

liber.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

*1 ejemplar
N. 22*



**ESTUDIO HISTOLOGICO DE LA RETINA FETAL DE
RATONES BLANCOS TRATADOS CON
DIAZEPAM (VALIUM)**

T E S I S

q u e p r e s e n t a

LILIA R. CORREA GARCIA

para obtener el título de:

B I O L O G O

México, D. F.,

6350

1979

641

35



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.

CONTENIDO

- I INTRODUCCION
- II MATERIALES Y METODOS
- III HISTOLOGIA NORMAL DE LA RETINA
- IV EMBIOLOGIA NORMAL DE LA RETINA
- V RESULTADOS HISTOLOGICOS Y ESTADISTICOS
- VI DISCUSION Y CONCLUSIONES
- VII BIBLIOGRAFIA

INTRODUCCION

El Diazepam (7 cloro - 1,3 - dihidro - 1 metil - 5 fenil - - 24 - 1,4 benzodiazepina - 2 ona) o Valium, es uno de los miembros del grupo de las benzopiazepinas que, aún cuando fué sintetizado - en 1960 por Sternbach y Reeder, publicado en el J. Org. Chem., y - registrado con el número 26,49,301 (Stecher, 1968); no fué conocido comercialmente sino hasta 1963 cuando lo patentaron los laborato_ rios Hoffman-La Roche, y desde su introducción a la industria far_ macéutica ha sido aplicado en diversos campos de la medicina como la Psiquiatría, la Medicina Interna, la Odontología, la Anestesiolo_ gía y la Obstetricia.

En Psiquiatría es muy útil por su acción sobre el sistema lím_ bico, región del cerebro constituida por el núcleo amigdalino, el hipocampo y las zonas septales, ya que provoca relajación y dismi_ nución de la tensión emocional, atenuando la ansiedad y excitación de los pacientes con trastornos mentales. Citado en la obra Valium Roche (Anónimo, 1970).

El Diazepam es muy aceptado en Medicina Interna, en el trata_ miento de pacientes con hipertonia de los músculos respiratorios que alteran la ventilación, siendo una ayuda efectiva en casos de asma bronquial y bronquitis espástica (Nirsching, 1968; citado en Anónimo, 1970) y coadyuvante en el tratamiento sintomático de los - trastornos funcionales del aparato digestivo, como el colon irri_

table .

Brown y col. (1968), citado en Valium Roche (1970), reportaron que el empleo de el Diazepam en Odontología contribuye como - un complemento para la anestesia local en pacientes ambulantes, - de los que se logra una mejor colaboración, a la vez que les permite una recuperación rápida.

En el campo de la Anestesiología, el Diazepam es seguro y - eficaz para la preparación preoperatoria de los pacientes, produciéndoles un sueño inmediato al suprimirles la excitación, Cushman, (1966) en Valium Roche, (1970)

Algunos autores, como Berger (1965), citados en Valium Roche (1970), consideran de gran importancia el uso del Diazepam como - regulador de las contracciones del miometrio, lo cual facilita la labor del parto acelerando la expulsión del producto; empleándose de igual manera en caso de aborto inminente, en placenta previa y para atenuar el nerviosismo y ansiedad de algunas pacientes tanto durante la gestación como en el parto.

Todas estas cualidades hacen que el Diazepam sea tan usado - por los ginecólogos y obstetras, a pesar de tener conocimiento - sobre su capacidad para atravesar la barrera placentaria; que es un conjunto de membranas con permeabilidad selectiva que actúa - impidiendo el paso de algunas sustancias de la sangre materna a - la fetal y permitiendo la transferencia de otras, dependiendo de sus características químicas, sin importar si son nocivas o no - para el producto. Tal es el caso de algunos analgésicos, sedantes, antibióticos, barbitúricos y otro tipo de fármacos, entre los cuales se encuentra el Diazepam, que por tener un peso molecular ba-

jo (284.76) atraviesa con facilidad la barrera placentaria y por ende llega hasta el producto.

Esto fué ampliamente comprobado por los trabajos de Indänpään y col. (1971), quienes administrando Diazepam marcado con C^{14} a hembras gestantes de ratón, hámster y mono, observaron su paso a través de la placenta. Sus estudios no se limitaron solamente a animales de laboratorio, sino también lo hicieron en mujeres embarazadas, encontrando que el Diazepam se metaboliza y atraviesa la barrera placentaria de la misma manera que lo hace en los animales de experimentación (Indänpään, 1970).

Este hecho ha atraído la atención de otros investigadores -- como Milkovich y Van Der Berg (1974), que se han interesado en estudiar los efectos que pudieran ejercer las benzodiazepinas sobre el producto, encontrando que en los niños nacidos de madres que han sido tratadas durante el embarazo con clordiazepóxido (Librium), que es otro miembro de este grupo de tranquilizantes, se presentan algunas alteraciones congénitas, como retardo mental, microcefalia, atresia duodenal, divertículo del fleón o de Meckel, hipoactividad e hipotonicidad muscular.

Los estudios hechos en recién nacidos de madres tratadas con el Diazepam durante el embarazo, revelan que aparentemente son normales morfológicamente, a pesar de que éste fármaco y sus metabolitos se acumulan en los tejidos fetales. Sin embargo al ser administrado durante el trabajo de parto Scher y col. (1972), observaron alteraciones del ritmo cardíaco de los recién nacidos y, -- Flowers (1969), en Scher (1972), encontró que el Apgar de estos --

niños es bajo, observándose así, cinco minutos después del nacimiento, debido básicamente a depresión respiratoria que podría ser causante de daño neuronal.

Por medio de los trabajos de Van Der Kleijn (1969), realizado con hembras de ratón embarazadas que fueron tratadas con Diazepam marcado con C^{14} , se pudo precisar la ruta metabólica seguida desde la aplicación a la madre hasta su llegada al feto, la acumulación en los tejidos maternos y fetales y su eliminación, logrando estos objetivos con los métodos autorradiográficos, con los que fué posible determinar que el Diazepam no sólo se deposita en los tejidos maternos y fetales, sino que su eliminación es más lenta en el feto y por lo tanto, el tiempo que permanece acumulado en éste es mayor.

El estudio se hizo de igual manera, con el clordiazepóxido y, comparando los resultados, se encontró que el Diazepam llega al cerebro en 14 segundos y alcanza su nivel máximo de radioactividad en un minuto, mientras que el Librium se empieza a acumular a los 5 minutos.

Además se observó una gran afinidad del cerebro en especial de la materia gris por ambos tipos de drogas, siendo más marcada en el caso del Diazepam.

En los tejidos en que se detectó una concentración de las benzodiazepinas de mayor importancia fueron, además de los del sistema nervioso central, el cardiovascular, el hígado, los riñones y los ojos. En éstos últimos se ha comprobado que el Diazepam se acumu

la principalmente en la retina, la coroides y el nervio óptico, -- confirmándose que se deposita rápidamente y permanece en los tejidos durante varias horas, hecho que se corroboró mediante los métodos autorradiográficos.

Conociendo que el Diazepam atraviesa la barrera placentaria -- tanto de los animales de laboratorio como la humana y sabiendo su localización en los tejidos oculares del ratón, ha surgido el interés de investigar mediante el presente trabajo si el Diazepam acumulado en la retina fetal es inocuo o si es capaz de producir alteraciones metabólicas que modifiquen su histogénesis.

En el caso de ser detectado algún cambio morfológico de la retina, con diferentes dosis del Diazepam, se tratará de hacer la -- correlación entre la dosis y los efectos producidos.

MATERIALES Y METODOS

Para realizar el presente trabajo se utilizaron ratones blancos de la cepa CD-1.

Las hembras con un peso de 30 a 35 g., y los machos de 35 a 40 g., ambos con una edad de 5 a 7 meses.

A las hembras se les practicó un frotis vaginal para poder determinar la fase del ciclo sexual en que se encontraban, y se procedió a separar a las que estuvieron en proestro, para ser apareadas de las 7 a las 8 A.M. del día siguiente, y a continuación se revisaron para observar la presencia del tapón vaginal. Este hallazgo se tomó como el inicio de la gestación.

En general en todos los roedores el apareamiento se lleva a cabo entre las 6 y las 8 A.M. dado sus hábitos nocturnos. El sistema de apareamiento que se usó fue de 5 a 1. Una vez separados de las hembras, los machos fueron marcados y puestos en cajas individuales. Las hembras que presentaron tapón vaginal, también fueron marcadas, pesadas y se dejó que continuara la gestación normalmente hasta el 6° día (ya que en éste se forma en los embriones la línea primitiva) y a continuación se procedió a formar los siguientes lotes:

Lote 1.- V1.25, inyectado con 41.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$., equivalente a inyectar

2.5 mg. a un paciente de 60 Kg.

Lote 2.- V5, inyectado con 166 μ g/kg., equivalente a inyectar 10 mg./60 kg.

Lote 3.- V20, inyectado con 664 μ g/kg., equivalente a inyectar 40 mg./60 kg.

Lote 4.- V40, inyectado con 1.328 mg/kg., equivalente a inyectar 80 mg./60 kg.

Lote 5.- V80, inyectado con 2.656 mg./kg., equivalente a inyectar 160 mg./60 kg.

Lote 6.- Testigo inyectado con el disolvente del Diazepam en cantidades equivalentes a las suministradas a cada uno de los lotes anteriores.

Lote 7.- Testigo inyectado con suero fisiológico en cantidades equivalentes a los lotes tratados con Diazepam.

El disolvente del Diazepam fué proporcionado por los Laboratorios Roche, puesto que se trata de una preparación especial.

A partir de éste 6° día se iniciaron los tratamientos administrando diariamente por vía intraperitoneal el Diazepam, el disolvente y el suero, y se llevó un control diario del aumento de peso hasta el 17° día de la gestación. Al 18° día se pesaron y se sacrificaron por decapitación para no usar anestésicos que atraviesan la barrera placentaria y causan cambios bioquímicos en los fetos. La razón por la que se sacrificaron un día antes de que dieran a luz fué para evitar que la madre, por instinto, dañara los productos anormales.

Se extrajeron los productos por laparotomía, se limpiaron y

se procedió a extraer intactos los globos oculares, que se fijaron durante 24 horas. Los fijadores empleados fueron: Bowin, Zenker, Helly, formol salino, formol al 10% y glutaraldehído con amortiguador de fosfatos a un PH de 7.4. Se lavaron y deshidrataron lentamente en alcoholes graduales para ser incluidos por el método de la doble inclusión en celoidina-parafina (Silliphant, 1949), que proporciona una mayor firmeza al tejido.

Posteriormente se obtuvieron cortes longitudinales seriados de 6μ de espesor, los cuales fueron teñidos con hematoxilina y eosina y hematoxilina de Weigert modificada. Estas técnicas son específicas para observar los núcleos, en este caso se trató de obtener la mayor nitidez de los retineanos.

El análisis histológico se realizó en el polo posterior de la retina y alrededor del nervio óptico, ya que es el área que presenta mayor grado de diferenciación, comparado con el resto de ella. Por esta razón, y para asegurar que el estudio se realizara en el mismo sitio, se calculó el número de cortes que estaban comprendidos en esta zona. Para esto se contaron los cortes que se obtuvieron desde el nervio óptico a la línea ecuatorial de la retina, que fueron aproximadamente 45 que multiplicados por 6μ de espesor, -- corresponden a un área de 270μ . Dentro de estos 45 cortes se estudiaron de 2 a 3 laminillas por pieza para describir la histología y morfología celulares, tanto de los grupos control como del testigo.

ESTUDIO ESTADISTICO

Dado que durante la diferenciación histológica de la retina, -

Las células de las capas nucleares externa e interna y la capa ganglionar, se estratifican de manera que pueden observarse hileras de núcleos que varían en número según el estado de desarrollo en que se encuentre, resulta posible cuantificar y analizar estadísticamente las diferencias que existen entre los grupos testigo y experimentales. El muestreo se realizó dentro de los 45 cortes, tomando uno o dos de cada 5. Los datos obtenidos se analizaron en una computadora digital PDP 11/40, obteniéndose los valores de la media de la población, la varianza y la desviación estandar. Posteriormente se compararon el grupo control con los experimentales para comprobar igualdades o diferencias, por medio de análisis de varianza y con la prueba de "t de student".

HISTOLOGIA NORMAL DE LA RETINA

El primer investigador que propuso un modelo morfológico de la retina fué Don Santiago Ramón y Cajal (1852-1934), el cual no ha cambiado con el tiempo, a pesar de los adelantos de la óptica moderna.

Ramón y Cajal (1892), citado por el mismo autor (1911) definió a la retina como un pedazo de cerebro colocado fuera del cráneo, - concepción que es fácilmente comprensible puesto que en la etapa - más primitiva de su desarrollo embrionario, los esbozos retineanos son un par de evaginaciones del prosencéfalo o cerebro anterior -- primitivo.

La estructura histológica de la retina adulta, dentro de la - clase de los mamíferos es muy similar, esto permite que se pueda - tomar como referencia cualquiera de ellas. En este caso la des_ - cripción se basa en la humana.

La retina es la pared más interna del ojo, constituida por -- 10 capas perfectamente diferenciables, que presentan variaciones - topográficas del fondo a la periferia de acuerdo al área que se - considere. Se toma como capa interna la que se encuentra más cer_ - ca de la cámara vitrea y la externa, es la que está en contacto -- con la coroides.

Dado este orden, se puede ver que la retina se encuentra for_

mada por elementos celulares y por fibras que se conectan y organizan de la siguiente manera:

1a. capa.- Pigmentaria. Esta es la capa más externa de la retina y está constituida por un epitelio cúbico simple, cuya membrana interna presenta numerosas digitaciones que rodean a los segmentos externos de los fotorreceptores.

2a. capa.- De conos y bastones. Constituida por los segmentos internos y externos de los conos y bastones, ubicados por fuera de la membrana limitante externa, a la cual atraviesan por pequeños poros.

3a. capa.- Membrana limitante externa. Se encuentra formada principalmente por los pies terminales de las células de Müller, que se aplanan y se unen entre sí. Kuwabara y col. (1974)

4a. capa.- Recibe el nombre de nuclear o granulosa externa, y contienen los núcleos de conos y bastones.

5a. capa.- Es la plexiforme externa y en ella se encuentran las sinapsis de los fotorreceptores con las células bipolares y las horizontales.

6a. capa.- Nuclear o granulosa interna. Esta capa presenta polimorfismo, ya que contiene cuatro tipos de células que se encuentran estratificadas, siendo las más externas las horizontales, después las bipolares, las de Müller y las amacrinas, que son las más internas.

7a. capa.- Plexiforme interna. Es el sitio donde se ponen en contacto los cilindros de las células bipolares, con las dendritas de las ganglionares y de las amacrinas.

8a. capa.- Ganglionar. Está constituida por grandes neuronas --

multipolares, llamadas células ganglionares que se distribuyen en un sólo estrato, excepto en la región macular en la que hay de 4 a 5 capas en el borde de la fovea centralis en la cual no existen.

9a. capa.- En ésta se encuentran las fibras ópticas, que son los cilindroejes de las células ganglionares que forman el nervio óptico.

10a. capa.- Membrana limitante interna. Formada por las prolongaciones citoplásmicas aplanadas de las células de Müller, que se unen entre sí y que están apoyadas en una membrana basal anhistá.

EMBRIOLOGIA DE LA RETINA

En la formación del aparato visual intervienen dos de las tres capas blastodérmicas que son: el mesodermo y el ectodermo. Este último, bajo la influencia del tejido cordomesodérmico, que es el organizador primario, se engrosa para formar la placa neural, que es el esbozo del que derivarán todas las estructuras del sistema nervioso central, entre las que se encuentran las vesículas ópticas; que originarán las porciones pigmentaria y sensorial de la retina. Una vez diferenciada la placa neural, se invagina formando el surco neural que se va cerrando conforme avanza el desarrollo, para formar en definitiva el tubo neural.

Aún antes de cerrarse el tubo neural la porción cefálica se ensancha, indicando la región que originará las tres vesículas cerebrales primitivas: el prosencéfalo, el mesencéfalo y el rombencéfalo, y en estas condiciones en los embriones humanos de 3.5 semanas se pueden observar en los bordes laterales del prosencéfalo, un par de depresiones conocidas como surcos ópticos, que son el primer indicio de la diferenciación de los campos ópticos. Estas vesículas presentan una estructura histológica idéntica a la del tubo neural, ya que son parte de éste y están constituidas por la membrana limitante interna, la capa ependimaria, la capa del manto, la capa marginal y la membrana limitante externa; estructura que se conserva prácticamente sin cambio en la retina, dicha distribución sólo es característica del período más temprano de su de-

sarrollo y que posteriormente se diferenciará en las diez capas de la retina funcional.

En las vesículas ópticas pueden distinguirse dos regiones: - una más estrecha proximal, que es la unión con el prosencéfalo y constituye los pedículos ópticos, y una porción más ensanchada y distal, o vesículas ópticas propiamente dichas, que está en contacto con el ectodermo superficial e inducirá a éste a formar las placodas ópticas o de la lente. (Fig.1). En el embrión humano al inicio de la 4a. semana, cada una de las vesículas ópticas se invaginan para dar lugar a una copa óptica constituida por una doble pared, que al formarse arrastra a la placoda óptica que originará la lente o cristalino. La capa externa de la copa dará origen a la pigmentaria y la interna a las nueve capas de la retina sensorial (Figs. 2 y 3).

La diferenciación total de la retina humana, se puede resumir en tres etapas según Mann (1969). Ver cuadro de las etapas del desarrollo de la retina.

La primera de ellas abarca de la 4a. a la 5a. semanas (Fig. 4). En la retina histológicamente se puede observar de dentro -- hacia afuera: la superficie de la capa marginal, que en este momento constituye la primitiva membrana limitante interna, la capa marginal propiamente dicha, el neuroepitelio constituido por las capas del manto, la ependimaria o germinal y finalmente, una membrana basal sobre la que se formará la membrana limitante externa. En la 5a. semana se pueden distinguir en el neuroepitelio tres -- tipos de células:

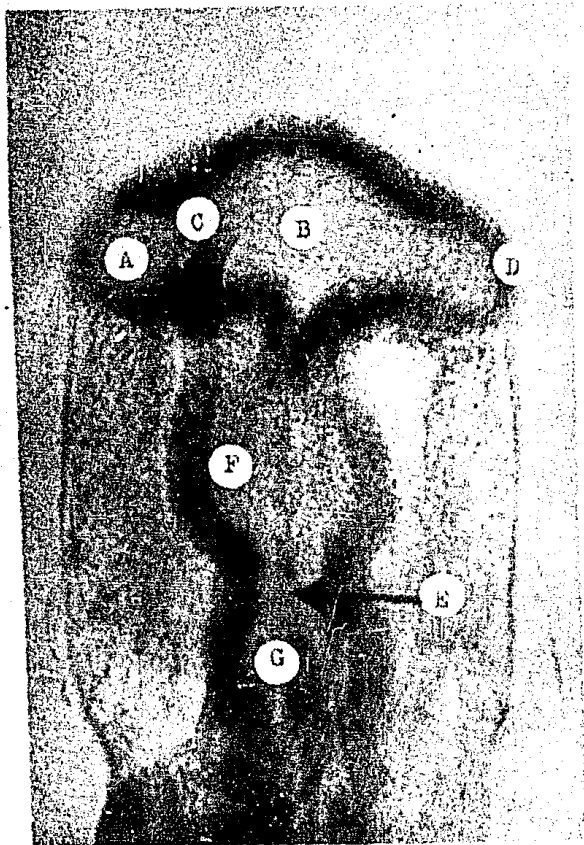


Fig. 1.- Embrión de pollo de 30 horas en el que se observan las vesículas ópticas (A) unidas al prosencéfalo (B) por los pedúnculos ópticos (C), el ectodermo superficial (D) que originará las placodas ópticas, la notocorda (E), el mesencéfalo (F) y el rombencéfalo (G) 150X.



Fig. 2.- Corte de un esbozo ocular de ratón blanco de aproximadamente 10 días de gestación, equivalente a la 4a semana del desarrollo humano, en el que la vesícula óptica está invaginándose para formar la copa óptica de doble pared (A y B) y la placoda óptica que también se invagina para originar la lente (C) 200X.

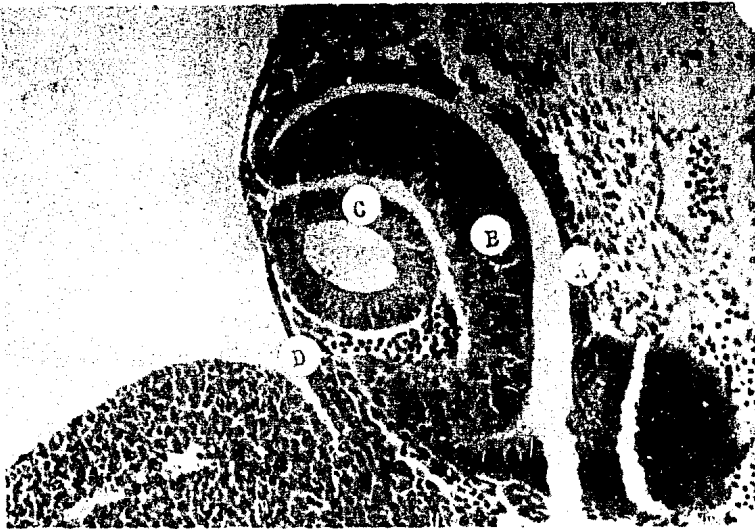
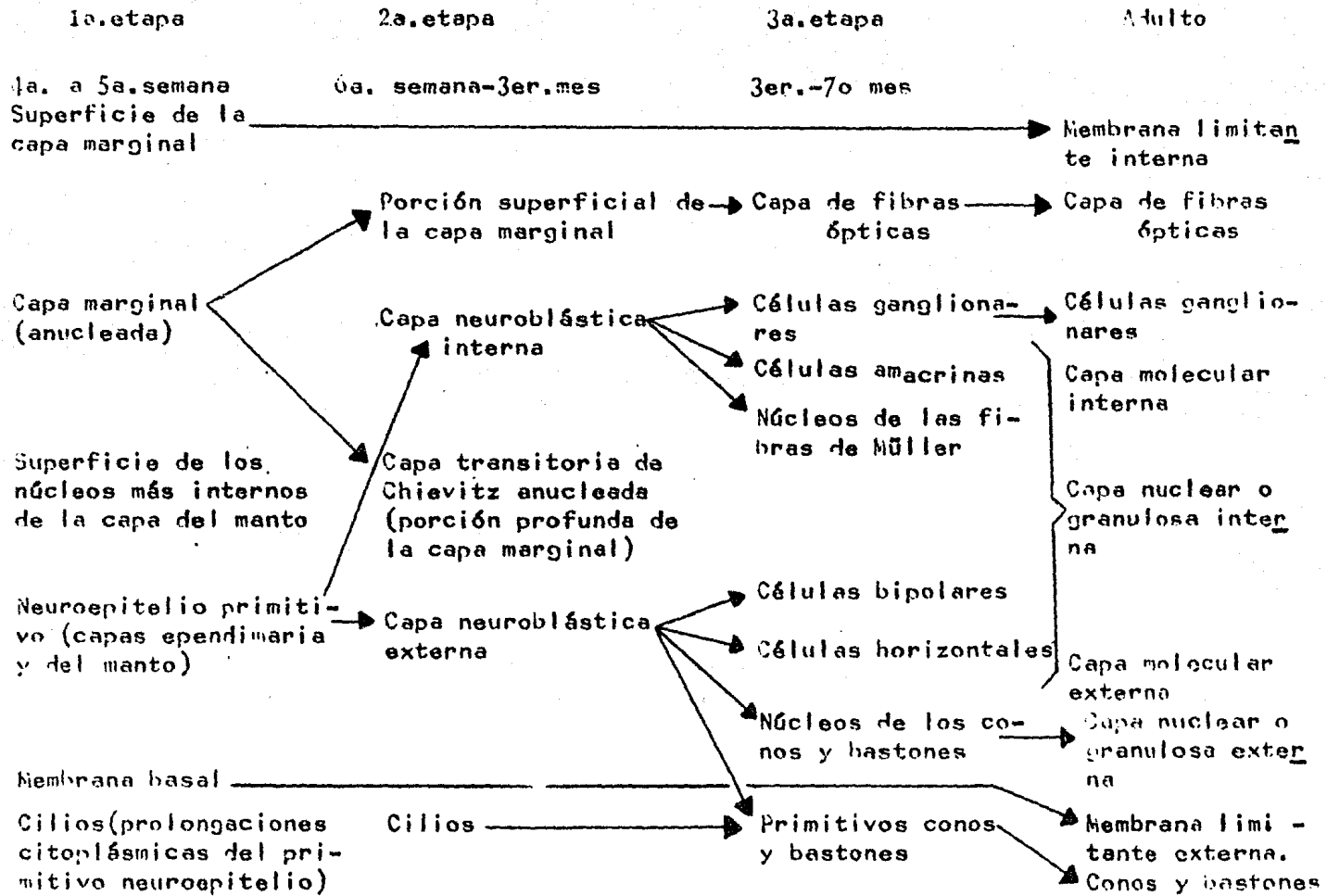


Fig. 3.- Esbozo ocular de ratón de 12 días de gestación, equivalente al inicio de la 5ª semana de desarrollo humano, en el que se observan los esbozos de la capa pigmentaria (A), la capa sensorial de la retina (B) y la vesícula de la lente (C) separada totalmente del ectodermo superficial (D) 200X.

CUADRO DE LAS ETAPAS DEL DESARROLLO DE LA RETINA (SEGUN MANN)



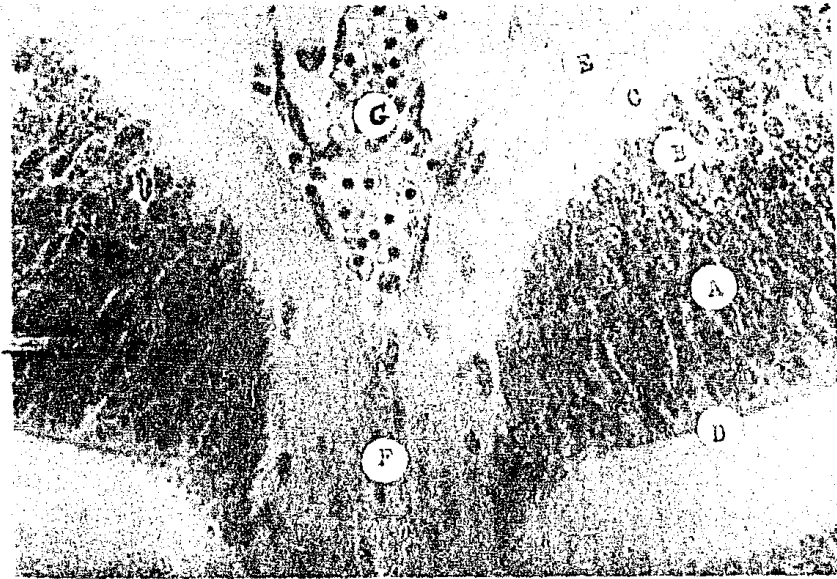


Fig. 4.- Polo posterior del globo ocular de ratón de 12-14 días, equivalente a la 5ª semana de desarrollo humano, mostrando la estructura primitiva de la retina constituida por las capas es pendi maria (A), del manto (B) y marginal (C); la membrana basal (D) y la superficie de la capa marginal (E). También se observan el primordio del nervio óptico (F) y la arteria hialoidea penetrando en la cámara vítrea (G) 600X.

- 1.- 6 a 8 hileras de células con núcleos ovalados que se tiñen intensamente y presentan un nucleolo muy evidente.
- 2.- Un segundo tipo de células son las de Müller, con núcleos -- muy semejantes a las anteriores, cuyo citoplasma emite prolonga_ ciones que se extienden hacia la capa marginal por un lado y ha_ cia la membrana basal por el otro, que más tarde se unen entre - sí para originar las membranas limitantes interna y externa defi_ nitivas.
- 3.- Por último podemos distinguir unas células con un núcleo -- grande, redondeado y de cara abierta que son las futuras células ganglionares. Estas células se encuentran en el estrato más in_ terno del neuroepitelio. (Fig. 5).

La segunda etapa abarca de la 6a. semana al 3er. mes. En -- este tiempo las primeras células que migran del neuroepitelio ha_ cia la capa marginal, son las células ganglionares, seguidas por las futuras células de Müller y las amacrinas. (Fig. 6). Estas células migran una por una lentamente, de manera que al hacerlo - se originan del neuroepitelio dos capas celulares: La neuroblás_ tica interna y la neuroblástica externa, quedando entre ellas -- una zona de la capa marginal formada por prolongaciones celulares, conocida como la capa transitoria de Chievitz (Fig. 6)

El aspecto morfológico de las células no ha cambiado con res_ pecto a la etapa anterior.

La tercera etapa comprende del 3o. al 7o. mes del desarrollo.

En esta etapa las células ganglionares avanzan aún más hacia

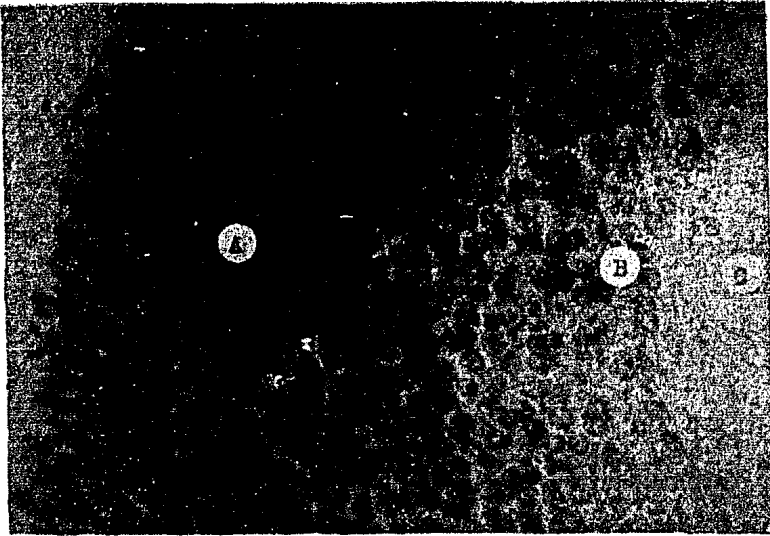


Fig. 5.- Capa sensorial de la retina de un embrión de 12-13 días de edad, equivalente al final de la 5a semana de desarrollo humano, en la que se observan las células del neuroepitelio (A) que inician la migración (B) hacia la capa marginal (C) para formar la neuroblástica interna. 600X.

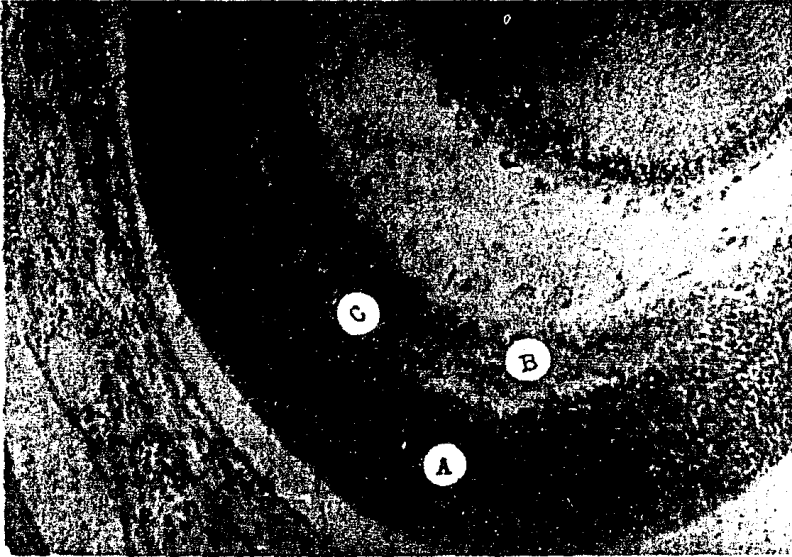


Fig. 6.- Retina de un embrión de ratón de 14-15 días de edad, equivalente a la 6ª semana de desarrollo humano, en la que se observan las capas neuroblásticas externa (A) e interna (B) y la capa transitoria de Chievitz (C) 200X.

la capa marginal para formar en definitiva la capa ganglionar y - sus axones la capa de fibras ópticas. Debido a esta migración; - ya que sólo éstas células lo hacen, se puede observar por debajo de estas, una capa de fibras en las que hacen sinapsis las células ganglionares con las bipolares que corresponde a la capa plexiforme interna.

A las células de la neuroblástica interna original que no migran, células amacrinas y de Müller, se le unen las células bipolares y horizontales procedentes de la capa neuroblástica externa, que se colocan en el sitio ocupado durante la segunda etapa de la diferenciación de la retina, por la capa de Chievitz, que desaparece. Las células procedentes de las dos neuroblásticas ya unidas, integran la capa granulosa interna. Hacia el exterior, entre esta capa y el resto de la neuroblástica externa se forma --- otra capa de fibras, que es la plexiforme externa en la que hacen sinapsis las células bipolares con los conos y bastones, que son los fotorreceptores, originados de la capa neuroblástica externa, y que está subdividida en dos capas por la membrana limitante externa, y que son la capa granular externa, constituida por los -- segmentos nucleados de los fotorreceptores y la capa de conos y - bastones propiamente dicha que contiene los pigmentos fotosensibles. En contacto con esta capa se encuentra la capa pigmentaria, diferenciada de la capa externa de la copa óptica. (Fig. 7).

Al cabo del 7o. mes, la retina está completamente diferenciada morfológicamente y lo comienza a hacer fisiológicamente la porción sensorial, lo cual se logra hasta después del nacimiento.

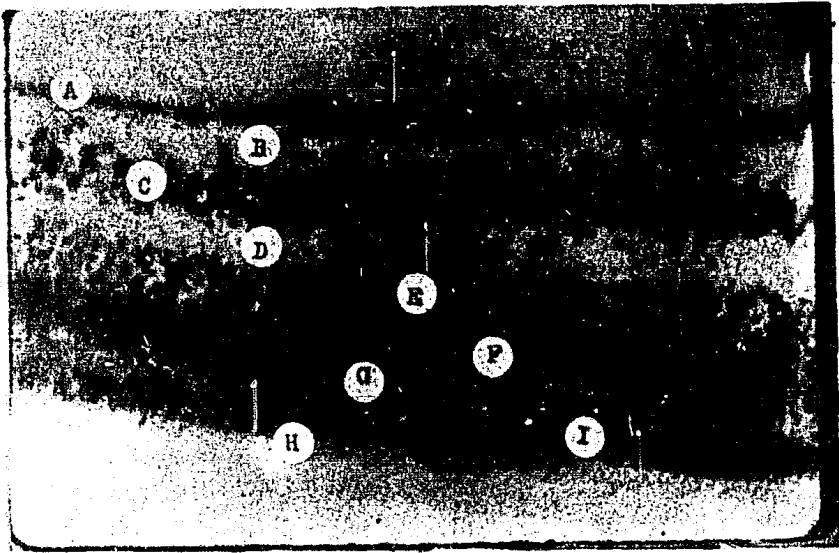


Fig. 7.- Retina humana a principios del 5o mes de desarrollo en la que se observan: la membrana limitante interna (A), las capas de fibras ópticas (B), la ganglionar (C), la plexiforme interna (D), la granulosa interna (E), el esbozo de la plexiforme externa (F), la granulosa externa (G), la membrana basal (H) y la capa de conos y bastones (I) 312.5X.

RESULTADOS HISTOLOGICOS

Al estudiar las laminillas se puede apreciar que en la retina de los ratones de 18 días de gestación se encuentran presentes 7 capas de las 10 que constituyen la retina adulta. A continuación se hace la descripción de la histología de la retina del polo posterior del ojo de los ratones del grupo control. Comenzando del interior al exterior (Figs. 8, 9, 10 y 11).

MEMBRANA LIMITANTE INTERNA

La membrana limitante interna, como ya se mencionó anteriormente, está constituida por los pies terminales de las células de Müller que se unen para formarla. En las preparaciones se puede observar fácilmente como una línea continua y homogénea con algunas pequeñas ondulaciones y adosada a ella se encuentran gran cantidad de vasos sanguíneos que provienen de la arteria hialoidea - que ha penetrado por el pedúnculo óptico. En las piezas mejor fijadas se distinguen con mayor precisión las prolongaciones citoplásmicas de las células de Müller unidas a ella (Fig. 8).

CAPA DE FIBRAS OPTICAS

Las células ganglionares como son las primeras que se diferencian desarrollan rápidamente sus axones para organizar la ca

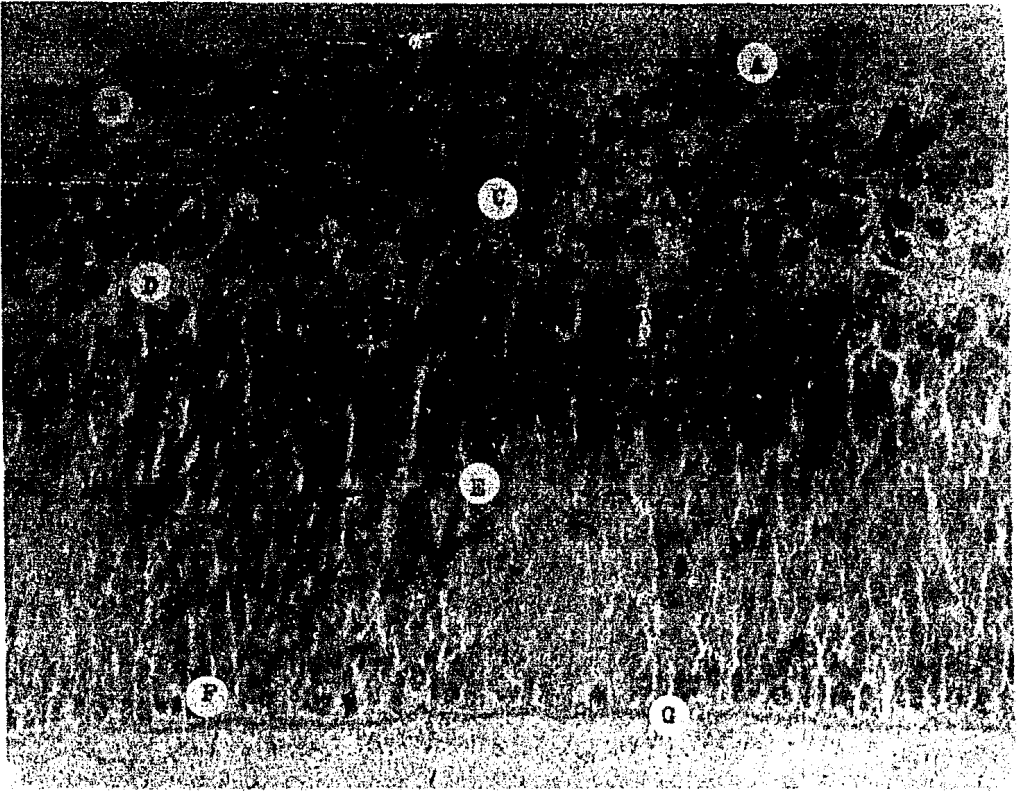


Fig. 8.- Corte histológico de la retina de ratón de 18 días de gestación en el que se pueden observar la membrana limitante interna (A), la capa de fibras ópticas (B), la capa ganglionar (C) la plexiforme interna (D), las capas neuroblásticas interna y externa (E), la capa de los fotorreceptores (F) y la membrana limitante externa (G) 600X.

pa de fibras ópticas que se unen en el pedúnculo óptico y consti-
tuyen el nervio óptico. Las fibras se disponen paralelamente a -
la membrana limitante interna y se ven desde la futura raíz de la
parte ciega de la copa óptica, en el casquete anterior en forma
radial, hasta converger en el punto ciego de la copa óptica loca-
lizado en el polo posterior y penetran en el pedúnculo óptico. -
En esta capa suelen encontrarse algunas células de Müller, que du-
rante la migración, para situarse en su posición definitiva, reba-
san los límites de la capa ganglionar y se colocan entre las fi-
bras. Estas células tienen núcleo ovalado, con cromatina en gru-
mos finos y prolongaciones citoplásmicas gruesas (Figs. 8 y 9)

CAPA GANGLIONAR

Está constituida por las células ganglionares de diferencia-
ción precoz, que a los 18 días de gestación se localizan en su lu-
gar definitivo, constituyendo una capa con un espesor de 2 a 3 hi-
leras de núcleos, esto es en promedio de 2.4 hileras. Las células
ganglionares son grandes, redondas o ligeramente ovaladas, con ci-
toplasma claro, con el núcleo de cromatina finamente granulada, -
dispersa uniformemente en el jugo nuclear.

Sus cilindroejes se proyectan hacia la membrana limitante in-
terna y penetran en el pedúnculo óptico (Figs. 8 y 9)

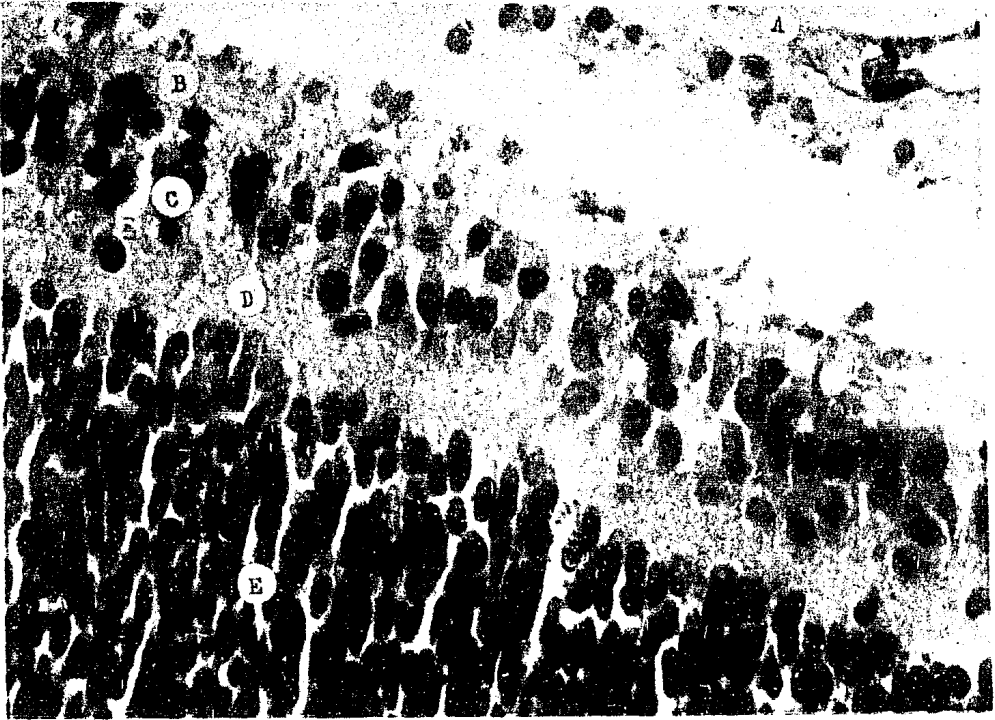


Fig. 9.- Corte histológico de la retina fetal de ratón de 18 días inyectado con suero fisiológico, mostrando específicamente la membrana limitante interna (A), la capa de fibras ópticas (B), la ganglionar (C), la plexiforme interna (D) y las neuroblásticas interna y externa (E) 500X.

CAPA PLEXIFORME INTERNA

Se encuentra ya presente a los 18 días, como resultante de la diferenciación de las células ganglionares derivadas de la migración de las células de la neuroblástica interna hacia el interior y está constituida por las sinapsis de las ganglionares con las bipolares y amacrinas. Al microscopio fotónico se observan las fibras que se disponen perpendicularmente en la capa ganglionar. Estas son delgadas y se ven dispersas en una matriz citoplásmica clara. Entre ellas existen algunos núcleos redondeados claros que siguen migrando (Figs. 8 y 9)

CAPAS NEUROBLASTICA INTERNA Y EXTERNA

Aparece como la capa más gruesa de la retina sensorial y en ella se encuentra el resto de las células que no se han diferenciado en su totalidad. Hacia el borde más interno se identifican de 2 a 3 hileras de los núcleos de las células que están todavía desprendiéndose para dirigirse a la capa ganglionar, atravesando la plexiforme interna. Su cromatina está finamente granulada y el jugo nuclear es claro, por lo que fácilmente se pueden observar. En su porción intermedia se aprecian células con núcleo bastante alargado con la cromatina ligeramente más densa, éstos son los de las fibras de Müller cuyas prolongaciones citoplásmicas se han extendido hacia las regiones interna y externa para formar las membranas limitantes correspondientes.

Acompañando a éstas se encuentran otras células con núcleos esféricos que se tienen un poco más que las anteriores y corresponden a las células amacrinas, bipolares y horizontales que aún no se han diferenciado totalmente. Hasta los núcleos de las células amacrinas y las de Müller corresponde a la capa neuroblástica interna a la que se han unido las células bipolares y las horizontales que ya pertenecen a la capa neuroblástica externa. Sin embargo solo la morfología del núcleo de las células permite saber cual es el límite de las capas neuroblásticas, pues la capa transitoria de Chievitz que las delimita está enmascarada por la migración celular.

En el borde externo de la capa neuroblástica externa, se encuentran unas células cuyo citoplasma no se observa muy bien definido, pero que forman prolongaciones citoplásmicas que atraviesan la membrana limitante externa como pequeños cilios que se proyectan hacia la capa pigmentaria. Este tipo celular corresponde a los fotorreceptores. La forma del núcleo de estas células que se han empezado a diferenciar, es arriñonada; característica por la cual podemos identificar como los futuros bastones, otros núcleos son esféricos y de mayor tamaño, y corresponden a las células que aún no se han diferenciado.

Braeckvelt y col. (1970) y Rugh (1968) mencionan que en los ratones y en las ratas, los conos no existen o bien se encuentran en número reducido, dado que son animales adaptados a la visión nocturna. Las células localizadas a los lados de los núcleos reniformes, podemos decir que corresponden a otro tipo de células todavía no diferenciados o bien a algunos conos que serían, en --

este caso los menos numerosos. En esta zona es frecuente encontrar figuras mitóticas.

En lugares donde la retina sensorial no se ha desprendido de la pigmentaria, por efectos de la fijación, se puede observar una clara unión de las digitaciones citoplásmicas de las células de la capa pigmentaria con las proyecciones de las de los fotorreceptores (Figs. 8 y 10).

MEMBRANA LIMITANTE EXTERNA

Es muy notoria una condensación gruesa y homogénea localizada en el borde externo constituida por los pies terminales de las fibras de Müller y está atravesada por los cilios de los fotorreceptores que teóricamente constituyen parte de esta membrana (Figs. 10 y 11)

CAPA DE FOTORRECEPTORES

Por fuera de la membrana limitante externa se localiza la capa de fotorreceptores, como un fleco de prolongaciones citoplásmicas claras y deshilachadas por haberse desprendido de la capa pigmentaria (Fig. 11)

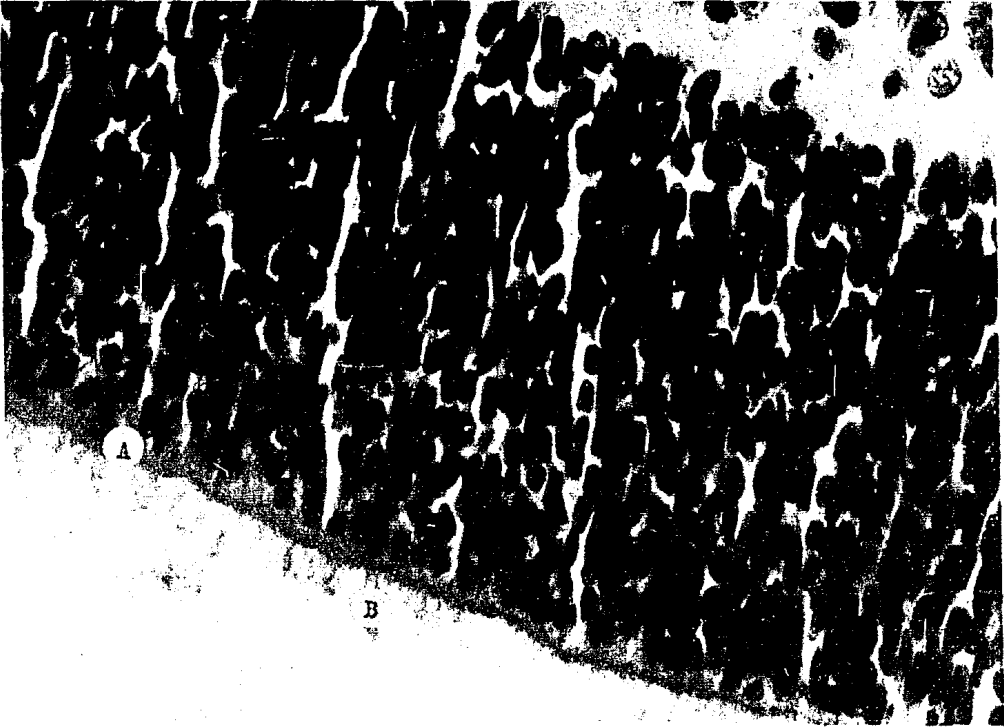


Fig. 10.- Corte histológico de la retina fetal de ratón de 18 días de gestación, tratado con suero, en el que se observa en el borde externo la membrana limitante externa (A) y las proyecciones citoplásmicas de los fotorreceptores (B) 500X.

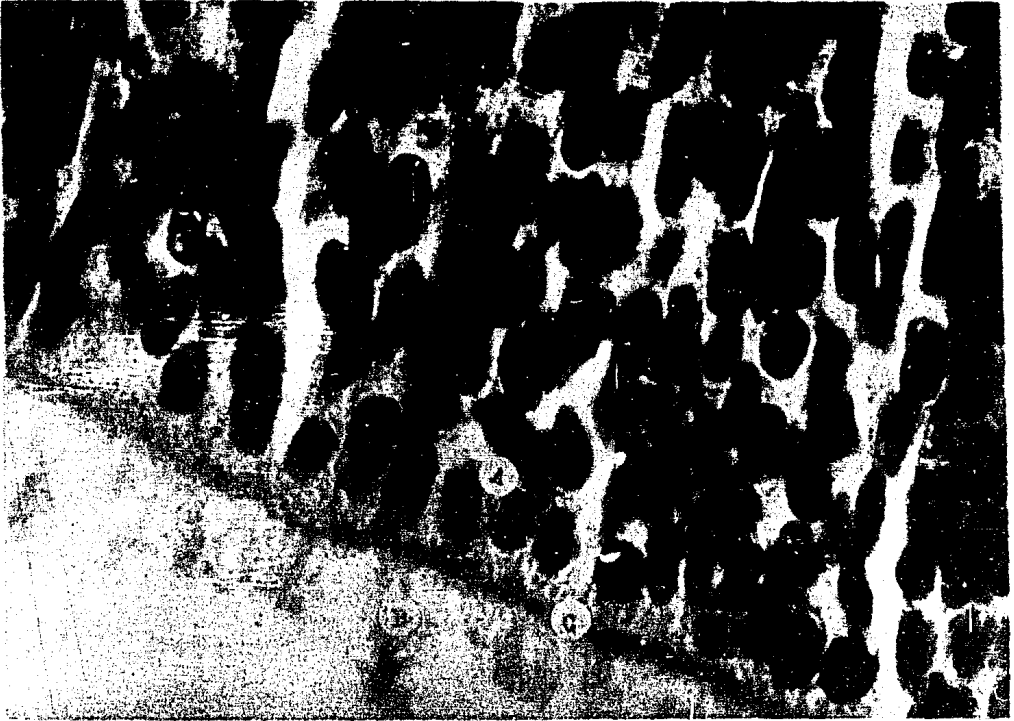


Fig. 11.- Corte histológico de la retina control que muestra claramente los núcleos de los fotorreceptores (A) sus prolongaciones citoplásmicas (B) y la membrana limitante externa (C) 1250X.

CAPA PIGMENTARIA

Constituida por un epitelio cúbico simple con células de citoplasma claro, con digitaciones que se proyectan hacia la capa de fotorreceptores, con núcleo esférico y cromatina de cara abierta. En este caso, el epitelio pigmentario carece de pigmento por tratarse de ratones albinos.

En la mayoría de las piezas de todos los grupos dicha capa se desprende de la fotosensible por efectos de la fijación, ya que por originarse de dos capas diferentes, sólo se ponen en contacto y es fácil su separación.

Realizando este estudio en las piezas que corresponden a los lotes del disolvente y los de las diferentes concentraciones del Diazepam, se observó que todas presentan la misma estructura histológica que la descrita para el grupo control y que las características morfológicas celulares en cada una de las capas, no presentaron diferencias aparentes. Sin embargo, el espesor de la retina de dichos grupos si fué distinto por lo que se inició un estudio estadístico para poder cuantificar las diferencias y determinar si eran o no significativas.

El aspecto histológico de la retina de los ratones tratados con el disolvente del Diazepam, V1.25, V5, V20, V40 y V80, se observa en las figuras 12 a la 22.



Fig. 12.- Detalle histológico de la retina de los fetos de ratones tratados con el disolvente del Valium, mostrando la capa ganglionar (A) con aspecto morfológico y número de hileras de núcleos iguales al del grupo control. 500X.



- Fig. 13.- Capas neuroblásticas interna y externa de embriones tratados con el disolvente del Diazepam. 500X.

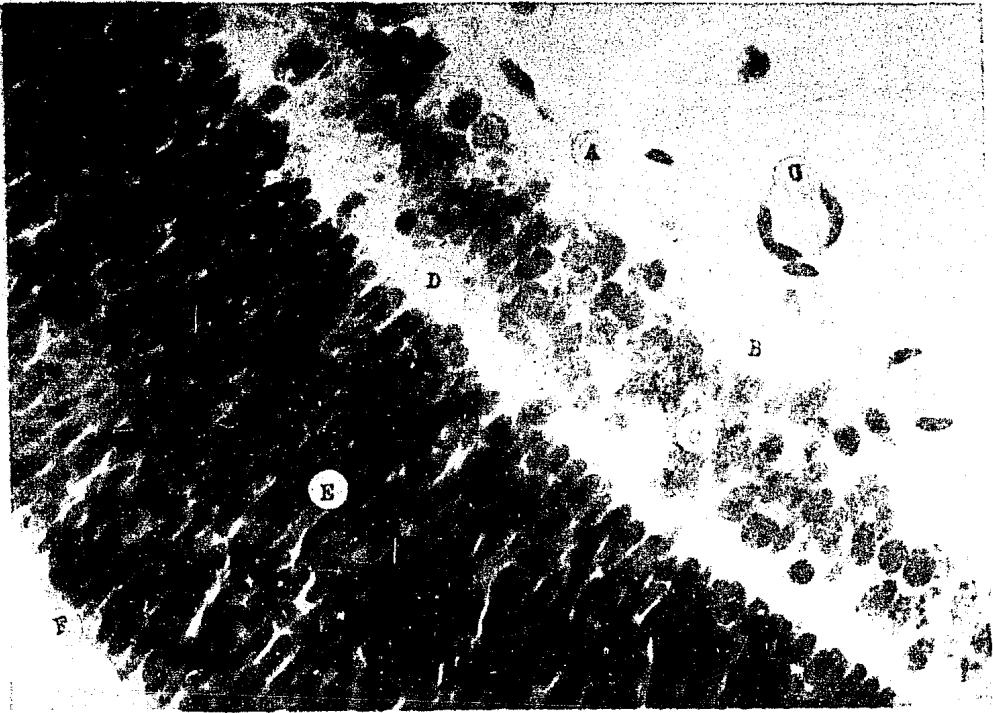


Fig. 14.- Corte histológico de la retina de un feto tratado con V1.25 en la que se pueden observar las siguientes capas: la membrana limitante interna (A), la de fibras ópticas (B), la ganglionar (C), la plexiforme interna (D), las neuroblásticas interna y externa (E) y la membrana limitante externa (F). En la cámara vítrea se aprecian vasos hialoides (G) 500X.

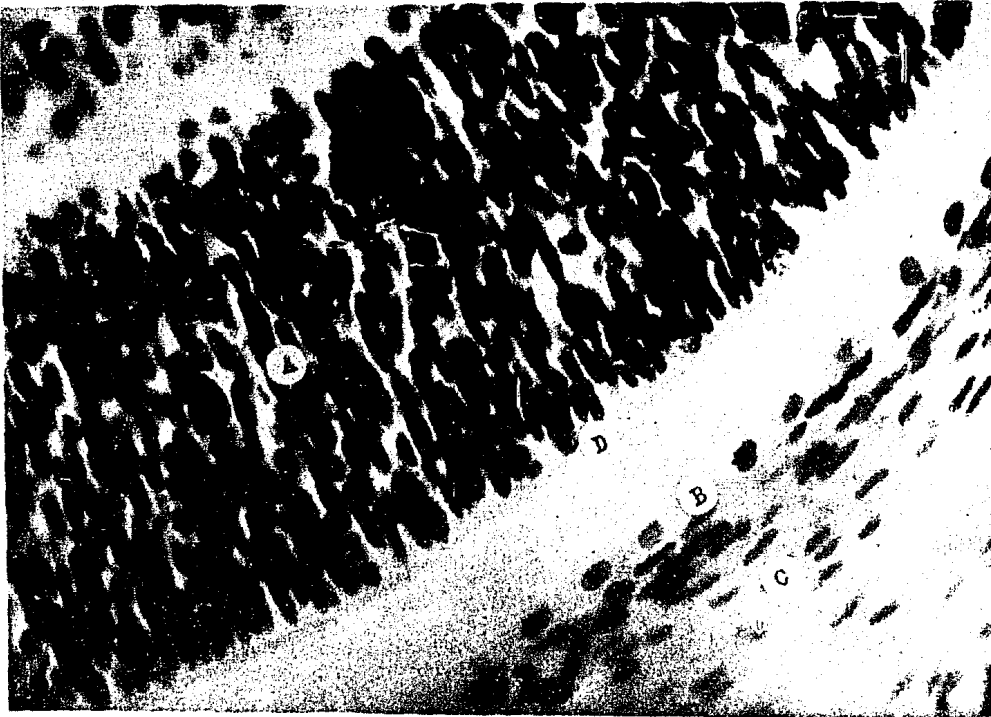


Fig. 15.- Aspecto histológico de la retina de un feto de ratón tratado con V1.25 en el que se muestran las capas neuroblásticas interna y externa (A), la capa pigmentaria (B), la coroides (C) y las figuras mitóticas (D) 500X.

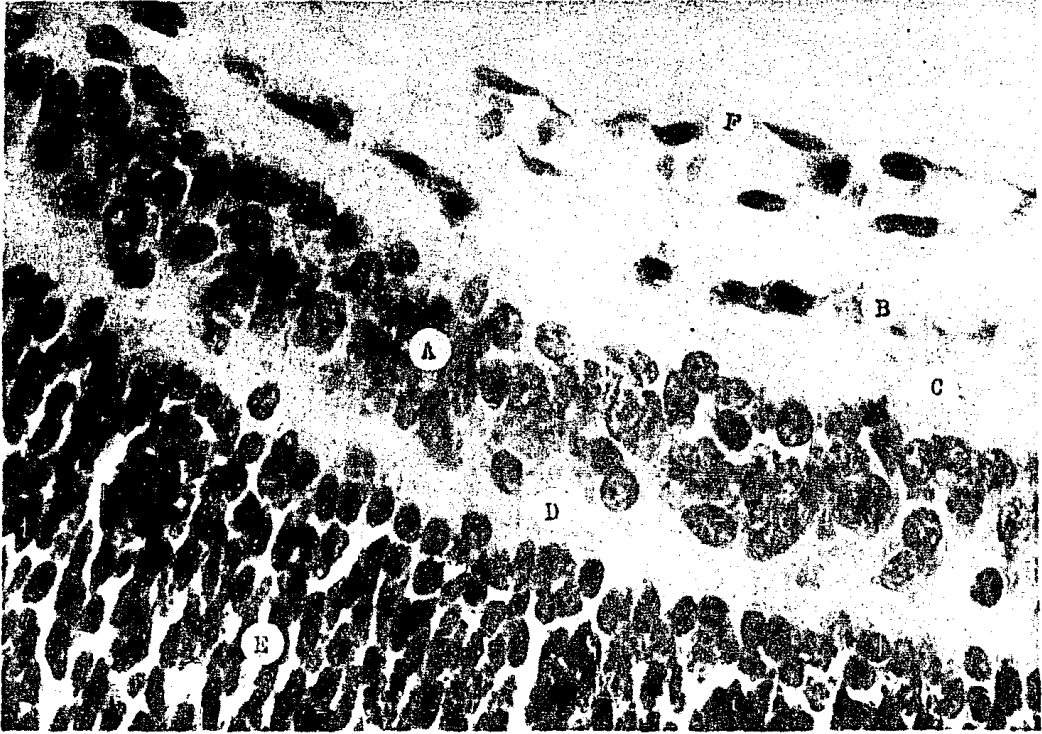


Fig. 16.- Acercamiento de la capa ganglionar (A), la membrana limitante interna (B), la capa de fibras ópticas (C), la plexiforme interna (D), parte de las capas neuroblásticas (E) y los vasos hialoideos (F) de la retina de un feto de ratón inyectado con V5.500X.

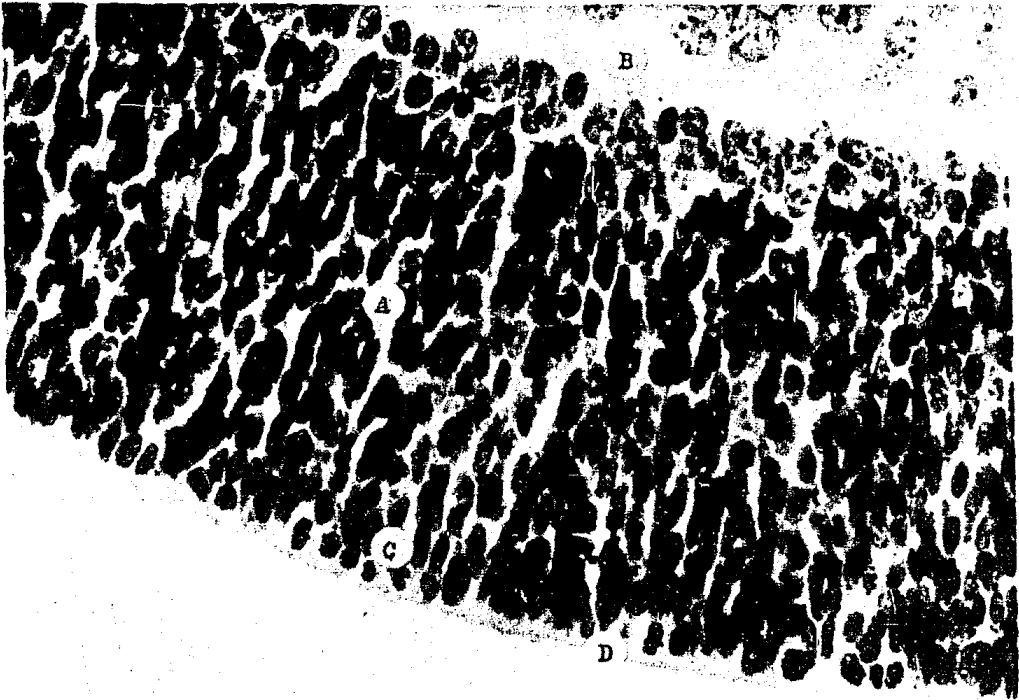


Fig. 17.- Fotografía que muestra las capas neuroblásticas interna y externa de un feto tratado con V5. Capa plexiforme interna (B), fotorreceptores en diferenciación (C) y la membrana limitante externa (D) 500X.

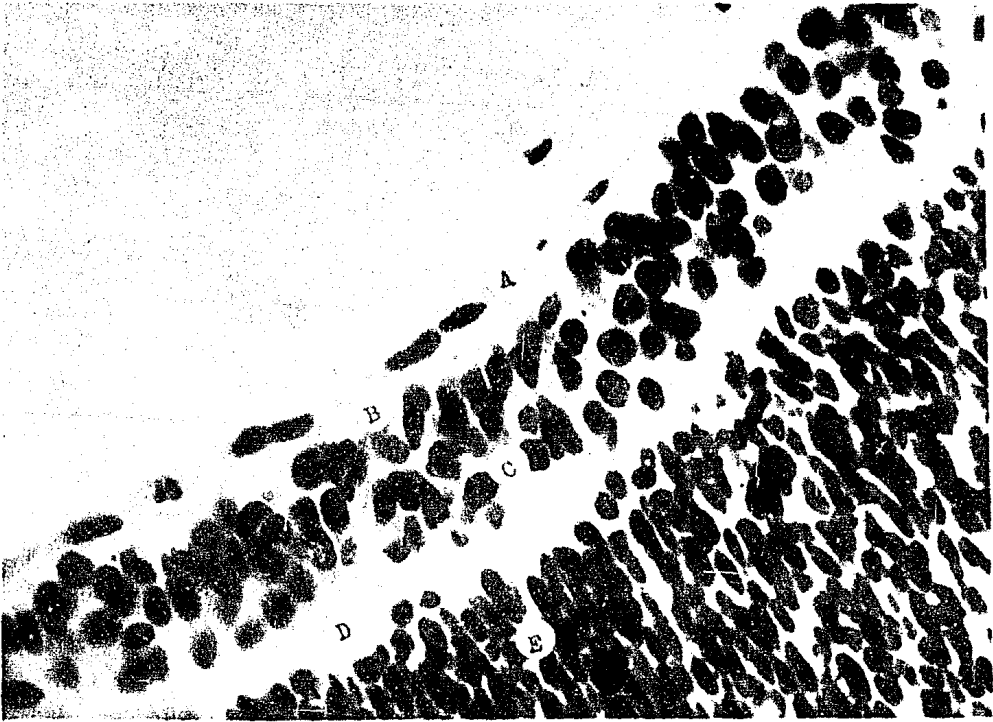


Fig. 18.- Retina fetal de un ratón del grupo tratado con V20. Membrana limitante interna (A), capa de fibras ópticas (B), capa ganglionar (C), plexiforme interna (D) y las capas neuroblásticas interna y externa (E) 500X.

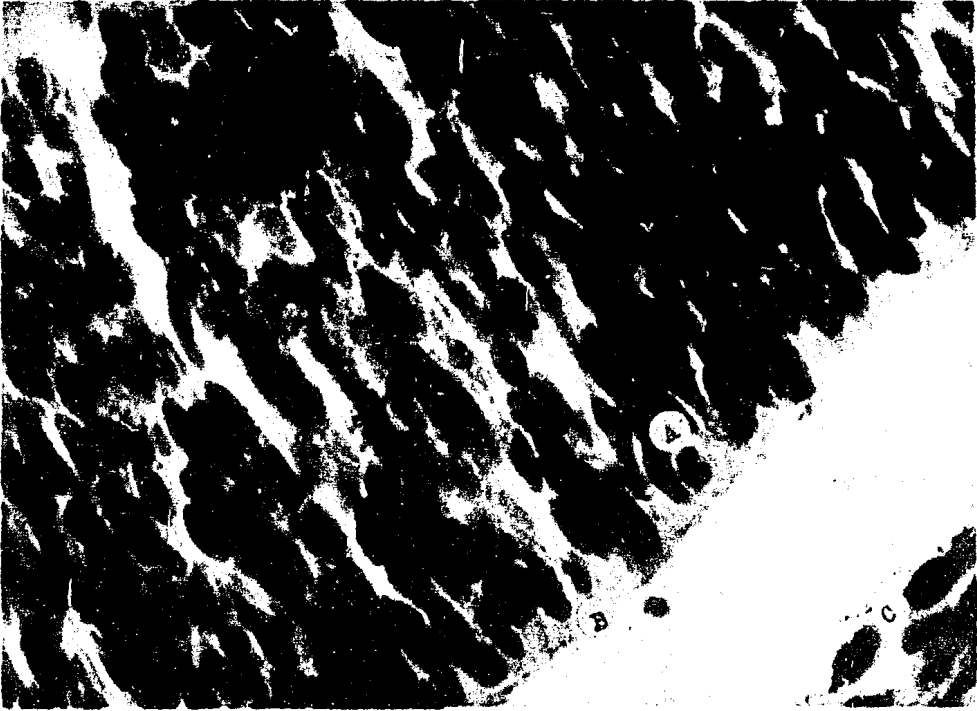
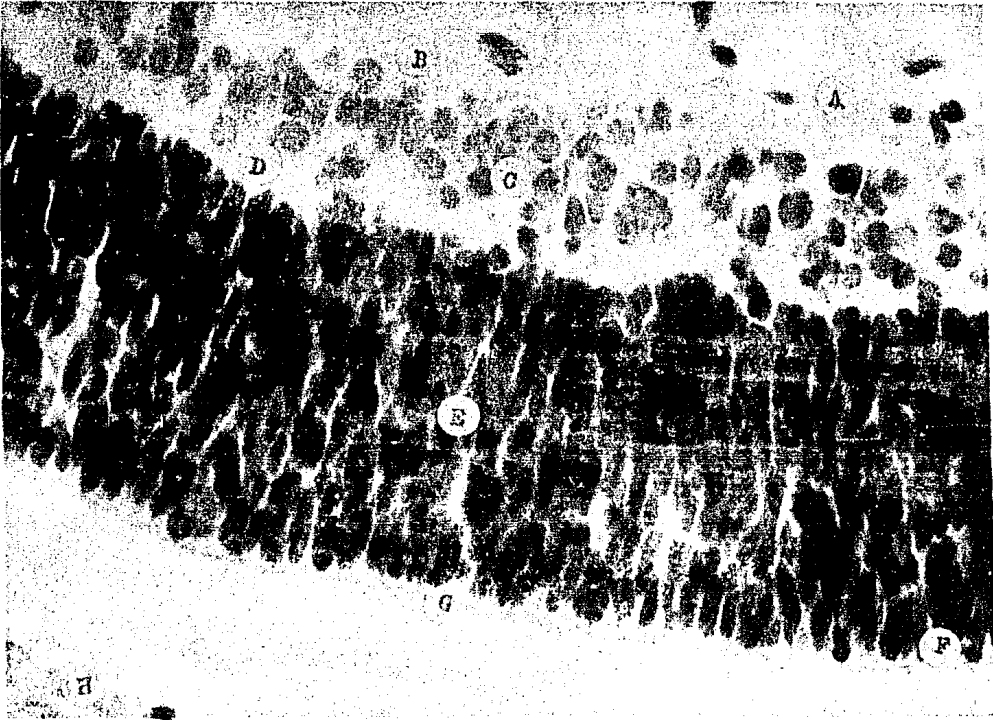


Fig. 19.- Capas neuroblásticas interna y externa de la retina de los fetos del grupo inyectado con V20. Núcleos reniformes de los fotorreceptores (A), la membrana limitante externa (B) y la capa pigmentaria (C) 500X.



-Fig. 20.- Corte histológico del grupo tratado con V40 en el que se observan las siguientes capas: membrana limitante interna (A) la de fibras ópticas (B), la ganglionar (C), la plexiforme interna (D), las neuroblásticas interna y externa (G) y la pigmentaria (H) 500X.

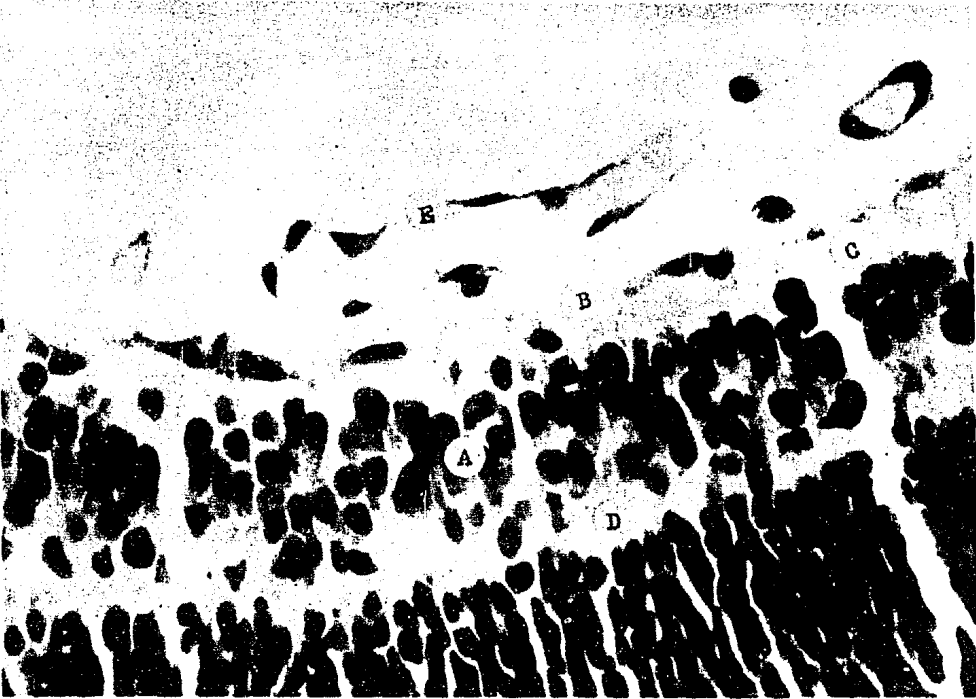


Fig. 21.- Retina de un feto de ratón al que se le administró una dosis de VRO, en la que se observa la capa ganglionar (A), la membrana limitante interna (B), la capa de fibras ópticas (C), la plexiforme interna (D) y los vasos hialoideos (E) 500X.

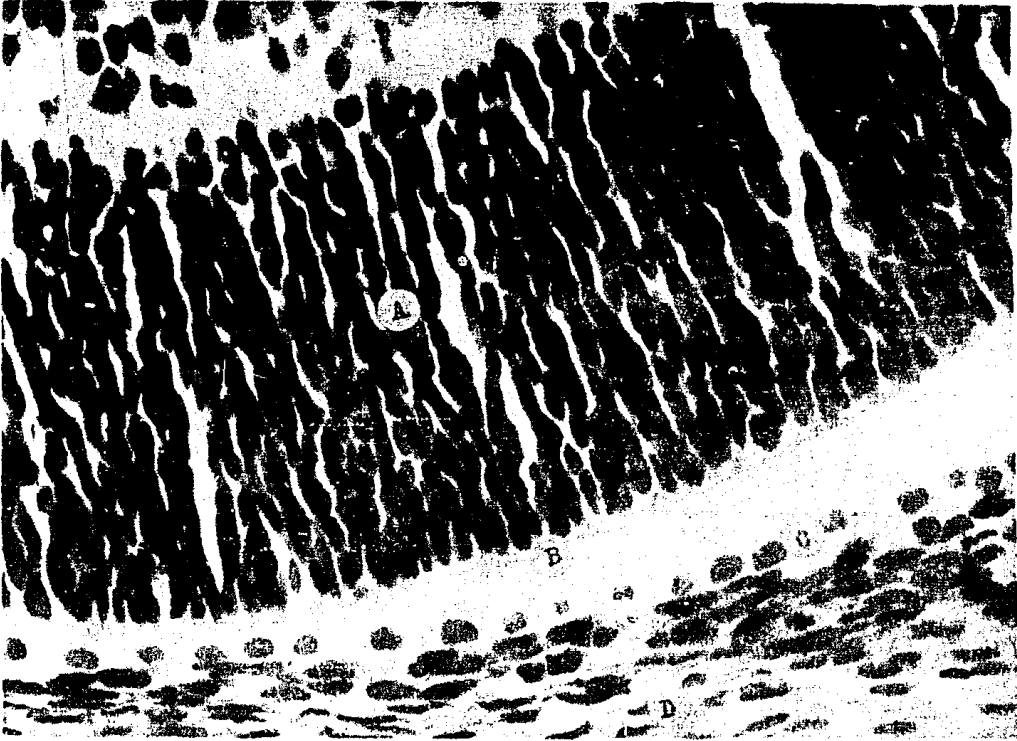


Fig. 22.- Aspecto histológico de la retina fetal del grupo tratado con VSO que muestra las capas neuroblásticas interna (A), la membrana limitante externa (B), la capa pigmentaria (C) y la coides (D) 500X.

RESULTADOS ESTADÍSTICOS

Los resultados estadísticos del número de hileras de núcleos de las capas de la retina de los fetos de ratón, tratados con Diazepam, su disolvente y el suero fisiológico se resumen en las tablas 1 y 2, y en la figura no. 24 se muestra gráficamente la distribución de los valores de las medias y las desviaciones estándar, de las mismas hileras de núcleos de la retina, tanto de la capa ganglionar como la de las neuroblásticas interna y externa.

Es conveniente hacer notar que el grupo tratado con el disolvente del Diazepam, tiene una media de 2.42 ± 0.31 hileras en la capa ganglionar y de 10.79 ± 1.40 hileras en las neuroblásticas que, comparadas con 2.44 ± 0.43 y 10.67 ± 0.02 hileras de los controles, no mostraron diferencias significativas entre ellas a un $\alpha = 0.01$, por lo que todos los resultados de los cinco grupos experimentales se comparan con el grupo control tratado con suero fisiológico.

En la capa ganglionar puede observarse que las dosis de V20 y V40 ejercieron un efecto mayor, es decir, que en estos grupos se registró un aumento en el grosor de dicha capa de 2.41 ± 0.43 hileras en el grupo control a 2.78 ± 0.42 y 2.73 ± 0.11 hileras respectivamente. En los grupos tratados con V1.25 y V30 también se registró, aunque en menor grado un aumento, en el promedio de

	SUERO	DISOL- VENTE	V 1.25	V 5	V 20	V 40	V 80
MEDIA	2.44	2.42	2.65	2.53	2.78	2.73	2.61
VARIAN- ZA	0.1895	0.0980	0.0540	0.1021	0.1770	0.1650	0.0431
DES ^U VIA- CION ES TANDARD	0.43	0.31	0.23	0.32	0.42	0.41	0.21

Tabla no. 1.- Valores del número de hileras de núcleos de la capa ganglionar de la retina de fetos de ratón de 17 días

	SUERO	DISOL- VENTE	V 1.25	V 5	V 20	V 40	V 80
MEDIA	10.67	10.79	9.93	11.04	11.28	10.57	11.40
VARIAN- ZA	0.3838	2.1442	0.4486	0.7632	0.7905	0.8373	0.3402
DES ^U VIA- CION ES TANDARD	0.62	1.46	0.67	0.87	0.80	0.92	0.58

Tabla no. 2.- Valores estadísticos del número de hileras de núcleos de las capas neuroblásticas interna y externa de la retina de fetos de ratón de 17 días.

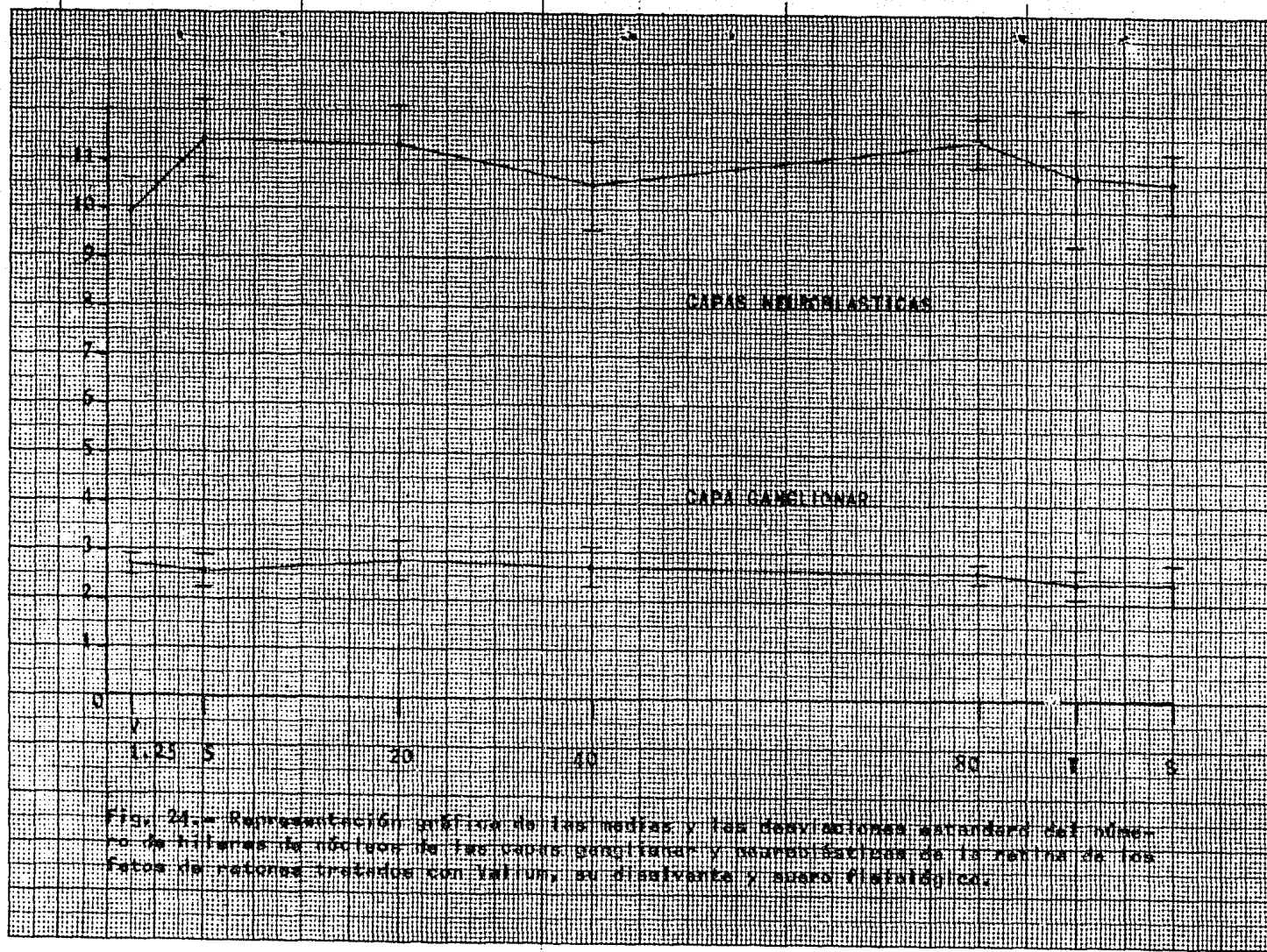


Fig. 24.— Representación gráfica de las medias y las desviaciones estándar del número de mitosis de células de las capas ganglionar y neuroblástica de la retina de los ratos de ratones tratados con Valium, su disolvente y suero fisiológico.

las hileras de núcleos que fué de 2.65 ± 0.23 y 2.61 ± 0.21 hileras. La dosis que produjo un efecto menos evidente fué la de V5, ya que sólo se incrementó la media a 2.53 ± 0.32 hileras.

Al ser tratados los datos por análisis de varianza y la prueba de "t de student", para determinar si las diferencias observadas entre los grupos experimentales y el control eran estadísticamente significativas, se demostró que los grupos tratados con Diazepam a dosis de $41.5 \mu\text{g}/\text{kg}$. (V1.25), $0.64 \mu\text{g}/\text{kg}$. (V20), $1.33 \text{ mg.}/\text{kg}$. (V40) y $2.66 \text{ mg.}/\text{kg}$. (V80) si lo son a un nivel $\alpha \ll 0.01$, mientras que el lote tratado con $166 \mu\text{g}/\text{kg}$. (V5), las diferencias sólo fueron significativas a un nivel $\alpha = 0.15$, comprobando que es la dosis que provoca una alteración menor en esta capa (Fig. 24a).

Al hacer el estudio en las capas neuroblásticas interna y externa, pudo observarse que el número de hileras de núcleos tiende a disminuir, encontrando que los grupos de V1.25 y V40 son los que muestran la máxima reducción, con una media de 9.93 ± 0.67 y 10.57 ± 0.92 hileras del grupo control. En cambio el resto de los fetos tratados con Diazepam, mostraron una respuesta contraria, pues tendió a aumentar el número de hileras de núcleos en vez de disminuir. Así los grupos tratados con V5, V20 y V80 tuvieron promedios de 11.04 ± 0.87 , 11.28 ± 0.89 y 11.40 ± 0.58 hileras. (Fig. 24b).

De igual manera que en la capa ganglionar, al estudiar los datos por medio del análisis de varianza y la prueba de "t", se

pudo demostrar que los grupos tratados con dosis de V1.25, V5, V20 y V80, muestran diferencias significativas con respecto al grupo control a un nivel $\alpha < 0.01$. En el caso de V40 el nivel de significación fué $\alpha > 0.25$.

En esta capa también se realizó un análisis porcentual para destacar gráficamente las diferencias que existen en el espesor de estas capas entre el grupo control, el grupo que fué inyectado con el disolvente del Diazepam y los tratados con las cinco dosis de Diazepam (Fig. 25b).

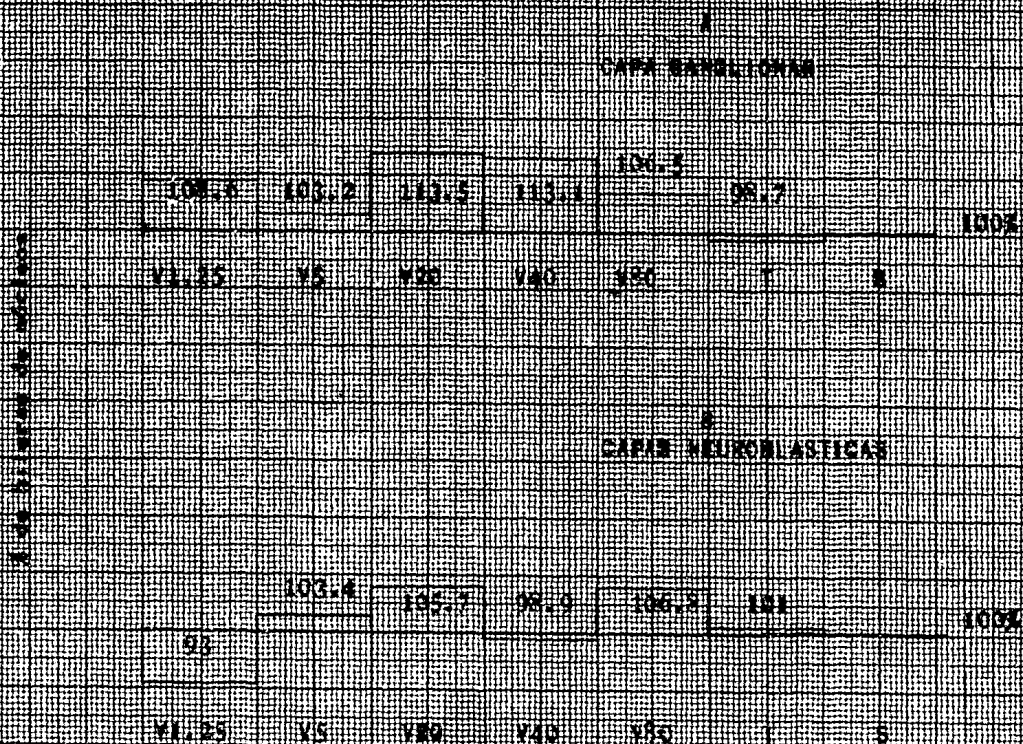


Fig. 25. Proporción de un porcentaje en μ que varía el espesor de las capas granular y neuronal que influye y actúan en la relación de los factores de rotación observados con las μ , su disolución y suero.

DISCUSION Y CONCLUSIONES

Al realizar el estudio histológico de la retina, como se muestra de la figura 8 a la 22 no se observó ninguna alteración aparente en la morfología de las células de cada una de las capas presentes al cabo de los 17 días de gestación. La descripción histológica realizada sobre las laminillas coincide con lo que describe Tansley (1951) de una retina de ratón al momento del nacimiento, datos que corroboran aún más los resultados observados en el grupo control.

Sin embargo, el haber encontrado datos negativos en el estudio morfocitogenético, no significa que no se hallan registrado cambios a un nivel más fino, ya que Breen y Stenchever (1970) realizaron un estudio con fibroblastos en un medio de cultivo al cual adicionaron el Diazepam en dosis de 0.1, 1.0, 10.0 y 20.0 $\mu\text{g}/\text{ml.}$, y no encontraron modificaciones histológicas con el microscopio óptico. En cambio, al realizar el análisis a nivel de microscopía electrónica, se observaron alteraciones ultraestructurales. Las estructuras que resultaron afectadas fueron: el retículo endoplásmico que estaba hipertrofiado, dilatado, rugoso y con gran cantidad de granulaciones, el aparato de Golgi se encontraba en abundancia y la membrana celular era irregular. Estas alteraciones fueron observadas en todas las dosis mencionadas, incluyendo la menor (0.1 $\mu\text{g}/\text{ml.}$), en la cual la mayoría de las células recuerdan a las del grupo control, pero las células afectadas son muy similares a las que fueron cul_

tivadas con la dosis mayor (20.0 $\mu\text{g/ml.}$).

Otros estudios de Stenchever y col. (1969) realizados "in vitro", revelan que en cultivos de leucocitos humanos en los que se les administró Diazepam en dosis de 10.0 y 20.0 $\mu\text{g/ml.}$, se producen rompimientos cromosómicos y en cultivos de fibrocitos pudo observar una disminución en la tasa de crecimiento en la multiplicación celular al utilizar dosis de 20.0 y 50.0 $\mu\text{g/ml.}$ Los mismos autores en 1970, efectuaron una investigación similar a la anterior, solo que la hicieron "in vivo" encontrando una cierta discrepancia en sus resultados al compararlos con los obtenidos en 1969, ya que se presentó la misma proporción de rompimientos cromosómicos en los leucocitos de la persona tratada con el Diazepam. Este fenómeno pueda ser explicado tomando en cuenta las diferencias que existen entre la actividad metabólica que se realiza en el cuerpo humano, que parece contrarrestar parcialmente el daño causado por este medicamento, aún cuando por las investigaciones de Erkkola y col. (1974), se sabe que al trabajar "in vivo", las concentraciones sanguíneas del Diazepam que se cuantifican son muy similares a las que se agregan a los cultivos de tejidos y que son causantes de rupturas cromosómicas.

Un hecho importante es que, por el tipo de relación materno-fetal, se ha encontrado que el Diazepam atraviesa tanto la barrera placentaria humana como la de los roedores y que después de cruzarla se pueden encontrar concentraciones mayores del Diazepam en los tejidos fetales que en los de la madre, observándose asimismo que el producto tarda más tiempo en eliminarlo (Idänpää, y col. 1970 y 1971; Nofid y col., 1973; Erkkola y col., 1974; Mandelli y

col., 1975).

En relación a lo antes mencionado, los resultados encontrados en el presente estudio, sugieren que el Diazepam causó un efecto nocivo en la histogénesis de la retina de los lotes experimentales, ya que al realizar el conteo de las hileras de los núcleos de las células de sus dos capas, se puede observar que la capa ganglionar es en general de mayor espesor que la de los controles, en cambio las capas neuroblásticas son más delgadas.

Normalmente el número total de células de la retina se diferencian antes de que el globo ocular termine de crecer, de manera que al ir aumentando el diámetro de éste, el espesor de las capas va disminuyendo debido al reacomodo de las células. Este fenómeno puede explicar el hecho de que la capa ganglionar sea más gruesa a consecuencia de un retraso en el crecimiento del globo ocular. La tendencia a disminuir el grosor de las capas neuroblásticas, puede atribuirse a un retardo en la actividad mitótica de sus células, siendo esto más evidente en la dosis de V1.25. En la dosis de V5 el efecto del Diazepam no es notable, en cambio en V20 la capa ganglionar es muy gruesa y las neuroblásticas externa e interna son ligeramente más gruesas que la del control, por lo que podría pensarse que es una consecuencia del retardo del crecimiento del globo ocular. En V40 el efecto sobre la capa ganglionar es similar a las del control y, en V80 tanto la capa ganglionar como las neuroblásticas son más gruesas, lo que indicaría un retardo en el crecimiento ocular.

Los resultados de este trabajo coinciden con los hallazgos

de Breen y Stenchever (1970) en que no existe una correlación clara entre dosis-efecto, y que a dosis pequeñas, el Diazepam parece afectar la histogénesis de la retina del ratón.

De acuerdo a los resultados en el presente trabajo se concluye que el Diazepam no produce alteraciones aparentes en la morfología celular de la retina de los lotes experimentales, pero sí se registran en el grosor de la capa ganglionar y las dos neuroblásticas, lo que podría deberse a un retardo en el crecimiento del globo ocular y una baja en la actividad mitótica.

Aunque dichas alteraciones no son letales no se ha estudiado, hasta el momento la repercusión de estos daños en el funcionamiento y en la estructura histológica de la retina, en los períodos postnatal y adulto, tanto en humanos como en animales de laboratorio; por lo que es conveniente continuar este trabajo experimental en ratones, ya que en productos humanos recién nacidos es difícil de observar las posibles alteraciones de la retina por los métodos rutinarios que utilizan los médicos, además de que las alteraciones visuales producidas por el Diazepam probablemente se detectarían durante la infancia. En la segunda etapa experimental se dejaría nacer y crecer a los roedores para realizar estudios fisiológicos, histológicos, histoquímicos y aún a nivel de microscopía electrónica; lo que nos permitiría conocer si el daño causado por el Diazepam es temporal, o sea que postnatalmente tendría una recuperación, o bien si es definitivo, provocando alteraciones permanentes en la visión.

Estos estudios proporcionarían antecedentes que serían de -

gran ayuda, ya que en la clínica oftalmológica se registran casos de niños que presentan alteraciones visuales, algunas de las cuales se desconoce la causa. Tratando de correlacionar los hallazgos del presente trabajo con estas retinopatías se podría investigar retrospectivamente para saber se la madre en algún momento del embarazo, estando o no bajo tratamiento médico, se le administró Diazepam.

Todo lo anterior y conociendo la gran utilización que tiene el Diazepam en ginecología y obstetricia, hace recomendar prudencia en su empleo durante el embarazo, administrándose solamente en los casos extremos que así lo requieran y bajo estricta vigilancia médica, para evitar con esto posibles daños estructurales de la retina y en el funcionamiento visual del producto.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Anónimo, 1970. Valium Roche. Resumen farmacológico y clínico. Editado por Laboratorios Hoffman-La Roche. Buenos Aires, Argentina.
- 2.- Braekevelt, Ch.R., and H.J. Hollenberg, 1970. The development of the retina of the albino rat. Amer J Anat, 127: - 281-301
- 3.- Breen, P.C., and Stenchever, H.A., 1970. Some effects of diazepam on the fine structure of human fibroblast in the tissue culture. Am J Obstet Gynecol, 108: 520
- 4.- Erkkola, R., and Kanto, J., 1974. Diazepam in early human pregnancy. Acta Obstet Gynec Scand, 53: 135-138
- 5.- Idäänpään-Heikkilä, J.E., R. J. Taska, H. Alton, and J.C. - Scholar, 1970. Placental transfer of diazepam 14_C in mice, hamsters and monkeys. J Pharmacol and Exp Ther, 176 (3): 752-757
- 6.- Idäänpään-Heikkilä, J.E., P. Jouppila, J. Poulakka and M. - Vorne 1971. Placental transfer and fetal metabolism of -- diazepam in early human pregnancy. Am J Obstet Gynecol, - 1011-1016.

- 7.- Kuwabara, T., and T. A. Weidman, 1974. Development of pre_natal rat retina. *Invest Ophthalmol*, 13 (10): 725-739.
- 8.- Mandelli, M. P. L. Morselli, S. Nordio, G. Pardi, N. Prin_cipi, F. Sereni and G. Togoni, 1975. Placental transfer of diazepam and disposition in the newborn. *Clin Pharmacol -- Ther*, 17 (5): 564-572.
- 9.- Mann, I., 1969. The development of the human eye. 3a. Ed. British Medical Association. 68-117
- 10.- Milkovich, L., and B. Van der Berg, 1974. Effects of pre_natal meprobamate and chlordiazepoxide hydrochloride on hu_man embryonic and fetal development. *N Engl J Med*, 291 --- (24): 1268-1271.
- 11.- Mofid, M., et al, 1973. Effects of diazepam on uteroplacen_tal and fetal hemodynamics and metabolism. *Obstet Gynecol*, 41 (3): 364-368.
- 12.- Ramón y Cajal, S., 1911. *Histologie du Système Nerveux de l' homme & des vertébrés*. Tomo II, caps. XV, y XVI.
- 13.- Rugh, R., 1968. *The mouse. Its reproduction and development* Burgess Puglising Company.
- 14.- Scher, J., D.M. Hailey and R.W. Beard, 1972. The effects of diazepam on the fetus. *J Obstet Gynecol of the British --- Commonwealth*, 79:635-638

- 15.- Silliphant, W.M., 1949. Manual of histologic and special -- staining technics. 2a. Ed. The Blakiston Division. Mac -- Graw-Hill Book Company, Inc.
- 16.- Stecher, P.G., 1968. The Merk Index. An encyclopedia of che -- micals and drugs. Merk and Co., Ind. 8a Ed. 341
- 17.- Stenchever, M.A., and Frankel, R.B., 1969. Some effects of diazepam in human cells in vitro. Am J Obstet Gynecol, 103: 836-842
- 18.- Stenchever, M.A., and Frankel, R.B., 1970. Effects of diazepam on chromosomes of human leucocytes in vivo. Am J -- Obstet Gynecol, 107: 456-460
- 19.- Tansley, K., 1951. Hereditary degeneration of mouse retina. Brit J Ophthal, 35: 573-582
- 20.- Van der Kleij, E., 1969. Kinetics of distribution and meta- bolism of diazepam and chlordiasepoxide in mice. Arch. Int. Pharmacodyn, 178 (1): 193-215

FE DE ERRATAS

Pág. 5.- Línea 5 dice: EMBIOLOGIA; debe decir: EMBRIOLOGIA

Pág. 58.- Línea 11 dice: "ya que se presentó"; debe decir:
"ya que no se presentó"

Pág. 57.- Línea 11 dice: morfocitogenético; debe decir:
morfocitológico