

24/ 53

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS



ESTUDIO MORFOLOGICO DE LA PLACENTA DE
Mus musculus DE LA CEPA CD-1 TRATADOS
CON DIAZEPAM (VALIUM).

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

MARIA HILDA FLORES OLVERA

MEXICO, D. F.

1980



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.

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

INDICE

	PAGS.
I.- RESUMEN.....	1-2
II.- ANTECEDENTES BIBLIOGRAFICOS.....	3-10
III.- ORIGEN, DESARROLLO E IMPORTANCIA DE LA PLACENTA DE RATON.....	11-16
IV.- OBJETIVO.....	17-18
V.- MATERIALES Y METODOS.....	19-21
A) METODOLOGIA EMPLEADA EN EL ESTUDIO MORFOLOGICO.....	22
B) METODOLOGIA EMPLEADA EN EL ESTUDIO ESTADISTICO	22-23
VI.- RESULTADOS	
A) RESULTADOS MORFOLOGICOS.....	24-44
B) RESULTADOS DEL ESTUDIO ESTADISTICO..	45-49
VII.- DISCUSION Y CONCLUSIONES.....	50-56
VIII.- BIBLIOGRAFIA.....	57-62

I.- RESUMEN

Este estudio forma parte del proyecto de investigación, que se viene desarrollando en el Departamento de Embriología de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México sobre, "Efectos del diazepam - (Valium) sobre el desarrollo de ratones de la Cepa CD-1", - dirigido por la M. en C. Ma. Cristina Márquez Orozco.

El diazepam es una droga psicotrópica muy empleada en medicina, por su amplio espectro de acción clínica. Las investigaciones que se han hecho, no han permitido tener - un conocimiento claro acerca de su posible efecto sobre el desarrollo embrionario. Sin embargo, se sabe que este fármaco atraviesa la barrera placentaria y se acumula en ella, por lo que podría tener efectos sobre la morfología de esta estructura.

Para tratar de comprobar esta hipótesis, se utilizaron siete grupos de ratones hembras preñadas de la Cepa CD-1, que se inyectaron diariamente del sexto al décimoséptimo día de la gestación por vía intraperitoneal con dosis de diazepam de 0.042 mg/Kg el primero, de 0.166 mg/Kg el - segundo, de 0.666 mg/Kg el tercero, de 1.333 mg/Kg el cuarto y de 2.666 mg/Kg el quinto, con el disolvente del diazepam el sexto y con suero fisiológico el séptimo.

El décimooctavo día de la gestación, las hembras se sacrificaron por decapitación y se disectó el útero. Las placentas libres del amnios y del corion liso se pesaron, - seccionaron y fijaron en formol al 10% o en los líquidos - de Bouin, Rossman o Zenker. Se hicieron cortes de 5 μ m que

se tiñeron por las técnicas de Hematoxilina-eosina o Hematoxilina férrica de Weigert.

Las observaciones realizadas con el microscopio óptico, revelaron que las dosis de diazepam empleadas alteran la estructura histológica de la placenta. Provocan adelgazamiento de la barrera placentaria, disminución de la talla de los núcleos de las células gigantes, vacuolización del citoplasma de las mismas y de las células de las capas trofoblásticas 1, 2 y 3, así como aumento en la amplitud de los espacios intervelllosos.

El estudio estadístico del peso de la placenta, mostró una disminución significativa con cuatro de las dosis administradas, a excepción de la de 2.666 mg/Kg

Aún cuando no es posible extrapolar los resultados obtenidos en la placenta de ratón al hombre, se sugiere por precaución no utilizar el diazepam durante la gestación humana, mientras no se pruebe si causa efectos similares en el hombre.

II.- ANTECEDENTES BIBLIOGRAFICOS

El diazepam, conocido con el nombre comercial de Valium, es una droga psicotrópica perteneciente al grupo de las benzodiazepinas, que es un conjunto de sustancias sintéticas relacionadas estructuralmente, que tienen aplicación terapéutica como ansiolíticos (Rojas, 1975).

Fue sintetizado en 1960 por Sternbach y Reeder, publicado en el Journal Organic Chemistry y registrado con el número 26,49361 (Stercher, 1968). Su fórmula química es 7-cloro-1,3-dihidro-1 metil-5-fenil-2H-1,4-benzodiazepina-2-ona.

Es un compuesto sólido, cristalino, incoloro, soluble en lípidos y su peso molecular es de 284.74.

Introducido al mercado en 1963 por los laboratorios F. Hoffmann-La Roche & Co. Ltd., Basilea, Suiza ha sido sujeto a diversos tipos de investigaciones que han permitido conocer mucho acerca de su espectro de acción clínica. Obra Valium Roche (Anónimo, 1970).

Es uno de los tranquilizantes que más se ha usado, a partir de que esta propiedad fue comprobada experimentalmente en mono y ratón, ya que se logra suprimir la conducta agresiva mediante la aplicación de dosis sedantes. Por no ser hipnótico resulta un éxito en el tratamiento de estados psiconeuróticos caracterizados por tensión, ansiedad, fatiga o síntomas depresivos. También disminuye la aprehensión, el insomnio y el temor propios de pacientes con problemas de personalidad, con cáncer, en cuadros de historia-

y en víctimas de accidentes, así como en otros transtornos emocionales y psicosomáticos.

Es suministrado antes de la anestesia general, - para contrarrestar la tensión que se presenta normalmente, en personas que van a ser intervenidas quirúrgicamente y - como premedicación en procedimientos endoscópicos.

Por los estudios realizados hasta el momento (Rojas, 1975), se presume que el diazepam ejerce su acción psicotrópica sobre el sistema límbico, que es la región del cerebro que gobierna gran parte de las emociones y está constituida por el núcleo amigdalino, el hipocampo y las zonas septales entre otras. A dosis bajas, de 0.5 mg/Kg - provoca en el hipocampo una disminución de la actividad eléctrica espontánea, que se generaliza a todas las regiones del sistema límbico al usar dosis más elevadas, que producen sedación.

Actúa sobre el sistema reticular del tallo cerebral, causando efectos colaterales como sedación, somnolencia, confusión, apatía, relajación, debilidad muscular, incoordinación motora, visión borrosa, vértigo y ataxia.

Su administración frecuente puede causar dependencia psíquica y fisiológica, con tratamientos prolongados, los pacientes llegan a desarrollar ideas e intentos suicidas y en casos de franca adicción ha causado intoxicaciones con dosis de 100 a 500 mg.

Se ha demostrado su efecto anticonvulsivo en ratón, y miorrelajante en gato, por lo que ha sido empleado en humanos en el tratamiento de muy variadas modalidades de espasmos musculares, como los que se presentan en parálisis cerebral; en atetosis, que es la imposibilidad de mantener en -

posición fija los dedos de las manos o pies, que están - agitados por movimientos lentos y extensos involuntarios; en esclerosis múltiple (enfermedad degenerativa del tejido nervioso) y, en accidentes cerebrovasculares. También se emplea en casos de hemiplejía, paraplejía, tétanos, - asma, epilepsia y en afecciones reumáticas y espásticas - en general.

Es auxiliar en algunos tipos de dismenorrea, en los trastornos característicos de la menopausia, durante embarazos que cursan con actividad anormal o prematura - del útero y en casos de placenta previa, pues produce - efecto sedante sobre el miometrio y evita hemorragias uterinas.

Constituye una ayuda efectiva durante el trabajo de parto, ya que acorta el tiempo de expulsión del producto y debido a estas propiedades es utilizado en la aplicación de forceps, como premedicación en operaciones cesáreas y en el manejo de la pre-eclampsia que es un síndrome que se presenta durante la segunda mitad del embarazo y se caracteriza por albuminuria, hipertensión arterial y edema generalmente de miembros inferiores, y de la eclampsia, que es un cuadro clínico similar al anterior acompañado de convulsiones, afecciones neurológicas, renales y cardiovasculares.

Estos usos se han extendido pues algunos autores como Joyce, Berger y Bepko, citados en Mandelli et al. - (1975), opinan que el diazepam es inocuo para la madre y el producto. Sin embargo otros autores como Flowers et al. (1969) citados en Scher et al. (1972) los han rebatido por haber encontrado que los niños de madres tratadas durante el parto con diazepam presentan hipotonía, hipotermia, depresión

neurológica y respiratoria, así como un Apgar de 5 a 6, - al minuto de haber nacido.

Recientemente Scher et al. (1972) descubrieron que en los niños nacidos de madres a las que se les administraron 20 mg de diazepam, por vía endovenosa durante el trabajo de parto, fue notoria la disminución de las fluctuaciones de la frecuencia cardíaca, que normalmente son de 120- a 160 latidos por minuto con un promedio de disminución de 23 latidos por minuto, observando que con el diazepam sólo disminuyen un promedio de 7 latidos, con una variación entre 5 y 9 por minuto, recuperándose en un promedio de 65 - minutos después de la inyección y al igual que Flowers - et al. encontraron baja la cifra de Apgar, que para estos productos fue de 6 aún 5 minutos después del nacimiento.

La distribución del diazepam y la de sus metabolitos en el organismo de ratones adultos se conoce gracias a Van Der Kleijn, (1969) quien suministró por vías - oral y endovenosa diazepam marcado con C^{14} , para estudiar autorradiográficamente su distribución, a diferentes intervalos después de su aplicación. Para esto utilizó los métodos cromatográficos de capa fina, el análisis bioquímico de los tejidos y cuantificó la excreción en orina, hallando que después de 5 minutos el diazepam marcado estaba en la sustancia gris del cerebro, a los 30 minutos pudo localizarlo en la sustancia blanca del cuerpo calloso, del mesencéfalo y de la médula espinal y a las 24 horas, lo detectó en algunos nervios como el trigémino, el óptico y los espinales.

En cuanto al sistema cardiovascular, observó que en el miocardio, el bazo y los nódulos linfáticos la acumulación del diazepam fue rápida. Otros órganos en los que al-

canzó concentraciones altas fueron: el hígado, la mucosa y la luz del intestino delgado, el estómago, el colon, el recto, los riñones, los ojos, principalmente en la coroides y en las glándulas lagrimales y en la nariz lo encontró en las cavidades nasales. Demostró también su presencia en la hipófisis, la corteza y la médula de las glándulas suprarrenales, los ovarios, en particular en los cuerpos lúteos, en los pulmones y en la grasa parda.

Idänpään-Heikkilä y colaboradores demostraron - en 1970, por medio de diazepam marcado con C^{14} , que este tranquilizante y sus metabolitos pasan a través de la placenta de ratón, hamster y mono, observando que a medida que avanza la gestación atraviesa con más rapidez, alcanzando el óptimo en la última parte de la misma o sea en el período de la vida intrauterina del mono, que es equivalente al último trimestre del embarazo humano y en el ratón y en el hamster al primero.

Otra de sus observaciones fue, que la barrera placentaria de las dos últimas especies, es más efectiva que la del mono para evitar el paso del diazepam y por medio de técnicas autorradiográficas, demostraron que no sólo pasa la barrera placentaria, sino que su distribución en los tejidos fetales es muy semejante a la encontrada en el adulto y que es retenida durante un período mayor en el feto que en la madre.

Poco tiempo después (1971), los mismos autores comprobaron la transferencia del diazepam a través de la placenta humana. Para esto, estudiaron a mujeres embarazadas en las que se practicó aborto por histerectomía, durante el primer trimestre de la gestación y a las cuales

se les suministraron 5 mg de diazepam marcado con C^{14} , - aplicado por vía intramuscular 1, 2 ó 6 horas antes de - la intervención quirúrgica. Una vez obtenidos los pro-- ductos, se disectaron y sus tejidos fueron homogenizados para poder medir su radioactividad y por lo tanto cono-- cer la acumulación del fármaco, que fue evidente en el - tracto gastrointestinal, en el hígado, en el cerebro, en la médula espinal, en los nervios periféricos, en la san-- gre y en la placenta, detectando mayor concentración en el feto que en la madre.

Erkkola et al. (1974) administraron diazepam - marcado con C^{14} , a mujeres embarazadas con productos del primer trimestre, a las que se les practicó aborto por - histerectomía. A un grupo de estas pacientes se les ad-- ministró una dosis única de diazepam de 10 mg de 40 a - 120 minutos antes de la intervención quirúrgica y al com-- parar las concentraciones de diazepam y N-demetildiazepam presentes en las sangres materna y fetal, las diferencias no fueron significativas. Sin embargo, en otro grupo de-- pacientes tratadas con 5 mg aplicados 3 veces al día, du-- rante períodos de 9 a 30 días, se observaron diferencias-- altamente significativas entre las concentraciones plasmá-- ticas del diazepam y el N-demetildiazepam en la madre y - el producto, comprobando que son considerablemente mayo-- res en el plasma materno, que en el fetal y que el N-deme-- tildiazepam se encuentra en grandes cantidades en el híga-- do fetal y por esta razón sugieren que es muy probable, - que las células hepáticas intervengan activamente en su - metabolismo.

A consecuencia de sus investigaciones, enfatiza ron la gran importancia de evitar la prescripción de esta droga a pacientes embarazadas, ya que mediante sus ex perimentos hallaron en los tejidos fetales, concentraciones de diazepam de $\mu\text{g/ml}$, comparables a las que Breen y Stenchaver (1970) utilizaron en cultivo de tejidos, descubriendo que con estas dosis, los elementos de la mem- brana celular de los fibroblastos humanos se deforman, - hay rupturas cromosómicas y retardo del crecimiento celu lar.

Con respecto a la teratogenicidad del diazepam, Miller y Becker (1975) comprobaron que la administración de dosis elevadas, por vía oral, producen un efecto tera tógeno similar al que causa la difenilhidantoína (Dilantin, Parke Davis); que es un medicamento análogo al diazepam en cuanto a estructura molecular, y en la propie- dad anticonvulsiva. Descubrieron que la difenilhidantoí na, causa en ratón paladar hendido cuando es administrada durante los días 11 al 14 de la gestación, y que el - diazepam causa un marcado decremento del peso corporal - del feto, después de la administración de 500 mg/Kg los días 12, 13 y 14 de la gestación y de 400 mg/Kg al ser - administrada del día 11 al 14. También comprobaron un - incremento en la frecuencia de paladar hendido, mediante la administración del diazepam los días 11, 12 y 13 a una concentración de 140 mg/Kg y cuatro casos de anomalías - esqueléticas con la administración de 500 mg/Kg durante los días 10 al 15 de la gestación.

Otro hallazgo importante, con respecto a la teratogenicidad causada por benzodiazepinas, fué hecho por Milkovich y Van Der Berg (1974) quienes estudiando el -

Librium (Clordiazepóxido), encontraron que niños nacidos de madres tratadas durante el embarazo con este fármaco, presentaron microcefalia, atresia duodenal, divertículo del fleon, hipoactividad, hipotonicidad muscular y retrso mental.

III.- ORIGEN, DESARROLLO E IMPORTANCIA DE LA PLACENTA DE RATON.

La placenta es un órgano transitorio, que desarrollaron los animales terrestres, como una adaptación para la viviparidad.

Su importancia para los mamíferos, radica en que durante la gestación desempeña funciones de pulmón, tracto gastrointestinal, hígado, riñón, glándula endocrina y barrera física entre el producto y la madre.

Funciona como un pulmón, pues permite el intercambio de O_2 y CO_2 , mientras los fetos permanecen en un medio acuático y sus pulmones están colapsados. Actúa como tracto gastro-intestinal, puesto que es capaz de digerir, por medio de enzimas a los glúcidos, lípidos y proteínas presentes en el endometrio y la sangre materna, permitiendo por difusión simple o facilitada, transporte activo, la absorción de agua, sales, iones y vitaminas indispensables para el desarrollo de los productos. Por pinocitosis pueden pasar también anticuerpos maternos, favoreciendo la inmunización pasiva de los fetos.

Funciona como hígado, ya que es capaz de almacenar temporalmente glucógeno, mientras el hígado fetal es un centro hematopoyético importante.

Es un sustituto eficiente de las funciones renales durante la vida intrauterina, tanto en el hombre como en el ratón, puesto que elimina de la sangre fetal todos los productos nitrogenados de desecho, como son la creatina, la urea y el ácido úrico, siendo tan efectivo-

al realizar esta función, que fetos con agenesia renal, - pueden llegar al término de la gestación.

La placenta también es importante por actuar como una glándula endócrina, ya que produce una gran cantidad de hormonas como el estrógeno y la progesterona, hormonas que al inicio del embarazo, son formadas en los cuerpos - amarillos de los ovarios de la madre y son indispensables para mantener en etapa progestacional al endometrio durante toda la gestación. La gonadotropina coriónica (HGC) - que estimula a los cuerpos amarillos, para que estos formen estrógenos y progesterona al inicio de la preñez, - mientras la placenta aún no ha alcanzado a secretar cantidades suficientes de estas hormonas, necesarias para mantener el embarazo, también es elaborada en la placenta.

Además de todas las funciones placentarias mencionadas, hay una muy importante, que es la de barrera física puesto que impide la mezcla de las sangres fetal y materna, el paso de algunos microorganismos que infectan a la madre, como bacterias, protozoarios y hongos en general y el paso de sustancias con peso molecular mayor de 1000, las cuales podrían ser dañinas para los productos.

Debido a que la barrera placentaria de ratón es muy reducida, la velocidad de intercambio entre las sangres materna y fetal, es mayor que la presente en otros tipos de placentas y aumenta a medida que avanza la gestación. Este fenómeno guarda una relación directa con el adelgazamiento de la barrera.

Existen diferentes criterios para la clasificación de la placenta, uno de ellos toma en cuenta el origen de los tejidos placentarios, considerándose que en el ratón es corio-alantoidea, ya que los vasos que irrigan al corion son los alantoideos.

De acuerdo con Björkman (1970), que sigue un criterio morfológico, la placenta de ratón es de tipo discoidal. Por la naturaleza de la superficie de contacto materno-fetal es laberíntica y por la relación que existe entre el corion y los tejidos maternos es hemocorial, pues el trofoblasto destruye la capa funcional del endometrio, incluyendo el endotelio de los vasos uterinos, por lo cual la sangre materna se extravasa en los espacios intervillósos y baña a las vellosidades coriales. Abundando un poco sobre este último criterio, es necesario mencionar que la clasificación más utilizada a nivel de microscopía óptica, es la propuesta por Grewer (citado en Björkman) -- (1970), que se basa en el número de capas celulares que se interponen entre los torrentes sanguíneos fetal y materno.

La parte fetal comprende al corion irrigado por los vasos alantoideos y se compone de tres tejidos que son: el endotelio de los vasos coriales, el mesénquima y el trofoblasto. La parte materna está constituida básicamente por tres capas: el epitelio uterino, tejido conectivo y el endotelio de los vasos uterinos. Sin embargo se ha demostrado, que no necesariamente todas estas capas participan en la formación de la barrera física, que se interpone entre las dos circulaciones y pueden reducirse considerablemente en algunos mamíferos, en cambio el componente fetal siempre permanece intacto.

Mientras la placenta del ratón fue estudiada con el microscopio óptico, se pensó que el trofoblasto desaparecía al avanzar el desarrollo y sólo se conservaba el endotelio de los vasos coriales, bañado directamente por la sangre materna y la clasificaban como hemoendoteliorial. Actualmente, los estudios realizados con la ayuda del microscopio electrónico, han aclarado que la placenta de ratón es de tipo hemocorial modificado, en la que el mesénquima de las vellosidades prácticamente ha desaparecido, pero el trofoblasto, aún cuando está muy adelgazado existe y está rodeando a los vasos coriales.

Por último, según la terminología de Enders, citado en Björkman, (1970) sería hemotricorial, por presentar tres capas de trofoblasto.

La placenta tiene un doble origen, ya que esta constituida por tejidos fetales y maternos. El inicio de su formación es la implantación del blastocisto en el endometrio, fenómeno que en la especie Mus musculus, se lleva a cabo del cuarto al quinto día de gestación (Rugh, 1968), cuando el trofoblasto del blastocisto libera enzimas citolíticas y proteolíticas, que erosionan al endometrio desencadenando la llamada reacción decidual, Methe--rington (1971), que consiste en un aumento de volumen y cambios metabólicos de las células endometriales, que tienden a cubrir al blastocisto hasta que queda incluido en el tejido uterino, que forma desde este momento las decidas basal, capsular y parietal. La primera de las cuales, tiene irrigación propia y será la parte materna de la placenta, la segunda es la que cubrió al blastocisto, no tiene irrigación propia y está en contacto con el corion liso. La última es el endometrio que no participa directamente en la implantación.

Mientras el blastocisto se implanta, de la parte interna del botón embrionario, se diferencia el endodermo del embrión y el saco vitelino, que tiene la peculiaridad de plegarse hacia la región dorsal del botón embrionario, cuando aún no se ha diferenciado de éste, el endoblasto y el mesodermo. Poco tiempo después las células del botón embrionario, que no participan en la formación del endodermo, se reacomodan y empiezan a aparecer entre ellas pequeños espacios intercelulares, que se reúnen para originar la cavidad amniótica, que está delimitada por el ectodermo del embrión y el epitelio amniótico.

Aproximadamente al séptimo día de la gestación - la cavidad amniótica, en un principio única se subdivide en dos compartimientos, uno inferior que es la cavidad amniótica definitiva y otro localizado por encima de ésta, que constituye la cavidad ectoplacentaria.

Por supuesto, ambas cavidades son revestidas por células ectodérmicas extraembrionarias. De éstas, las que delimitan a la cavidad ectoplacentaria proliferan activamente, formando el cono placentario, que avanza hacia el tejido materno presionando al trofoblasto, rompiendo vasos uterinos y penetrando entre las células trofoblásticas, cercanas al cono que dará origen a las células gigantes, cuya función es evitar reacciones inmunológicas de rechazo a los embriones y probablemente estén relacionadas con la producción de hormonas, de acuerdo con Deane et al. (1962) además de ser hormonodependientes.

Al tiempo que está sucediendo la formación del amnios, - se diferencian el mesodermo embrionario y el extraembrio nario. Este último se pone en contacto con el trofoblas to para originar el corion. El mismo mesodermo extraem brionario rodea al alantoides que lo induce a formar va sos sanguíneos, que al penetrar a las vellosidades del - corion toman el nombre de vasos coriales. Las vellosida des coriales vascularizadas son las definitivas, que co mo ya se mencionó, están bañadas por la sangre materna - extravasada de las arteriolas de la decidua basal. El - espacio intervelloso en el que circula la sangre materna es muy estrecho y se encuentra entre las vellosidades - que constituyen un verdadero laberinto placentario.

IV.- O B J E T I V O

Los recientes estudios realizados en el campo de la embriología experimental, han demostrado que diversos medicamentos de uso común, como antibióticos, antitumorales, progestágenos orales, alcaloides, tranquilizantes, etc., son capaces de atravesar la barrera placentaria desde las primeras semanas de la gestación y pueden alterar el desarrollo. Estos resultados no sólo se conocen por medio de las investigaciones hechas en animales de laboratorio como rata, ratón, hamster, cuy, mono y conejo, sino que actualmente ha sido posible determinar el poder teratogénico que algunos de ellos tienen sobre el feto humano, como es el caso de la talidomida, de los andrógenos, de los progestágenos orales, de los estrógenos y agentes antileucémicos como el busulfán y la aminopterina.

Aunque el uso de drogas durante el primer trimestre de gestación debe evitarse en general, existen complicaciones psiquiátricas del embarazo, en las que se requiere el uso de tranquilizantes, entre los que es muy frecuentemente empleado el diazepam. Por otra parte este fármaco es utilizado en ginecobstetricia con éxito, en algunos casos de amenaza de aborto, como agente tocolítico en embarazos que presentan actividad prematura de útero, en el tratamiento de pacientes con placenta previa, en la eclampsia y en la pre-eclampsia.

Estos usos terapéuticos y el continuo aumento que muestra en la actualidad el consumo de este sedante del-

sistema nervioso, han despertado el interés de aclarar -- cual es la acción que ejerce sobre el desarrollo normal, -- ya que aún cuando se ha trabajado experimentalmente a este respecto, existen pocos estudios médicos y biológicos -- que ayuden a aclarar si el diazepam altera o no directamente el desarrollo del producto, pues se ha comprobado -- que atraviesa la barrera placentaria y se acumula en ella y en los tejidos fetales. Por esto resulta de gran importancia determinar si este medicamento modifica la estructura morfológica de la placenta; que siendo el órgano de intercambio entre madre y feto, debe mantener su integridad para asegurar el desarrollo normal del producto.

Además como han demostrado Stenchever et al. - (1970, 1975) y Miller et al. (1975) elevadas dosis de diazepam (140, 400 y 500 mg/Kg), administradas a ratones hembras de laboratorio durante diferentes días de la gestación, causan efectos teratogénos, tales como la focomelia, el paladar hendido, anomalías esqueléticas, alteraciones en el peso fetal y rupturas cromosómicas. Por otra parte, Breen (1970) comprobó que el diazepam altera la membrana celular de fibroblastos humanos y retarda el crecimiento celular.

Con el objetivo de comprobar si el diazepam acumulado en los tejidos placentarios afecta su morfología o es inocuo, se proyectó hacer un estudio cualitativo de sus estructuras complementando con un análisis estadístico que permitiera determinar si las alteraciones encontradas por los autores antes mencionados, en el peso fetal, pudieran estar relacionadas con la fisiología de la placenta. También se trató de investigar si el peso de este órgano se altera al acumular el diazepam y sus metabolitos.

V.- MATERIALES Y METODOS

Los animales de experimentación usados fueron ratones blancos de la Cepa CD-1, de la especie Mus musculus de 5 a 7 meses de edad. Se aparearon hembras virgenes de 25 a 30 g de peso con machos de 30 a 35 g en grupos de 3:1 respectivamente, durante una hora entre las 7 y 8 a.m. Enseguida se separaron a las hembras de los machos, se determinó la presencia del tapón vaginal que se tomó como el inicio del embarazo, fueron pesadas, marcadas y se dejaron desarrollar normalmente hasta el sexto día de la gestación, en que se formaron siete grupos para iniciar los tratamientos, que consistieron en - inyectar por vía intraperitoneal, cinco dosis de diazepam, el disolvente del mismo o suero fisiológico.

Los grupos experimentales fueron:

- Grupo 1. V1.25.-Recibió una dosis de diazepam de 0.042 mg/Kg por día, que equivale a inyectar 2.5 mg a una persona de 60 Kg de peso.
- Grupo 2. V5.-Las hembras de este grupo recibieron una inyección diaria de diazepam de 0.166 mg/Kg que corresponde a la dosis terapéutica de 10 mg por 60 Kg de peso.
- Grupo 3. V20.-A este grupo se le aplicaron diariamente 0.666 mg de diazepam /Kg. En equivalente a que un humano de 60 Kg recibiera una dosis de 40 mg por día.

- Grupo 4. V40.-La inyección diaria de diazepam que recibieron los ratones hembras de este grupo, fue de 1.333 mg/Kg que es igual a administrar 80 mg a una paciente con 60 Kg de peso.
- Grupo 5. V80.-La mayor dosis experimentada fue la que recibió este grupo, de 2.666 mg de diazepam /Kg o sea como si se le inyectaran 160 mg a un individuo de peso corporal de 60 Kg que aún está por debajo de la dosis de mantenimiento en el humano que es de 200 mg diarios por 60 Kg de peso.
- Grupo 6. T.-Los ratones hembras de este grupo, recibieron el disolvente del diazepam proporcionado por los Laboratorios F. Hoffmann-La Roche & Co. Ltd., - Basilea, Suiza, inyectado en las mismas cantidades en que se administró con el diazepam a los grupos experimentales anteriores.
- Grupo 7. S.-Fue un grupo control inyectado con suero fisiológico, en cantidades equivalentes al disolvente del diazepam, suministrado a los grupos anteriores.

Los tratamientos de todos los grupos se continuaron del sexto al decimoséptimo día de la gestación. El décimooctavo día se sacrificaron por decapitación, para evitar el uso de anestésicos que atraviesan la barrera placentaria y pudieran modificar los resultados.

GRUPO	DOSIS INYECTADA EN EL RATON	DOSIS EQUIVALENTE AL SER HUMANO
V1.25	0.042 mg/Kg	2.5 mg/60 Kg
V5	0.166 mg/Kg	10 mg/60 Kg
V20	0.666 mg/Kg	40 mg/60 Kg
V40	1.333 mg/Kg	80 mg/60 Kg
V80	2.666 mg/Kg	160 mg/60 Kg

Una vez disectado el útero, se obtuvieron los -
fetos cubiertos por el amnios y el corion liso, unidos-
a las placentas por el cordón umbilical, a continuación
se liberaron de sus cubiertas, procurando recortar la -
mayor parte del amnios y del corion liso, dejando lim-
pia la placenta. Enseguida se comprimió y seccionó la-
porción del cordón umbilical proximal al abdomen, que -
quedó unido a la placenta, la cual se pesó en una ba-
lanza analítica. Después se seccionó radialmente y los
fragmentos fueron fijados durante 24 horas en alcohol -
absoluto, o en los líquidos de Zenker, de Bouin, de --
Rossman o en formol al 10%, amortiguado con fosfatos a-
un pH de 7.3. Se lavaron y deshidrataron en alcoholes--
graduales desde 30 grados hasta absoluto; se aclararon -
en cloroformo o incluyeron en Paraplast. Se hicieron -
cortes longitudinales de 5 µm de espesor que se montaron
y tiñeron por los métodos de la Hematoxilina-eosina o -
Hematoxilina férrica de Weigert (Davenport, 1960). Se mon-
taron en bálsamo de Canadá.

A) METODOLOGIA EMPLEADA EN EL ESTUDIO MORFOLOGICO

El estudio de la placenta se inició observando su morfología macroscópica: color, forma, sitio de implantación e inserción del cordón umbilical.

Las observaciones histológicas se realizaron con la ayuda de un microscopio óptico Zeiss, examinando: la decidua basal, las células gigantes observando su número, tamaño, aspecto del citoplasma y de los núcleos. El laberinto, las vellosidades coriales, las células de las capas trofoblásticas, el endotelio de los vasos fetales, la sangre fetal, los espacios intervillosos y la sangre materna extravasada.

B) METODOLOGIA EMPLEADA EN EL ESTUDIO ESTADISTICO

Los datos del peso de las placentas se trataron estadísticamente, para determinar si existían diferencias significativas entre los siete grupos experimentales. Para hacer este análisis se procedió de la siguiente manera: primero se observó que las medias del peso de los fetos de cada camada no eran uniformes, por lo que se seleccionaron los ratones que, por el grado de desarrollo de las estructuras externas del cuerpo, eran de la misma edad gestacional. Una vez formados grupos homogéneos se

trataron los pesos de las placentas con las pruebas de "F", que compara todos los grupos entre sí y la de t de "Student" que compara pares de grupos. El nivel alfa - usado fué de 0.05.

Para saber si existía correlación entre los pesos de las placentas y los de los productos, se hizo una prueba de regresión lineal.

VI.- R E S U L T A D O S

A).- RESULTADOS MORFOLOGICOS

La morfología macroscópica de las placentas de los grupos tratados con diazepam no presentaron alteraciones visibles. Su color, forma, sitio de implantación, e inserción del cordón umbilical, no mostraron diferencias con respecto a las de los grupos testigos S y T.

Descripción histológica de la placenta de ratón de los fetos del grupo testigo (S).- Hacia el final de la gestación, la placenta de los fetos de ratón tratados con suero fisiológico tiene una apariencia normal. En un corte histológico se observa que está constituida por tres partes: la decidua basal, una amplia zona de células gigantes y una zona laberíntica. (Fig. 1).

Las células de la decidua basal son grandes, poliédricas o irregulares, cuyo citoplasma presenta un retículo con finas granulaciones basófilas, su núcleo es voluminoso, de contorno irregular y la cromatina está distribuida en una red laxa. (Fig. 2).

Hacia el interior de esta capa se localizan zonas de condensación de células gigantes. Estas son trofoblásticas, tienen forma irregular con citoplasma que presenta abundante retículo endoplásmico, tienen dos o más núcleos muy grandes, esféricos, ovoides o de contorno irregular con la cromatina en grumos gruesos, que están dispersos en el jugo nuclear. Presentan de uno a cuatro nucléolos conspicuos que se pueden observar fácilmente por su gran afinidad tinteírea. (Fig. 3).

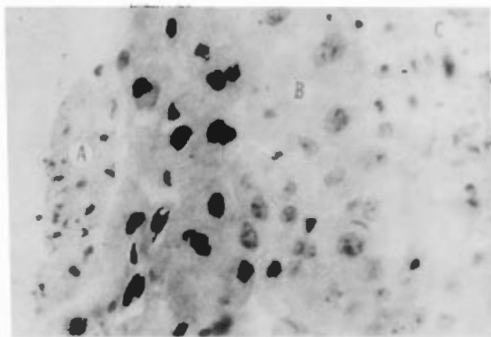
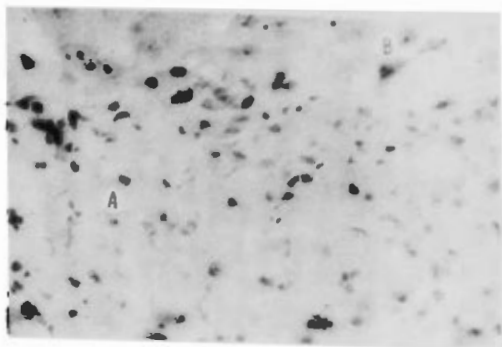


FIG. 1. Corte histológico de placenta de ratón de 14 días de gestación, teñido con carmalum-histológico, en el que se pueden identificar las tres zonas que la constituyen: la zona basal (A), las células gigantes (B) y el laberinto (C) (250X).



10. 2 Corte histológico de placenta de un feto de ratón de 18 días de gestación, tratado en suero fisiológico, en el que se observan la decidua basal con células polifóricas o irregulares (A) y algunas células viariantes (B). (250X)

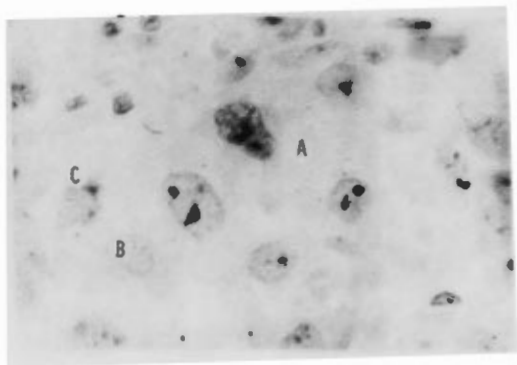


FIG. 1 Células gigantes de la placenta de un feto de ratón del grupo 5. Se observa que tienen abundante citoplasma (A), núcleos grandes (B) de contorno irregular o los o más nucleolos (C). 500X.

Internamente a la zona de células gigantes, se observan las vellosidades coriales que constituyen la parte laberíntica de la placenta. Estas estructuras son muy delgadas y están distribuidas en el estrecho espacio intervilloso, que es lo que determina la típica apariencia laberíntica.

La pared de las vellosidades es muy delgada y está formada por una fina capa de trofoblasto y el endotelio de los vasos coriales.

Al observar el trofoblasto con el microscopio de luz, se pueden distinguir en sus paredes unas células grandes con citoplasma basófilo, que emite gran cantidad de microvellosidades, que sólo pueden observarse con el microscopio electrónico, su núcleo es vesiculoso, con la cromatina en grumos gruesos y uno a dos nucléolos. Estas células integran la capa trofoblástica más externa de las vellosidades, que es la llamada capa trofoblástica 1.

Por dentro de esta primera capa se localizan dos capas trofoblásticas más, que tienen escaso citoplasma basófilo muy vacuolizado y núcleos más pequeños e irregulares que los de la primera capa trofoblástica y son las células de las capas trofoblásticas 2 y 3, que se caracterizan por tener grandes cantidades de lípidos en su citoplasma.

La pared interna de las vellosidades está formada por células endoteliales típicas, con citoplasma escaso y núcleo aplanado con cromatina que presenta gran afinidad tinteína. (Fig. 4).

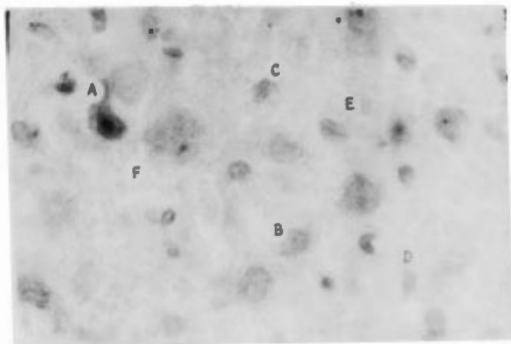


Fig. 4. Corte histológico de la zona placentaria de la placenta de un feto de ratón del grupo testigo (S), en el que se observan las vellosidades coriales, constituidas por las capas trofoblásticas 1 (A), 2 (B) y 3 (C), el endotelio de los vasos coriales (D) y los vasos coriales en el útero fetal (E). Entre las vellosidades están los espacios intervillares con sangre materna extrauterina (F). 500X.

En los cortes histológicos no se pudo observar la capa basal que existe entre la capa trofoblástica 3 y el endotelio, ya que es muy delgada y sólo se logra distinguir por medio del microscopio electrónico. Kirby, (1965).

La placenta de los fetos de ratón tratados con el disolvente del diazepam, tiene una apariencia histológica normal en todas sus capas y es muy semejante a la de los fetos del grupo testigo. (Figs. 5 y 6).

En los fetos del grupo tratado con 0.042 mg de diazepam /Kg (V1.25), se nota que los espacios intervillosos son más amplios que los que se observan en la placenta del grupo testigo (5) y la barrera placentaria no esta disminuida en su espesor. En general los núcleos de las células gigantes son un poco más pequeños y ligeramente más abundantes. (Figs. 7 y 8)

En el grupo tratado con dosis de diazepam de 0.166 mg/Kg (V5) son muy notables las diferencias que existen en la estructura histológica de la placenta en relación con la del grupo tratado con suero fisiológico. Como se puede observar en la figura 9, la barrera placentaria está muy adelgazada, las células de la capa trofoblástica 1 tienen núcleos prácticamente a la mitad del tamaño de los del grupo control y también esta disminuida la talla de los núcleos de las otras dos capas trofoblásticas. El borde externo de las villosidades tiene citoplasma condensado y parece haber perdido sus microvillidades, los espacios intervillosos son muy amplios y los vasos coriales en general son de mayor calibre.

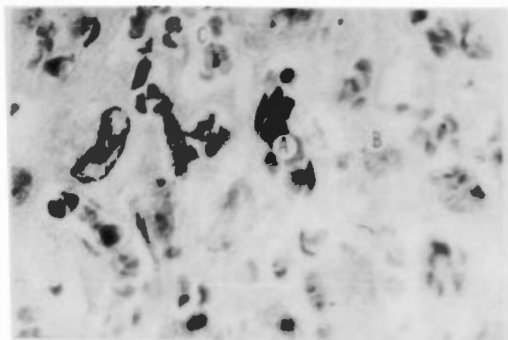


FIG. 5. Corte histológico de la placenta de un feto de ratón de 18 días de gestación, tratada con el disolvente del disrepan en el que se observan los vasos coriales (A), la barrera placentaria (B) y los espacios intervillarios de apariencia normal (C) (x 500).

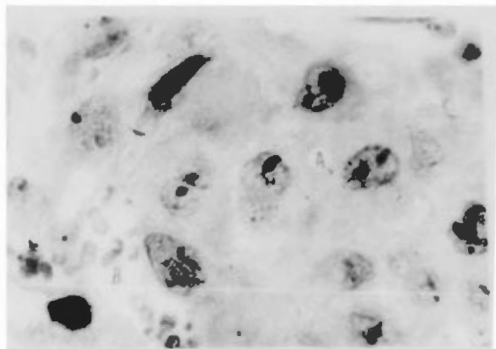
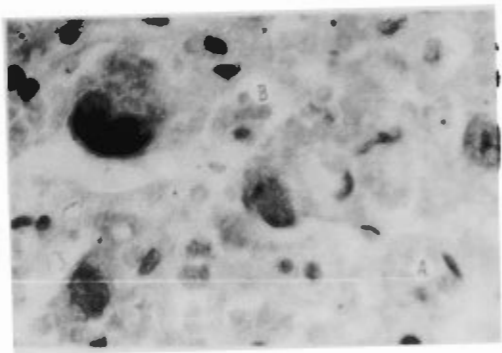


Fig. 1. Micrograph of a section of the
 of the



1. **Definición:** El **valor** de un bien o servicio se refiere a la utilidad que este proporciona a un individuo o a una sociedad.

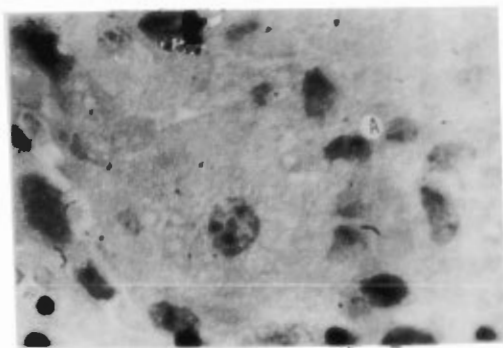


FIG. 8. Células gigantes de la placenta de un ratón del grupo VI-25, en las que se observa una ligera reducción de tamaño y un aumento numérico de los núcleos. (A).

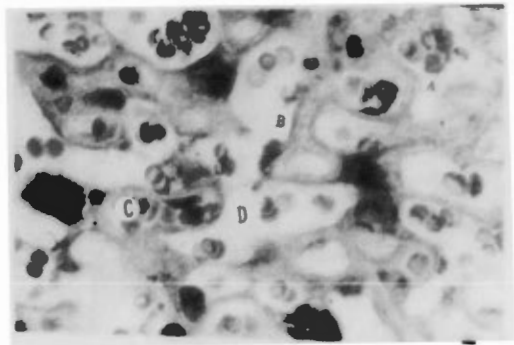


FIG. 2. Corte histológico de la placenta de un feto de ratón del grupo VS, en el que se puede observar en la zona liberfintica, - que el espesor de la barrera placentaria (A) está reducido, presenta el bazo externo condensado (B), los vasos arteriales (C) están excesivamente aumentados de calibre y los espacios intervillares (D) están distendidos. 500x

Las células gigantes en este grupo, son muy numerosas, su citoplasma se ve vacuolizado y con una tosca red, los núcleos son más pequeños y tienen grumos de cromatina gruesos y nucléolos de menor tamaño (Fig. 10).

En los fetos de ratón inyectados con una dosis de 0.666 mg de diazepam /Kg (V20), se observa que la barrera placentaria es aún más delgada que la del grupo anterior, también presenta el borde externo condensado y los núcleos de las tres capas trofoblásticas son de menor tamaño en general. Las células endoteliales de los vasos coriales son muy delgadas y sus núcleos son largos y prácticamente planos, esto puede deberse a la gran vasodilatación que se observa. Al igual que lo que sucede con la placenta del grupo V5, los espacios intervillerosos son muy amplios (Fig. 11).

En cuanto a las células gigantes es notable que el citoplasma está vacuolizado y parece tener una red de retículo endoplásmico de trama gruesa. Los núcleos son de tamaño variable, algunos de talla normal y otros muy chicos. La cromatina tiene gruesas granulaciones que se tiñen intensamente. (Fig. 12).

Las placentas de los fetos inyectados con 1.333 mg de diazepam /Kg (V40), tienen una estructura semejante a la del grupo V20, pero las células trofoblásticas tienen núcleos aún más pequeños, en los que se nota un aumento en la afinidad tinte de la cromatina, que parece estar más condensada. Los núcleos de las células endoteliales están muy aplanados y tanto

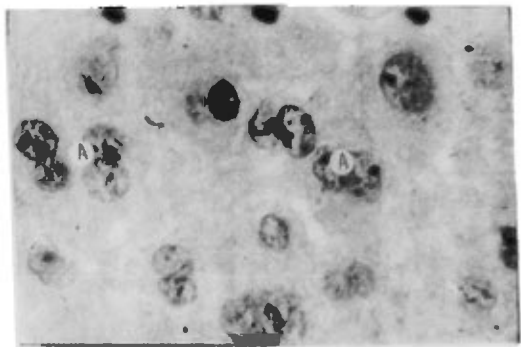


FIG. 10. Aspecto histológico de las células gigantes de la placenta de un feto del grupo VS. - Es notable en estas células que el núcleo (A) es de menor tamaño y que las células - son muy numerosas. 50X

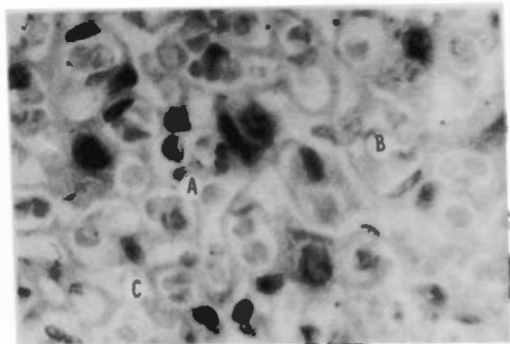
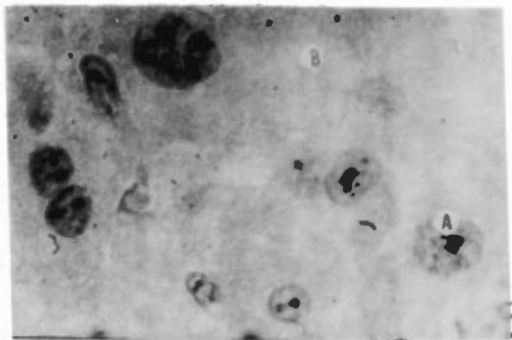


FIG. 11 Laberinto de la placenta de un feto -
del grupo de V20, en el que se nota -
la disminución del espesor de la barrera
placentaria (A), la distensión de -
los vasos coriales (B) y de los espa-
cios intervillares (C). 500X.



VIC. 12 Los núcleos (A) de las células gigantes de la placenta de los fetos de 121, son de tamaño y forma irregular y el citoplasma (B) está muy vacuolado 500X

los vasos coriales como los espacios intervellosos, son muy amplios. (Fig. 13).

En la Fig. 14 se observa como las células gigantes son más abundantes, con citoplasma reticular de tosca trama, vacuolizado y con núcleos pequeños en los que la cromatina tiene grumos gruesos y el jugo nuclear se tiñe intensamente, lo que le da al núcleo un aspecto difuso.

La barrera placentaria de los fetos del grupo tratado con dosis de diazepam de 2.666 mg/Kg. (V80) está también delgada, los núcleos de las células de la capa trofoblástica son evidentemente más pequeños, redondeados con la cromatina difusa y semicondensada. Las células endoteliales están aplanadas y es notable que los espacios intervellosos y los vasos coriales son enormes. (Fig. 15).

Si se comparan las células gigantes de la placenta de los fetos del grupo testigo S. (Fig. 4) con las de este grupo, se puede distinguir con facilidad que su número es mayor, el citoplasma está muy vacuolizado y los núcleos son más pequeños, más abundantes y la cromatina está distribuida en una red de malla gruesa, que se condensa cerca de la membrana nuclear. Los nucleólos han disminuido en número y se tiñen menos que los del grupo control. (Fig. 16).

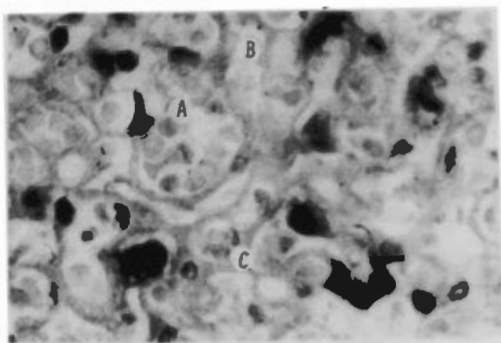


FIG. 1) Corte histológico de la placenta de un foto de ratón del grupo de V47 en el - que se nota la distensión de los vasos coriales (A) y de los espacios intervillares (B). También se observa el adelgazamiento de la barrera placentaria (C). 500X.

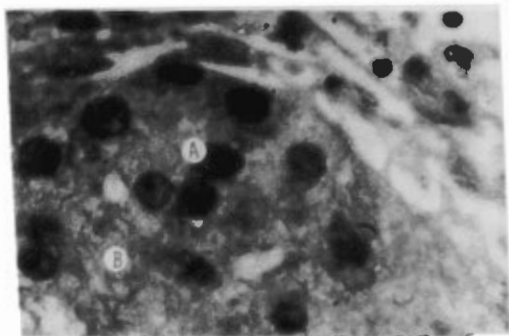


Fig. 1. Células gigantes de la pila celular del grupo de A40, con el núcleo pequeño (A), con la formación de un núcleo grueso y el citoplasma vacuolizado (B). 540X.

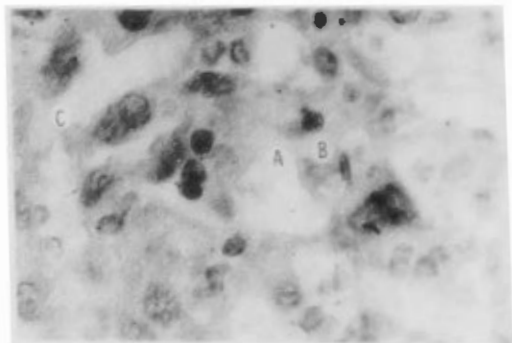


FIG. 15. En la placenta de un feto de 180, los espacios intervillares (A), los vasos coriales (B) y los villos coriales (C). La barrera placentaria está adelgazada. 500X.

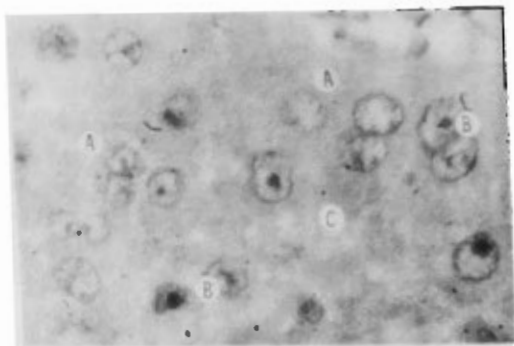


Fig. 16. Corte histológico de la retina de un feto de ratón del grupo de 280, en el que se observan las células gigantes (A) que son muy numerosas, así como las pequeñas (B), la retina en tramos (C) ya ulcerada.

B).- RESULTADOS DEL ESTUDIO ESTADISTICO

Los datos obtenidos del peso de la placenta de los grupos experimentales y los testigos, se presentan en el cuadro número 1.

Estos datos fueron analizados por medio de la "t" de "Student" y se comprobó que existen diferencias significativas entre el grupo tratado con suero fisiológico o grupo testigo (S) que tiene una media de 13.69 ± 2.77 mg y cuatro de los cinco grupos experimentales y el grupo tratado con el disolvente del diazepam (T), a un nivel alfa de 0.05.

De los grupos experimentales, el que presentó una mayor diferencia en el peso de las placentas fué el que recibió dosis de diazepam de 0.666 mg/Kg (V20), tiene una media de 12.18 ± 2 mg en el que la hipótesis de igualdad de medias se rechaza a un nivel alfa de 0.0005.

Los fetos de las hembras tratadas con una dosis de diazepam de 0.042 mg/Kg (V1.25), tienen una media del peso de la placenta de 17.32 ± 2.01 mg y el nivel de significación al que presentó diferencias con el peso de la placenta del grupo testigo, se encuentra a un nivel alfa de 0.005.

Entre el peso de las placentas del grupo S y las de los grupos que recibieron dosis de diazepam de 1.666 mg/Kg (V40), con una media de 12.39 ± 3.2 mg y de 0.166 mg/Kg (V5), con una media de 12.71 ± 2.05 mg, hay una diferencia significativa a un nivel alfa de 0.025.

La media del peso de la placenta del grupo que recibió dosis de diazepam de 2.666 mg/Kg (V80), es de 14.40 ± 3.89 mg que comparada con la del grupo testigo S- (13.69 ± 2.77 mg), no presentó diferencias significativas a nivel alfa de 0.05 encontrándose la diferencia a una alfa de 0.25

Entre el peso de la placenta del grupo tratado con suero y el tratado con el disolvente del diazepam (T) con una media de 12.19 ± 2.26 existe una diferencia significativa a nivel alfa de 0.005

En la figura número 17 se representan gráficamente las diferencias que existen entre las medias del peso de la placenta de los grupos tratados con el suero, con el disolvente del diazepam y con las diferentes dosis de diazepam.

También se analizaron los datos por medio de análisis de varianza y se obtuvo una $F=5.005$ que indica que la hipótesis de igualdad de medias se rechaza a un nivel alfa de 0.0001, lo que confirma los resultados obtenidos por medio de la prueba de χ^2

Mediante la prueba de regresión lineal, que se hizo para saber si existía correlación entre los pesos de las placentas y los de los productos, se encontró que en el grupo tratado con suero fisiológico no existe correlación, pues el nivel de significación sólo es de 0.216. En el caso del grupo tratado con el disolvente del diazepam (T) tampoco existe correlación y el nivel alfa es de 0.108

Entre los grupos experimentales, en el grupo - tratado con 0.666 mg/Kg de diazepam (V20) no hay correlación entre el peso de la placenta y el peso del producto y es tan baja, que el nivel alfa es de 0.51, que es mucho menor que el encontrado en el grupo de fetos tratados con suero y los tratados con el disolvente del diazepam.

Los niveles de significación para comprobar si - existe correlación en los grupos tratados con 0.042 mg/Kg (V1.25), con 0.166 mg/Kg (V5) y 1.333 mg/Kg (V40), son - muy cercanos al alfa de 0.05 que es el nivel al que se - probó la hipótesis, ya que son de 0.063, 0.053 y 0.062 - respectivamente, lo que indica que hay correlación a un - nivel alfa entre 0.05 y 0.1

En el caso del grupo tratado con 2.666 mg/Kg de diazepam (V80), si hay correlación y el nivel alfa es de 0.02

Entre el peso de los fetos de S y T, no existen diferencias significativas a alfa de 0.05 y las diferencias se encontrarían a una alfa de 0.20, ya que las medias son de 14.45 ± 0.87 mg y 14.31 ± 0.67 mg respectivamente.

Tampoco hay diferencias significativas a alfa - de 0.05 entre el peso de los fetos del grupo testigo (S) y los de los grupos de 0.042 mg/Kg (V1.25), de 1.333 mg/Kg (V40) y de 2.666 mg/Kg (V80), ya que sus medias son de 14.26 ± 0.62 mg, 14.60 ± 0.84 mg y 14.47 ± 0.45 mg respectivamente.

Entre el peso de los fetos del grupo testigo S- y los tratados con las dosis de diazepam de 0.166 mg/Kg- (V5) y de 0.666 mg/Kg (V20), sí hay diferencias a un nivel alfa de 0.025 y de 0.0005, respectivamente ya que sus medias son, para el grupo V5 14.09 ± 1.6 y de 13.82 ± 1.06 - para el grupo V20.

En el cuadro número dos se presentan los datos obtenidos del peso del feto.

C U A D R O 1

VALORES ESTADISTICOS DEL PESO DE LA PLACENTA
DE LOS GRUPOS EXPERIMENTALES. (MG)

	S	T	V _{1.25}	V ₅	V ₂₀	V ₄₀	V ₈₀
MEDIA	13.69	12.19	12.32	12.71	12.18	12.39	14.40
DESVIAC. ESTANDAR	2.77	2.16	2.01	2.05	2.00	3.20	3.89

C U A D R O 2

VALORES ESTADISTICOS DEL PESO DE LOS FETOS
DE LOS GRUPOS EXPERIMENTALES. (MG)

	S	T	V _{1.25}	V ₅	V ₂₀	V ₄₀	V ₈₀
MEDIA	14.45	14.31	14.26	14.09	13.82	14.60	14.47
DESVIAC. ESTANDAR	0.87	0.67	0.62	1.60	1.06	0.84	0.45

MEDIAS (MG)

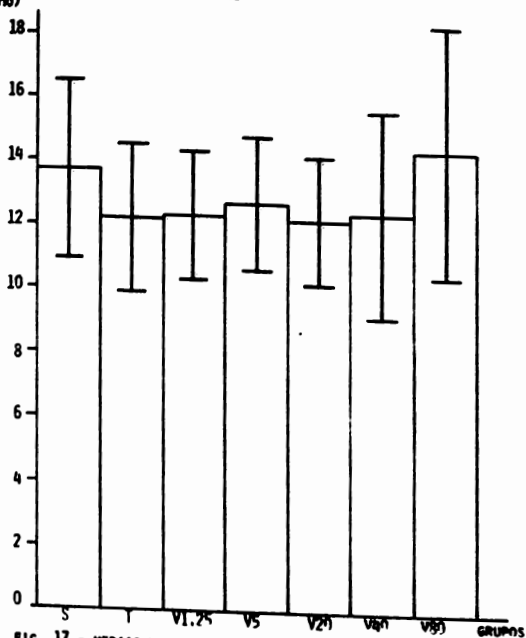


FIG. 17 - MEDIAS DEL PESO DE LA PLACENTA DE LOS CONJUNTOS TRATADOS CON SUERO FISIOLÓGICO (S), SOLVENTE DEL DIAZEPAM (T) Y LAS CINCO DOSES DE DIAZEPAM: 0.902 mg/kg (V1.25), 0.966 mg/kg (V5), 0.666 mg/kg (V20), 1.332 mg/kg (V40) Y 2.666 mg/kg (V80). LAS LINEAS VERTICALES REPRESENTAN LA DESVIACIÓN ESTÁNDAR.

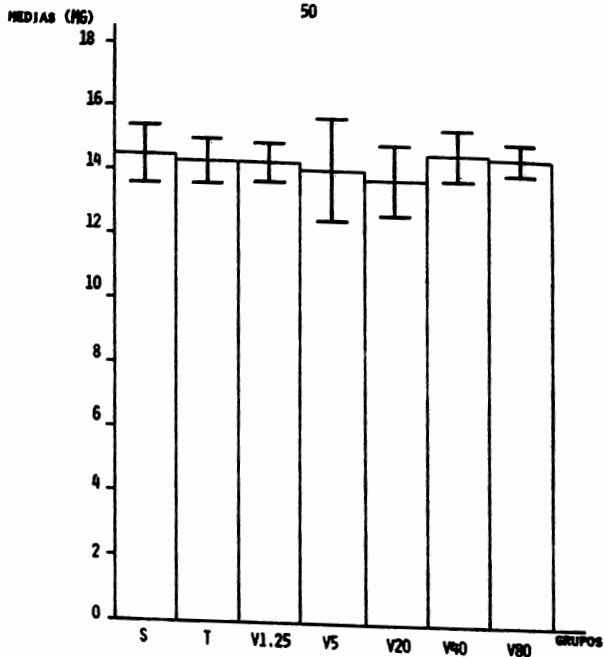


FIG.18- MEDIAS DEL PEO DE LOS PETOS DE LOS GRUPOS TRATADOS CON SUERO FISIOLÓGICO (S), SOLVENTE DEL DIAZEPAM (T) Y LAS CINCO DOSIS DE DIAZEPAM: 0.042 mg/Kg (V1.25), 0.166 mg/Kg (V5), 0.666 mg/Kg (V20), 1.333 mg/Kg (V40) Y 2.666 mg/Kg (V80). LAS LINEAS VERTICALES REPRESENTAN LA DESVIACION ESTANDAR.

de 20µg/ml, y sólo difería la respuesta en el número de células alteradas, que sí aumentaban al incrementar la dosis.

Estos datos parecen concordantes con las observaciones que se han hecho al microscopio de luz en las células gigantes, en las que se distingue en el citoplasma vacuolizado una red de trama burda, que podría ser el retículo endoplásmico, con las cisternas dilatadas e irregulares y los cuerpecitos electrodensos descritos por los mismos autores.

También las células de las capas trofoblásticas 1, 2 y 3, probablemente estén afectadas de manera semejante, puesto que la cantidad de citoplasma es mucho menor que el de las células de la placenta de los ratones tratados con suero.

Resulta lógico pensar que tal vez los efectos del diazepam, pudieran ser diferentes cuando el estudio se hace "in vitro" o "in vivo", debido a los mecanismos homeostáticos que intervienen en el segundo caso. sin embargo por los estudios de Van der Kleijn (1969), Idän pään-Heikkilä et al. (1971) y Erkkola et al. (1974), se ha comprobado que no sólo atraviesa la barrera placentaria, sino que se acumula en ella, ya que el diazepam es liposoluble y en las capas trofoblásticas 2 y 3 se almacenan gran cantidad de lípidos, siendo está la razón por la que se retiene en ella.

Por otra parte, la placenta es el primer tejido embrionario con el que se pone en contacto el fármaco y tiene la facultad de regular el paso de las sustancias que van de la sangre materna a la fetal.

VII.- DISCUSION Y CONCLUSIONES

Si bien las observaciones de la morfología macroscópica de las placentas de los fetos de ratón tratados con diazepam, no presentaron alteraciones, los resultados del estudio histológico revelan que causa lesiones tisulares, ya que aún a la dosis más baja empleada de 0.042 mg /Kg (Vl.25), el aspecto de la placenta difiere del tejido normal, en cuanto a la disposición laxa de las vellosidades coriales, que contienen grandes vasos con pequeñas y numerosas células gigantes y los espacios intervillosos de mayor amplitud.

Estos resultados contrastan con el trabajo de Breen y Stenchever (1970), quienes estudiando fibroblastos cultivados con diazepam, no observaron cambios morfológicos visibles con el microscopio de luz.

Sin embargo, con la ayuda del microscopio electrónico encontraron alteraciones en el aparato de Golgi, que era muy abundante, el retículo endoplásmico rugoso estaba distendido y presentaba dilataciones irregulares que contenían material electrodens, apareciendo con frecuencia vesículas citoplásmicas que contenían pequeñas esferitas o estructuras electrodensas largas e irregulares, así como elementos membranosos irregulares, cuyo número y complejidad varió con las diferentes dosis y no se encontró una relación directa dosis-respuesta, en cuanto al tipo de alteración celular, ya que aún con la dosis más baja que usaron (1µg/ml), las células se modificaban de la misma manera que lo hacían con la dosis más alta, -

Los mismos autores haciendo los estudios autoradiográficos y cuantitativos del paso y la acumulación del diazepam, han comprobado que las dosis empleadas "in vitro" son equivalentes a las encontradas "in vivo", y que lo excreta con mayor lentitud el feto que la madre. Otro hecho que hay que destacar es que al acumularse el fármaco en los tejidos fetales, la dosis real que actúa sobre éstos, es mayor que la circulante, por lo que la posibilidad de alteración aumenta.

La disminución del grosor de la barrera placentaria, en parte podría deberse a esta acumulación del diazepam, que además por los estudios de Breen y Stenchever (1970), se sabe que altera las membranas celulares y retarda el crecimiento celular, lo que probablemente explicaría en el primer caso, el engrosamiento de la superficie externa de la capa trofoblástica y la aparente ausencia de las microvellosidades en la misma.

El retardo en el crecimiento celular y el decremento de la actividad mitótica, tal vez serían las causas de la disminución del tamaño de los núcleos de las células gigantes, que presentan cromatina más densa y difusa. El incremento numérico relativo de estas células, puede ser el resultado de la disminución del tamaño de las mismas, que al mantener constante la amplificación del campo del microscopio, con el que se observan, produce este efecto. Las células gigantes en el ratón parecen estar relacionados con funciones inmunológicas, por lo cual podría repercutir la alteración del citoplasma y el núcleo en problemas de rechazo de los tejidos embrionarios por el útero o sobre la maduración del aparato --

inmunológico de los fetos.

En el grupo tratado con 2.666 mg/Kg de diazepam (V80) aunque la barrera placentaria es más delgada, el aumento significativo del peso de la placenta, tal vez podría deberse a que los espacios intervellosos están muy distendidos y en ellos se acumula un volumen sanguíneo mayor que el normal, lo que explicaría esta aparente discordancia en los datos obtenidos.

Los resultados del estudio histológico de la placenta de los fetos tratados con el disolvente del diazepam, demuestran que aparentemente no produce alteraciones, lo cual no concuerda con el estudio estadístico del peso de la placenta, puesto que hay una disminución significativa con respecto al del grupo testigo S. la causa podría ser que los componentes del disolvente del diazepam, cuya fórmula exacta es conocida sólo por los laboratorios F. Hoffmann-La Roche & Co. Ltd., Basilea Suiza, contiene alcoholes que son disolventes de las grasas y que aunque no se observa con el microscopio de luz, que modifica la estructura histológica, si disminuye el peso. Esto despertaría la duda acerca de si el efecto observado en la placenta de los fetos de las hembras tratadas con las diferentes dosis de diazepam, es debido al disolvente o a la droga, sin embargo las alteraciones histológicas observadas en las placentas de estos fetos, son francas y suficientemente evidentes, aún cuando la cantidad de disolvente utilizado como vehículo para inyectar el diazepam, se mantuvo constante en los grupos de V1.25, V3, V20, y V40 y sólo se aumentó en el de V80.

Otro apoyo para pensar que los efectos encontrados en los grupos de fetos tratados con diazepam se deben al fármaco y no al disolvente, es el hecho de que el peso de los fetos no presenta diferencias significativas, con respecto a los del grupo tratado con suero fisiológico y por medio de los estudios realizados por Correa (1979), De la Fuente (1979) y Ortega (1979), en la retina, el corazón y el riñón, de los mismos fetos utilizados en este trabajo, se demostró que el disolvente del diazepam no causa alteraciones del peso de estos órganos, ni produjo cambios histopatológicos visibles al microscopio óptico.

Mediante el estudio estadístico se corroboró, que con respecto al peso de la placenta, no existe una relación dosis-respuesta, lo que podría ser consecuencia de la falta de correlación entre el peso de la placenta y el peso de los fetos de ratón, dato que concuerda con los hallazgos de Sugiyama (1961) y Beer *et al.* (1975). Curiosamente la alteración del peso de la placenta, que es mayor en el caso del grupo tratado con 2.666 mg/Kg de diazepam (V80), hace que exista correlación positiva.

Las conclusiones a las que se puede llegar por medio del estudio realizado son que:

El diazepam altera la estructura histológica de la barrera placentaria, de los fetos tratados con las dosis de 0.042 mg/Kg, 0.166 mg/Kg, 0.666 mg/Kg, 1.333 mg/Kg y 2.666 mg/Kg.

El diazepam provoca un adelgazamiento de la barrera placentaria, disminución de la talla de los núcleos de las células gigantes, que son más pequeñas aún en la

placenta de los fetos del grupo de dosis de diazepam - de 0.042 mg/Kg.

La vacuolización del citoplasma de las células gigantes y de las células trofoblásticas de las capas - 1, 2 y 3, tal vez se deba a la alteración del retículo-endoplásmico, lo que tal vez podría comprobarse al estudiarse con el microscopio electrónico.

Los espacios intervellosos, son más amplios - en la placenta de los grupos experimentales, que en los testigos.

La relación dosis-respuesta, con respecto a - las modificaciones histológicas parecen evidentes en el caso de las células gigantes, pero no es clara en relación a la barrera placentaria.

El peso de la placenta de los fetos de los grupos tratados con dosis de diazepam de 0.666 mg/Kg (V20), 0.042 mg/Kg (V1.25), 1.333 mg/Kg (V40) y 0.133 mg/Kg -- (V5), muestra disminución estadísticamente significativa con respecto al del grupo tratado con suero fisiológico, en cambio el peso de la placenta del grupo tratado con 2.666 mg/Kg de diazepam (V80), aumenta y muestra correlación positiva entre el peso del feto y el de la placenta.

El disolvente del diazepam, provoca una disminución del peso de la placenta, debido probablemente a la disminución de la cantidad de lípidos de la barrera placentaria, que no muestra alteraciones histológicas - visibles al microscopio de luz.

no se pudo comprobar que exista una relación dosis-respuesta del diazepam sobre el peso de la placenta.

Aún cuando no es posible extrapolar los resultados de un estudio experimental hecho en el ratón al humano, se puede tomar como un indicador de los efectos que el diazepam probablemente causaría en la placenta humana y siendo éste un órgano de paso de nutrientes, gases, hormonas, sales, agua, anticuerpos y metabolitos en general, de la sangre materna a la fetal, es recomendable no administrar este fármaco durante el embarazo, pues las alteraciones de la barrera placentaria repercutirían sobre la economía del producto, además de los efectos que provocarían directamente el diazepam y sus metabolitos sobre los tejidos fetales.

No se descarta la posibilidad de que en la placenta humana, el diazepam cause algunos de los efectos observados sobre la placenta de ratón, puesto que después del alumbramiento, las placentas sólo son examinadas macroscópicamente por el médico y no se practican rutinariamente en ellas estudios histológicos que puedan corroborar la hipótesis sobre el posible daño tisular causado por este fármaco, desde luego, es necesario continuar con el estudio iniciado en este trabajo, aplicando técnicas histoquímicas y a nivel ultraestructural, para determinar los daños causados por el diazepam y correlacionarlos con las alteraciones funcionales que pueda provocar.

VIII.- B I B L I O G R A F I A

- Anónimo , 1970. Valium-Roche. Resumen farmacológico y - clínico. Editado por Laboratorios Hoffmann-La Roche. Buenos Aires.
- Beer, A.E., J.R. Scott, and R.E. Billingham, 1975. Histo incompatibility and maternal immunological - status as determinants of fetoplacental weight and litter size in rodents. J. Exp. Med. 142: 180-196.
- Björkman, N., 1970. An Atlas of Placental Fine Structure. Baillière Tindall & Cassel. London.
- Breen, P.C. and M.A. Stenchever , 1970. Some effects - of Diazepam on the fine structure of human fibroblasts in the tissue culture. Am. J. Obstet. Gynecol. 108:520-527
- Correa, L., 1979. Estudio histológico de la retina fetal de ratones blancos tratados con diazepam (Valium). Tesis Profesional de Biólogo. Facultad de Ciencias. UNAM. México.
- Davenport, H.A., 1960 Histological and histochemical - techniques. Saunders Co. USA.

- Deane, H.W., L. Rubin, E.C. Driks, B.L. Loebel and G. Peisner, 1962. Trophoblastic giant cells - in placentas of rats and mice and their probable role in steroid hormone production. - Endocrin. 70:407-419.
- Erkkola, R., J. Kanto, and R. Sellman, 1974. Diazepam - in early human pregnancy. Acta. Obstet. Gynec. Scand. 53:135-138
- De la Fuente, J.G., 1979. Determinación de alteraciones morfológicas del corazón fetal de ratones de la Ceba CD-1 producidas por la aplicación del diazepam (Valium). Tesis - Profesional de Biólogo. Facultad de Ciencias. UNAM. México.
- Hetherington, C.M., 1971. The decidual cell reaction, placental weight foetal weight and placental morphology in the mouse. J. Reprod. Fert. 25: 417-424.
- Idänpään-Heikkilä, J.E., P.I. Jouppila, O. Poulakka, - and M. S. Vorne, 1970. Placental transfer - of Diazepam ¹⁴C in mice hamsters and monkeys. J. Pharmac. Exp. Therap. 176 (3):752-757.

- Idänpää-Heikkilä, J.E., P. I. Jouppila, O. Poulakka and M. S. Vorne, 1971. Placental transfer and fetal metabolism of Diazepam in early human pregnancy. Am. J. Obstet. Gynecols. - 109(70):1011-1016.
- Kirby, D.R.S. and S. Bradbury, 1965. The hemochorial mouse placenta. Anat. Rec. 152:279-282.
- Mandelli, M.P.L. Morselli, S. Nordio, G. Pardi. M.-Principi, F. Sereni and G. Tognoni, 1975. - Placental transfer of Diazepam and its disposition in the newborn. Clin. Pharmacol. - Ther. 17(5):564-572
- Milkovich, L., and E. Van Der Berg, 1974. Effects of prenatal meprobamate and chlordiazepoxide hydrochloride on human embryonic and fetal development. N. Engl. J. Med. 291 - (24):1268-1271.
- Miller, R. and B. Becker, 1975. Teratogenicity of oral Diazepam and Diphenylhydantoin in mice. Toxicol. App. Pharmacol. 32:53-61.
- Ortega, R.M., 1979. Efectos de la administración del diazepam (Valium) sobre la morfología del riñón fetal de ratón blanco (Mus musculus) de la Cepa CD-1. Tesis Profesional de Biólogo. Facultad de Ciencias. UNAM. México.

Rojas Ramirez, V., 1975. Benzodiazepinas. Rev. Fac. Med. 18 (1):32-35

Rugh, R., 1968. The mouse: its reproduction and development. Burgess Publishing Co. USA.

Scher, J., D. M. Hailey, and R. W. Beard, 1972. The effects of Diazepam on the fetus. J. Obstet. Gynecol. Brit. Comm. 79:635-638.

Stecher, P. G., 1968. The Merck Index. An encyclopedia of chemical and drugs. Merck. and - Co. Ind. 8th. ed. pág. 341.

Stenchever, M.A., and Frankel, R.B., 1970. Effects of diazepam on chromosomes of human leukocytes in vivo. Am J. Obstet Gynecol. 107: 456-460

Stenchever, A.M. and K.J. Parks, 1975. Some effects of diazepam on pregnancy in the Balb/c mouse. Am. J. Obstet. Gynecol. 121 (6):765-770.

Sugiyama, T., 1961. Morphological studies on the placenta of mice of various ages and strains. 1. Variations in fetal and placental weight - at term. Acta Med. Univ. Kioto. 37:139 page.

Van Der Kleijn, E., 1969. Kinetics of distribution -
and metabolism of Diazepam and Chlordiazepo
xide in mice. Arch. Int. Pharmacodyn. 178 -
(1):193-215.