

*iber.* *4 junio 1979* *n. 32*  
**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO**  
**FACULTAD DE CIENCIAS**



**DETERMINACION DE ALTERACIONES MORFOLOGICAS  
DEL CORAZON FETAL DE RATONES DE LA CEPA CD-1,  
PRODUCIDAS POR LA APLICACION DEL DIAZEPAM  
(VALIUM)**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
B I O L O G O  
P R E S E N T A**

**GRACIELA DE LA FUENTE JUAREZ**

**México, D. F.**

**6360**

**1979**

*63 p.*

*45*



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## I N D I C E

	Pág.
I INTRODUCCION.....	1-8
II DESARROLLO DEL CORAZON DEL RATON.....	9-14
III DESCRIPCION HISTOLOGICA DEL CORAZON DE LOS FETOS DEL LOTE TESTIGO.....	15-24
IV OBJETIVO E HIPOTESIS DE TRABAJO.....	25
V MATERIAL Y METODO.....	26-28
VI RESULTADOS ESTADISTICOS.....	29-42
VII RESULTADOS HISTOLOGICOS.....	43-55
VIII DISCUSION Y CONCLUSION.....	56-60
IX BIBLIOGRAFIA.....	61-63

## I.- INTRODUCCION

El Diazepam (Valium) es un miembro del grupo de las benzodiazepinas, que son tranquilizantes sintéticos relacionados estructuralmente, cuya fórmula es 7 cloro 1,3-dihidrido-1-metil-5fenil 1,4 benzodiazepina-2-ona. Sternbach y V. Reeder (1970) lo sintetizaron en 1960 y desde el año de 1963 en que -- fué introducido a la industria farmacéutica por los laboratorios Hoffman-La Roche, ha sido muy empleado en la clínica, para la supresión de la ansiedad y la tensión emocional característica de pacientes con trastornos psicológicos.

En epilépticos suprime las crisis convulsivas, por ser un poderoso relajante muscular y es muy útil en el tratamiento de otros tipos de espasmos musculares como los que se presentan en las personas que han sufrido accidentes cerebrovasculares causantes de parálisis.

El Diazepam se ha usado con cierto éxito en el programa de supresión de la fármaco-dependencia y se emplea como parte de la medicación pre-operatoria para inducir la anestesia, sobre todo cuando la ansiedad y la agitación hacen poco cooperativo al paciente quirúrgico.

También ha dado buenos resultados cuando se aplica para practicar algunos exámenes clínicos, como la endoscopia y en la preparación para el caterismo cardíaco.

En pacientes ginecológicos es ampliamente utilizado

en amenazas de aborto, legrados, en la actualidad ha aumentado enormemente su uso como premedicación en el parto, pues se ha demostrado que acorta su duración promedio, pues induce sedación y relajamiento muscular durante las dos primeras etapas, además de disminuir la ansiedad, la tensión y el temor característicos.

En general las vías de administración del Diazepam -- más usuales son la oral y la parenteral. Por vía oral la difusión del Diazepam se inicia casi inmediatamente después de ser ingerido y su absorción es gastrointestinal.

La sustancia activa se metaboliza en el hígado, se -- distribuye en todo el cuerpo depositándose a altas concentraciones en algunos órganos, en particular en tejidos, como el adiposo el parénquima hepático, el músculo esquelético el sistema nervioso central y el aparato cardiovascular

Su eliminación es lenta y se excreta principalmente por vía urinaria y en menor escala por vía fecal.

Los conocimientos acerca del metabolismo del Diazepam en la madre y el feto se han obtenido gracias a los trabajos de diferentes investigadores y entre los más importantes se encuentran los de Juhana, E. Idänpääm - Heikkila y col. (1971), que -- usando Diazepam marcado con  $C^{14}$ , estudiaron su paso a través de la placenta y la habilidad de los tejidos fetales de metabolizarlo.

Dado que es una sustancia de bajo peso molecular ---

(284.74) es transferida con facilidad, y se encontró que los niveles en la sangre materna aumentan rápidamente, después de aplicar una inyección intramuscular de 5 mg. y más tarde aumenta en la sangre fetal del cordón umbilical hasta que a las 6 hrs. de la aplicación se igualan las concentraciones en las sangres materna y fetal.

Sin embargo, en los tejidos fetales se deposita rápidamente y en una hora alcanza su máximo en el hígado y cerebro en el que se mantiene constante el nivel durante seis horas. A las 48 horas de la aplicación de Diazepam se recuperó en la orina materna. También se comprobó que en la placenta de primer trimestre, el cerebro fetal y el intestino no intervienen activamente en el metabolismo del Diazepam.

Mandelli D. y Morselli (1975) al estudiar en humano la transferencia y acumulación del Diazepam en el recién nacido, observó en un mortinato de 31 semanas de edad con un peso de -- 900 g., cuya madre recibió tratamiento a base de Diazepam desde la vigésima semana de gestación, que éste se encontraba acumulado en grandes cantidades, en el corazón y en los pulmones, lo cual puede ser una buena base para explicar los trastornos del ritmo cardíaco, depresión respiratoria, hipoactividad y Apgar bajos que se observan con frecuencia en los recién nacidos de mujeres, que han recibido Diazepam durante el trabajo de parto ó en las últimas semanas de gestación, ya que 12 segundos des--

pués de su aplicación endovenosa, puede ser detectado en la san gre del cordón umbilical.

J. Sher. D. M. Hailey y Beard. (1972) estudiaron el e fecto del Diazepam en el feto en el cual se mostró una disminu- ción de las oscilaciones que en la frecuencia cardíaca fetal -- normal son de 23 a 7 latidos por minuto. Encontrando que dichas oscilaciones se recuperan a los 65' resultando significativa la diferencia entre los dos grupos.

Erkkola J. Kanto y R. Sellman (1974), investigaron -- los efectos de Diazepam durante el embarazo en 2 grupos de muje res a las que se les provocó aborto legal por histerectomía en el primer trimestre, el primer grupo lo formaron pacientes tra- tados con 10 mg. de Diazepam administrado por vía intramuscular entre 40 y 120 min. antes de la intervención quirúrgica y el segundo grupo recibió 5 mg. 3 ó 4 veces al día por vía oral, du rante un período máximo de 30 días antes de la intervención en ambos casos se tomaron muestras de sangre materna y fetal obte- nida del cordón umbilical directamente durante el acto quirúrgi co.

En el primer grupo de pacientes se comprobó que no -- hay diferencia significativa entre las concentraciones del Dia- zepam y N- demetil diazepam detectados en las sangres materna y fetal mientras que en el segundo grupo, las concentraciones de Diazepam y N-demetil diazepam fueron significativamente mayores en la sangre fetal que en la materna.

Una vez extraído el feto se tomaron muestras de cerebro, hígado placenta, y fueron determinadas por cromatografía de gases y por electrocaptura con  $\text{Ni}^{63}$  las concentraciones de Diazepam y N-demetil diazepam encontrando una mayor proporción de éste último en el hígado, lo que sugiere su intervención en el metabolismo de la droga.

En el cerebro y placenta también fué detectado pero la acumulación fué menor. Un hecho importante que es necesario destacar, es que las concentraciones de el Diazepam y N-demetil diazepam acumuladas en los tejidos fetales, son comparables a las que causan rupturas cromosómicas en cultivo de tejidos.

Otro aspecto importante de éstos estudios, es que además de realizarse en humanos, en los que es muy limitado el campo de estudio, han podido ampliarse en varias especies de animales de laboratorio, incluso en monos, en los que el período de gestación y subbiología en general es comparable a la humana, entre éstos trabajos se encuentran los de Juhana E. Idänpääm y --keikkilä (1971), que también investigaron sobre la transferencia placentaria del Diazepam marcado con  $\text{C}^{14}$ , en ratones, hamsters y monos, tanto en la gestación precoz como tardía aplicando 10 mg/kg a las primeras especies y 5mg/kg a la última, los estudios autorradiográficos permitieron comprobar que el Diazepam y sus metabolitos cruzan la barrera placentaria y se acumulan en los tejidos fetales de las tres especies tratadas, sin



embargo en el ratón se observó que el Diazepam se fijaba más rápidamente durante el embarazo tardío que en el precóz.

En los fetos de mono los niveles mas altos de radioactividad se encontraron en los nervios periféricos, en la médula espinal, el riñón, el pulmón, el cerebro, la grasa y el plasma.

E. Van Der Kleijn (1969) estudió la distribución de Diazepam y clordiazepoxido en ratones adultos que fueron sacrificados a diferentes intervalos después de recibir éstos fármacos, que se administraron por diferentes vías. También investigó el metabolismo del Diazepam y las diferencias en los patrones de distribución del mismo, correlacionandolo con sus propiedades fisicoquímicas y las de sus metabolitos. Para ésto, utilizó ratones suizos machos a los que se les inyectaron en la vena de la cola 340  $\mu$ /Kg de Diazepam, y se les sacrificó entre 1' a 60' y a las 2 y 4 hrs después de la administración, para obtener el cerebro, el corazón y el hígado para ser analizados por el método de cromatografía de capa delgada.

Otro grupo de animales tratados de la misma manera que los anteriores, se sometieron a un estudio autorradiográfico de todo el cuerpo, sin disecarse, observando que el Diazepam y sus metabolitos eran capturados rápidamente por el miocardio y las paredes de los grandes vasos, pudiendo detectarse altas concentraciones de radioactividad solo 14 seg. después de la administración endovenosa y se mantuvieron altos durante las 6 hrs.

siguientes, disminuyendo lentamente después de éste tiempo.

Los resultados de la administración del Diazepam por vía oral fueron similares a los obtenidos en los ratones tratados por vía endovenosa, observándose que la acumulación en el miocardio y los grandes vasos fué mas lenta, alcanzando su máximo en 2 hrs. después.

Entre los estudios realizados para determinar experimentalmente si el Diazepam es teratógeno está el de Morton H. Stenchever y col. (1975) que utilizaron hembras de ratón de la cepa Balb/C de 60 a 72 días de edad apareadas con machos de 60 a 150 días. Las hembras fueron clasificadas en cinco grupos. El A ingirió del 1 al 9 día de la gestación 0.002 mg. de Diazepam disuelto en propilen glicol. El B recibió del 5 al 12 día de la gestación el mismo tratamiento que el grupo A.

Los grupos C y D sirvieron como controles de los grupos A y B tratados con 0.1 ml. de propilen glicol.

Los animales del grupo E sirvieron como testigos sin ningún tratamiento, todos los animales fueron sacrificados al 15 día de la gestación y los fetos obtenidos fueron contados, pesados y estudiados macroscopicamente, obteniendo como resultados, que el grupo que ingirió el Diazepam del día 5 al 12 tuvo menor número de hembras preñadas, en comparación con los controles que recibieron propilen glicol, el peso de los productos de las hembras no tratadas fué menor que el de los cuatro primeros

grupos. En 6 de 156 fetos de las hembras a las que se les administró el Diazepam y en 5 a las que se les dió el disolvente -- presentaron diversos tipos de anomalias, por lo cual los resultados no son estadísticamente significativos y los mismos autores sugieren que es necesario aumentar el número de observaciones para descartar la posibilidad de que éstos resultados se deben al azar y no al Diazepam.

## II.- DESARROLLO DEL CORAZÓN DEL RATÓN

En el ratón, el desarrollo cardíaco se inicia siete días después de la fecundación con la aparición del área cardiógena, que se localiza en la zona extraembrionaria, limitada hacia adelante, por la placa neural y hacia atrás por el septo -- transverso. El área está constituida por pequeños acúmulos de mesénquima que se organizan para formar un par de tubos endocárdicos.

Al mismo tiempo que se desarrollan éstas estructuras, aparecen al delaminarse el mesodermo lateral, en las hojas somática y esplácnica, una cavidad que es el celoma pericárdico y como los dos tubos endocárdicos derivan del mesodermo lateral que está en contacto con el endodermo, la hoja esplácnica también rodea a los tubos, formándoles una cubierta que se diferencia rápidamente en una capa interna de tejido laxo, llamada gelatina cardíaca y una externa de tejido más compacto, denominada epimiocardio que poco tiempo después dará origen al miocardio y al epicardio ó pericardio visceral.

En cambio la hoja de mesodermo somático se transformará en el pericardio parietal.

Al crecer la región cefálica del embrión, los tubos cardíacos situados por delante de ésta, cambian de posición y se colocan en la región ventral a nivel cervical y poco tiempo después al irse uniendo las paredes del cuerpo, también lo ha--

cen los tubos cardíacos, originando así el tubo cardíaco primitivo, que puede ser observado a los ocho días.

Desde antes de iniciarse la fusión de los tubos se presentan constricciones, que marcan el límite de las cámaras dilatadas del corazón primitivo, que son cefalocaudalmente el ventrículo el atrio y el seno venoso.

La región más estrecha de la primera cámara es el tronco arterioso que está comunicado con un par de aortas ventrales ó sacos aórticos, en cambio al seno venosos llegan en un principio las venas vitelinas y umbilicales y más tarde se incorporan las cardinales comunes o conductos de Cuvier.

Genéticamente se ha establecido, que la pared derecha de la región ventricular, crezca a un ritmo más acelerado que al que lo hace la izquierda y la propia cavidad pericárdica, por lo cuál se flexiona sobre sí misma, dando origen al asa bulboventricular que tiene la forma de U cuya porción redondeada se dirige hacia adelante y a la derecha y como consecuencia de la formación de ésta a la izquierda, entre el bulbus cordis y el ventrículo se forma el surco bulboventricular.

El crecimiento del asa continúa y paulatinamente el ventrículo se hace colgante hasta quedar en posición caudal, respecto al atrio, que por lo tanto asciende virtualmente y se coloca por detrás de la región cefálica del bulbus cordis ó sea el tronco arterioso.

También el seno venoso que en un principio era caudal al atrio, se coloca en posición dorsal y cefálica respecto a éste y finalmente se incorporará a la aurícula derecha.

Por crecimiento de sus paredes laterales, el atrio, primitivo, se expande y se sitúa por encima y a los lados de la región ventricular. Los extremos inferiores del atrio, asemejan un par de bolsas, de las cuales se desarrollaran las orejuelas de las aurículas derecha e izquierda.

En éste momento, en el conducto localizado entre el ventrículo y el atrio primitivo (o sea el conducto atrio ventricular) se produce la proliferación del tejido conectivo plástico de sus paredes dorsal y ventral, que se diferenciarán en las almohadillas endocárdicas y crecen hacia el centro del conducto, en el que se unen para dividirlo en los conductos atrio-ventriculares derecho e izquierdo.

Simultáneamente a la formación de las almohadillas endocárdicas, aparece sobre el techo del atrio y a la izquierda de la desembocadura del seno venoso, el septum primum que es un delgado tabique falciforme cuyo borde libre se dirige hacia las almohadillas endocárdicas, a las que mas tarde se fusionará, -- mientras esto no acontece existe una comunicación interauricular llamada ostium primum, cuyo diámetro disminuye rapidamente hasta desaparecer, pero antes de que éste cierre, la parte superior del tabique comienza a degenerar para formar una segunda comunicación interauricular denominada ostium secundum, que al mantenerse ampliamente abierta, permite el paso de la sangre de la cavidad -

atrial derecha a la izquierda, desde el seno venoso que ahora solo desemboca en el atrio derecho.

A la derecha del septum primum se desarrolla a partir de dos puntos separados, un segundo tabique interauricular llamado septum secundum, que tiene forma de hoz ó C, que es más -- grueso que el septum primum y al crecer se dirige hacia la de-- sembocadura del seno venoso, pero antes de que su borde libre se fusione a las paredes del atrio, hacia los doce días cesa su desarrollo quedando un orificio llamado foramen oval, que no -- coincide con el ostium secundum. Esto hace que se conserve una comunicación interauricular que permite el paso de la sangre de la aurícula derecha a la izquierda durante toda la gestación, quedando el septum primum como la valva del foramen oval. La corriente sanguínea está orientada justamente en el eje de la circulación procedente de la vena cava inferior, hecho que favorece el paso de la sangre oxigenada por el foramen oval, impi-- diendo parcialmente su mezcla con la venosa.

Al mismo tiempo que se fusionan las almohadillas endo-- cárdicas aparece en el ápice del ventrículo el esbozo de la por-- ción muscular del septo interventricular, que crece hacia las almohadillas endocárdicas en forma de una media luna, sin lle-- gar a tocarlas, pues su crecimiento se detiene, conservándose el foramen interventricular permeable que desaparece al desarro-- llarse la porción membranosa del septo.

Esta porción se forma a partir de cinco esbozos. Las

dos crestas tronco-conales, las dos almohadillas endocárdicas y una pequeña contribución de tejido conectivo plástico del septo muscular.

Las crestas tronco-conales son dos láminas de tejido conectivo plástico, que se desarrollan en el interior del tronco arterioso, en la porción localizada entre los cuartos y sextos arcos aórticos y de éste punto crecen caudalmente en forma espiralada hacia la región del cono, se unen a las almohadillas endocárdicas separando totalmente a los dos ventrículos, a la vez que dividen al tronco arterioso en las porciones ascendentes de las arterias aorta y pulmonar, que quedan unidas al ventrículo izquierdo y derecho respectivamente y justo en éste punto las crestas y la pared de éstos vasos originan las válvulas de las valvas semilunares.

Las almohadillas endocárdicas y las paredes de los canales aurículo-ventriculares forman masas de tejido conectivo plástico, que crecen y se proyectan hacia la luz de los ventrículos, para constituir los esbozos de las válvulas de las valvas tricuspide y mitral. Dichas masas se unen a las trabéculas carnosas que son los primordios de los músculos papilares y al irse diferenciando el tejido de las válvulas en tejido adulto, también las trabéculas carnosas, hacia la pared de los ventrículos dan origen a los músculos papilares y distalmente a las cuerdas tendinosas que quedan firmemente unidas a las valvas.

La pared del tubo cardíaco primitivo, poco antes de



que se inicie la tabicación se empieza a diferenciar, y de la pared interna del epimiocardio se desarrolla un tejido muscular esponjoso que invade y sustituye a la gelatina cardíaca, formando las trabéculas carnosas. Más externamente, el epimiocardio se diferencia en la parte compacta del miocardio, y es el epimiocardio ó pericardio visceral que es la capa más externa del corazón.

III.- DESCRIPCION HISTOLOGICA DEL CORAZON DE LOS  
FETOS DEL LOTE TESTIGO

En el corazón se observan cuatro cámaras, las superiores corresponden a las aurículas y las inferiores a los ventrículos. Fig. 1

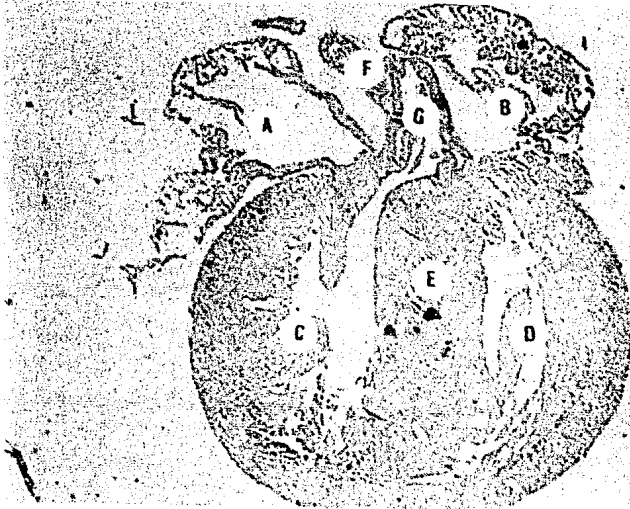


Fig. 1 Corte frontal del corazón de un feto de ratón del lote testigo, en el que se observan las aurículas derecha-- (A) e izquierda (B), los ventrículos derecho (C) e izquierdo (D) el tabique interventricular (E) y los troncos de las arterias -- aorta (F) y pulmonar (G).

Las paredes de las aurículas están constituidas por -- tres capas de tejido. La externa o sea el pericardio visceral ó epicardio se observa como una delgada capa monoestratificada con células aplanadas, con escaso citoplasma acidófilo cuyos núcleos ovoides o alargados son fácilmente distinguibles, ya que se en--

cuentran fuertemente teñidos. La capa intermedia es el miocardio que consta de dos partes la compacta y la esponjosa. La primera es la que está en contacto con el pericardio visceral, es delgada constituida por escasos mioblastos cuyo eje mayor se coloca paralelo a la superficie de la aurícula, éstas células presentan citoplasma con estructura fibrilar debilmente teñidas en las que se encuentran diferenciadas las estrias características del miocardio, las cuales solo se pueden localizar utilizando el objetivo de inmersión los núcleos son ovalados, o esféricos, con cromatina en grumos, que tienen una gran afinidad tinte. La parte esponjosa se localiza hacia el interior de la compacta y está formada por delgadas trabéculas que se proyectan irregularmente en la cavidad de las aurículas. Histológicamente son muy semejantes a la parte compacta del miocardio. Estas trabéculas son los esbozos de los músculos pectíneos. Toda la pared interna de las aurículas, incluyendo a los músculos pectíneos, está revestida por una capa endotelial que es el endocardio integrado por células pavimentosas de citoplasma claro acidófilo con núcleos alargados u ovoides con cromatina que se tiñe fuertemente, estos núcleos sobresalen del escaso citoplasma y es la capa que está en contacto con la sangre de las aurículas. Fig. 2.

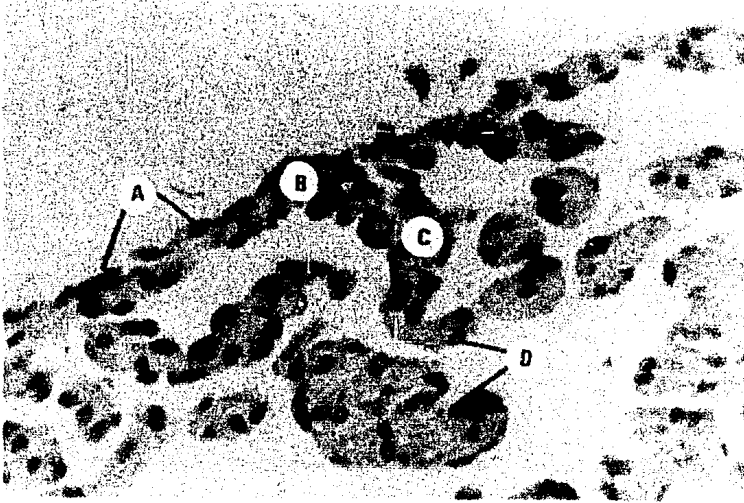


Fig. 2 Corte de la pared auricular del corazón de un feto de ratón, del lote testigo en el que se observa el epicardio ó pericardiovisceral (A), la delgada capa compacta del miocardio (B), Los músculos pectíneos o parte esponjosa del miocardio (C) y el endocardio (D): 500 x

Entre las aurículas es posible identificar a los esbozos del septo interauricular que son el septum primum y el secundum.

El primum es muy delgado y su estructura es semejante a la de un músculo pectíneo y está formado por un par de capas de endotelio separadas por tejido conectivo plástico de células largas orientadas con el eje mayor paralelo al endotelio, su citoplasma es claro acidófilo y el núcleo ovoide con cromatina finamente granulada.

El septum secundum es más grueso que el primum y también presenta sus dos capas endoteliales y un estroma con las mismas características histológicas que el primum.

En la parte inferior del corazón se observan los ventrículos, los cuales presentan las mismas tres capas de tejido que se describieron en las aurículas y que son del exterior al interior una capa delgada de tejido conectivo formada por un -- epitelio monoestratificado con células cuboides o alargadas con escaso citoplasma y núcleo ovoide con cromatina en grumos finos y 1 ó 2 nucleolos, ésta capa es el epicardio ó pericardio visceral, las células de esta capa están más cercanas entre sí, lo que hace que sus núcleos fuertemente teñidos den la impresión de formar una capa mas densa. Fig. 3.

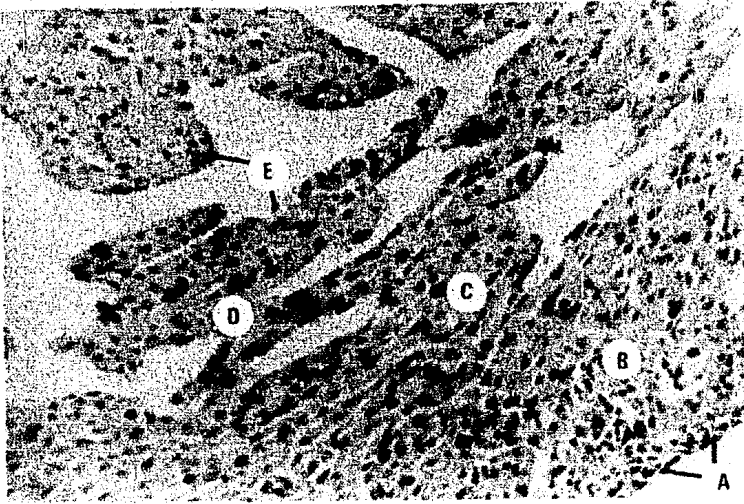


Fig. 3 Corte de la pared ventricular del corazón de un feto de ratón del lote testigo en el que se observa el epicardio (A), las partes compacta (B) y esponjosa del miocardio formada por las trabéculas carnosas primarias, (C), las secundarias (D) y el endocardio (E). 200 x

La parte compacta del miocardio es considerablemente más gruesa que la de las aurículas. Las células que lo constituyen son mioblastos de citoplasma fibrilar acidófilo, en el que la estriación característica puede ser observada con el objetivo de inmersión, los núcleos son alargados o esféricos con cromatina en gránulos pequeños y dos nucleolos. Estas fibras en general se colocan en el eje mayor paralelo a la superficie del corazón.

Entre los mioblastos se observan abundantes vasos capilares en los que se distinguen sus paredes endoteliales típicas y en el interior uno a dos eritrocitos. La red capilar está distribuida en todo el miocardio pero es más abundante en la zona cercana al epicardio. También se puede identificar vasos de mayor calibre que son ramas de las arterias y venas coronarias.

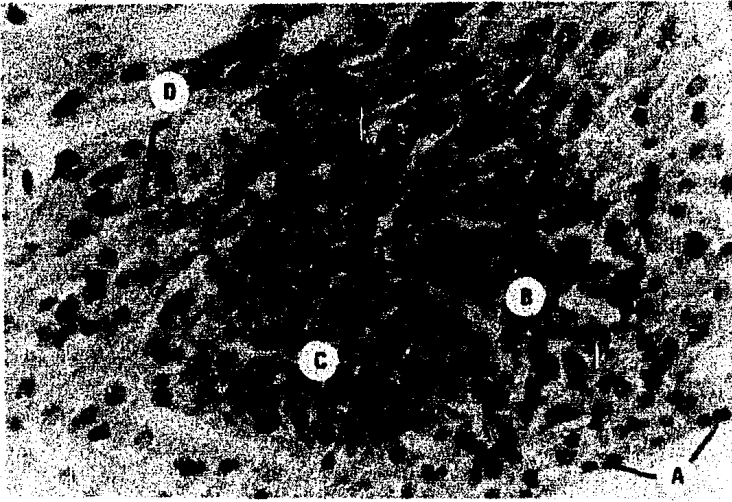


Fig. 4 Corte de la pared ventricular del corazón de -  
 ratón del lote testigo en el que se puede identificar el epicardi  
 o (A), el músculo compacto (B) con vasos capilares con eritroci  
 tos (C) y las trabéculas carnosas entrelasadas (D) 500 x

El músculo esponjoso esta constituido por las trabécu  
 las carnosas que ahora son los esbozos de los músculos papilare  
 res o pilares, formados por mioblastos que se colocan perpendicu  
 larmente a la pared de los ventrículos y crecen irregularmente  
 hacia el interior de estos uniéndose entre sí, y originando la  
 típica estructura esponjosa.

Las fibras musculares que se encuentran en las trabécu  
 las tienen citoplasma más abundante, acidófilo, en el que tambi  
 én se identifica la estriación típica, los núcleos son fusio  
 formes u ovoides más grandes que los del músculo compacto y meno  
 s abundantes, en la cromatina se observan finas granulaciones

que no tienen gran afinidad tinteora y los nucleolos bien teñidos Fig. 3 y 4

La porción distal de un gran número de trabéculas están fusionadas, el tejido de las válvulas aurículo-ventriculares que en esta porción se han diferenciado para formar los esbozos de las cuerdas tendinosas que tienen células fusiformes de tejido conectivo, con citoplasma fibrilar más teñido que el resto de las trabéculas y con nucleolos fuertemente teñidos. A estas trabéculas se les ha llamado de primer orden. Las de segundo orden se caracterizan por unir a las paredes ventriculares entre sí y las de tercer orden solo se proyectan en la luz del ventrículo, pero son más pequeñas y libres. Todos los tipos de trabéculas tienen un revestimiento endotelial típico que es el endocardio, cuyos núcleos se tiñen fuertemente Fig. 3

La parte muscular del tabique interventricular es tan gruesa como las paredes ventriculares y presenta hacia las cavidades de éstas, proyecciones que constituyen trabéculas carnosas de primer orden, que están unidas a las valvas aurículo-ventriculares, también presenta trabéculas de segundo y tercer orden Fig. 5



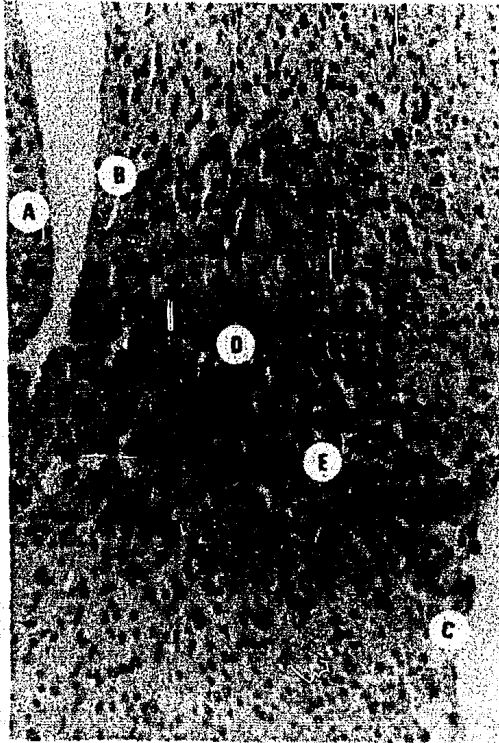


Fig. 5 Corte histológico del tabique interventricular del corazón de un feto de ratón del lote testigo en el que se observa las trabéculas carnosas de primero (A), segundo (B) y tercer orden (C) y la porción central compacta (D) con abundantes vasos sanguíneos (E). 250 x

En la parte central del septo, los mioblastos tienen una distribución diferente y en general el eje mayor de éstos es perpendicular al tabique y presenta células con citoplasma fibrilar ligeramente más teñido y con abundantes núcleos ovalados o esféricos, con la cromatina en grumos finos y 1 a 2 nucleolos oscuros.

Los vasos sanguíneos son muy numerosos y los mioblastos parecen estar separados por zonas claras que corresponden a la luz de los vasos, que están limitados por un endotelio típico Fig. 5 y 6 .

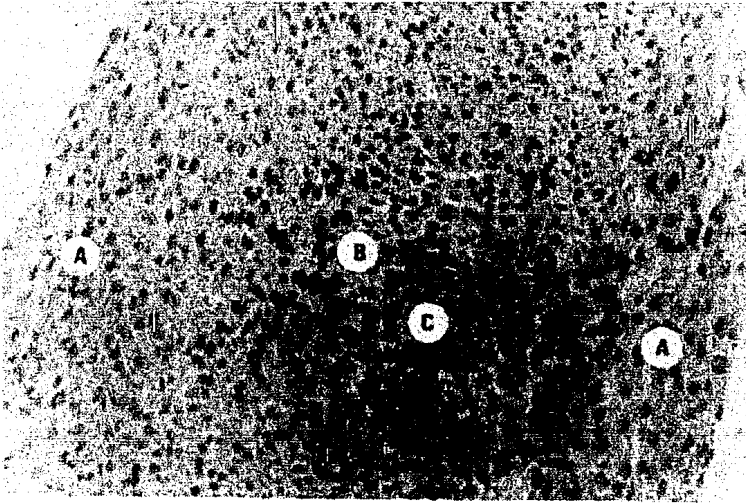


Fig. 6 Corte frontal del tabique interventricular del corazón de un feto de ratón del lote testigo en el que se identifica la parte externa, formada por músculo esponjoso (A) y la porción central constituida por músculo compacto (B), irrigada por numerosos vasos (C). 250 x

La porción membranosa del septo tiene una constitución histológica especial, ya que el tejido conectivo plástico que lo forma parece ser un remolino, ésto es que en cortes transversales al septo las fibras tienen un arreglo circular.

La afinidad tintorea de éste tejido es menor que el -

de la porción muscular y sus células tienen citoplasma claro y núcleos esféricos no muy teñidos.

Al hacer la comparación de los cortes histológicos -- del corazón del lote testigo con los tratados con el disolvente del Diazepam y con los grupos de  $V_{1.25}$ ,  $V_5$ ,  $V_{20}$ , y  $V_{40}$ , no se observaron diferencias notables ni en la pared ventricular ni en las trabéculas carnosas Figs 7 a 18.

En cambio en los fetos de  $V_{80}$  la pared del ventrículo sufrió alteraciones histológicas evidentes.

IV.- OBJETIVO E HIPOTESIS DE TRABAJO.

Si bién existe una enorme cantidad de literatura concerniente a las aplicaciones clínicas y experimentales de las benzodiazepinas y relativamente son pocas las investigaciones sobre la distribución del Diazepam y sus metabolitos en el hombre y en animales de laboratorio durante el embarazo y no encontrando estudios concretos del efecto que produce éste fármaco sobre el desarrollo de los órganos en los que se deposita, esto es, que no se conoce si causa algún daño o es inocuo, se planeó éste trabajo que tiene como objetivo:

Determinar estadísticamente si el Diazepam (Valium) aplicado a ratones de la cepa CD-I del 6° al 17° - - días de la gestación, produce alguna alteración en el peso, la talla y la estructura histológica del corazón fetal.

El Diazepam (Valium) por su bajo peso molecular atraviesa la barrera placentaria y aplicado a ratones del 6° al 17° - día de la gestación por vía intraperitoneal, a dosis de 41.5, - 166,664, 1,328 y 2,656  $\mu$ /kg puede causar alteraciones morfológicas en los fetos.

V.- MATERIAL Y METODO

Se usaron ratones de la cepa CD-I de 5 a 7 meses de edad, las hembras con un peso de 30 a 35 g. que se aparearon con machos de la misma edad, y con un peso de 35 a 40 g. El sistema de apareamiento que se usó fué de 5 hembras y 1 macho dejándolos juntos durante 1 hr. (7 a 8 AM), en seguida se separaron las hembras y se procedió a observar el tapón vaginal que se forma pocos minutos después de la inseminación, tomando su presencia como signo de fecundación y por lo tanto el inicio de la gestación.

Las hembras que lo presentaron fueron pesadas y marcadas y se esperó a que el desarrollo continuara su curso habitual hasta el 6º día en que se iniciaron 7 tratamientos consistentes en inyectar diariamente por vía intraperitoneal, Diazepam en 5 dosis diferentes, suero fisiológico y el disolvente del Diazepam. formando así los lotes experimentales que fueron:

Lote I S (testigo) tratado con solución de suero fisiológico en cantidad equivalente al volumen del disolvente suministrados a los animales de experimentación de los lotes III al VII.

Lote II T tratado con el disolvente del Diazepam de fórmula conocida solo por los laboratorios Roche, aplicado en la misma proporción que el inyec-

tado con el Diazepam a las hembras del lote III al VII.

Para los lotes inyectados con Diazepam se tomó como base la dosis de 10 mg. que aplicada a un hombre de 60 kg. produce sedación, y equivale a aplicar 166  $\mu$ /Kg. al ratón y en relación a ésta dosis se formaron los lotes III, IV, V, VI, y VII.

Lote	Dosis	Dosis aplicada mg/Kg.	Dosis Inyectada $\mu$ /Kg.
III	V <sub>1.25</sub>	2.5	41.5
IV	V <sub>5</sub>	10	166
V	V <sub>20</sub>	40	664
VI	V <sub>40</sub>	80	1,328
VII	V <sub>80</sub>	160	2,656

A partir del 6° día en el que se iniciaron los tratamientos y hasta el día 17° recibieron las mismas dosis y fueron pesadas diariamente para vigilar la evolución del embarazo, al día 18° se sacrificaron por decapitación, para eliminar el efecto de los anestésicos que atraviezan la barrera placentaria.

A continuación se practicaron las disecciones del abdomen y el útero para obtener los fetos vivos, los muertos y observar simultáneamente si algunos productos se habían reabsorbido.

El número total de productos que se gestaron se comprobó contando los cuerpos amarillos de los ovarios.

Los fetos vivos fueron pesados, medidos y una vez hecho ésto se disecó cuidadosamente el tórax para extraer ilesos los corazones, que ya aislados se pesaron y se tomaron sus medidas longitudinales, transversales y dorso-ventral, a continuación fueron fijados durante 24 hr. en una solución de formol al 10 % amortiguada con fosfatos a un pH de 7.4, se lavaron y deshidrataron utilizando alcoholes graduales, se aclararon en toluol e incluyeron en parafina cuidando la orientación de las piezas que fueron cortadas en sentido transversal y longitudinal, obteniendo cortes de un espesor de 5 $\mu$ , se montaron, se desparafinaron y se tiñeron usando las técnicas de hematoxilina-eosina y hematoxilina de Weigert, y a continuación se procedió a hacer el estudio histológico.

Los pesos y las medidas de los corazones se analizaron estadísticamente por medio de una computadora digital - - -

11/40  
PDP

## VI.- RESULTADOS ESTADÍSTICOS

Con respecto a la longitud del corazón de los embriones tratados con Diazepam se encontró que en las dosis de  $V_{80}$  la media es de  $2.975 \pm 0.35$  mm. y al compararla con la del suero que es de  $3.363 \pm 0.281$  mm. las diferencias por la prueba de T de "Student" son altamente significativas a un nivel alfa inferior de 0.0005.

El segundo grupo en orden creciente es el de  $V_{1.25}$  con una media de  $3.006 \pm 0.249$  mm. que también es significativamente diferente a un nivel alfa menor de 0.0005 y no hay diferencias significativas entre  $V_{80}$  y  $V_{1.25}$  .

En el caso de  $V_5$  la media es de  $3.1 \pm 0.443$  mm. y es significativa la diferencia con S a un nivel de 0.025. Entre las dosis de  $V_{20}$ ,  $V_{40}$  y T con respecto al lote testigo se demostró que no hay diferencias significativas aún a nivel alfa de 0.15 y tampoco existe entre los tres grupos si se comparan entre sí, ya que sus medias son de  $3.351 \pm 0.41$  mm.,  $3.287 \pm 0.393$  mm.,  $3.272 \pm 0.417$  mm. respectivamente.



Cuadro 1

	V <sub>1.25</sub>	V <sub>5</sub>	V <sub>20</sub>	V <sub>40</sub>	V <sub>80</sub>	T	S
Media	3.006	3.100	3.351	3.287	2.975	3.272	3.363
Dev. estandar	0.249	0.443	0.410	0.393	0.350	0.417	0.281

Cuadro 1.- Datos estadísticos de la longitud del corazón de los fetos de ratón, tratados con diferentes dosis de Diazepam, el disolvente del Diazepam y suero fisiológico.

En la fig. 26 se han representado gráficamente las medidas y las desviaciones estandar de la longitud de los 7 grupos estudiados.

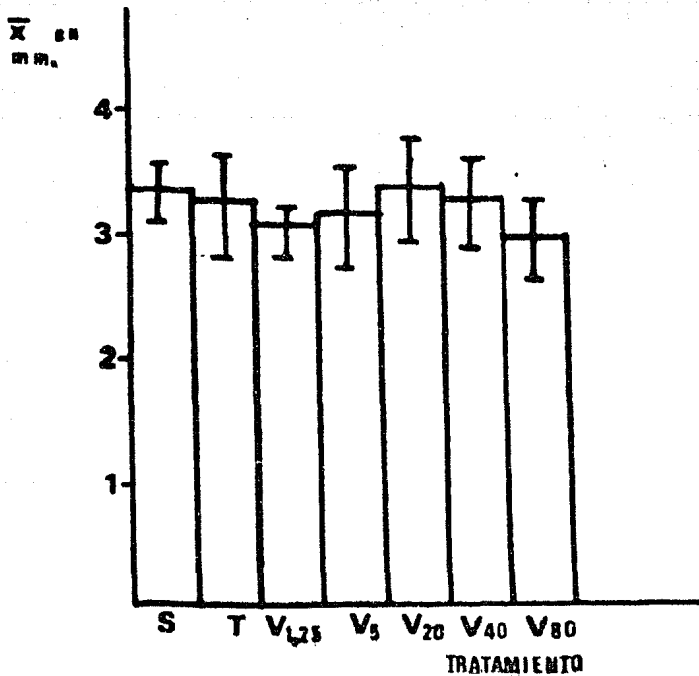


Fig. 26.- Longitud del corazón de los fetos de ratón del lote-testigo (S), los tratados con el disolvente del Diazepam (T) y los tratados con dosis de Diazepam de 41.5  $\delta$ /Kg. (V<sub>1.25</sub>), 166  $\delta$ /Kg. (V<sub>5</sub>), 664  $\delta$ /Kg. (V<sub>20</sub>) 1,328  $\delta$ /Kg. (V<sub>40</sub>) y 2,656  $\delta$ /Kg. (V<sub>80</sub>). Las líneas verticales indican la desviación estandar.

Al hacer un análisis de varianza la  $F$  calculada es de 6.682 que comparada la  $F$  .95 de tablas es de 2.10 con lo que se comprueba que las diferencias entre los grupos de Diazepam, el de su disolvente y el lote testigo son altamente significativas aún a nivel alfa de 0.00002.

Para tener una idea visual más clara de la proporción en que son diferentes los grupos, se tomó como el 100 % la medida de la longitud del corazón de los ratones tratados con suero y en base a éste se obtuvieron las diferencias porcentuales con los seis grupos restantes. Fig. 27 (A).

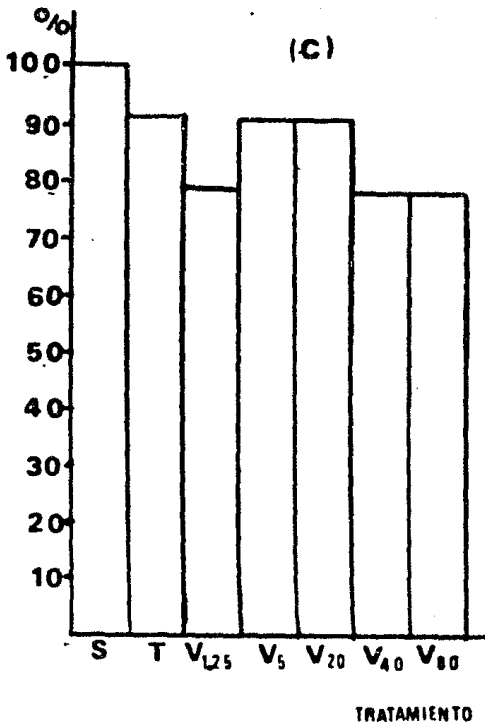
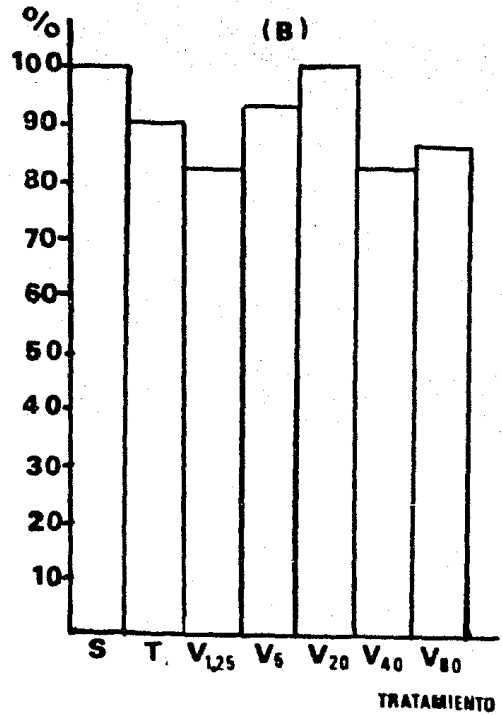
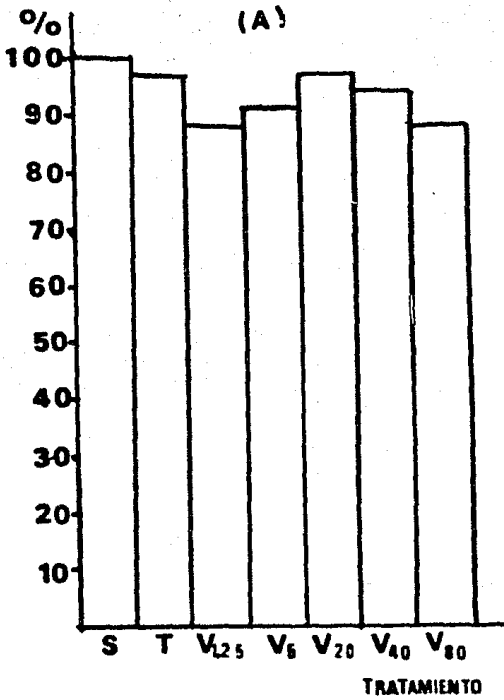


Fig. 27 - Diferencias porcentuales de la longitud (A), la medida del eje transverso (B) y la medida dorso-ventral (C) del corazón de los fetos de ratón del lote testigo -- (S), el disolvente del Diazepam -- (T) y las cinco dosis de Diazepam V<sub>1.25</sub>, V<sub>5</sub>, V<sub>20</sub>, V<sub>40</sub> y V<sub>80</sub>.

La medida del eje transverso del corazón de los embriones de  $V_{80}$ ,  $V_5$ , y  $V_{1.25}$  son significativamente mas pequeñas que las del lote testigo, siendo respectivamente de  $2.488 \pm 0.255$  mm.  $2.494 \pm 0.216$ mm. y  $2.511 \pm 0.332$  mm. y  $2.927 \pm 0.498$  mm. rechazándose la hipótesis de igualdad a un nivel alfa de 0.0005.

El grupo de T tiene una media de  $2.614 \pm 0.403$  mm. que comparada con el testigo resulta significativamente diferente a un nivel alfa de 0.005.

La media de  $V_{40}$  es de  $2.723 \pm 0.442$  mm. que aún muestra diferencias significativas con respecto al lote testigo a un nivel alfa de 0.05.

En el único caso en que la hipótesis de igualdad de medias no se rechaza es de  $V_{20}$  con una media de  $2.906 \pm 0.531$  mm.

Cuadro II

	$V_{1.25}$	$V_5$	$V_{20}$	$V_{40}$	$V_{80}$	T	S
Media	2.511	2.494	2.906	2.723	2.488	2.614	2.927
Dev. Estandar	0.332	0.216	0.520	0.442	0.255	0.403	0.498

Cuadro II.- Datos estadísticos del eje transverso del corazón de los fetos de las hembras, tratadas con Diazepam, disolvente del Diazepam y suero.

En la figura 28 están representadas gráficamente las medidas y las desviaciones estandar del eje transverso de cada uno de los 7 grupos estudiados.

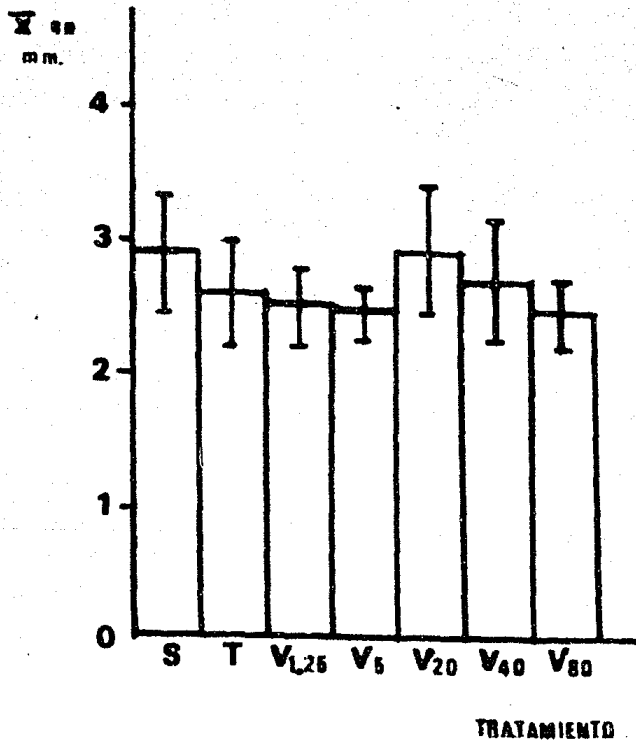


Fig. 28 - Medidas del eje transverso del corazón de los fetos de ratón de lote testigo (S), disolvente del Diazepam (T) y las cinco dosis de Diazepam . V<sub>1.25</sub>, V<sub>5</sub>, V<sub>20</sub>, V<sub>40</sub>, y V<sub>80</sub> . Las líneas verticales indican la desviación estándar.

Por el análisis de varianza se comprobó que las diferencias entre los grupos de experimentación son altamente significativas a un nivel alfa de 0.00001 con una F calculada igual a 7.086

Al igual que fueron tratadas las medias de la longitud del corazón para obtener una idea de las diferencias porcentuales que existen entre los grupos experimentales y el testigo se obtuvieron los datos relativos a las medias del eje transversal representados en la fig. 27 (B).

La hipótesis de igualdad de medias entre la medida -- dorso-ventral del corazón de los cinco grupos tratados con Diazepam y el lote testigo, se rechaza encontrándose que el nivel -- alfa es inferior a 0.0005 entre los grupos de  $V_{1.25}$  con una media de  $1.826 \pm 0.212$  mm.  $V_5$  con una media de  $1.824 \pm 0.293$  mm. y  $V_{80}$   $1.834 \pm 0.264$  mm. y S con  $2.35 \pm 0.468$  mm.

Entre  $V_{20}$  ( $2.072 \pm 0.445$  mm) y S la diferencia se encuentra a un nivel alfa de 0.025 y el grupo del disolvente del -- Diazepam con una media de  $2.126 \pm 0.442$  mm. es diferente del -- testigo a un nivel de 0.005 .

Cuadro III

	V <sub>1.25</sub>	V <sub>5</sub>	V <sub>20</sub>	V <sub>40</sub>	V <sub>80</sub>	T	S
Media	1.826	1.824	2.072	2.134	1.834	2.126	2.350
Dev. Estandar	0.212	0.293	0.445	0.482	0.263	0.442	0.468

Cuadro III.- Datos estadísticos de la medida dorso - ventral del corazón de los fetos de ratón, tratados con Diazepam su disolvente y suero fisiológico.

Las medias y las desviaciones Estandar de los grupos tratados con Diazepam y suero fisiológico están representados en la Fig. 29.

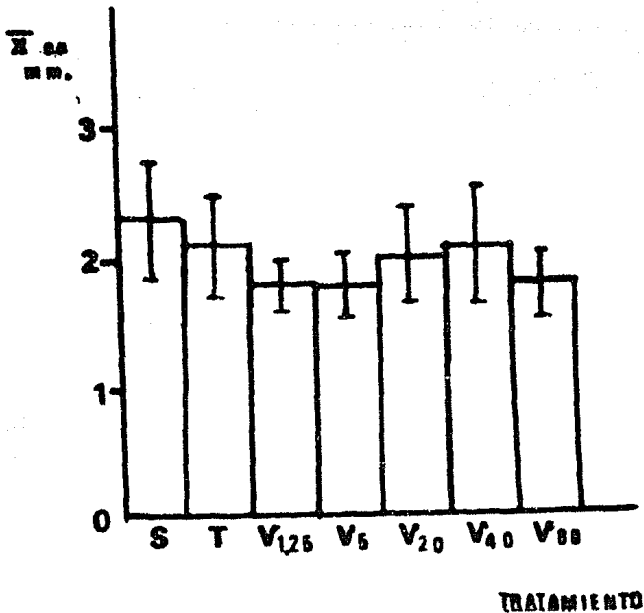


Fig. 29 - Medidas dorso-ventral del corazón de los fetos de ratón de los siete grupos estudiados, lote testigo (s), disolvente del Diazepam (T), y las dosis tratadas con Diazepam de V<sub>1.25</sub>, V<sub>5</sub>, V<sub>20</sub>, V<sub>40</sub> y V<sub>80</sub>. Las líneas verticales indican la desviación estandar.

Por análisis de varianza se demostró que la hipótesis de igualdad entre los grupos se rechaza a 0.0001 con una F calculada igual a 7.655.

Las diferencias porcentuales de la medida dorso-ventral del corazón, tomando como 100 % la del lote testigo (S) están representadas en la figura 27 (C).

El peso del corazón de  $V_{80}$  tuvo una media de  $11.85 \pm 19.63$  mg que comparada con la del lote testigo que es de  $13.76 \pm 2.902$  mg. es significativamente menor, a un nivel alfa de 0.005, también las diferencias son significativas a un nivel alfa de 0.025 entre el lote testigo y el de  $V_5$  con una media de  $12.1 \pm 1542$  mg.

$V_{1.25}$  con  $12.39 \pm 1.226$  mg. T con  $12.34 \pm 1.709$  mg. y  $V_{40}$  con  $12.38 \pm 17.61$  mg.

Con respecto al grupo  $V_{20}$ , sólo se rechaza la hipótesis de igualdad de medias a un nivel de 0.1 ya que la media del peso es de  $12.89 \pm 21.39$  mg.

En el cuadro IV se encuentran las medias varianzas y desviación de los grupos experimentales y testigo.



Cuadro IV

	V <sub>1.25</sub>	V <sub>5</sub>	V <sub>20</sub>	V <sub>40</sub>	V <sub>80</sub>	T	S
Media	12.394	12.100	12.894	12.381	11.859	12.342	13.76
Dev. Estandar	1.226	1.542	2.139	1.761	1.963	1.709	2.902

Cuadro IV- Datos estadísticos de el peso del corazón de los fetos de ratón tratados con Diazepam su disolvente y el Suero fisiológico.

En la figura 30 se muestran gráficamente las diferencias que existen entre éstos grupos.

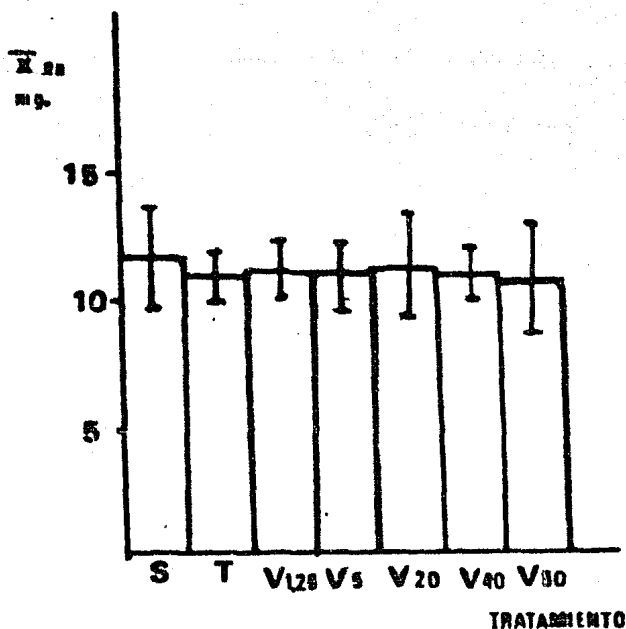


Fig. 30 - Peso del corazón de los fetos de ratón del lote testigo (S) del tratado con el disolvente del Diazepam (T) y las cinco dosis de Diazepam V<sub>1.25</sub>, V<sub>5</sub>, V<sub>20</sub>, V<sub>40</sub> y V<sub>80</sub>. Las líneas verticales indican la desviación estándar.

Por análisis de varianza se comprobó que las diferencias entre los grupos tratados con Diazepam, el del disolvente de Diazepam y el testigo, son significativas al nivel alfa de 0.0051.

El tratamiento porcentual está representado gráficamente en la figura 31.

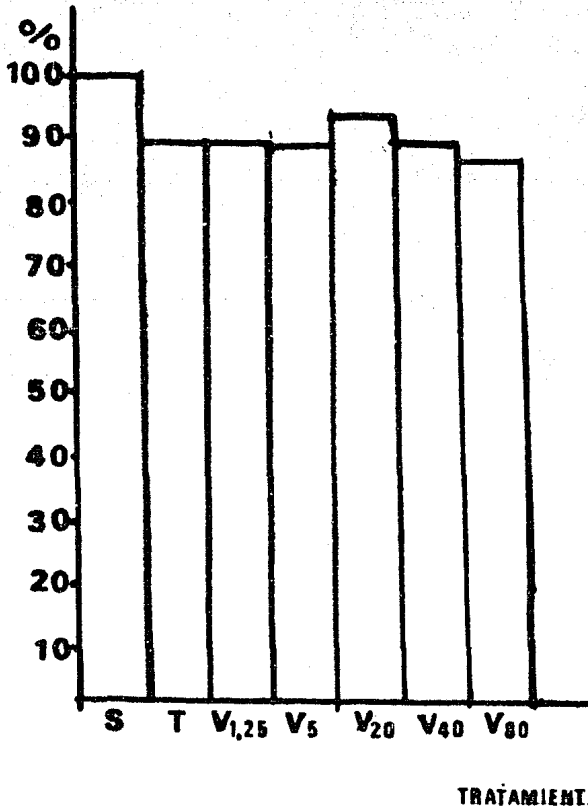


Fig. 31 - Diferencias porcentuales que existen entre el peso del corazón de los fetos de ratón del lote testigo (S), el disolvente del Diazepam (T) y con Diazepam  $V_{1.25}$ ,  $V_5$ ,  $V_{20}$ ,  $V_{40}$  y  $V_{80}$

Al comparar el peso de los fetos de los grupos experimentales y el testigo se demostró que el grupo de  $V_{20}$  es el más pequeño, con una media de  $1.348 \pm 0.081$  g. que con respecto al testigo con  $1.408 \pm 0.058$  g. es significativamente diferente a un nivel alfa de 0.0005. El de  $V_5$ , tiene una media de  $1.362 \pm 0.088$  g. y es menor que el testigo a un nivel alfa de 0.05. -- Entre  $V_{1.25}$  y S también se rechaza la hipótesis de igualdad, a un nivel alfa de 0.025 ya que  $V_{1.25}$  tiene una media de  $1.446 \pm 0.065$  g. Los grupos de  $V_{80}$ , T y  $V_{40}$  no muestran diferencias significativas con respecto al testigo a nivel alfa 0.05 y sus medias son respectivamente de  $1.432 \pm 0.08$  g.,  $1.419 \pm 0.089$  g. y  $1.416 \pm 0.095$  g.

Cuadro V

	$V_{1.25}$	$V_5$	$V_{20}$	$V_{40}$	$V_{80}$	T	S
Media	1.446	1.362	1.348	1.416	1.432	1.419	1.408
Dev. Estandar	0.0654	0.0886	0.0808	0.0947	0.0803	0.0890	0.0576

Cuadro V- Datos estadísticos del peso de los fetos de los ratones tratados con Diazepam, su disolvente y suero fisiológico.

En la fig. 32 se encuentran representadas las diferencias entre las medias del peso de los fetos de los grupos estudiados.

Con el análisis de varianza se comprobó que dichos -- grupos son diferentes a un nivel alfa de 0.00001 encontrándose

una F calculada de 7.062.

Para éstos grupos también se tomó como 100 % la medida del peso de los ratones del lote testigo y en base a éstos se obtuvieron las diferencias porcentuales de lo grupos restantes, que se representan en la Fig. 33.

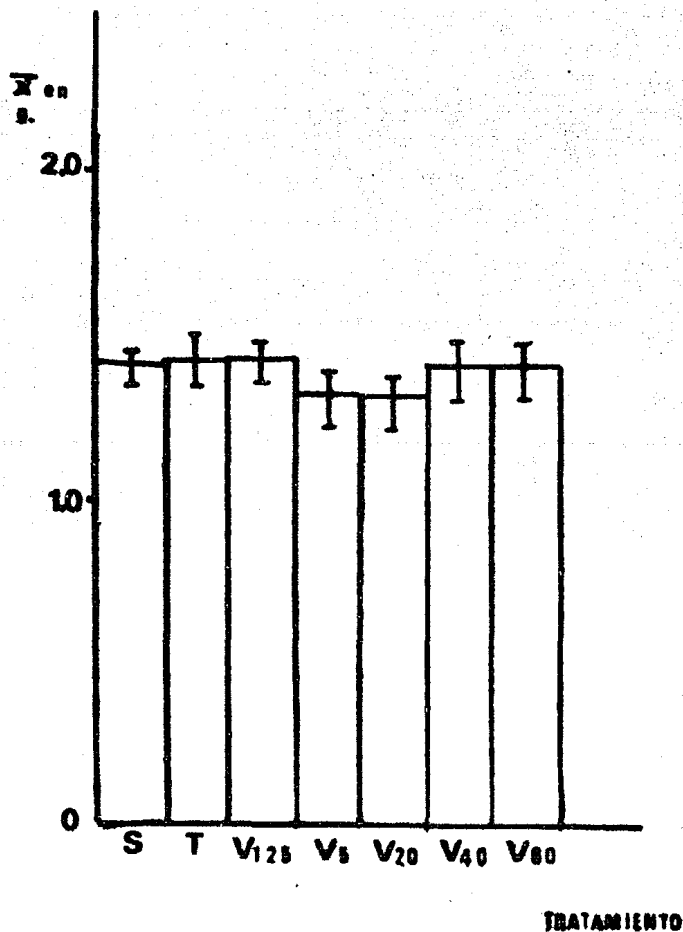


Fig. 32 - Peso de los fetos de ratón de los siete grupos estudiados. lote testigo (S) disolvente del Diazepam (T) y Diazepam V<sub>1.25</sub>, V<sub>5</sub>, V<sub>20</sub>, V<sub>40</sub>, y V<sub>80</sub>. Las líneas verticales representan la desviación estándar.

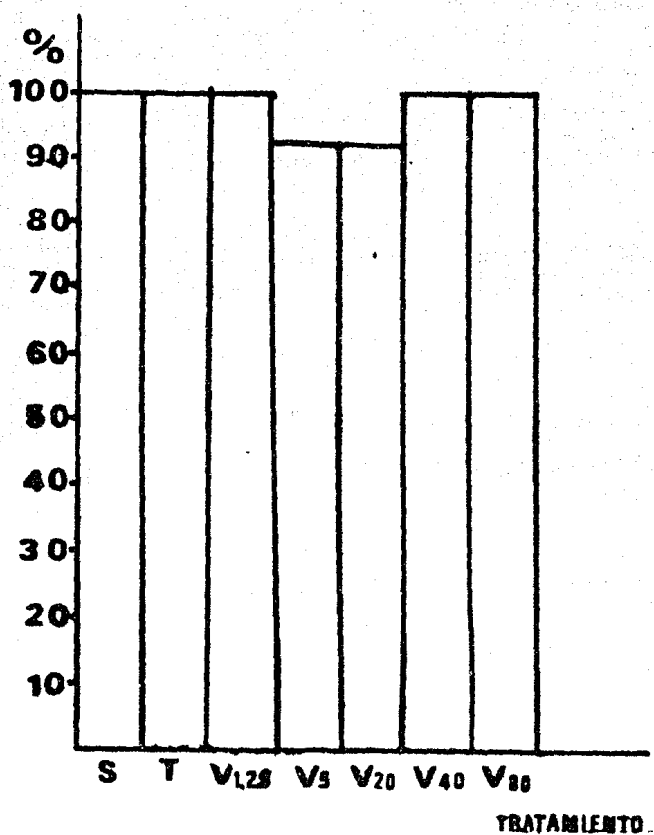


Fig. 33 - Diferencias porcentuales que existen entre el peso de los fetos de ratón del lote testigo (S), disolvente del Diazepam y las cinco dosis de Diazepam V<sub>1.25</sub>, V<sub>5</sub>, V<sub>20</sub>, V<sub>40</sub> y V<sub>80</sub>.

## VII. - RESULTADOS HISTOLOGICOS.

Si se compara la histología de la pared ventricular y las trabéculas carnosas del corazón de los fetos de ratón del lote testigo, inyectado con suero fisiológico (Fig. 7 y 8) con la pared del ventrículo y las trabéculas carnosas del corazón de los fetos tratados con el disolvente del Diazepam (Fig. 9 y 10) y los inyectados con dosis de Diazepam de 41.5  $\gamma$ /Kg. ( $V_{1.25}$ ) de 166  $\gamma$ /Kg. ( $V_5$ ) y 664  $\gamma$ /Kg. ( $V_{20}$ ) (Fig. 11 a 16) se puede observar que su estructura se conserva practicamente inalterada, tanto en las capas que la componen como en la abundancia de las trabéculas, encontrándose lo mismo en la pared auricular.

Con la dosis de Diazepam de 1,368  $\gamma$ /Kg. ( $V_{40}$ ), la pared ventricular aumenta ligeramente de espesor y las trabéculas carnosas son un poco más pequeñas y más cortas e incluso no están muy entrelazadas, por lo que el tejido se ve menos esponjoso (Fig. 17 y 18).

Tampoco en éste caso la pared de las aurículas mostró cambios histológicos evidentes.

Sin embargo con la dosis de Diazepam de 2,656  $\gamma$ /Kg. ( $V_{80}$ ) el corazón de los fetos sufrió alteraciones de sus paredes.

El epicardio ó pericardio visceral, está constituido por una capa de células pavimentosas, con citoplasma claro y nú

cleo fusiforme con la cromatina muy teñida. La parte compacta del miocardio está engrosada y sus células son más pequeñas con menor cantidad de citoplasma, por lo que los núcleos son más abundantes y muy pequeños con la cromatina en grumos o ligeramente difusa y con uno a tres nucleolos, que se tiñen fuertemente (Fig. 19).

En cambio la parte esponjosa del miocardio es muy delgada y está poco diferenciada. Las trabéculas carnosas son considerablemente más cortas, delgadas y escasas, tanto que dan la impresión de ser músculos pectíneos. Las fibras que los forman tienen citoplasma con granulaciones muy finas y con el objetivo de inmersión se logra distinguir una tenue estriación, los núcleos son ligeramente más grandes y alargados que los de las fibras del músculo compacto y tienen la cromatina en grumos más gruesos, 1 a 3 nucleolos y jugo nuclear con mayor afinidad tinte. (Fig. 19 y 20).

Algunas áreas del ventrículo tienen trabéculas que sobresalen ligeramente de la pared del ventrículo (Fig. 21) en otras se puede observar que el músculo esponjoso forma una especie de trabéculas que en corte transversal tienen fibras que se espiralizan como si fueran pequeños remolinos incluidos en la pared ventricular y están revestidos por una capa lisa de endotelio. (Fig. 22) también es frecuente encontrar áreas de la pared interna del ventrículo carentes de esbozos de trabéculas, en las

que el endotelio es totalmente liso (Fig. 23)

En el tabique interventricular se distingue la parte central del miocardio compacto, con las mismas características histológicas que la pared ventricular, esto es, que los núcleos son muy abundantes pequeños y muy teñidos, pero a diferencia de lo que pasa con el tabique interventricular del corazón de los fetos del lote testigo en éste miocardio no se logran distinguir los capilares (Fig. 5 y 6)

La parte esponjosa del miocardio, que se encuentra -- por fuera de la compacta, tiene células con citoplasma más claro, núcleos ligeramente más grandes y menos teñidos, pero no presenta prácticamente trabéculas y el endotelio que lo cubre es liso con sus núcleos fusiformes fuertemente teñidos (Fig.24)

La pared de las aurículas es también más gruesa que la del lote testigo . El epicardio tiene células alargadas o cuboidales, con núcleos con gran afinidad tintorea. La parte compacta del miocardio llega a presentar hasta 6 capas de fibras paralelas a la pared, mientras que en el testigo solo son de 1 a 2 capas (Fig. 2) las células tienen citoplasma más oscuro, -- con núcleos abundantes y fuertemente teñidos. Los músculos pec tíneos aparentemente son normales, aunque son un poco más delga dos. El endocardio es un endotelio con núcleos oscuros. (Fig. 25).



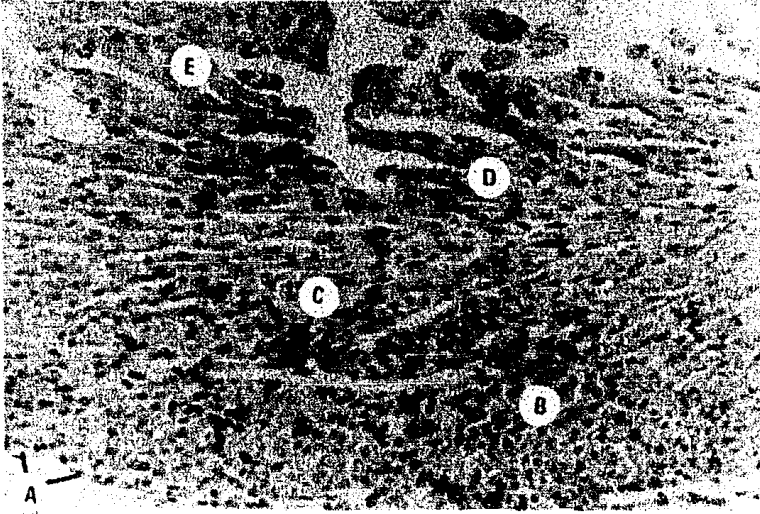


Fig.7- Corte longitudinal del corazón de un feto de ratón del lote testigo en el que se observa la pared del ventrículo constituida por el epicardio (A) el miocardio compacto (B) irrigado por numerosos vasos sanguíneos (C), el miocardio esponjoso (D) que forma abundantes trabéculas carnosas (E). 160 x



Fig.8.- Trabéculas carnosas (A) del corazón de un feto de ratón del lote testigo (tratado con suero fisiológico.) 500 x

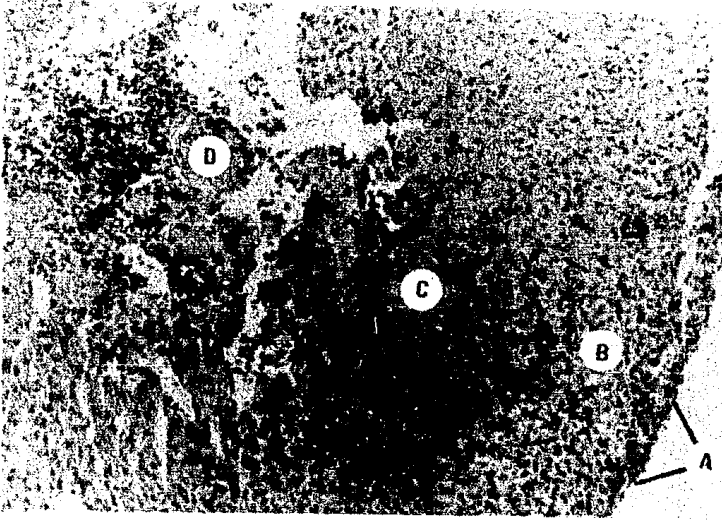


Fig. 9.- Pared ventricular del corazón de un feto de ratón, tratado con el disolvente del Diazepam en el que se observa el episcardio (A) el músculo compacto (B), el músculo esponjoso (C) con trabéculas carnosas bien diferenciadas (D) 160 x

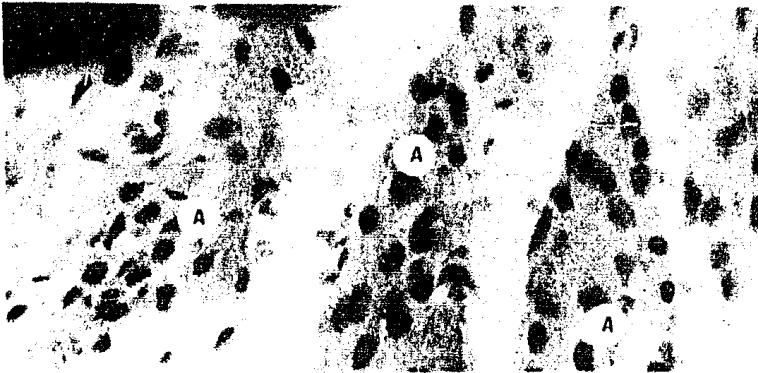


Fig. 10.- Trabéculas carnosas (A) del corazón de un feto de ratón tratado con el disolvente del Diazepam.

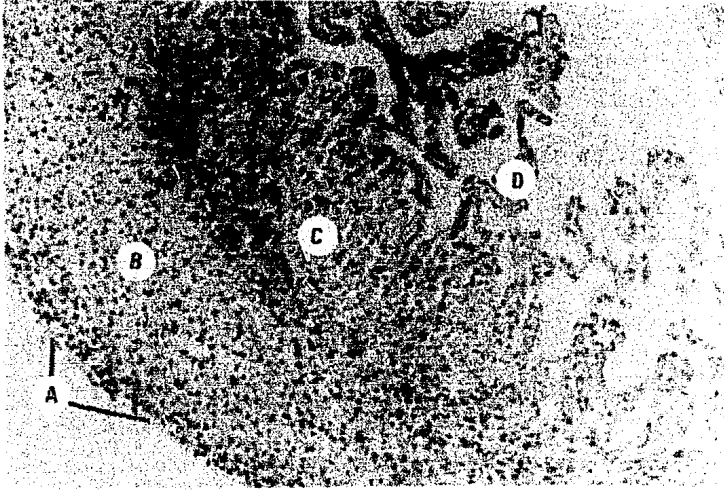


Fig. 11- Pared ventricular del corazón de un feto de ratón del -- grupo experimental, tratado con una dosis de Diazepam de 41.5  $\gamma$ /Kg. ( $V_{1.25}$ ), constituida por el epicardio (A) el miocardio compacto (B), el miocardio esponjoso (C) con numerosas trabéculas carnosas (D). 160 x

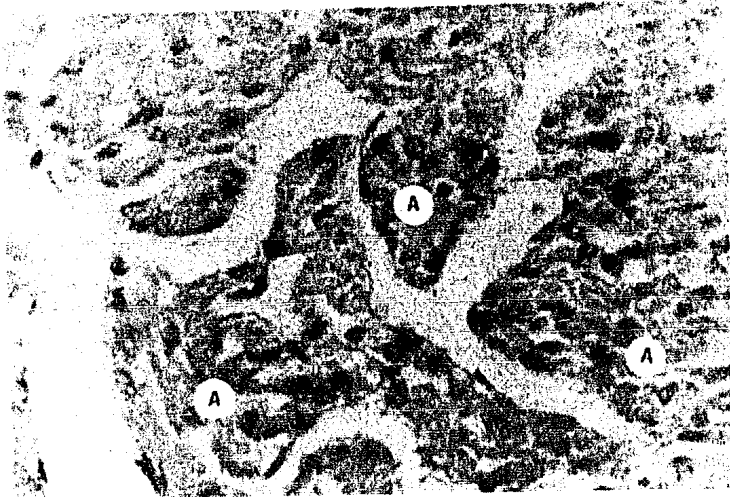


Fig. 12 - Trabéculas carnosas (A) del corazón de un feto del grupo experimental ( $V_{1.25}$ ) 500 x

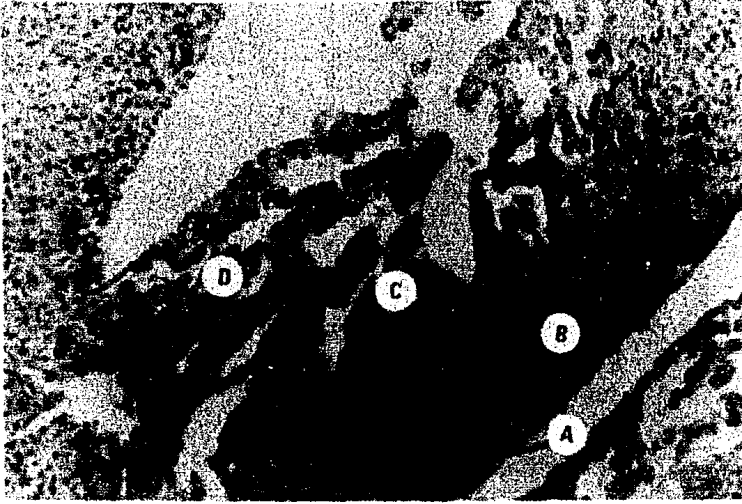


Fig. 13- Epicardio (A) miocardio compacto (B), miocardio esponjoso (C) y trabéculas carnosas (D) del corazón de un feto del grupo tratado con Diazepam a una dosis de 166  $\mu$ /Kg. (V<sub>5</sub>). 160x



Fig. 14- Trabéculas carnosas (A) del corazón de un feto de ratón del grupo V<sub>5</sub>. 500 x.

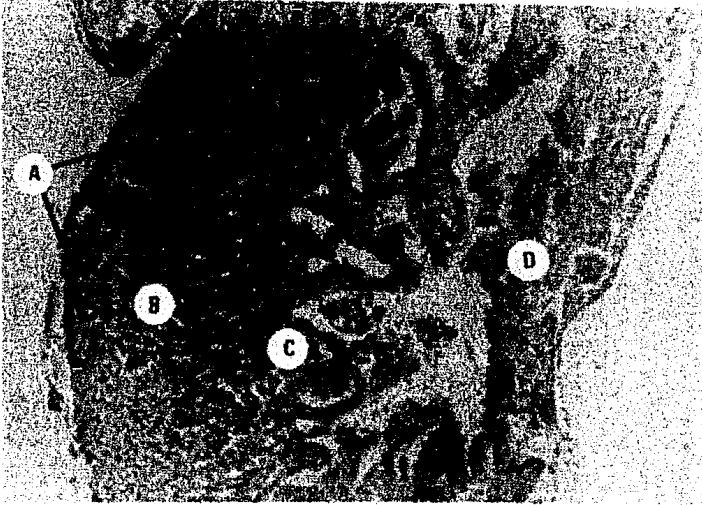


Fig. 15- Corte frontal del corazón de un feto de ratón tratado con una dosis de Diazepam de 664  $\mu$ /Kg. ( $V_{20}$ ), en el que se puede identificar el epicardio (A), el miocardio compacto (B), el miocardio esponjoso (C) y las trabéculas carnosas (D). 160 x



Fig. 16 - Trabéculas carnosas (A) del corazón de un feto de ratón del grupo  $V_{20}$ . 500 x

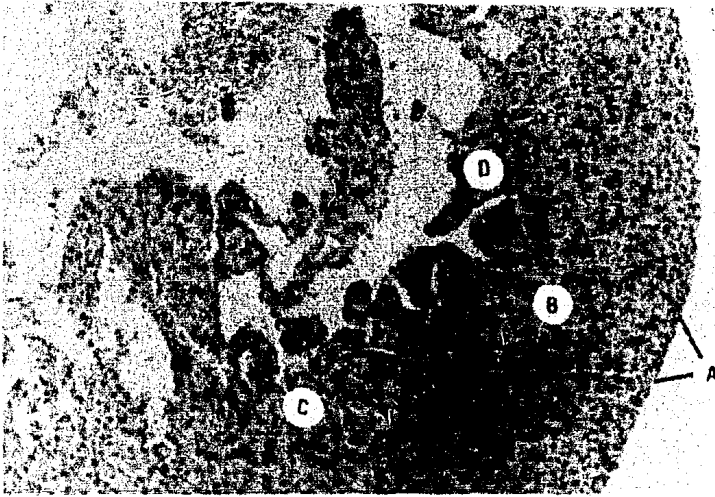


Fig. 17- Ventrículo del corazón de un feto de ratón del grupo experimental  $V_{40}$  (tratado con una dosis de Diazepam de 1,368  $\mu\text{g}/\text{Kg}$ ) en el que se observa el epicardio (A) el miocardio con sus zonas compacta (B) y esponjosa (C) engrosadas y las trabéculas carnosas (D) menos abundantes delgadas y cortas. 160 x

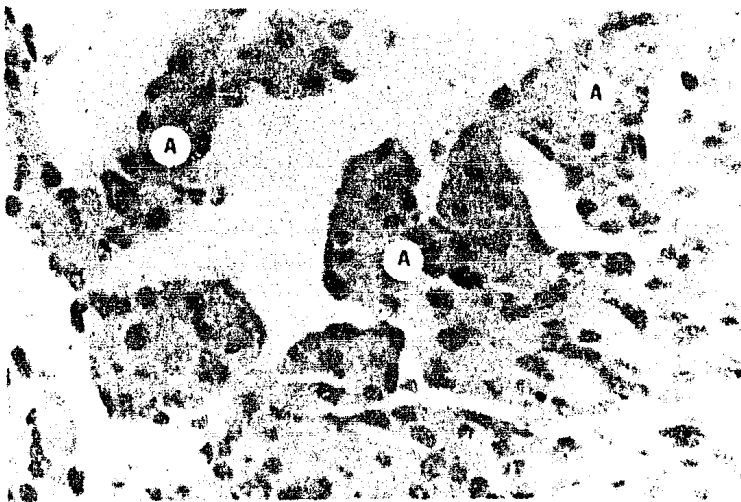


Fig. 18 - Trabéculas carnosas (A) cortas delgadas, escasas y poco entrelazadas del corazón de un feto de ratón del grupo  $V_{40}$ . 500 x

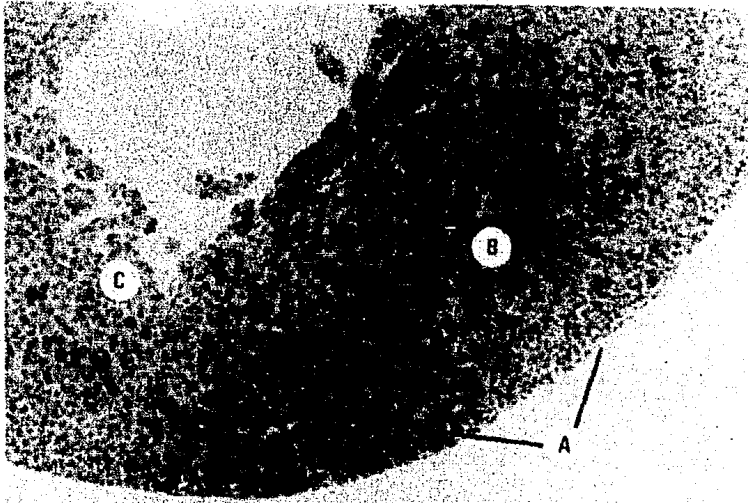


Fig. 19 - Pared ventricular del corazón de un feto de ratón del grupo V<sub>80</sub> (tratado con una dosis de Diazepam de 2,656 mg/kg) en el que se ve el epicardio (A), el miocardio compacto (B) grueso con abundantes fibras, el músculo esponjoso (C) poco diferenciado y con escasas, cortas y delgadas trabéculas carnosas. 160 x

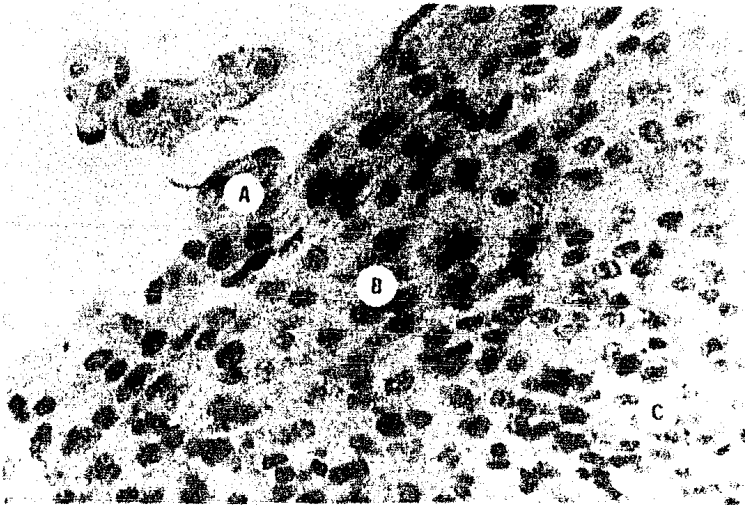


Fig. 20 - Aspecto que presentan las trabéculas carnosas (A), el músculo esponjoso delgado (B) y parte de músculo compacto (C) del corazón de un feto de ratón del grupo V<sub>80</sub>, que en éste caso son muy escasas cortas y delgadas. 300 x

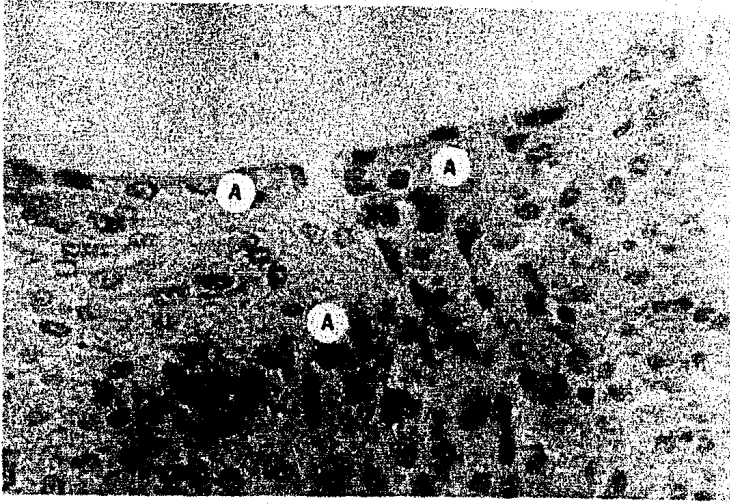


Fig. 21- Esbozos de trabéculas carnosas (A) del ventrículo del corazón de un feto de ratón del grupo V<sub>80</sub>. 500 x

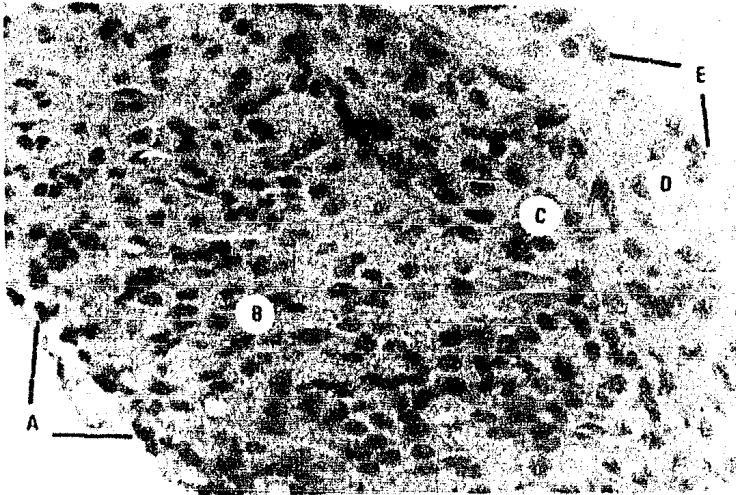


Fig. - 22 -Epicardio (A) músculo compacto (B), músculo esponjoso (C) y trabéculas carnosas (D) incluidas en la pared ventricular, cubiertas por el endocardio (E), del corazón de un feto de ratón del grupo V<sub>80</sub>. 500 x



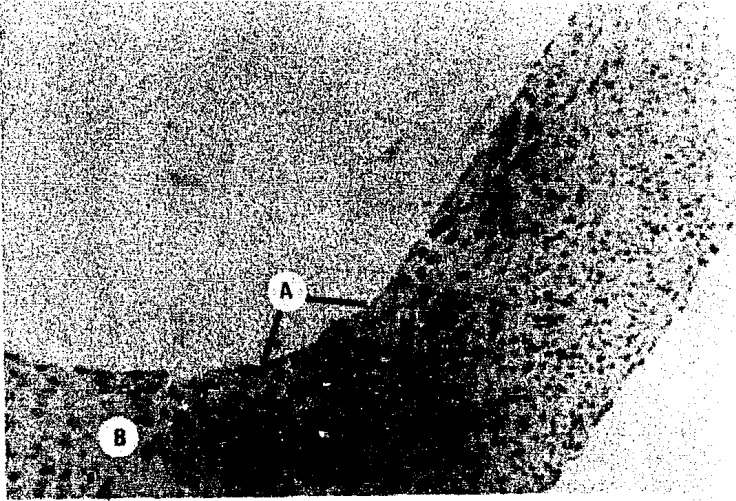


Fig. 23 - Pared ventricular del corazón de un feto de ratón del grupo  $V_{80}$  en el que se observa el endocardio liso (A) y el músculo esponjoso (B) carente de trabéculas carnosas diferenciadas. 160 x

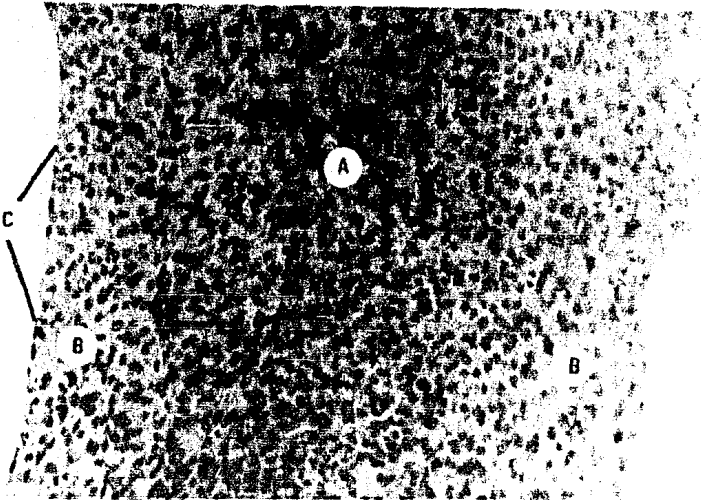


Fig. 24 - Corte del septo interventricular del corazón de un feto de ratón del grupo  $V_{80}$ , en el que se observa una amplia zona de miocardio compacto (A) y escaso miocardio esponjoso (B) que carece de trabéculas carnosas y está cubierto por el endocardio liso (C). 250 x

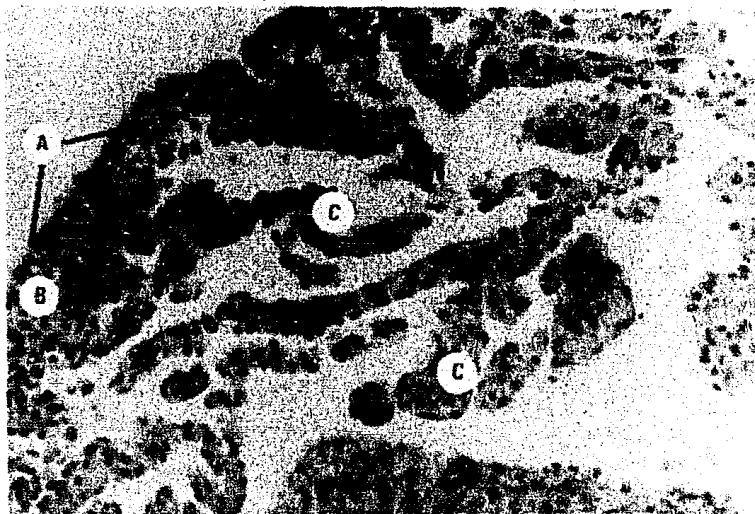


Fig. 25 - Corte de una aurícula del corazón de un feto de ratón del grupo  $V_{80}$  en el que se observa el epicardio (A) el miocardio compacto engrosado (B) y los músculos pectíneos (C). 250 x

VIII.- DISCUSION Y CONCLUSION.

A pesar de que los resultados del estudio histológico del corazón de los fetos tratados con las dosis de  $V_{1.25}$ ,  $V_{20}$  y  $V_{40}$  no muestran alteraciones aparentes al ser observadas con microscopio óptico, no se puede descartar la posibilidad de que existan a otros niveles, ya que Breen Stenchever (1970) al estudiar el efecto de varias dosis de Diazepam, en cultivos de fibroblastos tampoco pudieron encontrar alteraciones microscópicas, pero al continuar su estudio a microscopía electrónica de transmisión, hallaron que la arquitectura celular si estaba muy alterada y en particular la ultraestructura del citoplasma de las células tratadas con 20  $\mu$ /ml, en las que el retículo endoplásmico rugoso estaba distendido y presentaba gran cantidad de un material electrodensito disperso en todo el citoplasma, también contenía vesículas largas y conjuntos de vesículas irregulares en algunos casos y regulares en otros. El aparato de Golgi era abundante al igual que las estructuras fibrilares presentes en el espacio intercelular, además de elementos membranosos de forma compleja. Con dosis de 1 y 0.1  $\mu$ /ml. observaron alteraciones semejantes a las descritas con las dosis altas, solo que el número de células afectadas disminuyó. Todas estas modificaciones ultraestructurales repercutieron en el crecimiento de los cultivos, causando un retardo del mismo. Aparentemente el núcleo de las células no estaba afectado, sin embargo el hacer el cariotipo,

descubrieron que existían rupturas cromosómicas, por lo que en sus observaciones con las efectuadas por Erkkola y Kanto (1974) solo que éstos autores estudiaron el efecto de la misma droga "in vivo" lo cual explica el retardo del crecimiento tanto por una disminución de la mitosis de las células como por un funcionamiento anormal de los componentes celulares.

En base a esto se puede pensar que la disminución del peso y la talla del corazón de los fetos tratados con Diazepam, podría tener el mismo origen, pues aún cuando las dosis utilizadas en los cultivos, aparentemente son mayores que las suministradas a las hembras embarazadas y en éstas existen mecanismos homeostáticos que podrían modificar su efecto, por los trabajos de Idänpääm, Heikkila y col. (1971) Erkkola y Kanto (1974) se sabe que los niveles sanguíneos del Diazepam en los productos son mayores que en la madre y son comparables a las utilizadas por Breen y Stenchever (1970) en cultivo de tejidos.

Otro hecho importante es que el Diazepam, no solo circula en dosis mas altas en la sangre del producto que en la materna, sino que por los estudios autorradiográficos con Diazepam marcado con  $C^{14}$ , de Idänpääm Heikkila y col. (1971) y los de Erkkola y Kanto (1974) se demostró que se acumula en los tejidos fetales, en particular en el cardíaco, es retenido en éstos durante un período de tiempo muy superior al que permanecen en los maternos y es eliminado muy lentamente.

En la dosis de  $V_{80}$ , si es posible encontrar alteracioo

nes morfológicas en el corazón de los fetos estudiados, consistentes en un acortamiento evidente de los músculos papilares y un engrosamiento de la pared del miocardio, lo cual indica que cuando las modificaciones de la ultraestructura son mayores, pueden ser observadas aún con el microscopio óptico.

Por otra parte si las fibras cardíacas, como es probable están alteradas en su ultraestructura, tal vez su funcionamiento también sea anormal, lo cual no ha sido comprobado en este estudio, puesto que en principio se trató de determinar si el Diazepam acumulado en los tejidos, podría alterar su desarrollo morfológico. El postular ésta hipótesis se basa en lo observado por Scher J. and Beard (1972) en productos humanos que tuvieron alteración en la frecuencia cardíaca, a consecuencia de habérséle aplicado a la madre, durante el trabajo de parto una inyección endovenosa de 20 mg. de Diazepam.

Esta alteración diagnosticada por medio de electrocardiografía es explicada por los autores como una consecuencia de la aplicación del Diazepam que actúa sobre el sistema nervioso autónomo del corazón.

Sin embargo, es probable que en un principio éste sea el mecanismo de alteración del ritmo cardíaco y por un efecto crónico, no solo se afecta el control nervioso sino la respuesta del miocardio por la acumulación del Diazepam.

La hipótesis de que el uso crónico del Diazepam duran

te el embarazo, podría causar alteraciones del miocardio similares a las observadas en los fetos de los ratones del grupo de  $V_{80}$ , tal vez se comprobaría al estudiar el miocardio de productos mortinatos de madres tratadas con Diazepam durante la gestación, ya que por las diferencias genéticas y metabólicas que existen entre el hombre y los animales de laboratorio, no es posible extrapolar los resultados de éste trabajo.

De acuerdo a los datos obtenidos se observó que las cinco dosis de Diazepam utilizadas en éste estudio, alteran el desarrollo del corazón en forma significativa en cuanto a la talla y el peso.

En el corazón de los fetos tratados con  $V_{1.25}$ ,  $V_5$ ,  $V_{20}$  y  $V_{40}$  no se produjeron alteraciones tisulares visibles a microscopía óptica, con las técnicas de tinción utilizadas, pero no se descarta la posibilidad de que existan a nivel ultraestructural ó funcional.

Con la dosis de  $V_{80}$  los músculos papilares son escasos muy cortos y gruesos como si estuvieran contraídos y en algunas zonas no existen, observándose un engrosamiento de las paredes, ventricular y auricular, malformaciones que podrían ser la consecuencia de alteraciones ultraestructurales del miocardio y tal vez la causa de disfunción cardíaca.

A pesar de que la dosis de  $V_{80}$  fué la que afectó más el desarrollo cardíaco, no existe una correlación lineal dosis

respuesta, en cuanto al peso y la talla del corazón.

Aún cuando éste estudio fué hecho en animales de experimentación y no es posible extrapolar los resultados a humanos, es recomendable no usar el Diazepam durante el primer trimestre de la gestación, ya que no se puede asegurar que los altos niveles de benzodiazepinas observados en el corazón fetal humano por métodos autorradiográficos, no produzca los efectos indeseables observados en los fetos de ratón.

En los recién nacidos que reciben indirectamente éste fármaco de la madre a través de la circulación placentaria, sería muy difícil diagnosticarles alteraciones cardíacas estructurales ó fisiológicas, no muy evidentes al momento del nacimiento, mediante el estudio a que son sometidos rutinariamente.

Sería conveniente complementar éste estudio con una investigación de la estructura del tejido cardíaco, a nivel de microscopía electrónica y estudiar su fisiología.

IX. - BIBLIOGRAFIA.

- 1.- Anónimo, 1970. Valium Roche. Resumen Farmacológico y Clínico Edit. por Lab. Hoffmann-La Roche Buenos Aires Argentina.
- 2.- Breen, P.C. and Stenchever, M.A. 1970. Some Effects of Diazepam on the fine Structure of Human Fibroblasts in Tissue culture AM. J. Obstet. Gynecol. 108 : 520 - 530.
- 3.- Chai y C and S.C. Wang. 1966. Cardiovascular Actions of Diazepam in the Cat. The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics. 154 (2) : 257 - 271.
- 4.- De Haan L. Robert. PH. D. 1961 Differentiation of the Atrioventricular conducting sistem of the Heart. Circulation. J. AM Heart Assoc. 24 : 458 - 470
- 5.- Erkkola, R. CT. 1974 Diazepam in Early Human Pregnancy. Acta Obstet. Gynec. Scand 53 : 135<sup>5</sup> - 138.
- 6.- Farris J. Edmond and John a 1943 the Rat in Laboratory Investigation MC. Graw - Hill 2° Edición.
- 7.- Green, L. 1966 Biology of the Laboratory Mouse. MC. Graw.-- Hill New. York Toronto Sidney London 2° Edition 238 - 253.
- 8.- Greenblatt, J. David. Jan Koch-Weser 1973. Adverse Reactions to Intravenous Diazepam. The Journal of Medical Sciences. 226 (4): 261 - 265.
- 9.- Hurliman G. Reggiani and Theiss E. 1967 Some Aspects of the Experimental and clinical Toxicology of Chlordiazepoxide, Excerpta Medical International congress. Serie No. 145.
- 10.- Juhana, E. Idänpään.- Heikkila, Ronal y Col. 1971 Placental transfer of Diazepam C<sup>14</sup> in Mice, Hamsters and Monkeys. The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics 176 (3) : 752 - 757.
- 11.- Juhana, E. Idänpään, Pentti I, Joupila y Col. 1971. Placental Transfer and Fetal Metabolism of Diazepam in Early Human Pregnancy Am. J Obstet, Gynecol. 109: 1011- 1016.
- 12.- Luminov, I. B. Smolnikova M. Stekalova N. 1974. The effects of Diazepam on the Development of the Progeny. Biul Eksp. Biol. Med. 78 (10) : 66 - 68.



- 13.- Manasek, Francis J. 1970. Histogénesis of the Embrionic · Miocardium. The American Journal of Cardiology 25 :149-168.
- 14.- Mandelli, M. Morselli. 1975. Placental Transfer of Diazepam and its Disposition in the newborn. Clin. Pharmacol. Ther. 17 (5) : 564 - 572.
- 15.- Marcucci. Guaitani. A. 1968 Species Difference in Diazepam Metabolism, and Anticonvulsant Effect. Europeam Journal of Pharmacology. 4 : 467-470.
- 16.- Miller. R. Richard and Bernard A. Becker 1975 Teratogenicity of Oral Diazepam Diphenilhydantoin in Mice. Toxicology and Applied Pharmacology 32 : 53 - 61
- 17.- Mofil MD. Brinkman MD and Assali, NS. 1973. Effects of Diazepam on Uteroplacental and fetal Hemodynamics and Metabolism. Obstet. Gynecol. 41 (3) : 364 - 368.
- 18.- Morton. A. Stenchever. M.D. 1975. Some Effects of Diazepam on pregnancy in the Balb/C mouse. AM. J. Obstet. Gynaecol-March. 121 (6) : 765 - 770.
- 19.- Morton, A. Stenchever. MD. and Robert B. Frankel. 1969 Some Effects of Diazepam in Human Cells in Vitro. AM.J. Obstet. Gynaecol. 103 : 836 - 842.
- 20.- Morton A. Stenchever. M.D. Roberts. Frankel. 1970. Effect of Diazepam on Chromosomes of Human Leucocytes in vivo. Am. J. Obstet. Gynecol. 107 : 456 - 460.
- 21.- Rojas Ramírez V. 1975 Benzodiazepinas. Rev. Fac. de Med. -- 18(1) : 32 - 35.
- 22.- Rugh, Roberts. 1968. The Mouse its reproduction and Development Burgess Publishing Co. 268 - 272.
- 23.- Sher, J. Hailey DM. Beard R. W. 1972. The Effects of Diazepam on the fetus. The Journal of Obstetrics and Gynaecology of the British Common wert 79 : 635 - 638.
- 24.- Smithells, R. W. 1966. Diazepam in Pregnancy - Practitioner 196 : 599.
- 25.- Stecher, P.G. 1968. The Merck Index. Am. Encyclopedia of Chemicals and Drugs. Merck Co. Inc. octava edición 341.

- 26.- Tuchman - Duplessis. 1967. Embriología Cuadernos Prácticos Catedra de la Facultad de Medicina de París. Toray - Masson S. A. Barcelona España 104 - 137.
- 27.- Van der. Kleijn. E. 1969. Kinetics of Distribution and Metabolism. of Diazepam and Chlordiazepoxide in Mice. Arch. int. Pharmacodyn 178 (1) ; 193 - 215.
- 28.- Vidrio Horacio 1974. Bases Farmacodinámicas de la interacción de Farmacos. Rev. Fac. DE MED. 17 ( 2 ) : 23 - 26.

### FE DE ERRATAS

*Hoja I párrafo 4 dice caterismo debe decir cateterismo.*

*Hoja 29 párrafo 2 dice creciente debe decir decreciente.*