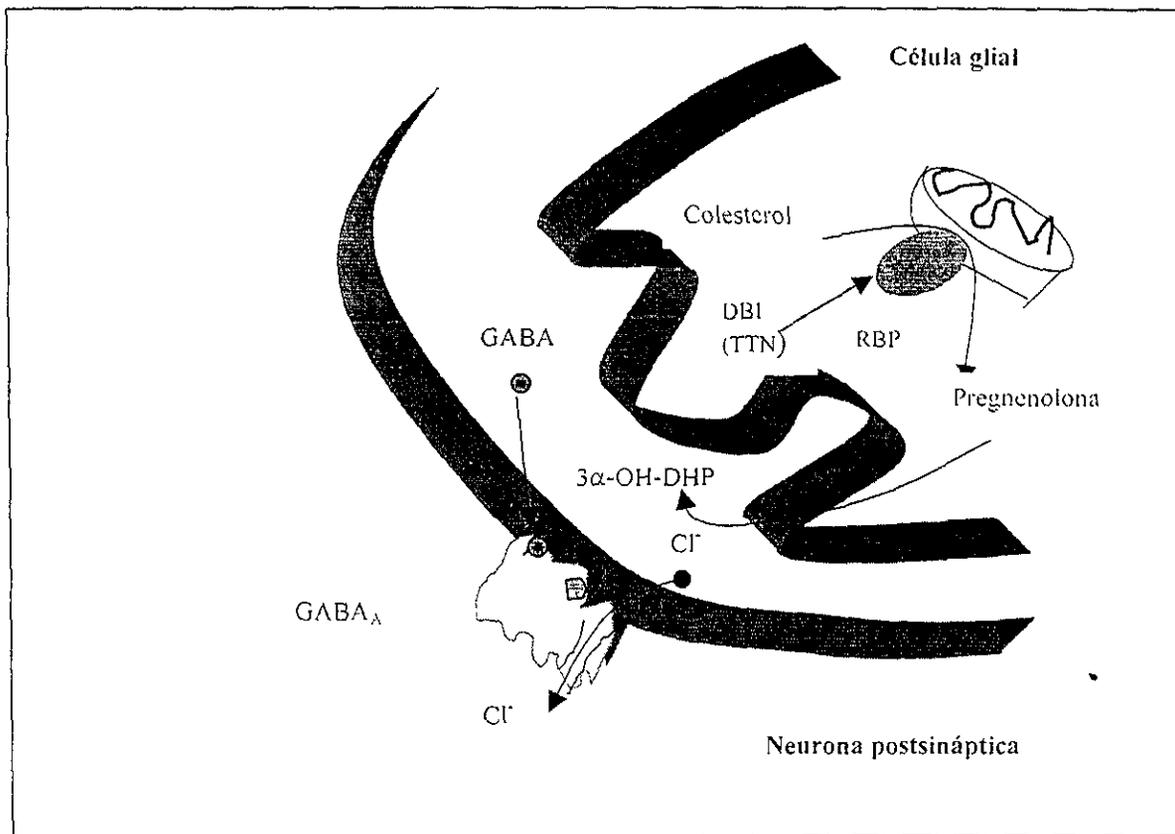


Figura 3 Papel hipotético del receptor benzodiazepínico periférico (RBP) y neuroesteroides en la modulación del receptor GABA_A. El RBP colocalizado en la mitocondria de las células gliales activados por sus ligandos endógenos como el DBI (el inhibidor de la unión de diazepam) o un deca-neuropéptido como el triacontaneuropeptido (TTN), al unirse el RBP induce la conversión de colesterol a pregnenolona que es un precursor de la síntesis de neuroesteroides como el 3α-OH-DHP y pregnenolona sulfato, al liberarse los neuroesteroides de la célula glia modulan negativa o positivamente los canales de Cl⁻ del receptor GABA_A (Modificado de Feldman y cols., 1997)

Otra característica que distingue los tejidos con altos niveles de RBP como corteza suprarrenal, piel, músculo cardíaco, túbulo contorneado ascendente del asa de Henle y túbulos colectores, es que tienen gran actividad de fosforilación oxidativa como fuente de energía. Anholt (1985) asocia, de forma positiva, la histoquímica de la actividad de la citocromo oxidasa con los patrones autorradiográficos de la unión de Ro5-4864, en los tejidos antes mencionados. Su papel fisiológico aún no se tiene muy claro por su localización tan variada.

con los patrones autorradiográficos de la unión de Ro5-4864, en los tejidos antes mencionados. Su papel fisiológico aún no se tiene muy claro por su localización tan variada.

Tabla1.

Características de los receptores benzodiazepínicos centrales y periféricos.

	RBP	RBC
Distribución	Ubicua, localizado en sitios específicos de los órganos, con alta densidad en tejido esteroideogénico y en la glia.	En sistema nervioso central, en las neuronas y la glia.
Localización subcelular	Membrana externa de las mitocondrias, membrana citoplásmica de las células sanguíneas.	Membrana citoplasmática de las neuronas.
Ligandos sintéticos	Isoquinolinas, imidazopiridinas, BDZ (insensible al GABA).	BDZ, imidazopiridinas (sensibles al GABA), β -carbolinas.
Ligandos endógenos	Ácido dicarboxílico porfirínico, análogos de la proteína de inhibición de la unión de DZ.	Purinas, proteína de inhibición de la unión de DZ.
Componentes estructurales	Proteína de unión de isoquinolina (IBP, 18 kd), CADV, ANC, proteína de 10 kd no caracterizada.	Es heterógeno, tiene subunidades α , β , γ , y δ . La α , está compartiendo con el receptor GABA _A .
Mecanismo de unión	En estudio. Está involucrado en el metabolismo y/o transporte del colesterol, o de canales iónicos. Modulación del sistema inmune.	Regula el flujo de Cl ⁻ por modulación del receptor GABA.

Aunque, su ubicación amplia, sí explica la acción farmacología a nivel molecular, el sistema neuro - hormonal y la variedad de respuestas al estrés, en estos tejidos (Drugan, 1996).

En linfocitos de pacientes y en ratas con ansiedad generalizada, se disminuye la densidad de RBP, al igual que su RNA mensajero, por lo que se comprueba que afecta la transcripción del gen (Rocca y cols., 1998).

El estrés agudo induce un incremento en los niveles plasmáticos de corticosterona y del RBP de las glándulas suprarrenales y en la producción de esteroides en ratas (Ferrarese y cols., 1991). Se ha propuesto que el RBP interviene en la respuesta al estrés, que incluye: un sistema de alerta en glándula suprarrenal, hipertensión inducida a nivel renal, e inmunosupresión temporal (Drugan y cols., 1995).

Sistema de respuesta al estrés

La respuesta adaptativa al estrés, se caracteriza por cambios en el comportamiento físico y emocional, como el incremento de la excitación, atención, estado de alerta, supresión de la actividad sexual y modificación de los hábitos alimenticios. Hay un aporte energético de oxígeno y nutrientes al sitio que se estresó y al sistema nervioso central donde se requiere.

Los coordinadores centrales del sistema de estrés son:

- La hormona liberadora de corticotropina (CRH)
- Neuronas hipotalámicas secretoras de angiotensina - arginina
- Neuronas catecolaminérgicas del locus ceruleus y otros grupos de la amígdala.

El eje hipotálamo – hipófisis – corteza suprarrenal y los sistemas adrenomedular - simpático son las ramas periféricas. La CRH y las neuronas adrenérgicas son estimuladas por la serotonina; en tanto que la acetilcolina es inhibida por los glucocorticoides, el ácido γ aminobutírico (GABA), las corticotropinas y los péptidos opioides (figura 4). La estimulación de la secreción de los opioides inhibe la respuesta del sistema de estrés y, a través del cerebro y de la médula espinal, produce analgesia (Stratakis y Chrousos, 1995). La respuesta al estrés

del eje hipotálamo-hipófisis–corteza suprarrenal, es la liberación de glucocorticoides que controlan la homeostasis corporal. Otros factores son producidos durante los diferentes tipos de estrés, y potencian la actividad del eje. Entre estos se encuentran la angiotensina II, las citocinas y lípidos mediadores de la inflamación.

El estrés relacionado con los estados de ánimo activa otras vías del sistema nervioso central, como:

- Sistema dopamina mesolímbico y mesocortical.
- Complejo hipocampo amigdalino, involucrado con estrés emocional como el miedo.
- Neuronas secretoras de péptidos opioides que alteran la sensibilidad al dolor e influyen emocionalmente (Stratakis y Chrousos, 1995).

Entre las manifestaciones clásicas de la respuesta generalizada al estrés, se encuentran la depresión melancólica, la ansiedad, la anorexia, la pérdida de la libido, excesiva y prolongada reversión de la energía que induce taquicardia o hipertensión. Tanto el eje hipotálamo-hipófisis–corteza suprarrenal como el sistema simpático, se activan, isocrónicamente, en la depresión melancólica, en la anorexia nerviosa, el pánico, los desórdenes obsesivo compulsivos, el alcoholismo crónico, la abstinencia narcótica, el ejercicio excesivo, la desnutrición y el abuso sexual en niñas.

Los primates no humanos, criados durante el período de infancia por madres que confrontan un ambiente hostil, después de varios años de permanencia con la madre durante su crianza, presentan en la etapa adulta alteraciones en el sistema dopaminérgico y serotoninérgico debidas a la concentración elevada de CRH en el líquido cerebroespinal y a la disminución de cortisol. Estos cambios hormonales son evidencia de hiperactividad de las neuronas hipotalámicas, secretoras de la CRH, la cual está involucrada en la fisiopatología de alteraciones afectivas, que son extrapoladas al humano, como el de la ansiedad. Esto podría explicar el origen de la psicopatología adulta de las personas expuestas a estresores durante la infancia (Coplan y cols., 1996).

El estrés prenatal por agresividad, en simios y ratones, trae como consecuencia que las crías desarrollen un comportamiento agresivo en la edad adulta. En un modelo de estrés, aplicado a hembras gestantes basado en el sometimiento a ruidos intensos y frecuentes, las

crías presentaron trastornos de comportamiento, como gestos estereotipados, ansiedad e inhibición (Postel Vinay, 1998). Al parecer el CRH interviene en todos los procesos cognitivos y alteraciones de comportamiento. Al inyectar en el líquido cerebro espinal de simios, se produce un comportamiento de desesperación similar al de los simios jóvenes separados de su madre en los primeros días de la infancia, pero se puede contrarrestar con un antagonista del CRH (Postel Vinay, 1998).

En el nivel celular existen procesos de adaptación a los efectos adversos del ambiente. El complejo multimérico de proteosomas que consiste en proteasas, tiene un papel esencial en el control de la diferenciación celular, el cual se requiere para la adaptación a cambios ambientales, tales como la respuesta al estrés. Su acción consiste en eliminar las proteínas anormales producidas en la respuesta inmune o en el control del programa celular, por degradación de ciclinas dependientes de proteínas cinasas, sintetizadas en diferentes fases del ciclo celular (Hilt y cols., 1996).

El estrés también induce la activación del factor de necrosis tumoral α (TNF α), que al unirse al receptor, Fas que lleva un dominio de muerte de 80 aminoácidos en la región citoplásmica (Lewin, 1997; Abbas y cols., 1999; Nagata, 2000; Bratton y cols., 2000). La trimerización de este dominio provoca la cascada de activación de procaspasas y la activación del apoptosoma, que produce fragmentación de: DNA por medio de la DNasa, proteínas de replicación, transcripción, traducción de proteínas del citoesqueleto como fodrina, gelsorina o actina (revisado en Nagata, 2000). Los tejidos de una gran cantidad de órganos pueden experimentar remodelación y degeneración, por el sistema activo de la apoptosis.

Las células apoptóticas presentan cromatina condensada y formación de pequeñas esferas cerca de la membrana celular, llamados cuerpos apoptóticos, los cuales son fragmentos nucleares. Este tipo de células son fagocitados, por lo cual sus componentes quedan incluidos en el citoplasma y no producen reacción inflamatoria (Hsueh y cols.; 1994 Abbas y cols., 1999).

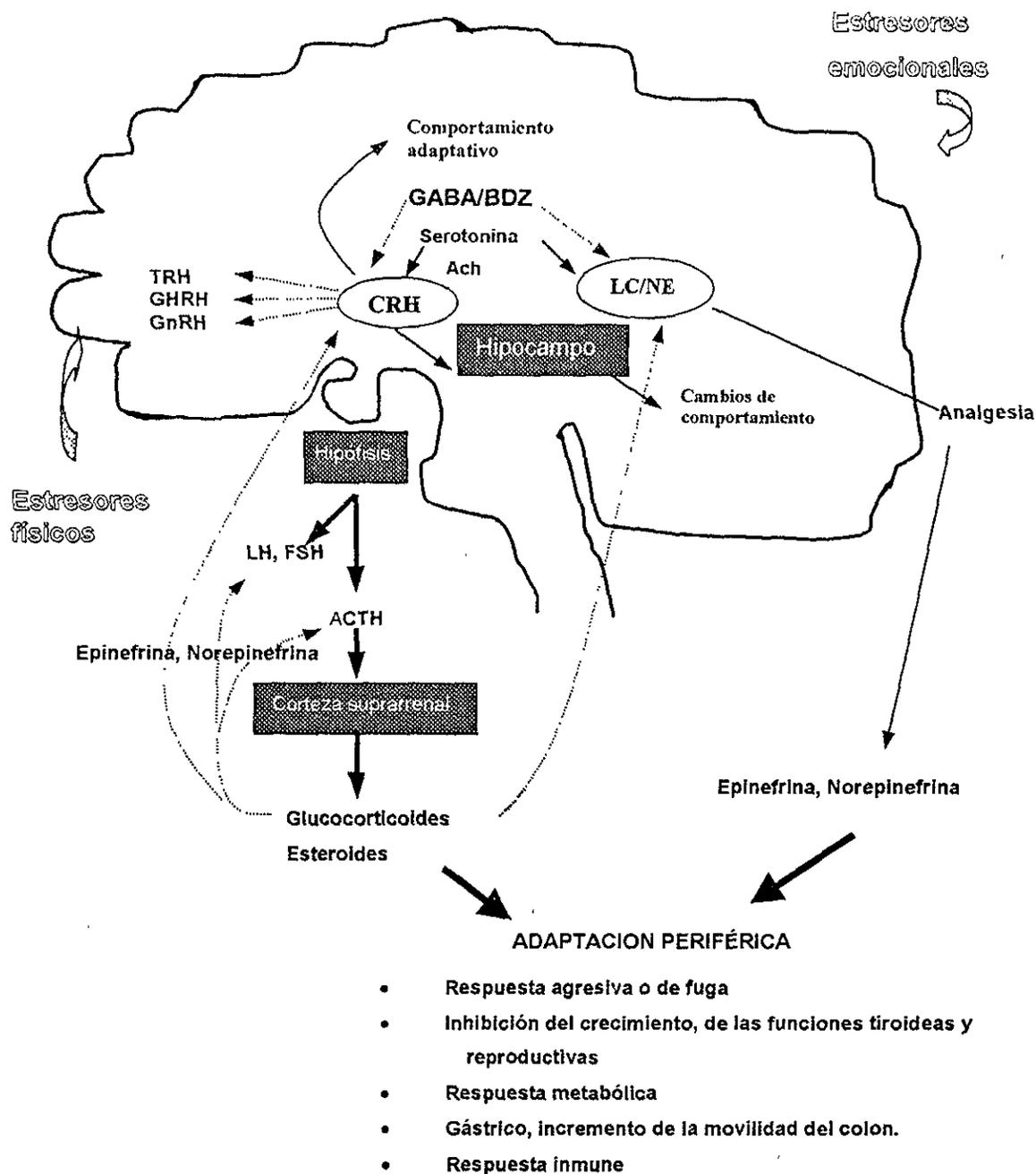


Figura 4. Representación esquemática de los cambios neuroquímicos y los componentes periféricos durante el sistema de respuesta de estrés. Las líneas punteadas señalan inhibición directa o indirecta. El factor liberador de corticotropina (CRH) estimula la liberación de ACTH desde la hipófisis, activa el locus coeruleus (LC) provocando un efecto de analgesia de inhibir el sistema de estrés. EL CRH también inhibe la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH) y a su vez a la LH y FSH. (Modificado de Ferrarese y cols., 1991, Stratakis, 1995).

Desarrollo del ovario

En el embrión trilaminar, las células germinales primordiales o gonocitos aparecen sobre el saco vitelino, hacia la región caudal, de donde migran con movimientos ameboides a lo largo del mesenterio dorsal y, posteriormente, llegan a los pliegues urogenitales, en donde se desarrollan en la parte medial las gónadas y en la lateral, el mesonefros. Los gonocitos y las células del epitelio celómico proliferan, se proyectan radialmente en la parte genital de la cresta y forman los cordones sexuales primordiales. En esta etapa del desarrollo, las glándulas sexuales son indiferenciadas, desde el punto de vista morfológico.

La determinación sexual del feto depende de los cromosomas XX o XY; en ambos los cordones sexuales primordiales se mantienen unidos a la superficie del epitelio que rodea las células germinales. El mesodermo intermedio, dorsal a las gónadas, dependiendo de la presencia de los cromosomas sexuales, invade, penetrando en éstas. En el macho lo hace en la región cortical, separa a los cordones del epitelio celómico, origina la túnica albugínea y los septos incompletos, y los cordones proliferan manteniendo su estructura original, que después evoluciona. Los gonocitos originan las espermatogonias y las células epiteliales a las indiferenciadas o futuras células de Sertoli. Del mesodermo derivan el estroma testicular y las células intersticiales o de Leydig. En las hembras, el mesodermo intermedio penetra en la región medular y avanza hacia la cortical, lo que provoca degeneración de los cordones primarios y la aparición un nuevo grupo de cordones sexuales que se mantienen en la corteza del ovario primitivo. A este grupo de cordones se les llama cordones sexuales secundarios, los cuales forman racimos alrededor de la célula germinal, que se transforman en ovogonias. El mesodermo intermedio se diferencia en el estroma ovárico y en el tejido esteroideogénico. Tempranamente las ovogonias forman ovocitos primarios rodeados por las células epiteliales de los cordones sexuales epiteliales, que constituyen los folículos primordiales y, posteriormente, serán las células de la granulosa de los folículos en crecimiento.

Las células mesenquimáticas del ovario se convertirán en las de la teca y las esteroideogénicas. En el mesonefros se diferencian dos tipos de conductos, los mesonéfricos o de Wolff y los paramesonéfricos o de Müller; ambos aparecen como pliegues del epitelio celómico en la parte lateral del mesonefros y continúan hacia la cloaca en el que llegan

medialmente. Los conductos de Müller, en las hembras, se mantienen y se diferencian en las tubas uterinas, el útero y la parte superior de la vagina. En el macho involucionan y originan el utrículo prostático.

Mientras el ovario presenta características de proliferación cortical, las ovogonias que no se transforman en el ovocito primario degeneran, sobre todo, aquellas que están en interfase o en mitosis. Al mismo tiempo éstas células entran a la profase de la primera división meiótica y se convierten en ovocitos primarios. Estos alcanzan el estado de diploteno, en la etapa fetal en el que se produce el primer bloqueo meiótico, persistente hasta la pubertad y etapa adulta.

1. Folliculogénesis

Muchos de los ovocitos rodeados por las células foliculares, que forman los folículos primordiales, postnatalmente, también degeneran por una masiva atresia (Hsueh y cols., 1994). En la etapa prepuberal, algunos folículos primordiales empiezan a crecer y las células foliculares originan las células granulosas de forma cuboide. Estas constituyen los folículos primarios, posteriormente son cilíndricas y como resultado de la proliferación celular se estratifican. Mientras los folículos son sólidos, con una o más capas de las células granulosas, forman los preantrales que al crecer continuamente y adquirir una cavidad se llaman folículos secundarios o antrales. Al mismo tiempo que crecen los folículos primarios y secundarios, los ovocitos primarios también lo hacen, duplicando o triplicando su tamaño y la participación de las células granulosas es sintetizar una membrana de proteoglicanos ácidos, que es la zona pelúcida. La comunicación de las células de la granulosa con el ovocito se hace mediante microvellosidades que atraviesan la zona pelúcida por donde pasan los nutrientes, los gases, las hormonas y los segundos mensajeros.

Las células foliculares sintetizan el líquido contenido en la cavidad o antro folicular, compuesto de estradiol, LH, FSH, alrededor de 20 enzimas y proteoglicanos fuertemente negativos. A medida que los folículos crecen las células granulosas, se distribuyen en tres

partes: las de la corona radiada, que rodean a la zona pelúcida, la cual está en contacto con el ovocito, las del *cumulus oophorus* que circundan la corona radiada y la une al estrato granuloso, constituido por las células granulosas que permanecen en contacto con la membrana basal y delimitan el antro folicular.

El estroma del ovario se origina por fuera de la membrana basal y sus células forman la teca interna, la cual contiene muchos capilares que transfieren para proporcionar oxígeno y hormonas hipofisarias a las células granulosas. En la parte interna de esta teca se encuentran las células esteroideogénicas productoras de androstenodiona y testosterona que al ser transferida a las células de la granulosa, serán los precursores de estradiol. Por fuera de la teca interna está la externa cuya característica es la de ser fibrosa, menos vascularizada y contiene células microepiteliales que al contraerse en la ovulación ayudan a la expulsión del ovocito con la zona pelúcida, las células de la corona radiada, las del *cumulus oophorus* y el licor folicular primario y secundario que están adyacentes al ovocito.

Al llegar a la pubertad es cuando los folículos primarios reciben una señal de las gonadotropinas hipofisarias (FSH y LH), producidas por el estímulo de la hormona liberadora de gonadotropinas en el hipotálamo; inician su maduración originando folículos secundarios y al transformarse en terciarios o de von Graff, los ovocitos primarios se convierten en secundarios y liberan el primer glóbulo polar. Esto sucede al desaparecer el primer bloqueo meiótico y se inicia la segunda división meiótica en el ovocito secundario sin que haya fase S del ciclo celular, la cual se detiene en la metafase al ocurrir la segunda detención, que desaparece sólo si hay fecundación completándose la segunda división y expulsando el segundo glóbulo polar cuando viaja por la tuba uterina.

La ovulación es inducida por un aumento brusco de la LH, la cual, en la mujer, empieza a aumentar aproximadamente dos días antes de ésta, y junto a la FSH provoca que el folículo forme mayor cantidad de licor folicular que es llamado secundario. La LH estimula a las células de la teca y a las foliculares para que se sintetice progesterona y disminuya la síntesis de estradiol, un día antes de la ovulación. La formación acelerada de licor folicular secundario entre las células granulosa y el licor folicular primario son determinantes del aumento del diámetro folicular que alcanza un tamaño de 1.0 a 2.0 cm y sobresale de la pared

ovárica, provoca compresión de la pared del folículo contra la pared del ovario y al colapsar los vasos de la teca se forma una zona isquémica o estigma. Con el desarrollo de nuevos vasos en la periferia del estigma, se secretan colagenasas, prostaglandinas y plasminógeno. En forma simultánea ocurre la secreción del licor folicular terciario a nivel del cúmulo ovígero, que desprenden sus células junto con las de la corona radiada, de las del estrato granuloso; provocando que el ovocito quede libre en el licor folicular y se acerque al estigma.

Antes de la ovulación se produce una disminución de la presión osmótica del folículo y hemostasis en la periferia del estigma, la cual tiene una pared débil. Por acción de las colagenasas y el activador de plasminógeno, el estigma se rompe, el músculo liso se contrae y se da la eclosión del ovocito secundario rodeado por el cúmulo ovígero, el licor folicular secundario es más fluido y el primario es más viscoso. El ovocito será captado por la fimbria de la tuba uterina (Marquez-Orozco, 1996).

En los folículos primordiales los ovocitos entran a la meiosis inducidas por la progesterona, que provoca el inicio de la primera división de la meiosis. La progesterona induce la formación del factor promotor de la maduración (MPF), el cual fosforila las proteínas de la membrana nuclear, provoca la condensación de los cromosomas y la formación del huso acromático (Lewin, 1997). Las células foliculares que rodean el ovocito activado por el MPF, forman al igual que éste, microvellosidades por las que le transfieren grandes cantidades de AMPc y purinas, que constituyen el factor inhibidor de la primera división meiótica. Este factor detiene al ovocito activado en la subfase diplotena, en el cual puede permanecer por años. En humanos, hacia el final del tercer mes de vida intrauterina las ovogonias inician la fase de crecimiento de la ovogénesis, se transforman en ovocitos primarios que al ser rodeados por la células foliculares forman los folículos primordiales que experimentan la primera detención de la meiosis. Al llegar a la pubertad el aumento de síntesis de LH, disminuye los niveles de AMPc en algunos ovocitos y los de las ciclinas dependientes de proteínas cinasas, lo que provoca la traducción de proteínas para la maduración del ovocito. La baja brusca de AMPc en el ovocito se debe a que las células granulosas de la corona radiada, por acción de la progesterona sintetizan grandes cantidades de AMPc y secretan ácido hialurónico a nivel de la zona pelúcida, provocando el desprendimiento de las microvellosidades del ovocito y de las

células foliculares, y el cese de transferencia de AMPc. La misma progesterona activa otro tipo de proteínas que contribuyen a la maduración del ovocito en la que se encuentran el protooncogen c-mos, que activa al gene c-mos (p39) y este a la ciclina cdc2 e inactiva a la tirosina cinasa Wee1 (inhibidor de la fosforilación). Al desaparecer el primer bloqueo meiótico se completa la primera división de la meiosis, se expulsa el primer glóbulo polar e inicia la segunda división de la meiosis de manera espontánea (Gilbert, 1997).

Entre la meiosis I y la II hay degradación de ciclinas, pero el ovocito tiene dos reservorios de éstas, que son necesarias para completar la segunda división, que se detiene en metafase II por acción de un factor citostático o CSF, activado por c-mos (p39). Uno de los reservorios está asociado a la cdc2/28 que forma el preMPF y se convierte en la forma activa por la cdc2, el cual también es necesaria para que la célula inicie la meiosis I y al final de ésta, induce la degradación de las ciclinas, lo que lleva a la inactivación del MPF. El segundo reservorio de ciclinas no se degrada al final de la división I de la meiosis por tener otra conformación y al activarse un gen c-mos promueve la forma activa del MPF (Murray y Hunt, 1993).

El CSF detiene la segunda división meiótica en metafase II por evasión de la degradación de las ciclinas. El ovocito secundario se libera del segundo bloqueo meiótico al momento de la fertilización, en la que al aumentar la concentración intercelular de Ca^{2+} , inactiva el MPF, al c-mos y ocurre la degradación de ciclinas (Murray y Hunt, 1993).

En el ratón el bloqueo de la segunda división meiótica desaparece en los ovocitos secundarios tres horas antes de la ovulación. Entre los doce y los diecisiete días de vida postnatal, en el cual se observa la formación de folículos antrales y algunos folículos con sus ovocitos alcanzan, su tamaño máximo. Cuando ocurre la primera ovulación, alrededor de los 35 días de edad, aumenta la proporción de los folículos atrésicos, ya que la degeneración folicular se produce antes y durante la ovulación. En cada ciclo estral, que dura de cuatro a cinco días, se calcula que alrededor de 1,000 ovocitos son aptos para continuar la ovogénesis, sin embargo, sólo el 1% madura. Se considera que la vida reproductiva óptima, comprende de los dos a los doce meses, tiempo en el que la hembra tiene un promedio de 60,000 ovocitos

viables; de los cuales maduran aproximadamente 500 y de estos 100 son candidatos para generar ratones que llegan al término de la gestación (Rugh, 1968).

2. Atresia folicular

Desde 1957, se identificó la atresia folicular en fetos humanos, antes del nacimiento (Byskov, 1978) y posteriormente se observó que ocurría en todos los estados del desarrollo folicular. La atresia consiste en la pérdida o la ausencia de la luz de una estructura o de un órgano. Es un fenómeno que se presenta en la clase mamífera y en otros grupos de vertebrados, que tienen tejidos con una tasa de proliferación celular acelerada, como la del sistema hematopoyético, el epitelio intestinal y el tejido germinal del testículo (Kaipia y col, 1997).

Los folículos atrésicos se caracterizan por la presencia de actividad fagocitaria masiva de las células de la granulosa, que tienen núcleos picnóticos o con zonas densas de heterocromatina que ocultan la membrana nuclear. Al inicio de la atresia, las células granulosas se aplanan, pierden las prolongaciones citoplásmicas, la comunicación intercelular y aumentan los niveles de la 3β - HSD y de lípidos. El ovocito pseudomadura, su citoplasma se fragmenta para formar células de menor tamaño, semejantes a los blastómeros.

En la atresia folicular, la zona pelucida se pliega y engrosa, muchos de los ovocitos reducen su tamaño, los organelos citoplásmicos tienden a aglutinarse y la membrana nuclear pierde su apariencia bilaminar. Las células apoptóticas tienen características morfológicas similares a las de células de la teca y de la granulosa atrésicas; ya que la degeneración folicular es un proceso apoptótico, controlado hormonalmente (Kaipia y cols., 1997; Sinha-Hikim, 1997).

La apoptosis se presenta en diferentes tipos de atrofia, incluyendo el que se producen en tejidos dependientes del sistema endocrino que es provocada por la disminución en la concentración sanguínea de hormonas tróficas. Por ejemplo, la baja de los niveles de ACTH que actúa sobre la corteza suprarrenal, de estrógenos en el epitelio endométrico, en la teca

interna y en el endotelio vascular durante la regresión lútea de ovino, en ambos casos, se produce muerte celular por apoptosis (revisado en Wyllie y cols., 1980).

En las células de la teca interna, durante la atresia folicular, se presenta acumulación de lípidos, aumento del retículo endoplásmico liso, la transformación de estas células es similar morfológicamente al tejido intersticial. El material celular producido durante la degeneración, se acumula y bloquea los capilares tecales de los folículos atrésicos, el colapso total se completa por la contracción de las fibras del músculo liso de la teca externa.

Los folículos atrésicos tienen una alta actividad de endonucleasas dependiente de Ca^{+2}/Mg^{+2} , sobre todo en las células de la granulosa, no así en las células del *cumulus oophorus* ($p < 0.001$), pero en folículos sanos, la actividad de la enzima es baja ($< 1.0\%$) (Manabe y cols., 1996). La relación de la actividad de la endonucleasa y la razón de progesterona/estradiol del fluido folicular tiene una correlación de $r=0.987$, lo que comprueba la influencia de las hormonas (Manabe y cols., 1996).

Esta forma de muerte celular, representa un mecanismo importante de eliminación de excedentes celulares o de los que tienen algún daño, el cual puede ser regulado por diferentes estímulos. El aporte hormonal es esencial para algunos tejidos, por ejemplo al tratar células germinales de ratas machos adultos con antagonistas de hormonas hipofisarias, se produce un incremento en la fragmentación del ADN, y existe una correlación de $r=0.94$ entre el número de células apoptóticas y las que inician la degeneración (Sinha-Hikim, 1997). Se sabe que en este proceso están involucradas muchas proteínas del ciclo celular.

El crecimiento de los folículos del ovario es regulado por vía hormonal, en donde las células que forman parte de un folículo primario que están en fase G1 del ciclo celular, son inducidas a proliferar por acción de la hormona FSH y LH hasta que alcanzan el estado preovulatorio. Al inicio del ciclo celular se presenta la activación de una cascada de cinasas.

En el ratón se comprobó que la ciclina D2, actúa como regulador positivo del ciclo celular, la cual se une a las cinasas dependientes de cinasas (Cdc) 4 o 6, que determinan el inicio de la fase G1. La ciclina E, se acumula y actúa la cdc2 en la transición de G1 a S, mientras que la proteína $p27^{kip1}$ detiene el ciclo en G1 al inactivar las cinasas (revisado en Robker y Richards, 1998) (figura 4).

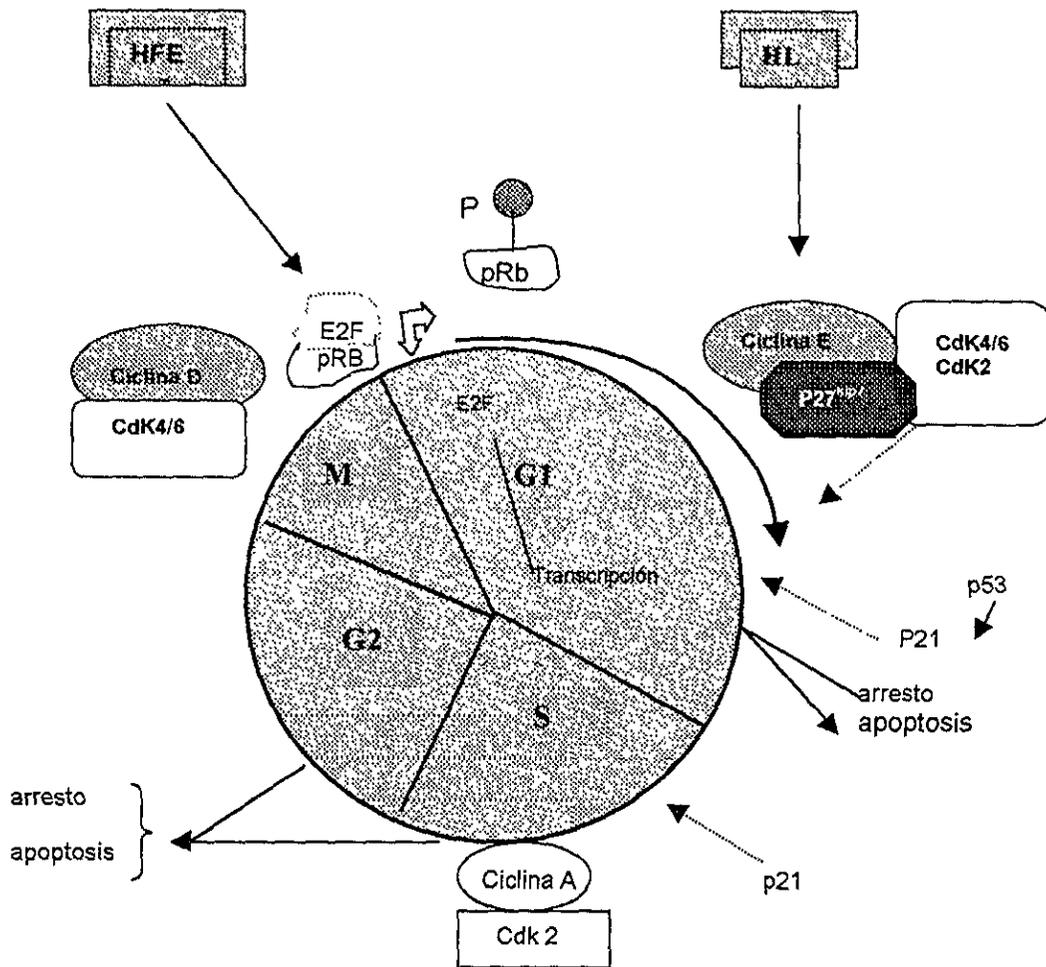


Figura 5. Relación de la activación o inhibición de las ciclinas dependientes de cinasas (cdks) con la progresión del ciclo por fosforilación de la proteína pRb (retinoblastoma) y el arresto celular por acción de la proteína p53 permanece en G1, ésta a su vez, estimula la transcripción de la proteína inhibidora p21. p53 reconoce y se une a varios tipos de ADN dañado (Meikrantz, 1995, Schafer, 1998). Las células de la granulosa responden a la HFE, proliferando. Las células granulosas en proceso de luteinización responden a la HL y se detienen en G1 al bajar la producción de la ciclina E y aumentar la p27 (Robker y Richards 1998).

La ciclina D responde a la LH y evita el primer paso en la progresión del ciclo celular. La LH provoca que termine la proliferación de la granulosa que inician su diferenciación en células lúteas invirtiendo el balance de los reguladores positivos y negativos del ciclo (Robker y Richards 1998).

También la proteína cinasa A y el AMPc juegan un papel relevante en la proliferación, diferenciación y muerte de las células granulosas. Las FSH y la LH controlan los niveles de AMPc en estas células, que al aumentar activan la ciclina D2/E y proliferan. La unión de la proteína cinasa A al AMPc controla la salida de la mitosis, por degeneración de la ciclina B que por lo tanto no puede unirse a las ciclinas dependientes de cinasas y deja de producirse el MPF.

Planteamiento del problema

El estudio del efecto de fármacos, que atraviesan la barrera placentaria como el flunitrazepam (Kanto, y cols., 1987), cuyos receptores (RBC y RBP) son de temprana aparición en el desarrollo fetal, pretende responder las siguientes preguntas:

¿Cuál es el efecto del FNZ, a nivel histológico y morfométrico en el ovario de crías de ratón si se le administra prenatalmente? ¿Podría afectar poblaciones de folículos ováricos y las células del cuerpo lúteo? No se han descrito reportes del efecto del FNZ en tejido ovárico de ratones, por lo que el presente trabajo se justifica, ya que busca contribuir al esclarecimiento de las preguntas expuestas.

El FNZ es lipofílico, por lo que se acumula en los tejidos maternos y fetales en donde abundan los lípidos, en particular en los esteroideogénicos.

El FNZ es utilizado por la población humana como tranquilizante menor, es consumido como fármaco dependiente por vía oral o intravenosa, se usa en padecimientos como la ansiedad y estrés excesivo. El estrés es frecuente en la población debido a aspectos culturales, sociales, políticos, económicos y patológicos, que requieren de tratamiento farmacológico de tipo profiláctico o de padecimiento específico, para el que son muy eficientes y muy utilizadas las benzodiazepinas. Por lo anterior, es importante explorar mediante un modelo experimental, *in vivo*, las consecuencias del uso del FNZ, utilizando el efecto del estrés como control en este estudio de estructura - función en el ovario, lo que es relevante en la reproducción, que pudieran tener efecto evolutivo. Porque si se alteran genes mayores durante la embriogénesis, repercutirá en generaciones subsecuentes y en desequilibrio del funcionamiento metabólico del organismo.

Hipótesis

Dado que el FNZ es una benzodiazepina, se utiliza en humanos por su efecto tranquilizante y el DZ es un fármaco de la misma naturaleza, que al administrarse prenatalmente produce alteraciones histológicas en el ovario. Así la administración *in utero* de FNZ a ratones de la cepa ICR, en condiciones normales y estresantes, provoca cambios histológicos y morfométricos en el ovario.

Objetivo general

Analizar el efecto postnatal del flunitrazepam en el tejido ovárico de los ratones de la cepa ICR, expuestos *in utero* a dosis únicas de 2.5mg/kg de peso corporal.

Objetivos específicos

- Identificar las alteraciones histológicas del ovario de ratones expuestos *in utero* a flunitrazepam, cuyas madres fueron sometidas a estrés por inmovilización y de las sometidas a ambos tratamientos.
- Comparar los cambios histológicos observados y el número de los tipos celulares del ovario, como en los folículos primordiales, primarios y secundarios normales, así como de los atrésicos, células lúteas y paralúteas de los ratones expuestos prenatalmente al flunitrazepam, estrés y a ambos tratamientos, con los controles.
- Analizar las concentraciones de progesterona y 17 β estradiol en el plasma de ratones adultos que fueron sometidos a flunitrazepam, a estrés y la combinación de ambos durante el período prenatal.

Material y Métodos

La colonia de ratones utilizada en el estudio fue de la cepa ICR, importada de Harlan Sprague Dawley Inc., Indianapolis. Las hembras con peso de 25-30 g y los machos de 30-35 g, fueron mantenidos en un ambiente libre de patógenos, a temperatura de 21-22°C, en un ciclo de luz-obscuridad, que es de 12 / 12 horas empezando a las siete horas. Su alimentación fue balanceada utilizando la dieta Teklad LM-485, esterilizable, de Harlan, proporcionada *ad libitum*, la cama (Aspen, de Harlan de México S.A. de C.V.) se esterilizó y el agua se pasaba por un filtro milipore de 0.45 μ m para eliminar microorganismos. El promedio de crías por camada fue ocho a doce. Todos los individuos de la colonia incluyendo los grupos de

grupos de experimentación se criaron en el bioterio del Departamento de Embriología de la Facultad de Medicina de la UNAM. El apareamiento fue endogámico entre los miembros de la colonia de los que se formaron los grupos de experimentación a partir de tres generaciones iniciadas con el grupo colonizador (figura 6).

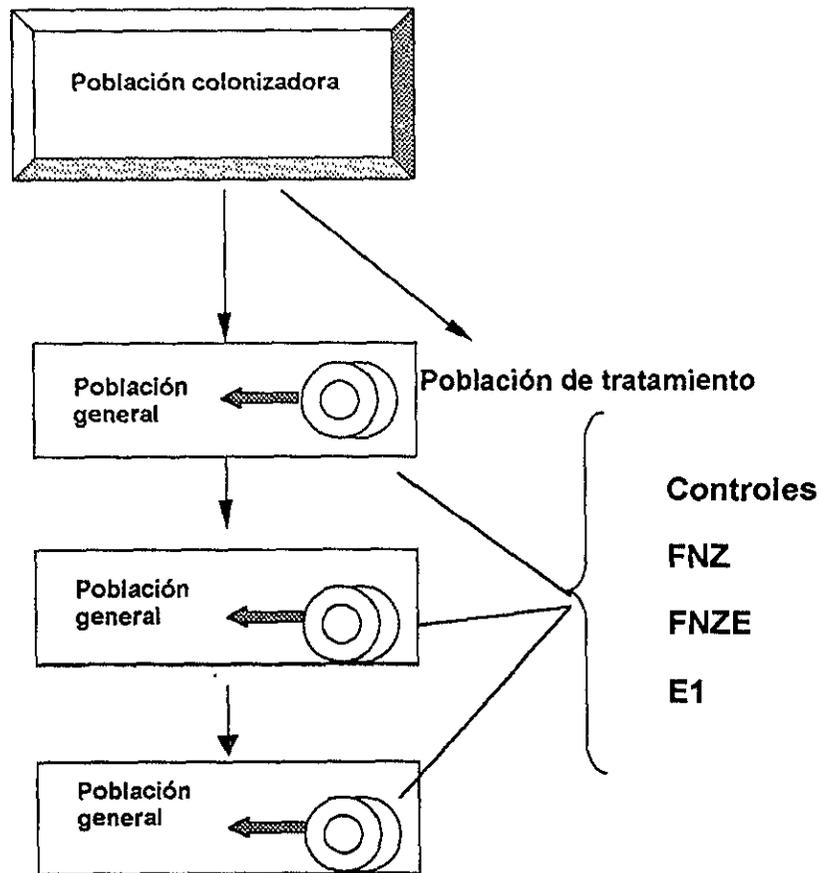


Figura 6. Esquema descriptivo de la distribución de los grupos de experimentación a través de las generaciones de la población colonizadora en el bioterio.

Las cruzas eran abiertas, por lo que se espera en teoría, que las frecuencias genéticas al cabo de n generaciones varíen poco. Tal como lo observó Kimura (1955) al desarrollar un análisis teórico para predecir la distribución de las frecuencias génicas mediante una ecuación

compleja que estructura una población de tamaño finito; pero Cavalli-Sforza predijo el tiempo medio de variación de la distribución de un gen en n generaciones sobre la deriva genética en una población (Cavalli-Sforza y Bodmer, 1985) (figura 7). Es muy probable que la población utilizada en este estudio se comporte a través de las generaciones como se muestra en la figura 7.

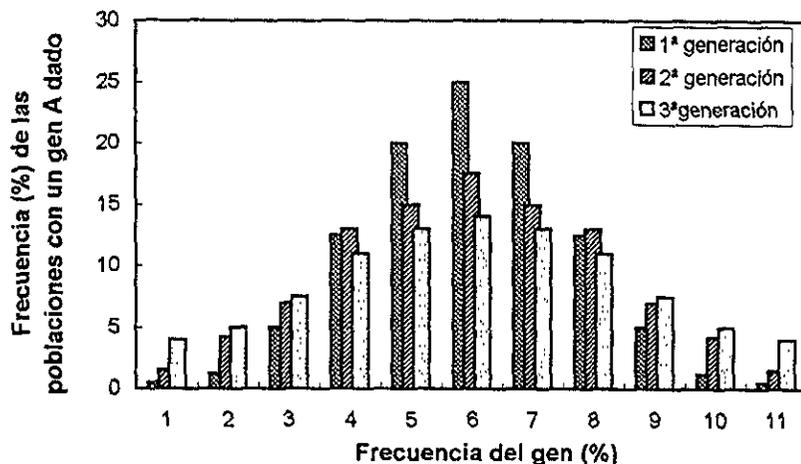


Figura 7. Distribución teórica de frecuencias genéticas bajo deriva al azar en una población de $N=5$ individuos (10 genes). Esta corresponde a la distribución observada por Kimura (Cavalli-Sforza y Bodmer, 1985).

Hembras vírgenes de dos meses de edad se aparearon con machos de la misma cepa y edad, en una proporción de 3:1. El apareamiento se realizó durante el período de obscuridad siempre a la misma hora (05:00 AM), las que presentaron tapón vaginal, que es un signo de la copula, se aislaron; fueron distribuidas al azar en seis grupos y se mantuvieron con alimentación *ad libitum* hasta el sexto día en el que se iniciaron los tratamientos.

El primer grupo (FNZ), recibió por vía oral una sola dosis de flunitrazepam de 2.5mg/kg de peso corporal, el segundo (FNZE) recibió la misma dosis del fármaco que el primero, después de ser sometido a tres horas de estrés por inmovilización, el tercer grupo (E) se estresó por inmovilización en el sexto día de gestación por el mismo período, el cuarto grupo (S) se le suministró solución salina al 0.9%, y el quinto (NT) no fue tratado. Del grupo

uno al tres se utilizó como controles a NT y S, y el grupo E fue control positivo para FNZE. Las crías nacieron entre el 18° y 19° día de gestación.

Las crías de todos los grupos fueron transferidas con nodrizas no tratadas, que las amamantaron en camadas de ocho animales. Se destetaron a los 21 días y a partir de los 60 días a las hembras, se les hicieron frotis vaginales para determinar en la fase del ciclo estral en la que se encontraban y cuando estaban en estro temprano, fueron sedados con éter para extraer, directamente del corazón el volumen total de sangre. Las células sanguíneas fueron separadas por centrifugación en tubos Vacutainer con gel y el plasma fue conservado a -70°C hasta que se realizó el radioinmunoensayo de esteroides (17β estradiol y progesterona). Del plasma se extrajo con tres lavados de éter la hormona 17β estradiol y de progesterona, uno de los cuales se congeló a -70°C y se le agregó carbón para detener la reacción. Se extrajeron 150 nmoles/ml de 17β estradiol y 250 nmoles/ml de progesterona, a partir de estas cantidades se hizo la curva de calibración. Se purificó mediante una columna de Sephadex y la elución fue con una solución de tolueno-metanol. La curva de concentración de 17β estradiol y de progesterona en cada experimento era de $r=0.99$. La técnica se estandarizó con 5000 cpm (cuentas totales), la unión no específica del 1 al 3% de las cuentas totales y la unión específica era del 30 al 50% de las cuentas totales. El líquido de centelleo era el Líquid Fluor-etanol absoluto el cual se aforó con tolueno y se le agregó 12.5 ml/l de BBS y la cuentas se realizaron en un contador Beta (PACKARD 300). Este análisis se hizo en la Unidad de Investigación Médica en Medicina Reproductiva del Hospital de Ginecología y Obstetricia n° 4 Luis Castelazo Ayala.

Los ovarios fueron extraídos y fijados en líquido de Zenker. El fijador se preparó con 2.5g de dicromato de potasio, 1.0g de cloruro de sulfato sódico, 5.0g de bicloruro de mercurio, 100 ml de agua y 5.0 ml de ácido acético puro agregado al momento de usarse. Al cabo de las 24 horas, las piezas fueron lavadas en agua corriente por 24 horas. La deshidratación consistió en aplicar dos cambios de alcohol graduales de 10 en 10%, de 15 min, a partir del 30% hasta alcohol absoluto, se aclararon con tolueno (MERCK). La inclusión de las piezas se hizo en Paraplast, en estado líquido, en una estufa (Vacuun Oven) a 60°C y al vacío de 15 libras, por 20 min.

Los cortes de $5\mu\text{m}$ estrictamente seriados, se hicieron en un microtomo "820" Spencer (Americam Optical). La tinción de los cortes con Hematoxilina de Harris-eosina fue preparada con 5.0g de hematoxilina, 50 ml de alcohol absoluto, 100g de alumbre de amonio, 2.5g de

óxido mercurio amarillo y 1.0l de agua destilada. La hematoxilina se disolvió en alcohol y el alumbre en el agua caliente, se mezclaron ambas soluciones, se calentó, se retiró del calor para agregar el óxido de mercurio lentamente, se volvió a calentar hasta obtener un color púrpura oscuro, cuando enfrió se le agregaron 20ml de ácido acético glacial, finalmente se filtró. La eosina se preparó en solución acuosa al 1.0%, a la que se agregaron 2ml de ácido acético glacial.

Los cortes recibieron tratamiento para eliminar el exceso de cristales de cloruro de mercurio de la fijación, el cual consistía en pasar las laminillas por xilol, alcohol 96%, alcohol yodado, hiposulfito de sodio al 1.0% y agua. Una de cada 3 laminillas se tiñeron con hematoxilina, se lavaron con agua destilada, se viraron con carbonato de litio al 1.0%, se lavaron en agua destilada, se tiñeron con eosina, se pasaron a alcohol de 96%, alcohol absoluto, xilol y se montaron con resina sintética.

Las laminillas restantes, de los ovarios fueron teñidos con Mallory para observar la zona pelúcida de los folículos en crecimiento. Antes de la tinción se le aplicó un tratamiento para el exceso de cristales de mercurio. La tinción consistió en: fuscina ácida al 0.1%, lavado con agua destilada, sumergir en ácido fosfomolibdico al 1.0%, en solución de azul de anilina-naranja G, constituida por: 0.5g de azul de anilina, 2.0g de naranja G, 2.0g de ácido oxálico, 8ml de ácido acético puro y 100ml de agua destilada, lavado con agua destilada, alcohol 96%, alcohol absoluto, xilol y se montaron con resina sintética.

Las laminillas se observaron en un microscopio óptico de comparación, para identificar las características y tipos de folículos; así como, la de los cuerpos lúteos. Con ayuda de un ocular, así como de una rejilla micrométrica, se contaron el número de folículos normales y atrésicos y se midieron, al igual que de células lúteas y paralúteas por campo. Las medidas se tomaron de acuerdo al diámetro mínimo y máximo y en rangos aproximados, no con análisis estadístico.

Los datos del número de folículos en el ovario se analizaron con las pruebas no paramétricas de Kruskal Wallis, U de Mann-Whitney. Para compararla concentración de hormonas en la sangre en los diferentes tratamientos a los cuales fueron sometidas las hembras gestantes se utilizó t de Student, análisis de varianza y las pruebas de Duncan y Tukey.

RESULTADOS

Aspectos Morfológicos

Los ovarios de ratones de 63 días de los grupos no tratados (NT) y de solución salina (S) fueron utilizados de manera indistinta como controles en la investigación, debido a que no se encontraron diferencias morfológicas entre ambos. La estructura de los cortes de ovarios observada a menor aumento, presenta una organización y distribución de sus componentes, tanto en la corteza como en la médula del ovario, similar en los grupos FNZ, E, FNZE y en los controles (NT) (Figura 8 a, b, c y d).

Grupo Control

Folículos primordiales

El ovario de los ratones de los grupos control (NT y S) presentan en su corteza folículos primordiales de 10 a 12 μm , algunos solos y otros formando grupos en los que están muy cercanos uno a otros. En cada uno existe un ovocito ovoide o esférico con un diámetro de 7.2 a 9.6 μm . El núcleo vesiculoso es esférico, voluminoso, ocupa la mayor parte de la célula y está rodeado por citoplasma escaso. Alrededor del ovocito se encuentra una capa de células foliculares aplanadas o fusiformes (figura 9 a).

Folículos primarios

Los folículos primarios o preantrales con tamaño de 36.0 a 40.0 μm , están constituidos por un ovocito esférico, un núcleo voluminoso, que presenta heterocromatina de aspecto granular, nucléolo evidente y citoplasma escaso. El ovocito tiende a ser esférico con un diámetro de 19.6 a 21.3 μm , su núcleo es semejante al de los ovocitos de folículos más chicos, pero su cromatina tiene mayor proporción de grumos. Están rodeados por una delgada zona pelúcida, que con la hematoxilina y la eosina se ve clara, y azul con la técnica de Mallory. Se rodea por una o dos capas de células foliculares de forma cuboide y presentan prolongaciones que forman un área acidófila, teñidas tenuemente, que atraviesan la zona pelúcida. Por fuera de las células foliculares, en las tecas y la membrana basal, que están alineadas al tejido conectivo y se organizan con el eje mayor, el cual está orientado en sentido paralelo a la superficie de los folículos, entre los que se encuentran pequeños vasos, además se rodean

por fibras de colágenas. A nivel de la teca interna también se pueden identificar las células esteroidogénicas con núcleo ovoide y citoplasma claro. En la teca externa no se logran distinguir a las células mioepiteliales de los fibroblastos, con las tinciones utilizadas (figura 10 a).

Folículos secundarios

Además de los folículos primordiales y primarios, se observan folículos secundarios o antrales esféricos u ovoides. Los más jóvenes con un diámetro que varía entre 72.0 a 81.6 μm , los cuales se caracterizan por tener una cavidad folicular, localizada entre las células granulosas, que aparece en los cortes como uno o dos espacios llenos de licor folicular, ligeramente eosinofilos, que con la técnica de Mallory se tiñe de azul grisáceo y presenta granulaciones muy finas. Las células granulosas se redistribuyen en una capa cercana a la membrana basal o estrato granuloso de espesor variable, una capa que rodea a la zona pelúcida, la cual corresponde a la corona radiada y, entre ambas, se encuentran las que formaran el *cumulus oophorus* y otras aún no han tomado su posición definitiva. En los más grandes las células foliculares forman un estrato granuloso, una corona radiada y un *cumulus oophorus* bien definidos y la cavidad folicular es única. El ovocito con diámetro de 36.0 a 38.4 μm , tiene un núcleo con cromatina reticular, condensada en algunos grumos y dependiendo del nivel del corte puede observarse un nucléolo voluminoso. El citoplasma ha aumentado y corresponde a la mayor proporción de la célula, está rodeada por una zona pelúcida en la que se une el ovocito y las células de la corona radiada. Estas células tienen aspecto cuboidal con núcleo esférico y escaso citoplasma (figura 11 a).

El estroma del ovario circunda a estos folículos, se organiza alrededor de la membrana basal para formar las tecas, en la que se observan fibroblastos fusiformes con el eje mayor paralelo a la pared folicular, con núcleo alargado, teñido intensamente y fibras de colágena eosinófilas. En la teca interna se observan las células esteroidogénicas cercanas a la membrana basal, bien definidas al teñirlas con la tricrómica de Mallory, los cuales tienen el núcleo ovoide o esférico y citoplasma abundante. Hacia la parte externa de esta teca predominan los fibroblastos y no se pueden identificar las células mioepiteliales. En el estroma se observa tejido conectivo intersticial con fibroblastos distribuidos de manera irregular. En

algunas áreas están las glándulas intersticiales y abundantes vasos sanguíneos de gran diámetro, sobre todo en la región medular (Figura 11a). No se observaron folículos terciarios.

Folículos atrésicos primarios

Entre el estroma también se encuentran folículos en diferentes grados de atresia, que se relacionan con el tipo de folículo en que se manifestó la degeneración, clasificado como: primario y secundario.

En los folículos atrésicos primarios más pequeños, se pierde por completo el ovocito y la zona pelúcida está plegada sobre sí misma como una cinta, localizada en el interior de una cavidad, que se ha formado al degenerar el ovocito. Alrededor de la cual se observan células semejantes a las esteroidogénicas que se confunden con las del estroma ovárico. Los que tienen un diámetro de 28.8 a 60.0 μm hasta 148.8-148.8 μm inician la atresia. El citoplasma del ovocito presenta unas áreas con vacuolas o inclusiones citoplásmicas, localizadas, principalmente en la región cortical, que dejan espacio con cariolinfa característico de la atresia y su núcleo no se observa (Figura 12a).

El ovocito pierde la comunicación con las células granulosas de la corona radiada, la zona pelúcida está engrosada y aparece un amplio espacio entre ambas estructuras, donde es frecuente encontrar macrófagos y cuerpos basófilos semejantes a los apoptóticos. En algunas células foliculares el núcleo es picnótico, ovalado o fusiforme y es semejante al de los fibroblastos del estroma ovárico o las de la teca interna. La cantidad de células granulosas varía entre una y dos capas desorganizadas (figura 12 a).

Folículos atrésicos secundarios

Los folículos atrésicos secundarios más jóvenes tienen un ovocito de 28.8 a 33.6 μm y en los más evolucionados de 33.6 a 48 μm (Tabla 2). El citoplasma tiene cambios degenerativos como granulaciones o vacuolas de contenido densamente teñido, con inclusiones basófilas pequeñas, que son estructuras semejantes a los cuerpos apoptóticos. Las células foliculares no están unidas al ovocito. Algunas células granulosas tienen núcleos picnóticos de menor tamaño o irregulares, otras, con la cromatina en grumos gruesos teñidos fuertemente, que con frecuencia se extienden hacia la periferia y se unen a la membrana nuclear. El nucléolo en los núcleos de las células menos alteradas, es de menor tamaño que el

de las células normales y en las que presentan un grado de compactación cromatínica mayor, en la que no se puede distinguir dicho nucléolo (figura 13 a).

En el citoplasma de estos folículos atrésicos, se observan granulaciones abundantes y evidente vacuolización, que en algunas involucra la mayor parte de éste. Las células foliculares de la corona radiada y el estrato granuloso están desorganizadas en distinta proporción. Entre las células se distingue una invasión masiva de macrófagos en su mayoría en el líquido folicular así como, pero en menor proporción, entre las células de la granulosa. Algunos macrófagos tienen núcleos de forma arañada y otros multinucleado. La zona pelúcida se engrosa y deforma. En otros, aún existen restos deformados del citoplasma del ovocito rodeado por la zona pelúcida. En pocas ocasiones tienen signos de fragmentación (figura 13 a).

En la teca interna las células esteroideogénicas se distribuyen en grupos, exhiben un volumen nuclear y proporción mayor, ya que forman de 4 a 5 capas en relación con la de los folículos secundarios normales. Algunas de las células de la teca interna se confunden con las del estroma ovárico. Los fibroblastos fusiformes están pobremente definidos y los vasos sanguíneos tienen un diámetro reducido (figura 13 a).

Grupos Experimentales

Folículos normales

Los ovarios de los grupos FNZ, FNZE y E tuvieron una organización y constitución de la corteza y médula similar a los controles. Los folículos normales, sin embargo, se encontraron en una proporción menor a la normal, en cambio los atrésicos tienen una mayor proporción y la gama de las características de atresia es más amplia que la observada en los controles. En los grupos FNZ, FNZE y E las células granulosas de los folículos primordiales, primarios y secundarios tienen alta afinidad por los colorantes tanto ácidos como básicos (figura 8–13 b, c, y d).

Folículos atrésicos primarios, FNZ

En los tratados con FNZ el ovocito, que mide de 2.4 a 7.2 μm , está fragmentado y deforme; además muestran signos de degeneración como la presencia de inclusiones citoplásmicas. El ovocito de estos folículos tienen núcleos con grumos gruesos de cromatina,

el nucléolo es grande, muy teñido y con una estructura reticular densa, y la membrana nuclear deformada. Las células granulosas están desorganizadas, presentan vacuolas y núcleo con la cromatina abundante, en grumos o picnóticos y los macrófagos son escasos (figura 12 b).

Grupo E

Los folículos miden de 28.8 a 33.6 μm de diámetro (figura 12c), en la tabla 3 están agrupadas las medidas de los diferentes folículos atrésicos de este grupo en rango de menor a mayor. En este grupo se observan folículos atrésicos primarios con características similares al de los controles, pero las células granulosas tienen núcleos con cromatina abundante (figura 12 c).

Grupo FNZE

Los ovocitos de los folículos atrésicos primarios del grupo FNZE, que miden de 2.4 a 14.4 μm , tienen núcleos con grumos gruesos de cromatina, muy teñido y con una estructura reticular densa similar al del grupo FNZ. También se observan algunos folículos atrésicos primarios con el ovocito en plena división celular, que formaban pseudomórula (no se observa). La membrana basal tanto de folículos primarios como secundarios atrésicos esta contraída, deforme y teñida fuertemente con la tinción de Mallory. Las células esteroideogénicas de la teca interna, están hipertrofiadas, forman una capa gruesa con aspecto glandular alrededor de la membrana basal y están delimitadas por fibroblastos paralelos a la superficie folicular (figura 12 d).

Folículos atrésicos secundarios. Grupo FNZ

En los grupos FNZ los folículos atrésicos secundarios presentan la zona de la corona radiada alterada morfológicamente, algunas de las células granulosas muestran núcleos picnóticos, y se han separado de esta área, en donde empiezan a observarse los macrófagos. Su ovocito muestra un núcleo con una gran parte de la cromatina en grumos gruesos. Se observa que la membrana basal presenta una alteración morfológica. Las células de la teca están dispuestas en hileras rodeando la membrana basal con apariencia glandular. La mayoría de las células que conforman el folículos presentan cromatina en grumos gruesos, si no están picnóticas y el citoplasma es abundante (figura 13 b).

Grupo E

Los folículos atrésicos secundarios del grupo E, que miden de 259.2 a 345.6 μm , tiene el ovocito aislado de las células de la corona radiada por un espacio de espesor variable. En la periferia y en el espacio intercelular de las células foliculares que forman el cúmulo ovífero, en el licor folicular y en las células del estrato granuloso se observan macrófagos, que invaden radialmente y avanzan hacia el líquido folicular. En esta área, también contiene cuerpos pequeños, basófilos semejantes a los apoptóticos o a los micronúcleos. El licor folicular muestra grumos acidófilos abundantes con aspecto de precipitados protéicos. La membrana basal está deformada (figura 13 c).

Grupo FNZE

En el grupo FNZE se observan folículos atrésicos secundarios con dos ovocitos, uno de esos tiene un diámetro de 36 a 40.8 μm y el otro de 31.2 a 50.4 μm (Tabla 3), presentan inclusiones citoplásmicas a manera de grumos grandes y zonas claras. La zona pelúcida está engrosada y separada de las células de la corona radiada y el líquido folicular, que tiene abundantes áreas acidófilas, que pueden ser restos citoplásmicos de las células foliculares degeneradas. En estos folículos las células foliculares han perdido la organización típica. En este grupo similar al de FNZ, las células granulosas y tecales forman cromatina en grumos gruesos y citoplasma abundante (figura 13 d).

Cuerpo lúteo, Células Lúteas y Paralúteas

Controles

El cuerpo lúteo de los grupos NT y S miden de 120.0 a 199.0 μm , en los más pequeñas y de 235.0 a 336.0 μm los más grandes (tabla 4).

Presentan células lúteas con núcleos casi esféricos, que miden de 3.0 μm hasta 4.0 a 5.0 μm . El núcleo fusiforme de las células paralúteas tiene un diámetro que varía de 1.0 a 3.0 μm y de 2.0 a 6.0 μm (Tabla 4). Los dos tipos celulares tienen de uno a dos nucléolos teñidos intensamente. La cromatina del núcleo interfásico, se encuentra, en la mayoría de los casos, hacia la periferia cerca a la membrana nuclear y rodeando el nucléolo (figura 14 a).

Grupos experimentales

Grupo FNZ

El cuerpo lúteo tiene un diámetro de 267 a 215 μm aproximadamente. Las células lúteas son voluminosas, poliédricas irregulares, con citoplasma acidófilo abundante. El núcleo ovalado tienen un diámetro menor de 3.0 a 6.0 μm y uno mayor de 4.0 a 7.0 μm (Tabla 4). La cromatina forma grumos gruesos alrededor del nucléolo y de la membrana nuclear (figura 14 b). Las células paralúteas de FNZ son fusiformes, con escaso citoplasma, tienen un núcleo con diámetro entre 1.0 a 5.0 μm y 2.0 a 8.0 μm . Su cromatina está en grumos y el nucléolo no se logra identificar con claridad (figura 14b).

Grupo E

El cuerpo lúteo del grupo E con diámetros de 225.6 a 312 2.0 μm aproximadamente, tienen células lúteas que miden de 2.0 μm y 4.0 a 5.0 μm , tiene características similares a las células lúteas de FNZ (Tabla 4). También se observa que tanto en el control como en los grupos experimentales, algunas células tienen la cromatina distribuida a manera excéntrica hacia un punto de la membrana nuclear o tienen cariolinfa clara, casi transparente de forma tal que se confunde con el citoplasma. Las células paralúteas tienen núcleos con diámetro similares a los controles, los primeros tienen, además la cromatina en grumos gruesos (figura 14 c).

Grupo FNZE

En las hembras del grupo FNZE se observan cuerpos lúteos que miden de 192 a 225.6 μm , células lúteas semejantes a las descritas en el grupo FNZ y otras más pequeñas con un diámetro que varía entre 2.0 a 3.0 μm y 5.0 a 5.0 μm , lo cual es un indicador de la heterogeneidad que presentan. Las paralúteas tienen formas similares a FNZ y su núcleo tiene un diámetro que varía entre 1.0 a 3.0 μm y 3.0 a 7.0 μm , algunas de estas células tienen la cromatina en grumos gruesos, con el nucléolo poco evidente, pero en otras se observa con claridad (figura 14 d).

El citoplasma de ambos tipos celulares en los grupos de FNZ, FNZE y E, tienen inclusiones, algunas débilmente teñidas con aspecto de vacuolas.

Aspectos Estadísticos

En los cortes histológicos del ovario de ratón, estrictamente, seriados se contaron los folículos y el número de las poblaciones celulares del cuerpo lúteo por campo.

Los folículos primordiales, primarios, secundarios y atrésicos primarios del grupo control, de acuerdo a las frecuencias absolutas presenta una distribución normal.

La proporción de folículos primordiales en los ovarios de todos los grupos experimentales se redujo significativamente a un nivel de $p < 0.001$, debido a que guardan una relación de aproximada de 1:1.6 en relación con los controles (Tabla 5).

El número de folículos primarios disminuyó, sin embargo tuvieron un comportamiento estadístico distinto. En los tratados prenatalmente con FNZ el promedio es de 17.5 ± 0.9 ($p < 0.05$), en los de FNZE 14.3 ± 1.4 ($p < 0.001$) y en E de 21.0 ± 3.6 ($p < 0.01$), pero no hubo diferencias en el número de folículos primarios en el grupo S (32.6 ± 6.8) y el NT (33.4 ± 1.1), valores que son los de una curva normal.

Los folículos secundarios se comportaron de una forma similar a los folículos primarios, ya que en todos los grupos experimentales FNZ, FNZE y E se observó que disminuía su cantidad, que es de 3.0 ± 0.6 , 3.5 ± 0.97 y 3.5 ± 1.0 , respectivamente ($p < 0.01$), que tuvieron una proporción aproximada de 1:2 con relación a los controles S, con 10.0 ± 0.9 y NT con 8.0 ± 1.0 . El grupo E con un promedio de 6.2 ± 3.1 entre los que la diferencia no fue significativa.

La cantidad de folículos atrésicos primarios fue alto y consistente en todos los grupos de experimentación, que en FNZ fue de 17.8 ± 2.4 ($p < 0.01$), en FNZE de 27.5 ± 2.6 y en E1 de 34.9 ± 4.7 , que tuvieron una diferencia significativa a nivel de $p < 0.001$ con respecto a los controles NT (11.6 ± 1.0), lo equivale a una proporción aproximada de 2.7:1.

El número de folículos atrésicos secundarios ascendió en los grupos de FNZE, que fue de 21.2 ± 2.6 ($p < 0.05$) y E de 13.4 ± 1.4 ($p < 0.05$). El grupo de FNZE tiene una proporción aproximada de 2.2:1 por arriba de los controles.

La frecuencia del número de cuerpos lúteos en los ovarios de hembras tratadas durante la etapa prenatal también decreció en grupos de experimentación, como FNZE con un promedio de 3.6 ± 0.7 ($p < 0.003$) y E de 3.9 ± 1.1 ($p < 0.03$).

De las subpoblaciones del cuerpo lúteo, las células lúteas fueron más numerosas con respecto a los controles cuyo promedio fue de 23.4 ± 0.7 (tabla 6), en los grupos de FNZ el promedio fue de 17.6 ± 0.6 ($p < 0.01$) y E de 20.0 ± 1.2 ($p < 0.01$), pero no hubo diferencias significativas en FNZE, el cual tenía un promedio de 23.5 ± 0.6 . Las células paralúteas también aumentaron su proporción en todos los grupos tratados ($p < 0.01$) (Tabla 6).

Determinación hormonal

La determinación de las hormonas esteroideas 17β estradiol y progesterona en el plasma, por radioinmunoensayo, dio como resultado que la primera no se detectara, en cambio la progesterona se cuantificó en todos los grupos. En el grupo FNZE disminuyó ($p < 0.001$) con respecto a los controles, aunque los datos presentan una dispersión alta (tabla 7).

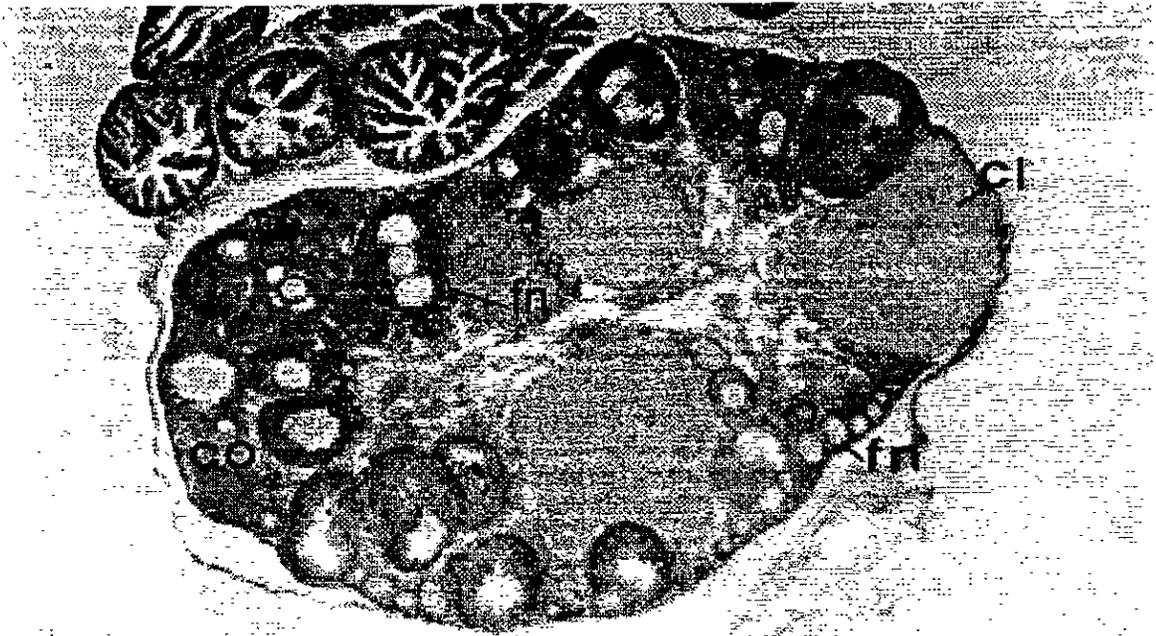
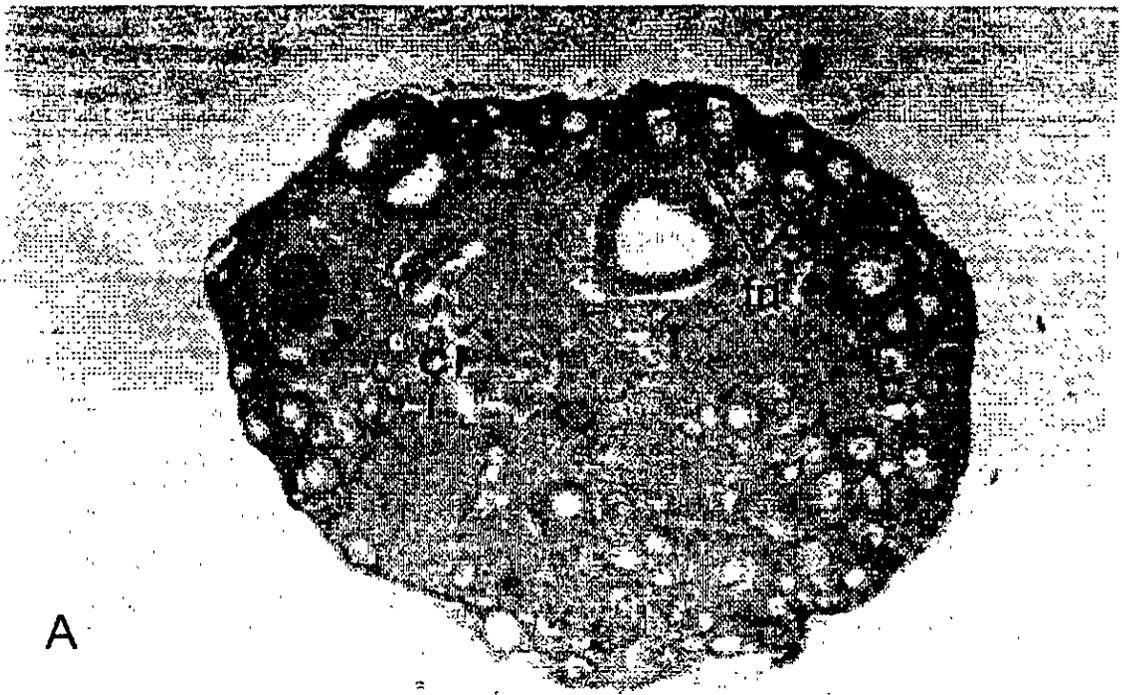


Figura 8. Vista panorámica del ovario de ratones de 63 días. A grupo control (NT) y B. grupo al que se le administró flunitrazepam (FNZ). Se observan cuerpos lúteos (cl), en la corteza ovárica (co), folículos con apariencia normal (fn) y atrésicos (fa). H-E. 45X

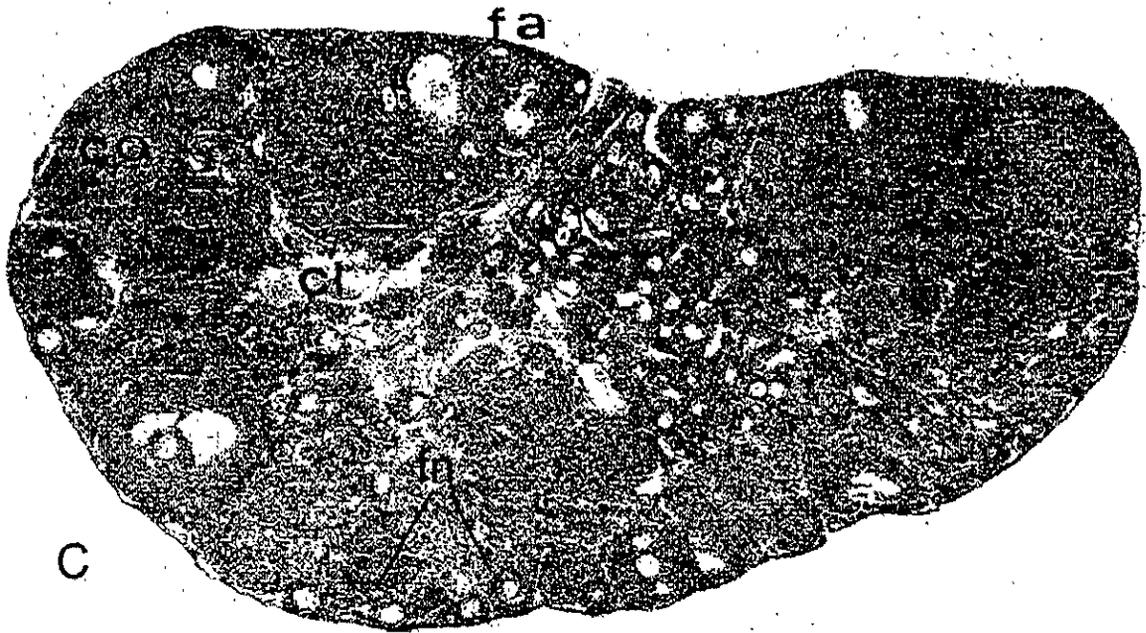


Figura 8 (C y D). Vista panorámica del ovario de ratones de 63 días, C: al que se le sometió a estrés (E) y D: se le administró FNZ después de someterlo a E por inmovilización; en ambos se observan cuerpos lúteos (cl) y en la corteza ovárica (co) folículos con apariencia normal (fn) y atrésicos (fa). H-E. 45X.

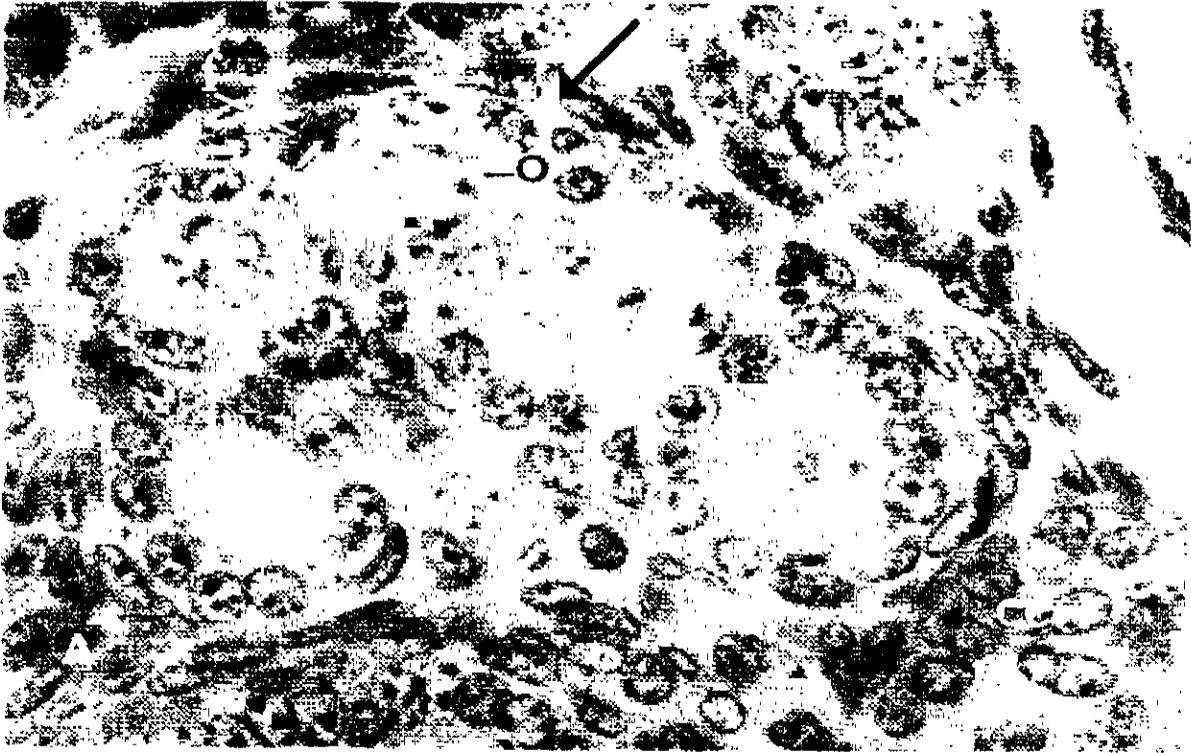


Figura 9 (A y B). Folículos primordiales (señalados con una flecha) del ovarios de ratones de 63 días. A control (NT) y B: del grupo experimental tratado con FNZ, en ambos, se aprecia el ovocito primario (o) con núcleo grande y ovalado, rodeado por células foliculares (f), en las que sobresale el núcleo, también ovalado o fusiforme. En B se distinguen núcleos de las células del estroma (ce) con abundante cromatina en grumos gruesos. H-E. 1125X.

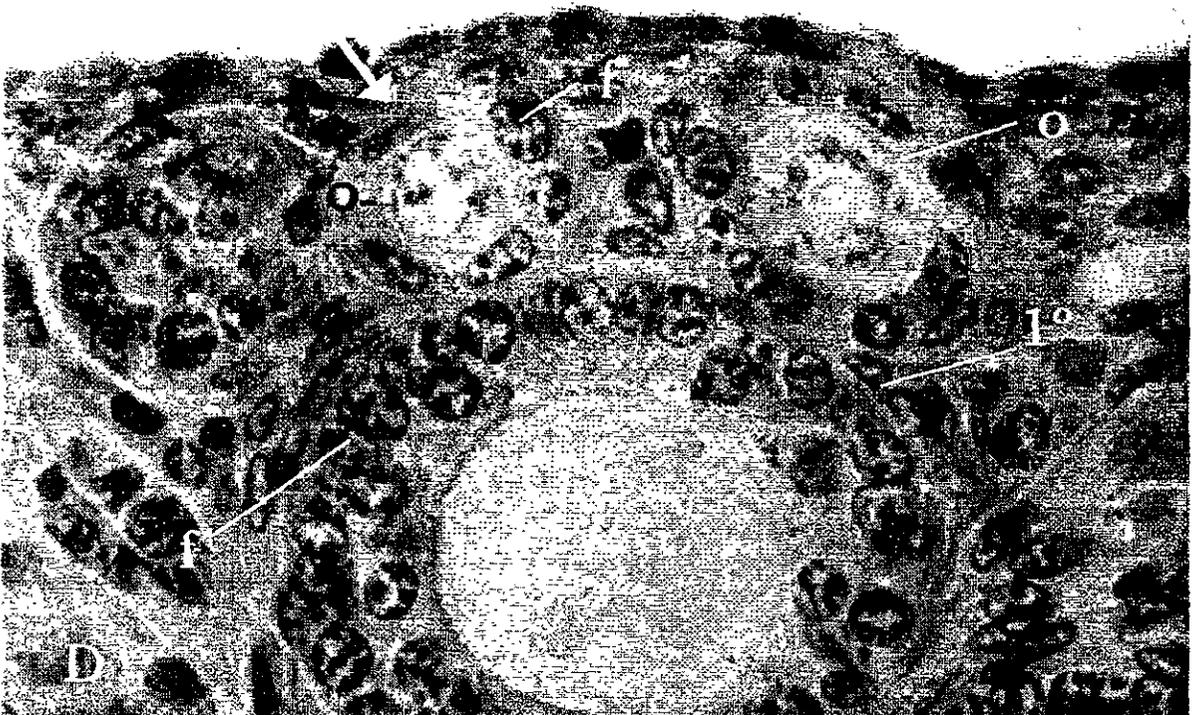


Figura 9 (C y D). Folículos primordiales (señalados con una flecha) del ovario de ratones de 63 días. C: sometidos a E y D: a los que se le administró FNZ después de someterlos a E. Se observa el ovocito primario (o) con núcleo ovalado y a su alrededor las células foliculares (f). En D, las células foliculares de los folículos primordiales y primario (1°) presentan cromatina abundante y en grumos gruesos. H-E. 1125X.

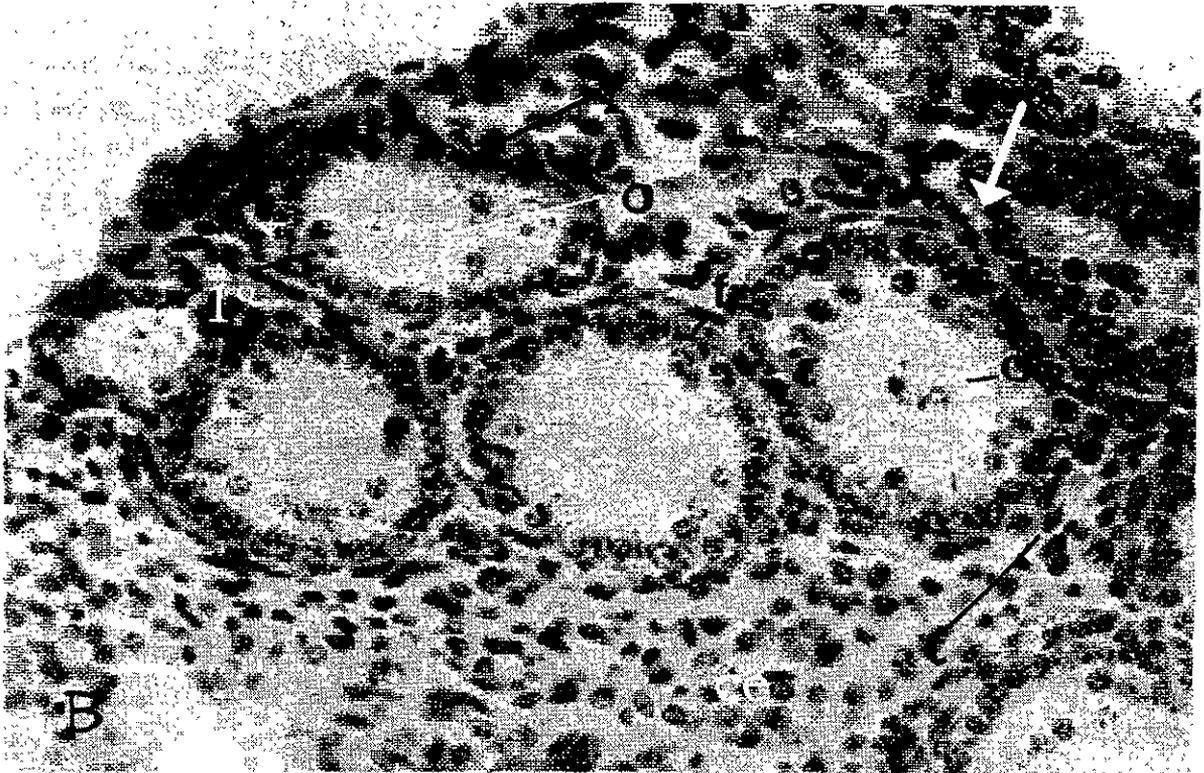
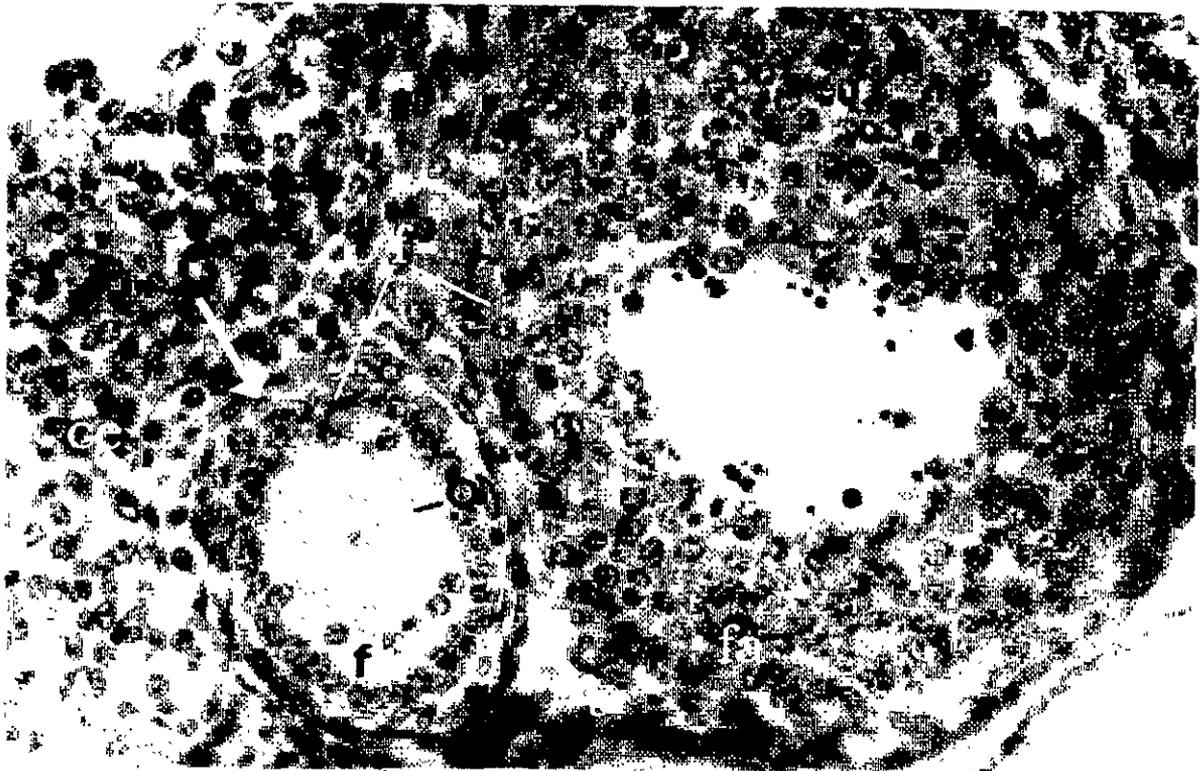


Figura 10 (A y B). Folículos primarios (flecha) del ovario de ratones de 63 días del grupos control (A) y FNZ (B), el cual fue tratado con una dosis de FNZ de 2.5 mg/kg de peso. Se distinguen ovocitos (o) rodeados por una capa de células foliculares (f) cuboides y en la periferia por las células de la teca (t). En B los ovocitos, las células foliculares, las tecales y las del estroma (ce) tienen núcleo voluminoso, cromatina en grumos gruesos y citoplasma abundante. H-E. 450X.

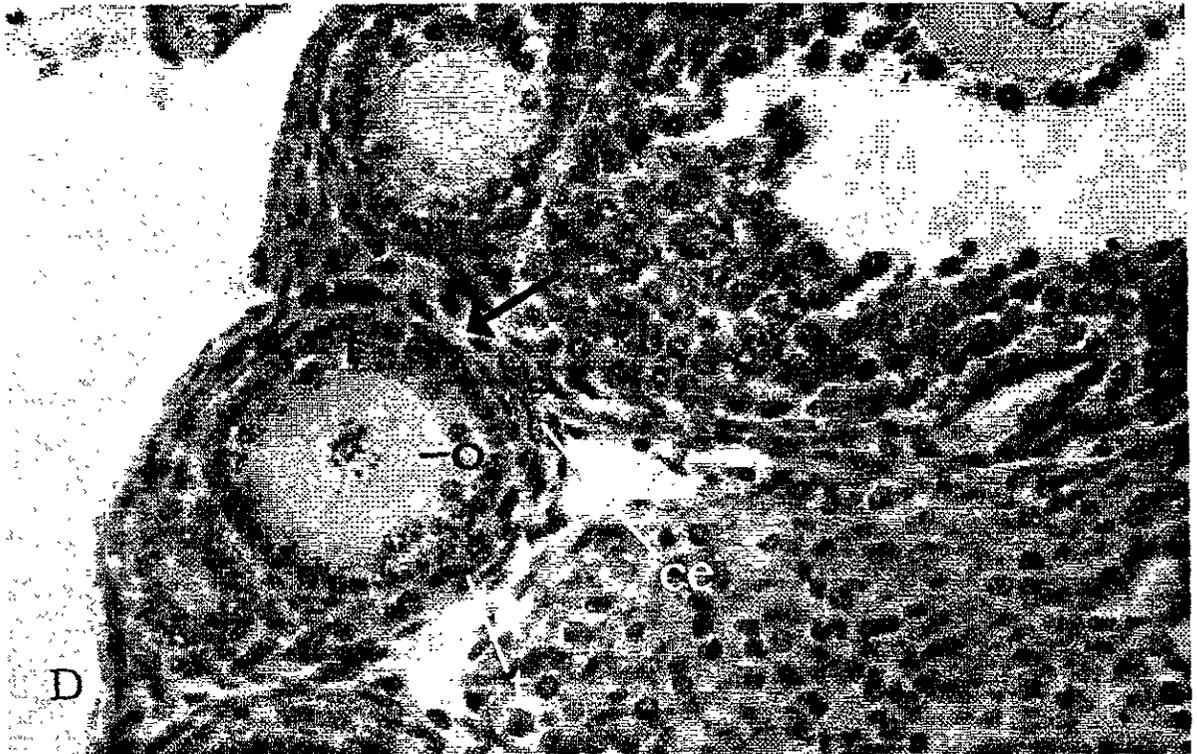
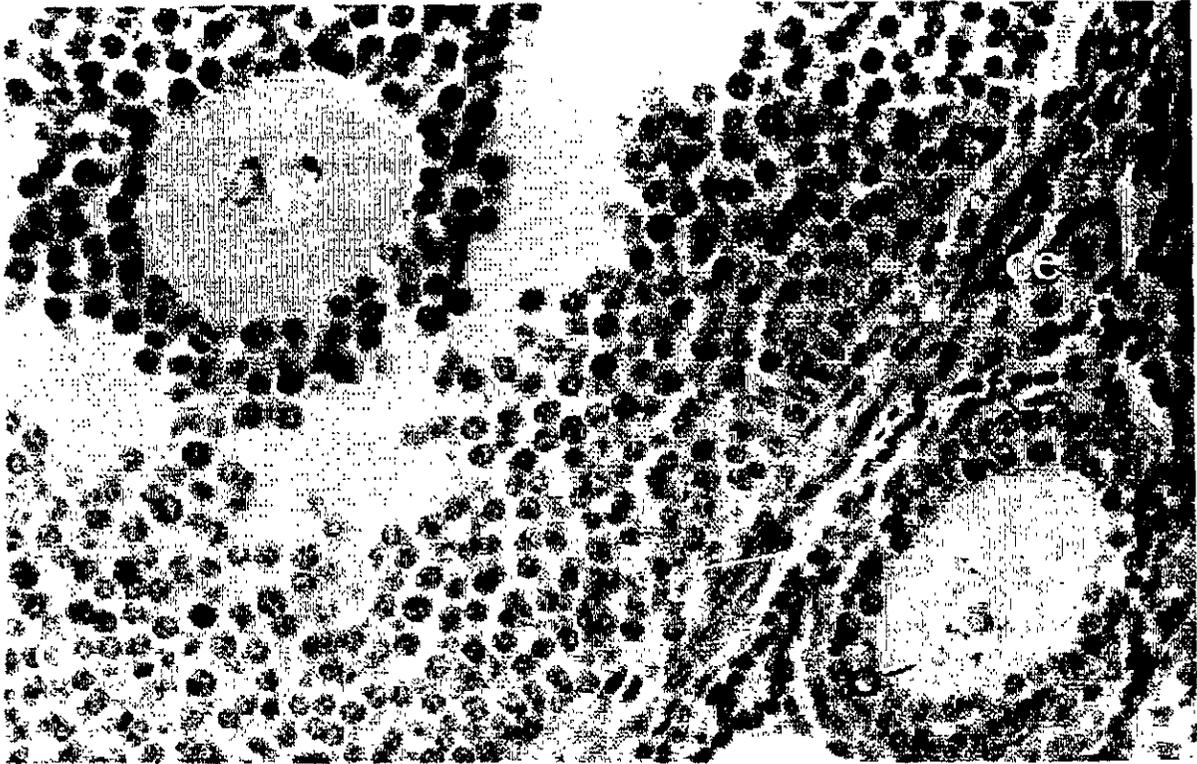


Figura 10 (C y D). Folículos primarios (flecha) del ovario de ratones de 63 días. C: del grupo sometido a E y D: los tratados con FNZE. Se observan los ovocitos primarios (o) rodeados por una capa de células foliculares (f) y en la periferia están las células de las tecas (t). En FNZ el ovocito, las células foliculares, tecales y las del estroma (ce) tienen núcleo voluminoso, cromatina en grumos gruesos y citoplasma abundante. H-E. 450X.

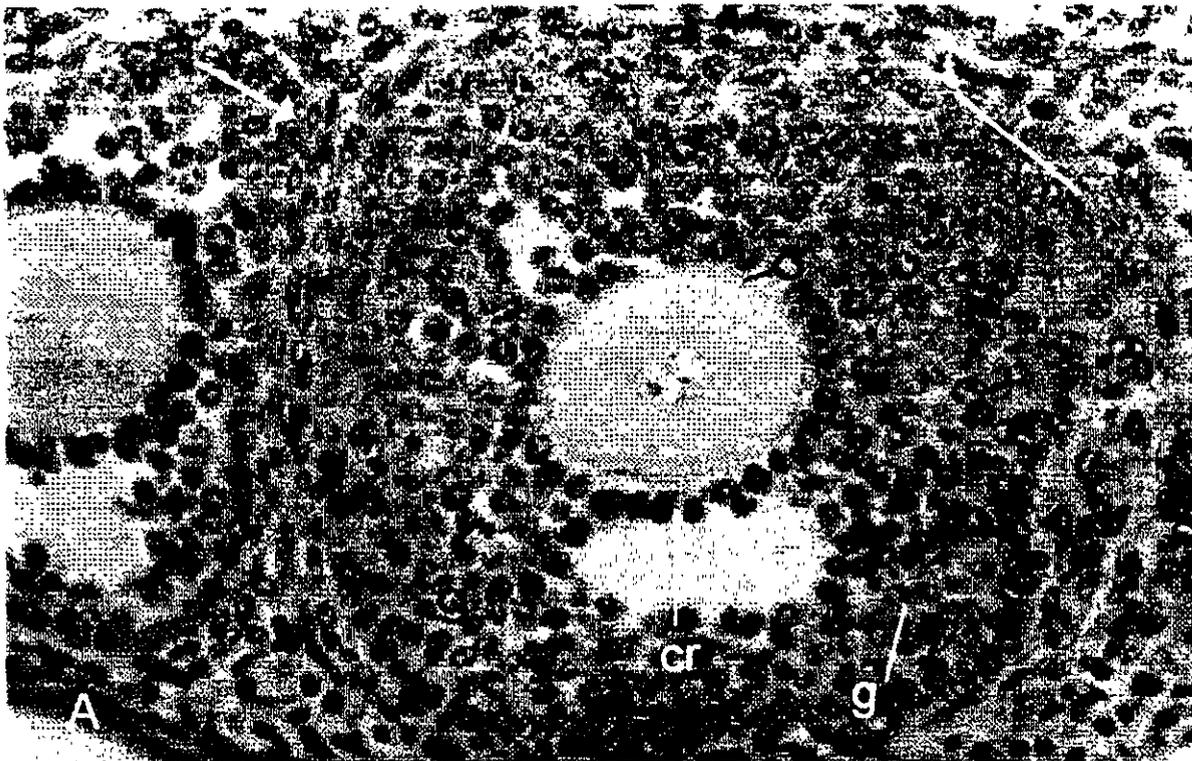


Figura 11 (A y B). Folículos secundarios del ovario de ratón de 63 días. El control (A) y el tratado prenatalmente con FNZ (B), en ambos se observa un ovocito primario, rodeado por las células de la corona radiada (cr), del estrato granuloso (g) y las de la teca interna (t), las cuales tienen núcleos ovoides. En FNZ las células presentan cromatina en grumos gruesos y las del estrato granuloso tienen un grado de desorganización (dg). H-E. 450X

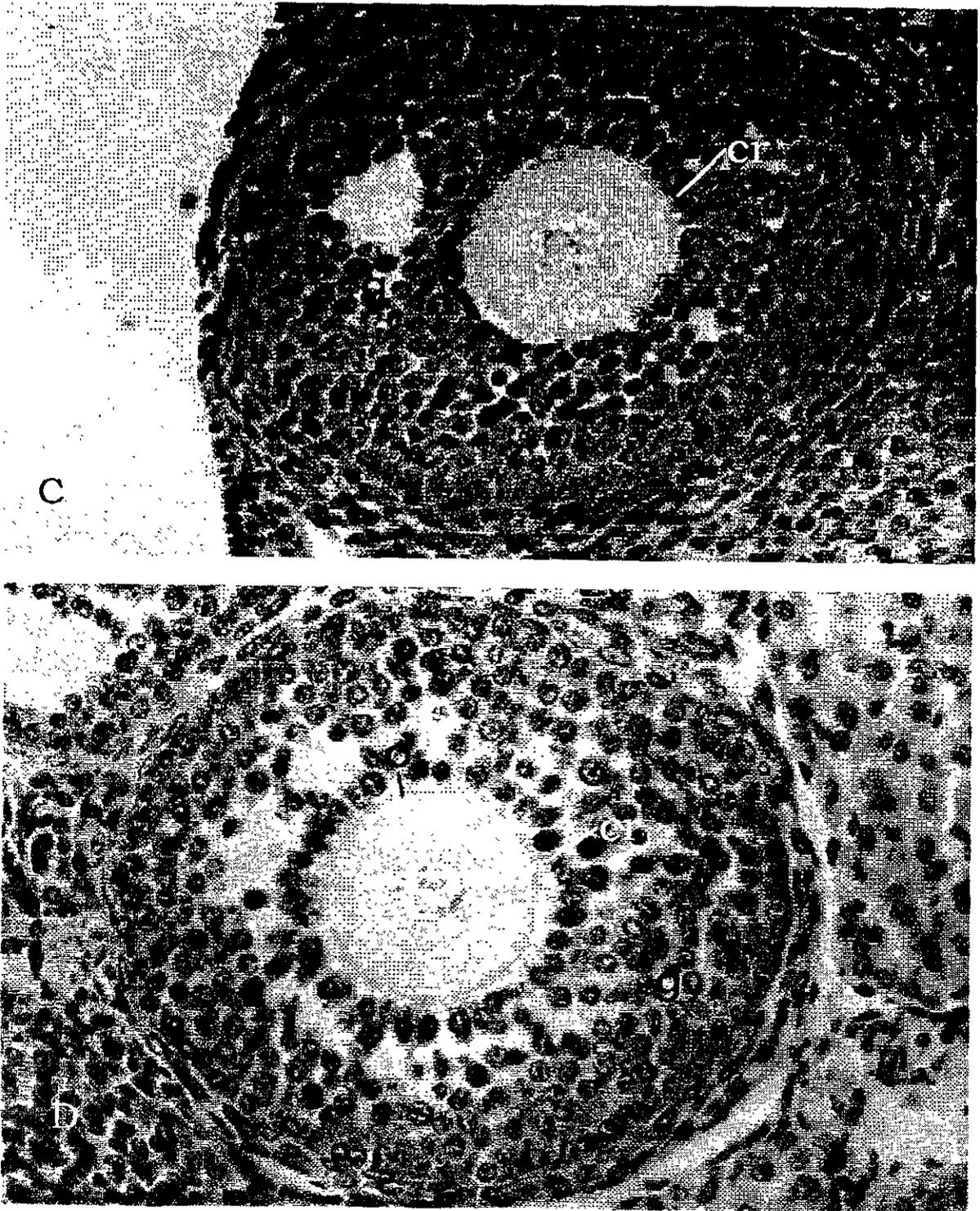


Figura 11 (C y D). Folículos secundarios del ovario de ratón 63 días, sometidos a E (C) y tratados prenatalmente con FNZE, D. Se observa el ovocito primario (o), a su alrededor están las células foliculares de la corona radiada (cr), las del estrato granuloso (g) y de las de la teca interna (t). En D las células presentan cromatina en grumos gruesos y en ambos las granulosas tienen un grado de desorganización. H-E. 450X

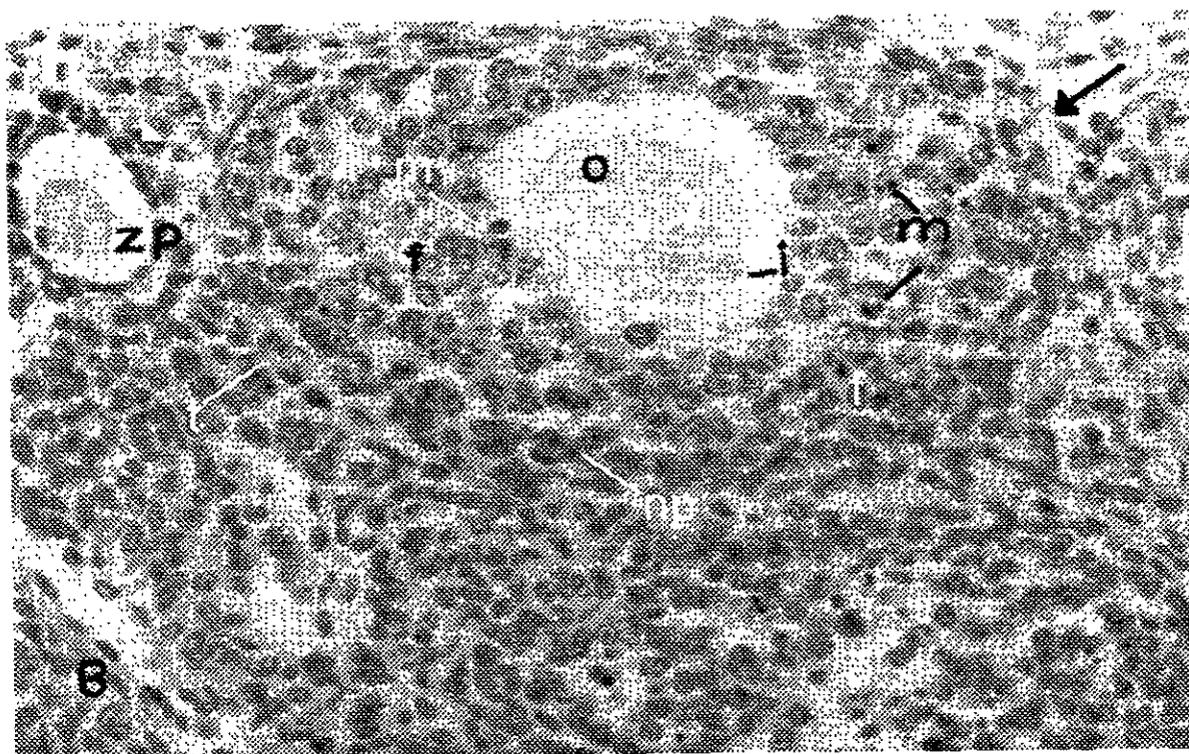
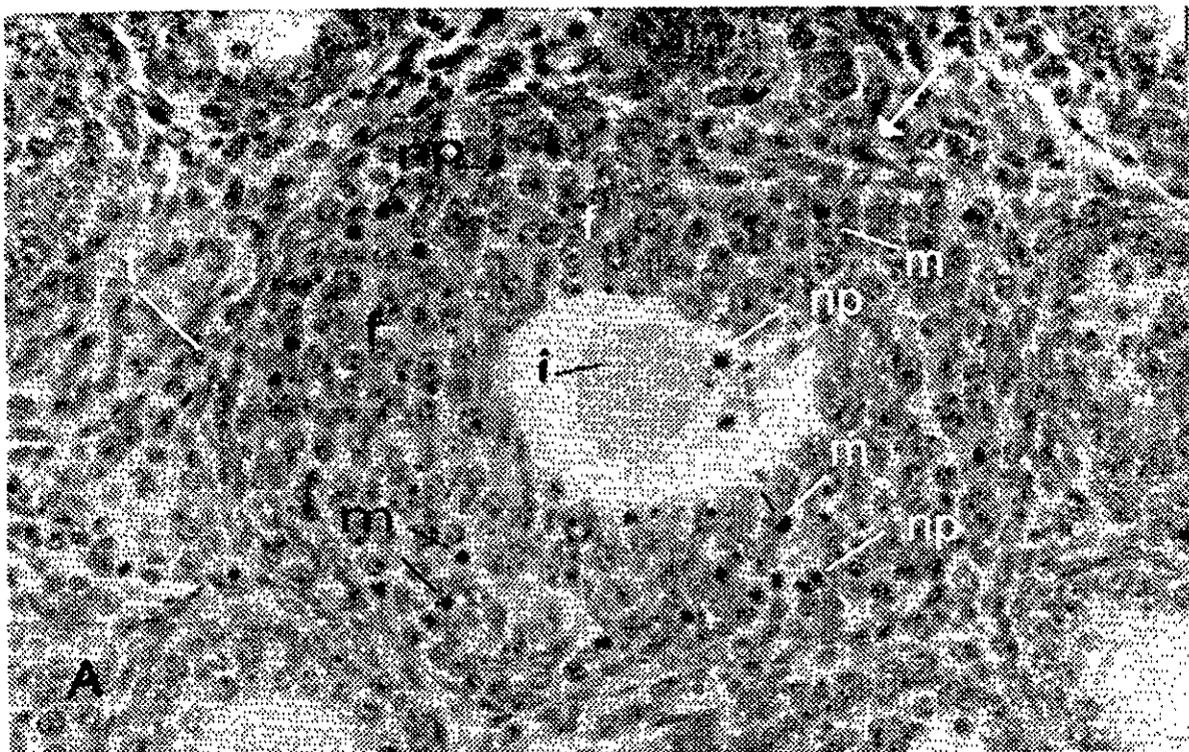


Figura 12 (A y B). Folículos atrésicos primarios (flecha) del ovario de ratones control (A) y de los tratados prenatalmente con FNZ (B). El ovocito (o) que se ha separado de las células foliculares (f) tiene inclusiones citoplásmicas (i) y se identifican macrófagos (m) entre las células foliculares, las cuales tienen o no núcleos picnóticos (np), y no hay macrófagos en las tecales (t). Otro atrésico primario (cabeza de flecha) presenta la zona pelúcida (zp) plegada y el ovocito está ausente. En FNZ los folículos muestran células con mayor afinidad por los tintes y son más voluminosas. H-E. 450X

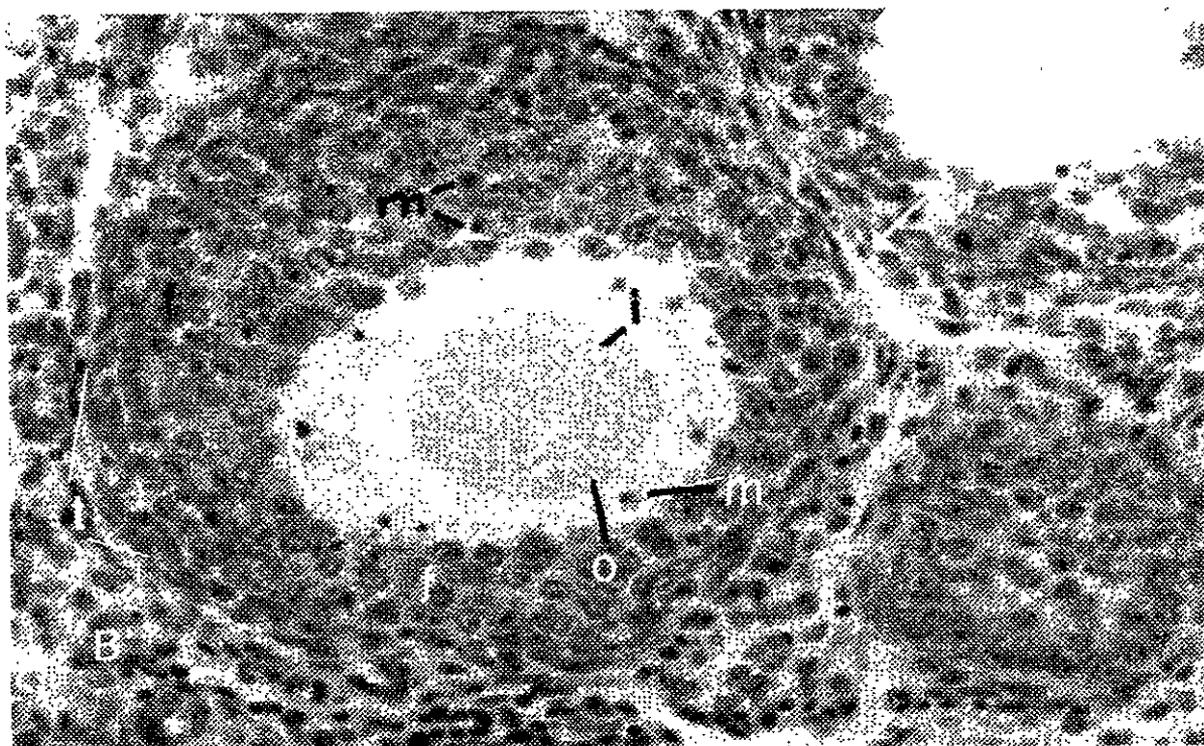
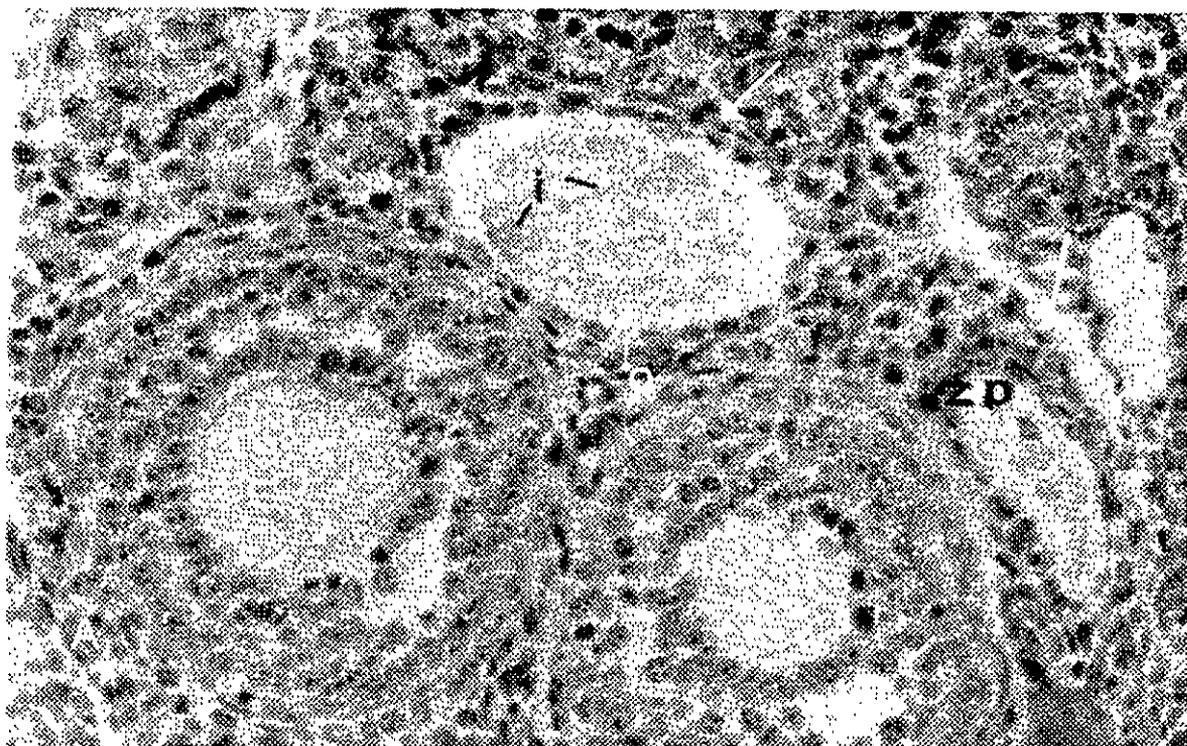


Figura 12 (C y D). Folículos atrésicos primarios de los ovarios de ratones de 63 días C: se le sometió a E y D: se le administró FNZE. En ambos se observa que los atrésicos primarios (flecha) tienen el ovocito (o) con numerosas inclusiones citoplásmicas (i), la zona pelúcida (zp), parcialmente separada y las células foliculares tienen aspecto glandular. En D además de las características de atresia el folículo tiene células más voluminosas y cromatina en grumos gruesos H-E. 450X

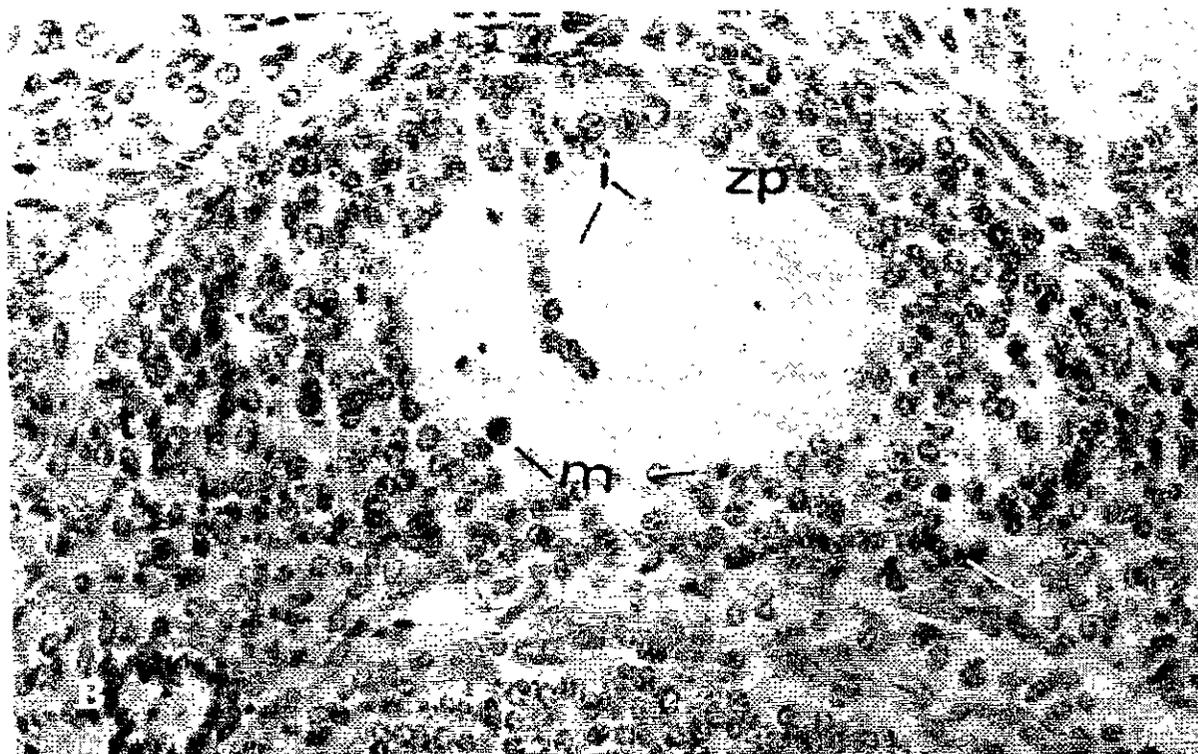
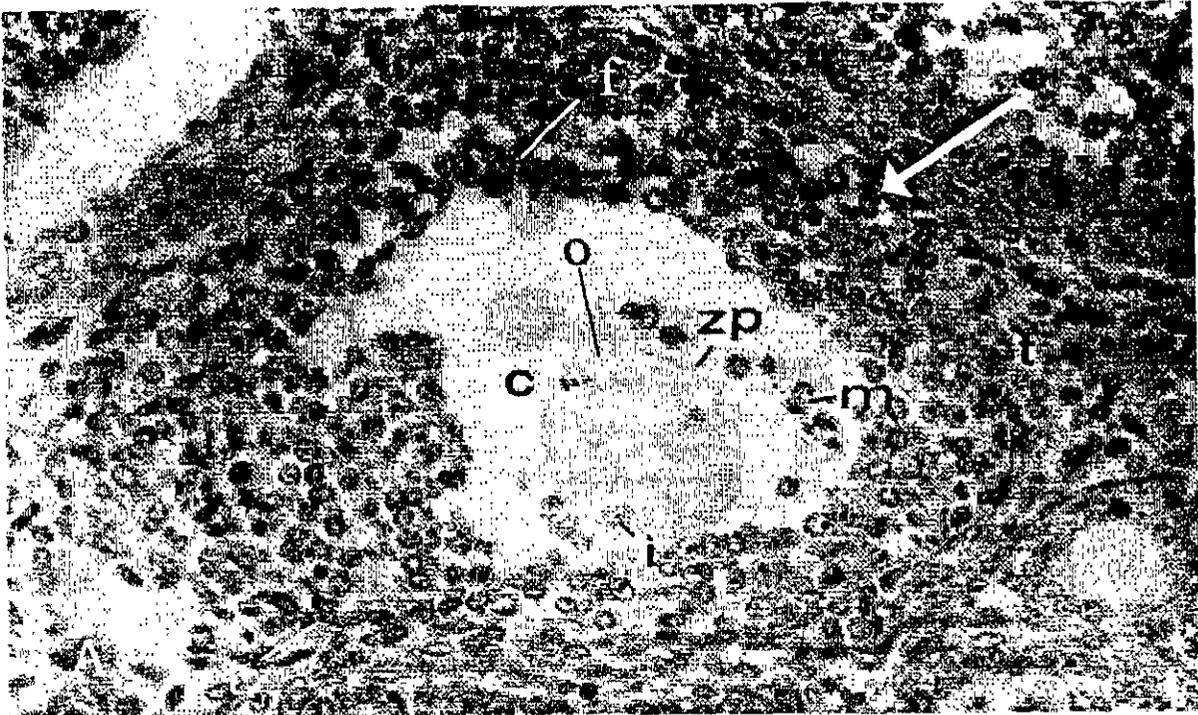


Figura 13 A y B. Folículos atresicos secundarios de un ovario de ratón. Control. A y el que se le administró FNZ. B. El ovocito (o) de estos folículos tiene inclusiones citoplásmicas (i) algunos con apariencia de cuerpo apoptótico (c), la zona pelúcida (zp) está desprendida y en el antro folicular las células de la corona radiada se han deformado, entre ellas hay macrofágos (m) y las células de la teca (t) están desorganizadas. En B las células del folículo y del estroma tienen mayor cantidad de cromatina en grumos gruesos. H-E. 450X.

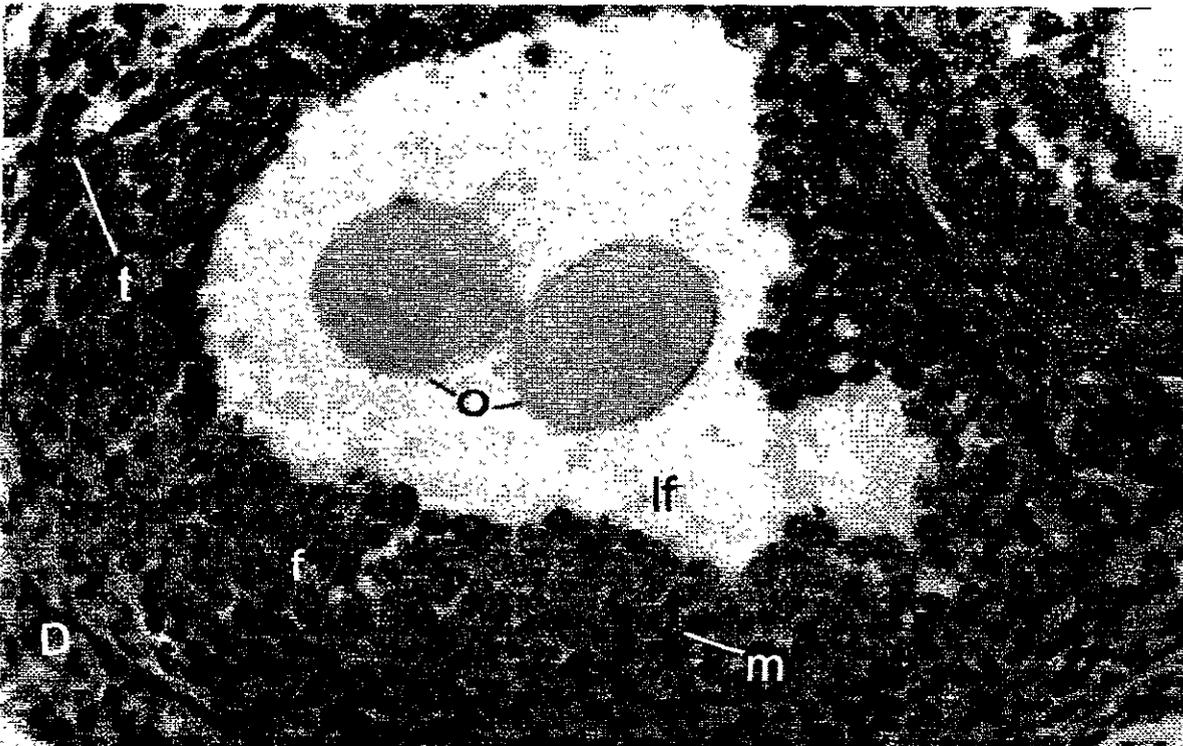
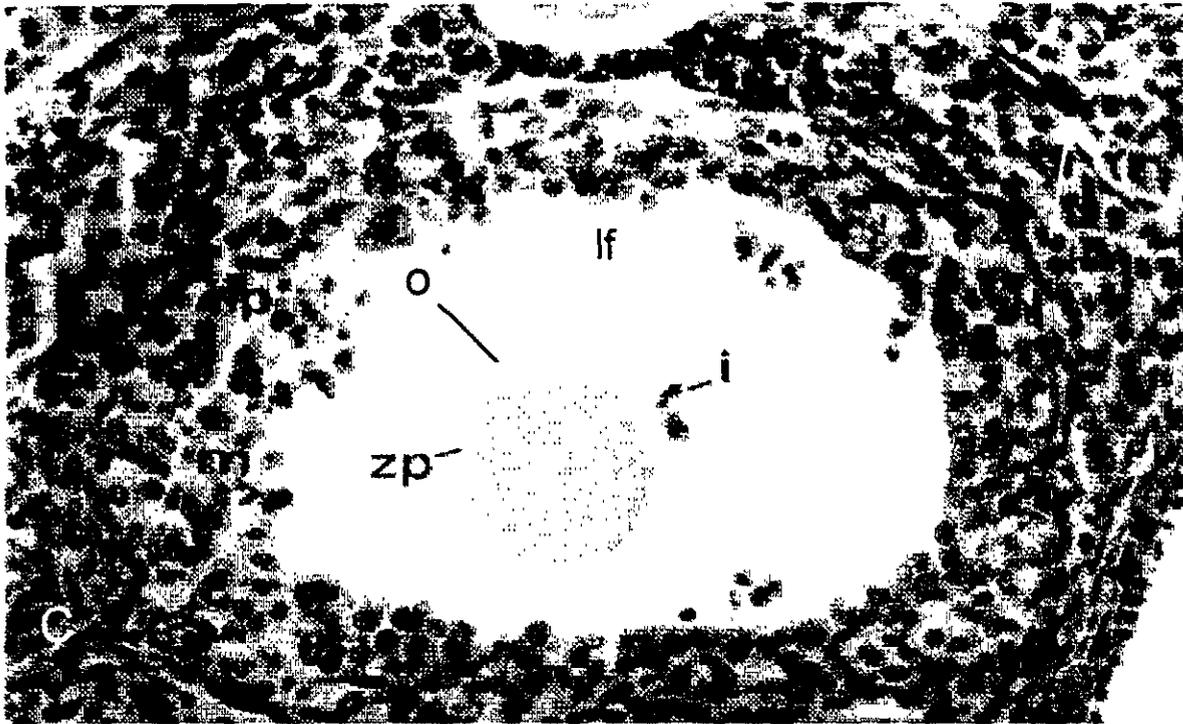


Figura 13 C y D. Folículos atréticos secundarios de un ovario de ratón E y FNZE, respectivamente. En ambos hay macrófagos (m) entre las células folículares (f), las cuales algunas tienen núcleos picnóticos (np). Estas células como las de la teca (t) están desorganizadas. En FNZE el folículo tiene doble ovocito (o) y en el líquido folicular (lf) hay gran cantidad de grumos con apariencia de precipitados. H-E. 450X.

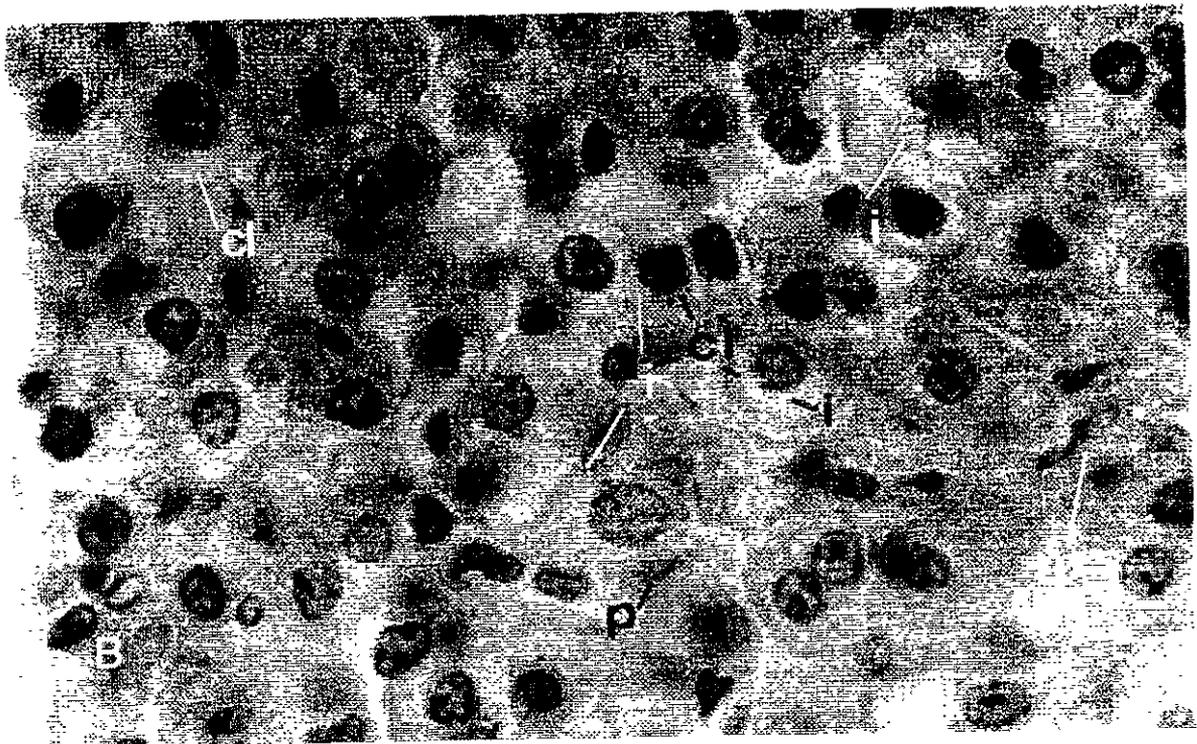
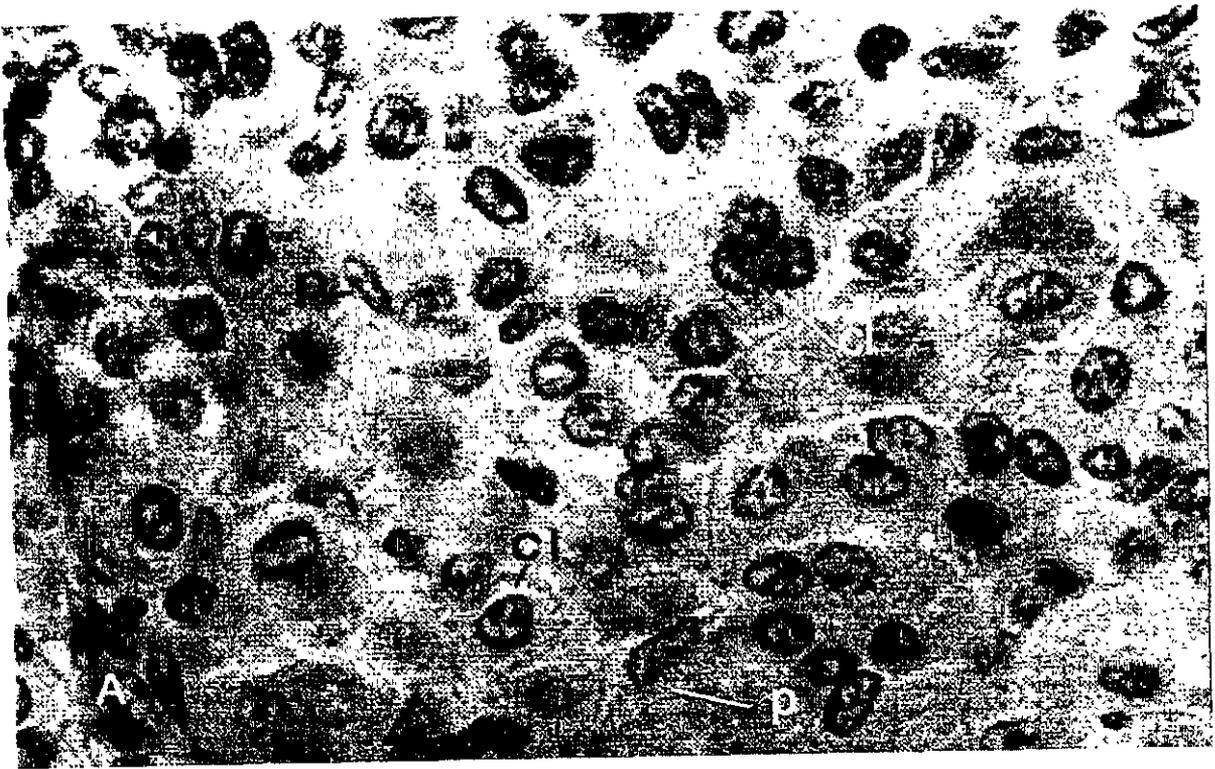


Figura 14 (A y B). Cuerpo lúteo de un ovario de ratón control (A) y expuesto prenatalmente a FNZ (B). Las células lúteas (cl) ocupan una mayor superficie en el cuerpo lúteo que las paralúteas (p) las cuales generalmente, están rodeando capilares. En B las células luteínicas tienen núcleos más voluminosos, abundante cromatina en grumos gruesos o compactada y más cantidad de citoplasma. H-E 1125X

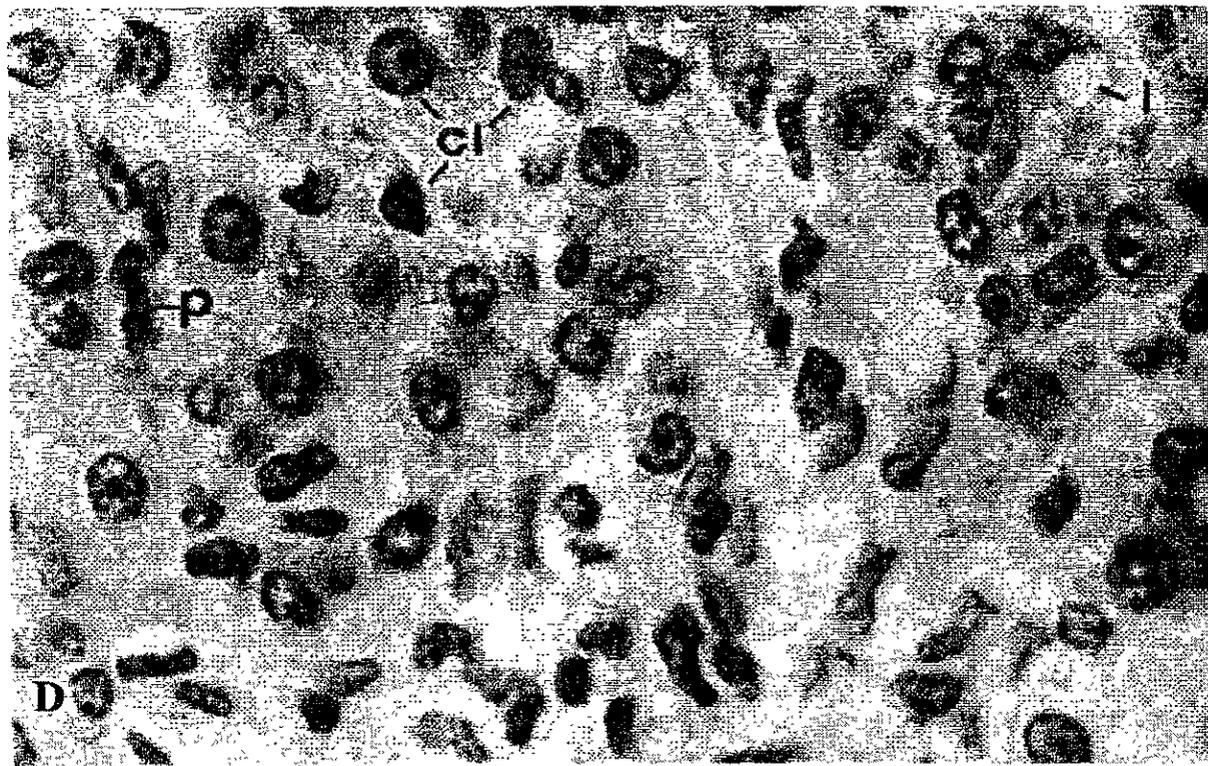
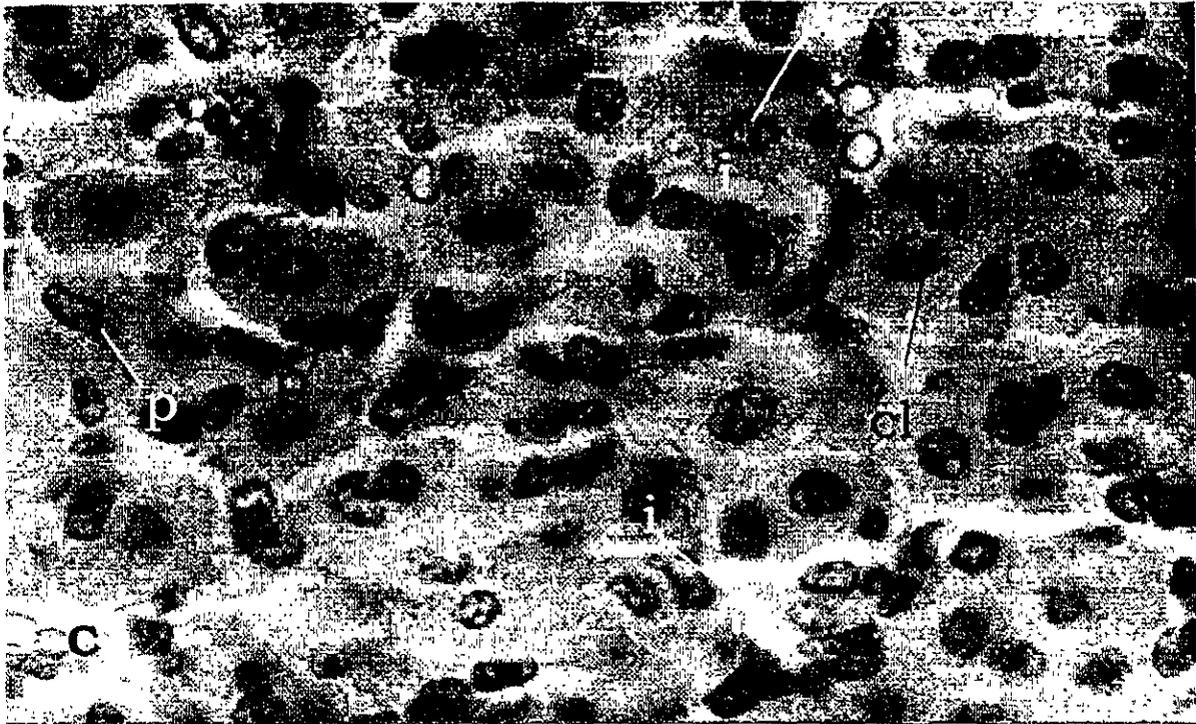


Figura 14 C y D. Cuerpo lúteo de un ovario de ratón sometido a E (C) y otro al que se le administro FNZE prenatalmente (D). En ambos las células lúteas (cl) tienen gran cantidad de inclusiones citoplásmicas (i). En D, se observan células paralúteas (p), que están dispersas en el campo y de tamaños diversos. En ambos las células tienen cromatina en grumos gruesos H-E. 1125X

Tabla 2.

Morfometría de los folículos del ovario de ratón en los grupos experimentales FNZ, FNZE, E, y el control (NT).

Grupos	F. Primordial				Folículo Primario		Folículo Secundario					
	Diámetro mínimo y máximo (µm)		Forma	Tamaño (µm)		Forma	Diámetro mínimo y máximo (µm)		Forma			
	Folículo	Ovocito	Núcleo	núcleo	Folículo	Ovocito	Núcleo	Núcleo	Folículo	Ovocito	Núcleo	Núcleo
Controles	10.0-16.0	7.2 - 9.6	7.2-6.5	Ovoide	14.4-144	12-33.6	7.2 - 14.4	Ovoide o Esférico	52.8 - 240	16.2 - 40.8	7.2-16.8	Esférico
FNZ	9.0-11.0	6.0 - 9.0	5.0 - 7.0	Ovoide	26.4-57.6	14.4-40.8	7.2-12	Ovoide o Esférico	48.0-194.4	31.2-45.6	12-16.8	Esférico
FNZE	9.0-11.0	6.0 - 9.0	5.0 - 7.0	Ovoide	19.2-91.2	9.6-36.0	7.2-14.4	Ovoide o Esférico	100.8-62.4	24.0-43.2	14.4-16.8	Esférico
E	10.0-11.0	8.0 - 9.0	7.0	Ovoide	16.8-153.6	12.0-38.4	7.2-14.4	Ovoide o Esférico	69.6-189.6	28.8-40.8	12.0	Esférico

Intervalos de las medidas foliculares obtenidos en el ovario de los animales del grupo control (NT y S), de los tratados con flunitrazepam (FNZ), flunitrazepam y estrés (FNZE) y estrés (E).

Tabla 3.

Diámetro y morfología de los folículos atrésicos primarios y secundarios del ovario de ratón adulto en los grupos experimentales.

Grupos	F. Atrésico 1o			F. Atrésico 2o				
	Folículo	Diámetro mínimo y máximo(µm) Ovocito	Núcleo Ovocito	Forma del Ovocito	Folículo	Diámetro mínimo y máximo (µm) Ovocito	Núcleo Ovocito	Forma del Ovocito
Controles	28.8-148	19.2-36.0	14.4- 17.2	Ovoide, Deforme	105.6-223	28.8-48.0	9.6-16.8	Esférico,
FNZ	19.2-100.8	7.2-31.2	2.4-7.2	Ovoide, Contraído	84.0-216.0	12.0-48.0	4.8-14.4	Esférico Reducido
FNZE	31.2-120.0	12.0-40.2	2.4-14.4	Ovoide, Deforme	268.8-96.0	28.8-48.0	7.2-19.2	Esférico Ovoide
E	19.2-72.0	4.8-38.4	4.8-9.6	Esférico, Deforme	62.4-345.6	24.0-76.8	14.4-33.6	Poco esférico

Intervalos de las medidas foliculares obtenidos en el ovario de los animales del grupo control (NT y S), de los tratados con flunitrazepam (FNZ), flunitrazepam y estrés (FNZE) y estrés (E).

Tabla 4.

Características morfométricas del cuerpo lúteo y sus poblaciones celulares de los grupos FNZ, FNZE y E comparados con los controles (NT).

Grupos	Núcleo de las Células							
	Cuerpo Lúteo		Dimensiones (µm)		Células Lúteas		Células Paralúteas	
	Menor	Mayor	Menor	Mayor	Menor	Mayor	Menor	Mayor
Controles	91.2-240.0	192.0-252.0	3.0-3.0	4.0-5.0	Ovoide	1.0-3.0	2.0-7.0	Fusiforme
FNZ	144.4-288.0	184.8-374.4	4.0-4.0	4.0-7.0	Ovoide	2.0-4.0	2.0-8.0	Fusiforme
FNZE	67.2-182.4	192.0-297.6	2.0-3.0	5.0-5.0	Ovoide	1.0-3.0	4.0-7.0	Fusiforme
E	96.0-235.2	148.8-360.0	2.0-2.0	4.0-5.0	Ovoide	1.0-5.0	5.0-6.0	Fusiforme

Intervalos de las medidas foliculares obtenidos en el ovario de los animales del grupo control (NT y S), de los tratados con flunitrazepam (FNZ), flunitrazepam y estrés (FNZE) y estrés (E).

Tabla 5.

Distribución de los valores de la media, error estándar y p, en diferentes tipos de folículos en ovario de ratón, en estro, tratados durante su período embrionario a flunitrazepam y sometidos a estrés.

Tratamientos	Tipos de Folículos					
	Primordial	Primario	Secundario	Atrésico 1°	Atrésico 2°	n
NT	15.8 ± 1.1	33.4 ± 1.1	8.8 ± 1.0	11.6 ± 1.0	10.8 ± 1.3	20
FNZ	7.7 ± 1.25***	17.5 ± 1.9*	3.0 ± 0.6**	17.8 ± 2.4**	12.6 ± 1.9	10
FNZE	8.9 ± 1.2***	14.3 ± 1.4***	3.5 ± 0.97**	27.5 ± 2.6***	21.2 ± 2.6***	14
E	9.5 ± 1.5***	21.0 ± 3.6**	3.5 ± 1.0**	34.9 ± 4.7***	13.4 ± 1.4*	8
S	10.4 ± 2.1	32.6 ± 6.8	10.0 ± 0.9	10.0 ± 1.3	11.2 ± 0.5	5

Controles (NT, no tratados y S, con solución salina al 0.9%); FNZ: flunitrazepam; FNZE: flunitrazepam después de someter a estrés; E: animales sometidos a estrés en el sexto día de gestación. p < 0.05*, p < 0.01**, p < 0.001***

Tabla 6.

Distribución de los valores de la media, error estándar y p en las células lúteas, paralúteas y número de los cuerpos lúteos (cl) de ovarios de ratón, en estro, que fueron sometidos *in utero* a flunitrazepam y/o a estrés.

Tratamientos	Promedio del nº de células lúteas/ campo				
	Lúteas	Paralúteas	Total	nº de cl	n
NT	23.4 ± 0.7	8.1 ± 0.4	14.9 ± 0.8	6.9 ± 1.0	11
FNZ	17.6 ± 0.6**	5.8 ± 0.4**	10.5 ± 0.2	4.8 ± 0.9	8
FNZE	23.5 ± 0.6	9.6 ± 0.6**	16.7 ± 0.9	3.6 ± 0.7**	8
E	20 ± 1.2**	5.3 ± 0.6***	17.0 ± 1.2	3.9 ± 1.1*	9
S	21.3 ± 0.6	7.2 ± 0.5	14.8 ± 0.9	5.9 ± 0.8	5

Control (NT, no tratados y S, con solución salina al 0.9%); FNZ: flunitrazepam; FNZE: flunitrazepam después de someter a estrés; E: animales sometidos a estrés en el sexto día de gestación. $p < 0.03^*$, $p < 0.01^{**}$ y $p < 0.001^{***}$.

Tabla 7

Distribución de los valores de la media, desviación estándar y p, de la concentración de progesterona de los ratones tratados durante su período embrionario a flunitrazepam y sometidos a estrés.

Grupos	Promedio (pg)	Desv. Estand.	n
NT	1533	860	20
FNZ	1095	826	15
FNZE	884*	406	17
E	1028	327	6

Control (NT, no tratados); FNZ: flunitrazepam; FNZE: flunitrazepam después de someter a estrés; E: animales sometidos a estrés en el sexto día de gestación. $p < 0.01^*$.

Tabla 8

Análisis de resultados de las pruebas X^2 , U de Mann Witney*, KW* y t de student** para los grupos experimentales

Grupos	Tipos de Folículos					Número de Cuerpos Lúteos.	Progesterona
	Primordial	Primario	Secundario	Atrésico. 1°	Atrésico. 2°		
FNZ	↓*	↓*	↓*	↑*			
FNZE	↓*	↓*	↓*	↑*	↑*	↓*	↓**
E	↓*	↓*	↓*	↑*	↑*	↓*	
S	-	-	-	-	-	-	-
NT	-	-	-	-	-	-	-

↑ aumento del número de folículos y cuerpos lúteos

↓ disminución del número de folículos y cuerpos lúteos

* diferencia significativa

DISCUSIÓN

El análisis histológico de ovario de ratón adulto sometido durante el período embrionario a FNZ y/o a estrés por inmovilización no ha sido descrito en la literatura, sin embargo, se reportan alteraciones con DZ en ovario (Hernandez-Alvarez y cols., 1991). En el presente estudio se analiza, mediante técnicas histológicas y morfométricas, las características y la frecuencia de los folículos primordiales, primarios, secundarios normales; primarios y secundarios atrésicos, de los cuerpos lúteos, y de las células lúteas y parálúteas de ratones tratados *in utero* con FNZ, estrés o ambos (Tabla 8).

Los cortes histológicos de los grupos FNZ, en general, presentan alta afinidad por los colorantes ácidos y básicos; cromatina en grumos gruesos que persisten hasta la vida adulta, lo que coincide con lo observado en ovario tratado con DZ *in utero* (Hernandez-Alvarez y cols., 1991), esto se puede deber a que el fármaco tiene una acción directa sobre el ADN, produciendo rupturas en los cromosomas, similares a las encontradas *in vitro* en linfocitos con DZ, a concentraciones de 0.1, 1.0, 10.0 y 20.0 $\mu\text{g/ml}$ de medio de cultivo, en los cuales, también aumentan la formación de isocromosomas (Stenchever y cols., 1975).

Con dosis de 5 $\mu\text{g/ml}$, el DZ produjo en ratón de la cepa MFI, después de permanecer en medio de cultivo durante 16 horas, una reducción del porcentaje de ovocitos que entran a meiosis II. En concentraciones de 25 $\mu\text{g/ml}$, provocó la detención en la meiosis (Eichenlaub-Ritter y cols., 1996).

A través de un estudio utilizando los modelos teóricos, realizado en el Instituto de Química de la UNAM, se demostró la probabilidad de que el DZ forme aductos con el ADN al insertarse en forma transversa a la doble hélice, lo que provocaría la rupturas cromosómicas, que aumentaría la formación de la cromatina dispuesta en grumos como los observados en los tejidos fetales y adultos de ratón expuestos *in utero* al fármaco (Márquez-Orozco, 1997).

Otra característica de los grupos FNZ es el citoplasma abundante y con inclusiones, vacuolas o grumos, que probablemente son la manifestación histológica de la presencia de alteraciones de los organelos citoplásmicos, como las observadas mediante microscopía electrónica en el corazón y el hígado de fetos de madres tratadas con DZ. Estos tenían el citoplasma con vacuolas grandes, delimitadas por una membrana bien definida, rodeadas por

abundantes gránulos de glucógeno, el retículo endoplásmico rugoso con cisternas dilatadas, abundante complejo de Golgi y polirribosomas (Márquez-Orozco y cols., 1993, 1997). También Stenchever y cols. (1975), encontraron, además, alteraciones en los organelos citoplásmicos semejantes a los descritos, elementos membranosos y reducción de la cantidad de colágena. La presencia de numerosos polirribosomas, de acuerdo con el modelo teórico, realizado en el Instituto de Química de la UNAM, podría deberse a que el DZ y, probablemente otras benzodiazepinas como el FNZ también pueden interferir con la síntesis de la aminoacil sintetasa, responsable de unir los aminoácidos al ARN transferencia, lo que explicaría la acumulación de polirribosomas y la alteración de la síntesis de proteínas (Márquez-Orozco, 1997).

La disminución, estadísticamente significativa, de la cantidad de folículos primordiales, primarios y secundarios normales en el grupo FNZ, se puede deber a una alteración en la diferenciación de los primordiales y al desarrollo de los primarios y secundarios, relacionados con la modificación morfológica y fisiológica de sus organelos citoplásmicos que podrían impedir la respuesta normal a las hormonas hipofisarias; por ejemplo, el no desarrollo de la cantidad de receptores a éstas, lo que a su vez explicaría la presencia de una proporción mayor de folículos atrésicos primarios o secundarios (tabla 5). Los folículos secundarios del grupo FNZ no aumentaron significativamente con respecto al grupo NT, tal vez se deba a la gran dispersión de los datos del grupo FNZ, lo que aplanan la curva. Hernández y cols. (1991) al administrar DZ, también encontraron un aumento del número de folículos atrésicos, pero los normales aumentaron, lo que difiere a lo observado en el tratamiento con una dosis única de FNZ, que puede deberse al tiempo de exposición a la droga, puesto que con DZ fue del 6° al 17° día de gestación, sin embargo, es importante resaltar el hecho de que los tejidos de los animales tratados con FNZ experimenten daños similares a los producidos por el DZ, a pesar de la utilización de una sola dosis; aunque ambas BDZ son ligando del RBC asociado al GABA y del RBP, los cuales aparecen temprano en el desarrollo.

Los RBC, han sido identificados al utilizar como ligando el FNZ ^[3H] en embriones y fetos humanos de la 7ª a la 26ª semana de gestación y en el día 19 en los fetos de ratas. Los RBP son de aparición más precoz que los RBC, y se han podido detectar en la rata a los 16

días (Hebreband y cols., 1988; Anholt y cols., 1985). La gran variedad del efecto farmacológico de las BDZ puede deberse a la presencia del RBC, localizado en el sistema nervioso central (SNC) (Feldman y cols., 1997) y el RBP, que se encontró tanto en el SNC como en los tejidos de órganos periféricos (Parola y cols., 1993; Zisterer y cols., 1997).

El RBP forma un complejo proteico, cuyo ligando agonista permite el paso del colesterol a través de la membrana externa de las mitocondrias, el cual puede biotransformarse en el ovario, el SNC y las glándulas suprarrenales en esteroides, como la progesterona, precursora de otras hormonas (Parola y cols., 1993; Riond y cols., 1991). Por otra parte, si las BDZ inducen el aumento de la concentración de esteroides, éstos podrían provocar un desequilibrio fisiológico del eje hipotálamo-hipófisis-ovario (H-H-O), ya que al inhibir la secreción de GnRH, la LH y la FSH disminuye el estímulo necesario para mantener la producción de hormonas ováricas. Al bajar la concentración de estas hormonas podrían hipertrofiarse las células de la teca interna y las células granulosas, presentar características similares a los descritos durante la apoptosis o muerte celular programada. Algunas de las células apoptóticas presentan una cromatina compacta, desplazada hacia la periferia de la membrana nuclear, otras en la que la cromatina es densa y homogénea (picnótica) y unas más en la que se condensa en grumos y tienen abundante citoplasma con inclusiones acidófilas, localizadas entre células con apariencia de ser viables. El proceso ha sido descrito por Wyllie (1980) y Jolly y cols. (1997) en las células apoptóticas foliculares, utilizando el marcaje del extremo 3' (técnica de TUNEL) y observaron, que en las células al experimentar la apoptosis el ADN se ha fragmentado, lo que era un indicador temprano del proceso de atresia folicular. A pesar de la similitud en las características morfológicas de las células granulosas del grupo FNZ con las apoptóticas, sería necesario emplear técnicas específicas para corroborar la fragmentación del ADN, así como autorradiografías o fluorometría, para medir de manera cuantitativa actividad de las caspasas, o de la enzima interconvertidora de interleucina -1 (ECI), que participan en el proceso de la apoptosis (Kaipia y cols., 1997).

Sinha-Hikin y cols., (1997) corroboraron el efecto de la ausencia de las hormonas tróficas sobre las células germinales de ratas adultas, utilizando antagonistas de hormonas hipofisarias, las cuales provocan un aumento en la fragmentación del ADN. La correlación

entre las células en degeneración y las apoptóticas, presentan una $r=0.94$ ($p < 0.001$) (Sinha Hikim y cols., 1997).

El número de células lúteas y paralúteas del grupo FNZ, difiere de las encontradas por Hernández y cols., ya que con DZ aumentaron y con FNZ disminuyeron. Esto podría deberse al tiempo de exposición prolongado del DZ durante la gestación; además, en un sentido farmacológico, el DZ pasa por un proceso corto de biotransformación, tiene un átomo de halógeno (Cl) y su esteroquímica es más afin a los receptores benzodiazepínicos que el FNZ, el cual tiene vías de metabolismo más complejas (Cirimele y cols., 1997; Zisterer y cols., 1997; Márquez-Orozco, 1997) .

Otra posible explicación de la alteración, es que el FNZ afectara el desarrollo del SNC como lo hace el DZ, que retrasa la migración y la diferenciación de las células neuroepiteliales y de las neuronas. Altera las fibras mielínicas que presentan vainas con láminas desorganizadas y engrosadas a nivel de la corteza cerebelar, el cuerpo estriado y el mesencéfalo (Márquez-Orozco, 1997). Esta alteración se ha observado en otras áreas del SNC, como en el hipotálamo y el hipocampo (información personal, Márquez-Orozco), que podrían modificar la fisiología del eje H-H-O y desequilibrar la acción hormonal a nivel del ovario.

Un indicador de la alteración del eje H-H-O podría ser la disminución de la concentración de progesterona en el suero sanguíneo, del número de cuerpos lúteos y del número de células lúteas y paralúteas por campo, presente en los ratones del grupo FNZ.

Por otra parte, el elevado número de folículos atrésicos primarios y secundarios de las hembras del grupo E, y la disminución del número de folículos primordiales, primarios y secundarios normales, probablemente disminuyan la cantidad de ovocitos que lleguen a madurar. Lo anterior se puede deber a que el estrés induce un incremento de la secreción de glucocorticoides a nivel suprarrenal, provocado por la producción excesiva de hormonas hipotalámicas e hipofisiarias, que en conjunto constituyen el eje H-H-Suprarrenal. Como los glucocorticoides son precursores de las hormonas esteroideas, al aumentar sus niveles en la circulación, de acuerdo a lo descrito por Sratakis y Chrousos (1995), inhiben la secreción de la LH y la FSH.

Billig y cols. (1993) a ratas inmaduras hipofisectomizadas les colocaron implantes de dietilestilbestrol (DES) por dos días y después de removerlos, cada 12 horas sometieron a un grupo a tratamiento con estrógenos, otro al de andrógenos (testosterona) y uno más no recibió hormonas. En los tres cuantificaron el ADN marcado, el fragmentado, y por técnicas histoquímicas demostraron que la ausencia de estrógenos induce apoptosis en las células granulosas de los folículos primarios grandes y de los secundarios, pero no tuvo este efecto en las células de la teca interna, en las del tejido intersticial ni en las células granulosas de los folículos primordiales y primarios más jóvenes. Billig y cols. (1993) y previamente Azzolin y cols. (1983); comprobaron que el tratamiento con andrógenos incrementa la apoptosis y produce cambios morfológicos en las células granulosas de los folículos secundarios antrales y de los preantrales.

Los glucocorticoides, además de ser importantes en el mantenimiento de la homeostasis del organismo, participan en la activación de proteasas del tipo ECI involucradas en la apoptosis (Vaux y Strasser, 1996), por lo tanto, el aumento de la concentración de glucocorticoides también podría acelerar de manera directa la apoptosis, que se presenta durante la atresia folicular. Jolly y cols. (1997), mediante marcaje del extremo 3' del ADN (TUNEL) y microscopía, examinaron células apoptóticas en la capa de la granulosa de folículos ováricos atresicos y detectaron que este proceso aparecía en una etapa temprana de la atresia, antes de los cambios morfológicos o bioquímicos indicadores de la atresia folicular.

El estrés físico aplicado a ratones provoca aumento de los niveles de corticoesteroides plasmáticos y el número de células apoptóticas en otros órganos como en el timo y el bazo, vía caspasas 3 a tres horas de la exposición, sin embargo puede el daño puede disminuirse mediante un antagonista (Fukuzuka, 2000).

La disminución del número de células lúteas y paralúteas en los ovarios de las hembras del grupo E es otro de los efectos del estrés agudo, el cual inhibe el eje H-H-O (Stratakis y Chrousos, 1995) y reduce el suministro hormonal necesario para la división de las células del cuerpo lúteo, que sintetizan la progesterona. Lo que coincide con la baja concentración de progesterona detectada en el suero, el cual representaría una tendencia a pesar de no tener diferencias estadísticamente significativa, ya que el valor de la media es

menor al 50% del grupo NT; sin embargo, la dispersión de los datos de este grupo pudo enmascarar las diferencias o bien que el tamaño de la muestra sea insuficiente para detectarlas. La dispersión de los datos, probablemente, esté relacionada con la observación del estro vaginal, que tiene una duración relativamente mayor que el ovárico en la evolución de los folículos y de los cuerpos lúteos, que es tan rápida, por lo que, simplemente al no sacrificar de forma simultánea a todos los animales, la determinación hormonal podría ser modificada. La baja concentración de progesterona sugeriría que de embarazarse estos animales serían incapaces de mantener el desarrollo del embrión durante el período de preñez.

Para investigar si el FNZ evita que el estrés altere la estructura celular del ovario, se utilizó el grupo FNZE, en el que también aumenta el número de folículos atrésicos (tabla 5), lo que sugiere un efecto producido por ambos tratamientos, pudieron sumarse, en lugar de que el FNZ eliminara el del estrés, debido a que los dos actúan sobre la regulación directa del eje H-H-O, a través del eje H-H-S, que aunado a las alteraciones de los organelos citoplásmicos, de la cromatina, la mitosis y la diferenciación celular sugerido por Márquez Orozco (1997) con el DZ, contribuirían al aumento de la atresia folicular.

En el cuerpo lúteo el FNZE tiene tamaños celulares heterogéneos lo que coincide con Aguirre y cols. (1999) en un estudio con ratones a los que se les sometió, prenatalmente a estrés y a DZ, esto tal vez se deba a la acción persistente del estrés en algunas células y al del fármaco en otras. La talla heterogénea de las células, también podría deberse a un efecto similar al observado en ratas sometidas a estrés agudo, en la cual incrementa el porcentaje de RBP en las suprarrenales, los niveles plasmáticos de corticosterona y la producción de esteroides (Ferrarese y cols., 1991), por lo que se produciría un proceso de retroalimentación que inhibe el eje H-H-O.

El aumento del número de células paralúteas en el grupo FNZE (tabla 6), apoyaría la idea de que el FNZ, al igual que el DZ, altera la diferenciación y la morfología celular que tendría como consecuencia alteraciones fisiológicas que se aunarían a las del estrés. Aguirre y cols. (1999) coincide en la alteración que provoca la combinación del estrés y el DZ, en el

aumento del número de células paralúteas, pero no en la disminución de las células lúteas, ya que en el grupo FNZE no hubo diferencias con respecto a los controles.

Es evidente que los efectos sedantes, miorelajantes e hipnóticos de las benzodiazepinas como el FNZ y el DZ, mejoran las características psicológicas de los pacientes sometidos a estrés, sin embargo, por su acción a nivel del SNC y de los ovarios, al igual que en los ratones, podría alterar el eje H-H-O y no revierten la que tiene el estrés sobre el H-H-S, que repercute sobre la fisiología del primero. La posibilidad de extrapolar los datos a la especie humana existe, ya que, por ejemplo las alteraciones del aprendizaje y de la actividad locomotora observadas en los niños nacidos de madres que tenían concentraciones altas de BDZ en la sangre, durante el parto, son semejantes a las observadas en las crías de ratones expuestos prenatalmente a DZ. Todas la observaciones podrían sugerir que al menos en la histología y morfometría de los folículos y el cuerpo lúteo del ovario, el FNZ no impide el daño celular.

CONCLUSIONES

La exposición prenatal de ratones de la cepa ICR en una dosis única de 2.5 mg/kg de peso de FNZ en el sexto día de gestación provoca en el ovario de crías adultas:

- Presencia de heterocromatina en grumos gruesos distribuidas atípicamente en los ovocitos, en las células granulosas, lúteas, paralúteas y las tecales.
- Aumento del tamaño nucleolar y citoplasma con vacuolas e inclusiones basófilas, principalmente en los ovocitos.
- Incremento de la atresia de folículos primarios ($p < 0.01$) y no significativa de los secundarios. Disminución de la población de folículos primordiales, primarios y secundarios ($p < 0.05$).
- Disminución del número de células lúteas y paralúteas ($p < 0.01$).

El estrés por inmovilización aplicado durante tres horas a hembras de ratón de la cepa ICR, en el sexto día de gestación provoca en el ovario de crías adultas:

- Disminución significativa del número de folículos primordiales ($p < 0.001$), primarios y secundarios ($p < 0.01$). Aumento del número de folículos atrésicos primarios en una proporción de tres veces mayor que el grupo NT ($p < 0.001$) y de los secundarios atrésicos ($p < 0.05$).
- Disminución significativa del número de células lúteas ($p < 0.01$) y paralúteas ($p < 0.001$).

El efecto de la administración de FNZ después de someter a las hembras de ratón de la cepa ICR a estrés por inmovilización, en el sexto día de gestación, induce en el ovario de las crías adultas:

- Presencia en los ovocitos, las células granulosas, las lúteas y paralúteas con heterocromatina en grumos gruesos, prominente nucleolo e inclusiones citoplásmicas.
- Disminución de dos veces el número de los folículos primordiales, primarios y secundarios ($p < 0.01$). Duplicación del número de folículos atrésicos primarios y secundarios ($p < 0.001$).
- Tamaño heterogéneo de las células lúteas.

- Incremento estadísticamente significativo del número de células paralúteas ($p < 0.01$).
- Disminución significativa de la concentración de progesterona en el suero sanguíneo ($p < 0.01$).
- Los tratamientos de FNZ, E y FNZE aplicado a ratones de la cepa ICR, durante el sexto día de gestación produce en el ovario de las crías adultas efectos histológicos perdurables, que pueden tener repercusiones fisiológicas.
- El FNZ administrado a ratones de la cepa ICR, durante el sexto día de la gestación, sometidos a estrés, produce en el ovario alteraciones histológicas, que se suman a las causadas por el estrés.

PERSPECTIVAS

El uso de herramientas de la Biología Molecular han sido instrumentos que permiten descifrar los mecanismos moleculares de los procesos metabólicos.

Para verificar y corroborar los efectos del FNZ, dado que las benzodiazepinas fueron usadas desde 1960, se requiere el uso y manejo de técnicas de diagnóstico que permitan correlacionar la relación efecto-daño-dosis, es decir, molécula-estructura-función.

Existen referencias de trabajos bien documentados que constatan la relación referida:

- a. estudios de metabolitos de FNZ después de 12 a 72 horas de aplicación (Salamone, 1997).
- b. estudios de rutas metabólicas mediante antagonistas como picrotoxina (del receptor GABA_A o la biculina. Análisis de dosis respuesta-efecto en la modificación de receptores, a nivel embrionario y adulto. Alteración de proteínas (RNAm) observadas mediante secuenciación.
- c. estudios de apoptosis y factores que intervienen para poder diferenciar el daño provocado dependiendo de esos factores (Jolly y cols., 1997; Nagata, 2000).

La integración de las diferentes técnicas ayudan a dilucidar otros efectos provocados por las benzodiazepinas.

REFERENCIAS

- AMOIA M., Azzollini CV., Ippedico M., Donadio S. 1987. Effetti ipercinetici del flunitrazepam e del diazepam nel feto. *Minerva Anestesiol* 53: 123-128.
- ANDRÉ M., Sibout M, Petry J-M, Vert P. 1973. Depression respiratoire et neurologique chez le prématuré nouveau-né de mère traitée per diazepam. *J Gyn Obst Biol Reprod* 2: 357-366.
- BAIN P., Yoo M., Clarke T., Hammond S., Payne A. 1991. Multiple forms of mouse 3(- hydroxysteroid dehydrogenase/ (5-4) isomerase and differential expression in gonads, adrenal glands, liver, and kidneys of both sexes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 8870-8874.
- BAMFORD M., Walkinshaw G., Brown R. 2000. Therapeutic applications of apoptosis reserch. *Exp Cel Res* 256: 12-18.
- BIXLER E., Kales A., Soldatos C., Kales J. 1977. Flunitrazepam, an Investigational hypnotic drug: sleep laboratory evaluations. *J. Clin Pharmacol* october, pp. 569-578.
- BYSKOV AGS. 1978. Follicular atresia. In: *The vertebrate ovary* (Plenum Press, NY) pp 533-562.
- CHAPMAN J., Waterhouse T., Michael S. 1992. Changes in mitochondrial and microsomal 3(HSD activity in mouse ovary over the course of the estrous cycle. *Biol Reprod* 47: 992-997.

CONCAS A, Follesa P., Barbaccia ML, Purdy RH., Biggio G. 1999. Physiological modulation of GABA(A) receptor plasticity by progesterone metabolites. *Eur J Pharmacol* 30;375 (1-3): 225-235.

COPLAN J., Andrews M., Rosenblum L., Owens M., Friedman S., Gorman J., Nemeroff C. 1996. Persistent elevation of cerebrospinal fluid concentrations of corticotropin – releasing factor in adult nonhuman primates exposed to early-life stressors: implications for the pathophysiology of mood and anxiety disorders. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93: 1619-1623.

DE ST HILAIRE-KAFI S., Gaillard J.M. 1988. Hypnotic action of flunitrazepam in the rat: does 5-HT mechanism play a role?. *Neuropharmacol* 27 (12): 1227-1230.

DRUGAN R. 1996. Peripheral benzodiazepine receptors: molecular pharmacology to possible physiological significance in stress-induced Hypertension. *Clin Neuropharmacol* 19 (6): 475-496.

FELDMAN R. Meyer J., Quenzer L.F.. 1997. Principles of neuropsychopharmacology. Editorial. SINAUER, USA., pp.424-436.

FERRARESE C., Mennini T., Pecora N., 1991. Acute noise stress in rats increase the levels of dizepam binding inhibitor (DBI) in hippocampus and adrenal gland. *Psychopharmacol* 103: 339-42.

FUKUZUKA K., Edwards III C., Clare-Salzer M., Copeland III E., Moldawer L., Mazingo D. 2000. Glucocorticoid-induced, caspase-dependent organ apoptosis early after burn injury. *AJP - Reg, Integ Comp Physiol* 278(4): 1005-1018.

- GARRET KM, Barron KW., Briscoe RJ., Heesch CM. 1997. Neurosteroid modulation of [3H]flunitrazepam binding in the medulla: an autoradiographic study. *Brain Res* 12; 768 (1-2): 301-309.
- GRAVIELLE MC., Fiszler de Plazas S. 1991. Benzodiazepine receptor sites in the chick optic lobe development and pharmacological characterization. *Neurochem Res* 16(1): 57-62.
- GRECO T., Payne A. 1994. Ontogeny of expression of the genes for steroidogenic enzymes P450 side-chain cleavage, 3 α -hydroxysteroid dehydrogenase, P450 17 α -hydroxylase /C17-20 lyase, and P450 aromatase in fetal mouse gonads. *Endocrinol* 135 (1): 262-268.
- GUIDOTTI A., Forchetti C., Corda M., Konkel D., Bennett C., Costa E. 1983. Isolation, characterization, and purification to homogeneity of an endogenous polypeptide with agonistic action on benzodiazepine receptors. *Proc Natl. Acad. Sci. USA* 80: 3531-3535.
- HERNANDEZ-ALVAREZ L., Márquez Orozco M., Márquez Orozco A. 1991. Effects of prenatal administration of diazepam on the ovary of mice. *Proc. West. Pharmacol. Soc.* 34: 379-382.
- HEBEBRAND J., Hofmann D., Reichelt R., Schnarr S., Knapp M., Propping P., Fodisch HJ. 1988 Early ontogeny of the central benzodiazepine receptor in human embryos and fetuses. *Life Sci* 43(25): 2127-2136.
- HSUEH A., Billig H., Tsafri A. 1994. Ovarian follicle atresia: a hormonally controlled apoptotic process. *Endocrine Rev.* 15 (6): 707-724.
- JOLLY P.D., Smith P.R., Heath D.A., Hudson N.L., Lun S., Still L.A., Watts C.H., McNatty K.P. 1997. Morphological evidence of apoptosis and the prevalence of apoptotic versus

mitotic cells in the membrana granulosa of ovarian follicles during spontaneous and induced atresia in ewes. *Biol of Reprod* 56: 837-846.

KANTO JH. 1982. Use of benzodiazepine during pregnancy, labour and lactation, with particular reference to pharmacokinetic considerations. *Drugs* 23(5): 354-380.

KANTO J., Errkkola R., Kangas L., Pitkänen Y. 1987. Placental transfer of flunitrazepam following intramuscular administration during labour. *Br. J. Clin. Pharmacol* 23: 491-494.

KRUEGER K., Papadopoulos V. 1990. Peripheral type benzodiazepine receptors mediate translocation of cholesterol from outer to inner mitochondrial membranes in adrenocortical cells. *J Biol Chem* 265: 15015-15022.

LENHINGER A. *Bioquímica*. Segunda edición. Ediciones Omega S.A.. Barcelona, p 690-701. 1988.

McELHATTON PR. 1994. The effects of benzodiazepine use during pregnancy and lactation. *Reprod toxicol* 8(6): 461-475.

McENERY M., Snowman A., Trifiletti R., Snyder S. 1992. Isolation of the mitochondrial benzodiazepine receptor: Association with the voltage-dependent anion channel and the adenine nucleotide carrier. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 3170-3174.

MEIKRANTZ W., Schlegel R., 1995. Apoptosis and the cell cycle. *J Cel Biochem* 58: 160-174.

MUKHIN A., Papadopoulos V., Costa E., Krueger K. 1989. Mitochondrial benzodiazepine receptors regulate steroid biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 9813-9816

NAGATA S., 2000. Apoptotic DNA fragmentation. *Exp Cel Res* 256: 1218.

- PAPADOPOULOS V., Amri H., Li H., Boujrad N., Vidic B., Garnier M. 1997. Targeted disruption of the peripheral-type benzodiazepine receptor gene inhibits steroidogenesis in the R2C Leydig tumor cell line. *J. Biochem Chem* 252 (51): 32129-32135.
- PAPADOPOULOS V., Nowzari F., Krueger K. 1991. Hormone-stimulated steroidogenesis is coupled to mitochondrial benzodiazepine receptors. *J. Biochem Chem* 266 (6): 3682-3687.
- PAROLA A., Yamamura H., Laird II H. 1993. Peripheral-type benzodiazepine receptors. *Life Sci* 52: 1329-1342.
- PAYNE A., Abbaszade I., Clarke T., Bain P., Park Chang-Hyun. 1997. The multiple murine 3 α -hydroxysteroid dehydrogenase isoforms: structure, function, and tissue- and developmentally specific expression. *Steroids* 62: 169-175.
- POSTEL-VINAY O. 1998. Cómo influye el estrés sobre los genes. *Mundo científico*, oct. 194:60-63.
- RIOND J., Mattei M., Kaghad M., Dumont X., Guillemot J.C., Le Fur G., Caput D., Ferrara P. 1991. Molecular cloning and chromosomal localization of a human peripheral-type benzodiazepine receptor. *Eur J. Biochem* 195:305-311.
- REICHELT R., Hofmann D., Fodisch H.J., Mohler H., Knapp M., Hebebrand J. 1991. Ontogeny of the benzodiazepine receptor in human brain: fluorographic, immunochemical, and reversible binding studies. *J. Neurochem* 57 (4): 1128-1135.

- ROCCA P., Beoni A., Eva C., Ferrero P., Zanalda E., Ravizza L. 1998. Peripheral benzodiazepine receptor messenger RNA is decreased in lymphocytes of generalized anxiety disorder patients. *Biol Psychiatry* 43: 767-773.
- ROBKER R., Richards J. 1998. Hormonal control of the cell cycle in ovarian cells: proliferation versus differentiation. *Biol Reprod* 59: 476-482.
- SALAMONE S., Honasoge S., Brenner C., McNally A.J., Passarelli J., Goc-Szkutnicka K., Brenneisen R., ElSohly M., Feng S. 1997. Flunitrazepam excretion patterns using the abuscreen ontrack immunoassays: comparison with GC-MS. *J Anal Toxicol* 21: 341-345.
- SCHAFFER K. 1998. The cell cycle: a review. *Vet Pathol* 35: 461-478.
- STRATAKIS C., Chrousos G., 1995. Neuroendocrinology and pathophysiology of the stress system. *Ann New York Acad Sc* 771:1-20.
- SINHA HIKIM A., Rajavashisth T., Sinha Hikim I., Lue Y., Bonavera J., Leung A., Waang C., Swerdloff R. 1997. Significance of apoptosis in the temporal and stage-specific loss of germ cells in the adult rat after gonadotropin deprivation. *Biol Reprod* 57: 1193-1201.
- STENCHEVER MA, Parks KJ. 1975. Some effects of diazepam on pregnancy in the Balb/C mouse. *Am J Obstet Gynecol*, 121: 765-770.
- VERHEIJ M., Bose R., Hua Lin X., Yao B., David Jarvis W., Zon L., Grant S., Birrer M., Szabo E., Kyriakis J., Haimovitz-Friedman A., Fuks Z., Kolesnick R. 1996. Requirement for ceramide initiated SAPK/JNK signalling in stress-induced apoptosis. *Nature* 380 (7) march pp. 75-79.

- WEISMAN R., Dagan E., Snyder SH., Gavish M. 1997. Impact of pregnancy and lactation on GABA (A) receptor and central-type and peripheral-type benzodiazepine receptors. *Brain Res* 28, 752 (1-2): 307-314.
- WHITAKER KJ., Manchester EL., Jacobson W., Wilkinson M. 1984. Benzodiazepine ([3H])-flunitrazepam binding sites in cerebellar and cerebral cortical slices of mouse brain. *Brain Res Bull* 12(3): 215-219.
- WILKINSON M, Moger WH.. Grovestine D 1980. Chronic treatment with valium (diazepam) fails to affect the reproductive system of the male rata. *Lif Sci*, 27: 2285-2291.
- WYLLIE A., Kerr J., Currie A. 1980. Cell death: the significance of apoptosis. *International Rev Cytol* 68: 251-305.
- ZISTERER D., Williams DC. 1997. Peripheral-type benzodiazepine receptors. *Gen Pharmacol* 29(3): 305-314.

INDICE DE ABREVIATURAS

Acarreador adenina nucleótido.....	ANC
Acido gamma aminobutírico.....	GABA
Acetilcolina.....	Ach
Benzodiazepinas.....	BDZ
Canal anionico dependiente de voltaje.....	CADV
Diazepam.....	DZ
Eje hipotálamo-hipófisis-ovario.....	H-H-O
Eje hipotálamo-hipófisis-suprarrenal.....	H-H-S
Estrés.....	E
Factor promotor de la mitosis.....	MPF
Flunitrazepam.....	FNZ
Flunitrazepam y estrés.....	FNZE
3 β - hidroxiesteroide deshidrogenasa/ Δ ⁵⁻⁴ isomerasa.....	3 β HSD
3 β - hidrox-5 α -pregnan-20-ona.....	3 α -OH-DHP
Hormona adenocorticotropica.....	ACTH
Hormona folículo estimulante.....	FSH
Hormona liberadora de hormona gonadotrópica.....	GnRH
Hormona liberadora de corticotropina.....	CRH
Hormona liberadora de la hormona del crecimiento.....	GHRH
Hormona liberadora de hormona tiroides.....	TRH
Hormona luteinizante.....	LH
Inhibidor de la unión de benzodiazepinas.....	DBI
Locus coeruleus.....	LC
Norepinefrina.....	NE
No tratado.....	NT
Proteína retinoblastoma.....	pRb

Receptor benzodiazepínico central.....	RBC
Receptor benzodiazepínico periférico.....	RBP
Solución salina.....	S
Sistema nervioso central.....	SNC
Tinción Hematoxilina-Eosina.....	H-E