

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

**EFFECTOS DEL DIAZEPAM (VALIUM) SOBRE EL
DESARROLLO DEL PULMON DE
EMBRIONES DE RATON BLANCO**

TESIS PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

B I O L O G O

P r e s e n t a

ZINA BARBARA BECKER FINCOWSKY



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

	PAGINAS
RESUMEN	1
INTRODUCCION	3
MATERIAL Y METODO	10
DESARROLLO DE LOS PULMONES	12
RESULTADOS HISTOLOGICOS	15
RESULTADOS ESTADISTICOS	37
DISCUSION Y CONCLUSIONES	46
BIBLIOGRAFIA	52

R E S U M E N

El diazepam es uno de los fármacos más efectivos para suprimir la ansiedad que caracteriza a una gran variedad de padecimientos, así como por ser un efectivo relajante muscular, razones por las que actualmente su uso se ha extendido incluso en gineco-obstetricia y aún cuando se conoce que se acumula en los tejidos fetales humanos, existen pocos estudios para determinar si afecta el desarrollo intrauterino o no.

Este trabajo tiene como objetivo identificar si el diazepam produce alteraciones del tejido pulmonar fetal de ratones, cuando se inyecta intraperitonealmente a la madre, del sexto al decimoquinto día de la gestación, dosis diarias de 2.666 mg/Kg.

Para esto se utilizaron tres grupos de ratones hembras embarazadas que fueron tratadas, el primero con diazepam a la dosis indicada, el segundo y al tercero se les aplicó el disolvente del diazepam y suero fisiológico respectivamente, utilizando la misma metodología y un volumen equivalente al administrado con el diazepam.

Al decimosexto día de la gestación, se sacrificó a las hembras para extraer a los fetos, los cuales fueron disecados para obtener los pulmones que se fijaron en formol al 10% amortiguado, se deshidrataron e incluyeron en Paraplast para obtener cortes de 5 μ de espesor que fueron teñidos con las técnicas de hematoxilina de Harris-cosina, hematoxilina férrica de Weigert y la de Gallego.

Mediante el microscopio fotónico se comprobó que el diazepam a la dosis empleada, altera la estructura histológica del árbol bronquial, el cual conserva un aspecto glandular pues su distensión es mínima, sobre todo a nivel de los conductos alveolares que tiene un epitelio más grueso, luz estrecha y no muestran actividad secretora.

Por análisis de varianza y la prueba de Scheffé se comprobó que existían diferencias estadísticamente significativas -- con los controles, en el diámetro de estos conductos, su luz y el espesor de su epitelio. Las modificaciones observadas podrían -- ser causadas por cambios ultraestructurales que no se sabe si serían temporales o permanentes y tal vez produzcan trastornos respiratorios que afectarían la oxigenación del sistema nervioso -- central.

Aún cuando los resultados no son extrapolables al hombre, son un indicador, que permite sugerir que se evite hasta donde -- sea posible el uso del diazepam durante el embarazo.

I N T R O D U C C I O N

El diazepam pertenece al grupo de las benzodiazepinas, --- que son sustancias sintéticas relacionadas estructuralmente, que tienen aplicación como fármacos ansiolíticos (Rojas, 1975).

La industria farmacéutica fabrica una enorme variedad de medicamentos que contienen diazepam, sin embargo el Valium es probablemente el más conocido y que se consume con mayor frecuencia. Su fórmula química es 7 cloro 1,3-dehidro-1-metil- 5 fenil 1,4 benzodiazepina-2-ona. Fue sintetizado por Sternbach y Reeder en --- 1960, siendo publicado el trabajo original en el J. Org. Chem. y registrado con el número 26,49361 (Stecher, 1968).

En 1963, fue introducido al mercado por los laboratorios Hoffman La Roche y desde entonces es preferido por la mayoría de los médicos, por sus propiedades de supresión de la ansiedad y de relajación muscular.

El diazepam actúa principalmente a nivel del sistema límbico, el tálamo e hipotálamo, sobre los que induce un efecto calmante que se refleja en el comportamiento de los pacientes . Clínicamente, la inhibición de la ansiedad podría deberse a que el diazepam actúa deprimiendo al sistema límbico.

Siendo el sistema nervioso central el principal sitio de acción del diazepam, es lógico que sea un buen tranquilizante, -- anticonvulsivante, sedante e hipnótico. Es uno de los agentes -- ansiolíticos más conocidos de los que se dispone en la actualidad. En los hospitales, es de enorme utilidad cuando se emplea como -- premedicación para la remisión de la ansiedad y la tensión de los pacientes que van a ser sometidos a procedimientos quirúrgicos o cardioversión. Es un buen auxiliar en procedimientos endoscópicos para relajar a los pacientes aprensivos ya que disminuye el recuerdo de la exploración .

También se emplea en trastornos psicofisiológicos, en donde la ansiedad se traduce en manifestaciones somáticas y en enfermedades orgánicas específicas, que se acompañan de un estado de ansiedad y agitación.

Su efecto sobre los sistemas endócrino y nervioso autónomo es muy discreto, provocando modificaciones poco significativas de la presión arterial, la función cardíaca y la frecuencia respiratoria.

Asimismo es un recurso eficaz para aliviar espasmos musculares, que se presentan secundariamente a traumatismos, que provocan inflamación de músculos y articulaciones.

En ginecología, se utiliza como premedicación en el trabajo del parto, ya que disminuye su duración promedio, debido a que induce sedación y relajación de la musculatura uterina, principalmente en las dos primeras etapas del mismo. También por su efecto sobre las fibras del músculo liso, coadyuva en el tratamiento de la eclampsia, la pre-eclampsia y en pacientes con actividad prematura del útero.

Entre los estudios realizados para conocer el paso del diazepam a través de la placenta, se encuentran los efectuados por Idänpään-Heikkilä et al (1971), uno en ratones, cuyos y monos y otro en mujeres embarazadas.

Mediante el primero, demostraron que tanto el diazepam marcado con C^{14} , como sus metabolitos, cruzan la barrera placentaria en las tres especies tratadas y que es más efectiva para evitar el paso del fármaco en ratones y cuyos, que en monos, ya que en los ratones la mayor concentración fue alcanzada, en los fetos jóvenes una hora después de ser administrado y dos horas más tarde en los fetos de mayor edad tanto de ratón como de cuyos. En cambio, en los monos, la mayor concentración fue alcanzada en el pulmón, el hígado, los riñones, la médula espinal y el cerebelo fetales a la media hora.

En el segundo estudio, efectuado en mujeres embarazadas, en las que se practicó aborto por histerectomía y a las cuales se les suministraron 5mg de diazepam marcado con C^{14} , por vía intramuscular, encontraron que atraviesa la placenta durante el primer trimestre del embarazo y se acumula rápidamente en el feto, en particular en el tracto gastrointestinal, en el hígado, en el cerebro y en la placenta.

Mandelli et al (1975), evaluaron la transferencia del diazepam en la placenta de mujeres embarazadas, a las que se les administró el fármaco por vía endovenosa, intramuscular y oral. Las pacientes fueron distribuidas en dos grupos, que recibieron tratamientos consistentes, el primero en la aplicación de dosis únicas de 10mg de diazepam, de 24 a 48 hrs antes del parto y en el segundo existe una gran variabilidad, en cuanto al número de días en los que se administró y en algunos casos las pacientes recibieron de 10 a 20 mg diarios del medicamento, encontrando que 12 min después de aplicarlo, se detectó en la circulación fetal, en concentraciones similares a las presentes en el plasma materno y aproximadamente a los 30 min, los niveles plasmáticos del diazepam, son mayores en el feto que en la madre.

Erkkola et al (1974) estudiaron el paso del diazepam y del N-demetil-diazepam, a través de la placenta humana durante el primer trimestre del embarazo. A un grupo de pacientes a las que se les practicó aborto por histerectomía, se les administró por vía intramuscular, una dosis de 10 mg de diazepam de 40 a 120 min, antes de la intervención quirúrgica y el otro grupo de pacientes, recibió por vía oral 5 mg de diazepam, tres veces al día, durante un período máximo de 30 días.

En las mujeres que fueron tratadas con dosis únicas, probaron que no existen diferencias significativas, entre las concentraciones de diazepam y N-demetil-diazepam presentes en la sangre materna y fetal, mientras que en las que se aplicaron tres dosis diarias, la diferencia entre las concentraciones son muy signifi-

cativas, comprobándose que son mayores en la sangre fetal que en la materna. Además complementaron el estudio tomando muestras de placenta, cerebro e hígado de los fetos, para determinar las concentraciones de diazepam y N-demetil-diazepam, encontrando que este último se presenta en una mayor cantidad en el hígado, lo cual sugiere la posibilidad de que las células hepáticas fetales, intervengan en el metabolismo del fármaco.

Para determinar el efecto del diazepam en el embarazo e identificar su teratogenicidad, Stenchver y Parks (1975), utilizaron ratones de la Cepa Balb/c, de 60 a 70 días de edad, apareadas con machos de la misma edad, que fueron distribuidas al azar en cinco grupos: el grupo A recibió del primer al noveno día de la gestación, 0.002 mg de diazepam, disuelto en propileno glicol, al B se le administró la misma dosis que al grupo A, del quinto al decimosegundo día de la gestación, los grupos C y D sirvieron como controles de los grupos A y B y fueron tratados con 0.1 ml de propileno glicol y por último el grupo E sirvió como testigo, sin tratamiento.

En el grupo A no se demostraron alteraciones, en cambio en el B, se encontró un menor número de embarazos, tres casos de focomelia y un aumento en el peso de los fetos, que pudo deberse a un trastorno directo del metabolismo fetal.

Scher et al (1972), observaron los cambios que produce el diazepam en el producto, durante el trabajo de parto, aplicando a doce pacientes por vía endovenosa a una dosis de 20 mg. En todos los casos hallaron una disminución de la frecuencia cardíaca, de 23 a 7 latidos por minuto. La recuperación tuvo lugar 65 min. después de haber sido aplicada la inyección.

Otro estudio sobre la teratogenicidad del diazepam fue realizado por Miller y Becker (1975), quienes administraron a ratones por vía oral, dosis del fármaco que fueron desde 50 mg/Kg hasta 500 mg/Kg, suministrada durante uno, tres o cuatro días de la

gestación. Con la máxima dosis ingerida diariamente, durante los días 8, 9 y 10 ó 11, 12 y 13 de la gestación, produjo una tasa de letalidad del 50% y cuando fueron tratadas del decimoprimeró - al decimoquinto día de la gestación, se presentaron cuatro casos de anomalías esqueléticas, consistentes en osificación incompleta. También hubo una gran incidencia de reabsorciones fetales, cuando recibieron los mismos 500 mg/Kg en dosis únicas, durante los días 12, 13, 14 ó 15.

Tanto las dosis de 400 mg/Kg como la de 500 mg/Kg, produjeron un decremento del peso fetal, la primera al ser aplicada en el día 14 y la segunda en los días 12, 13 y 14 de la gestación. - Mediante la ingestión de diazepam, durante los días 11, 12 y 13, a una dosis de 140 mg/Kg, se produjo una mayor frecuencia de padar hendido.

Van Der Kleijn (1969), estudió el metabolismo y la distribución del diazepam y elordiazepoxido marcados con C^{14} , administrándolo a ratones por vía oral y endovenosa, sacrificando a los animales entre los 3 seg y 24 hrs después de la aplicación del -- diazepam, cuando se hizo por vía endovenosa y de 5 seg a 24 hrs - en el caso del tratamiento oral. En todos los animales realizó estudios autoradiográficos, utilizó métodos de cromatografía de capa fina, análisis bioquímico de los tejidos y cuantificó la -- excreción de los fármacos en la orina.

En los ratones que se sacrificaron en los períodos com--- prendidos entre los 15 seg y 3 min, después de iniciado el trata--- miento de diazepam, éste lo encontró en alta concentración en el miocardio, en la musculatura cervical, en las glándulas adrena--- les y en los riñones. En los sacrificados entre 3 y 30 min, también halló un alto nivel de diazepam radioactivo en el hígado, en las glándulas salivales y lacrimales, en el corazón, en el múscu--- lo esquelético, en las paredes de los grandes vasos y en la cor--- teza cerebral y cerebelar, en la sustancia blanca del cuerpo ca--- lloso, del cerebro medio, del cerebelo y de la médula espinal.

A las 24 hrs de haber suministrado el fármaco lo localizó en - nervios periféricos como el trigémino, el óptico y los espinales. Otros órganos en los que alcanzó concentraciones importantes, -- fueron las mucosas del estómago e intestino delgado, los ovarios y los pulmones.

Estudios realizados a nivel de microscopía fotónica en -- siete grupos de ratones embarazados de la cepa CD-1, cinco de los cuales fueron tratados con dosis de diazepam de 41.5 μ /Kg, 166 - μ /Kg, 664 μ /Kg, 1.328 mg/Kg y 2.666 mg/Kg respectivamente, - el sexto fue inyectado con suero fisiológico y el séptimo con el disolvente del diazepam (Valium), siendo en todos los casos la ad - ministración por vía intraperitoneal, una vez al día del sexto al decimoseptimo día de la gestación, se demostró; que el desarrollo de las capas neuroblásticas y de la ganglionar de la retina está alterada, Correa (1979), que la estructura de las paredes auricu - lar y ventricular muestra cambios histológicos, siendo más evi - dentes con la dosis de 2.666 mg/Kg, ya que las trabéculas carno - sas disminuyen y están ausentes en algunas zonas, existiendo di - ferencias estadísticamente significativas en el peso y la talla - de los corazones de los fetos de los cinco grupos tratados, con - respecto a los grupos control, Fuentes (1979). También en el ri - ñón de los fetos de estos mismos grupos, el peso y la talla están alterados, al igual que el número de corpúsculos renales, el --- cual disminuye considerablemente, sobre todo el grupo tratado - con 2.666 mg/Kg, Ortega (1979).

El cuarto trabajo desarrollado con el mismo material fue el de Flores (1980), quien estudió la placenta, en la que fue no - table la disminución del espesor de la barrera placentaria, así - como la vacuolización del citoplasma de las células gigantes, las cuales disminuyeron de tamaño, observándose que el efecto se --- acentuó con la dosis de 2.666 mg/Kg .

Ya que el diazepam es de bajo peso molecular, es capaz de atravesar la barrera placentaria y depositarse en los tejidos fe - tales, el objetivo y la importancia de éste estudio, es determi--

nar si produce alteraciones en el tejido pulmonar fetal de ratones de la cepa CD-1, aplicando por vía intraperitoneal, una dosis de diazepam de 2.666 mg/Kg durante los días 6° al 15° de la gestación, comprobando los resultados estadísticamente .

MATERIAL Y METODO

Los ratones utilizados para el presente trabajo, son de la Cepa CD-1 y pertenecen a la especie Mus musculus, con una edad que varía entre los 5 y 7 meses y con un peso entre las hembras de 30 a 35 grs y entre los machos de 35 a 40 grs.

Los ratones se aparearon por unidades de cinco hembras -- por macho, durante una hora entre las 7 y 8 A.M. En seguida se procedió a separar a las hembras de los machos y a determinar la existencia del tapón vaginal, que indica el inicio del desarrollo.

Los animales fueron divididos en tres grupos, dependiendo de lo que se les iba a administrar: el primer grupo fué tratado con diazepam, en una dosis diaria de 2.666 mg/Kg, que corresponde a administrar a un ser humano de 60 Kg, 160 mg del tranquilizante, el segundo grupo fué inyectado con el disolvente del diazepam, -- que fué proporcionado por los laboratorios Roche y al tercer grupo se le inyectó suero fisiológico. Tanto en el segundo como en el tercer grupo, los volúmenes inyectados fueron equivalentes a -- las que recibieron los animales tratados con diazepam.

La administración en los tres grupos se llevó a cabo diariamente por vía intraperitoneal, a partir del sexto al decimo-- quinto día del embarazo. El decimosexto día se sacrificó a los animales con eter y se procedió a extraer a los embriones. Estos se observaron macroscópicamente para determinar si existían anomalías externas y posteriormente se disecó cada embrión para obtener los pulmones, los cuales se fijaron en formol al 10% amortiguado.

Una vez efectuada la fijación, se deshidrataron utilizando alcoholes graduales, se aclararon con Xilol, se incluyeron en Paraplast y se obtuvieron cortes de 5 μ de espesor, que fueron -- teñidos con las técnicas de hemotoxilina férrica, la de hematoxilina eosina y la de Gallego y se hicieron las observaciones con

el microscopio fotónico.

Con el propósito de realizar un estudio estadístico y poder determinar si existen diferencias significativas, entre el tejido pulmonar de los fetos de ratón de 16 días de gestación, cuyas madres fueron tratadas con diazepam, disolvente de diazepam y suero fisiológico, se procedió a la medición del diámetro de los conductos alveolares, de la longitud de sus células y de la luz de dichos conductos. Para esto se seleccionaron al azar, en los cortes histológicos, 200 conductos alveolares de cada uno de los grupos, que fueron medidos con un ocular micrométrico a un aumento total de 600X.

La medición se hizo mediante una prueba de doble ciego, que consistió en tomar un mismo número de preparaciones de cada uno de los grupos, ocultar la identificación de los mismos, remarcarlas al azar antes de ser observadas al microscopio, evitando así errores por sugestión de la persona que realizó el estudio.

Los datos obtenidos fueron tratados estadísticamente en una computadora Digital PDP 11/40, aplicando análisis de varianza y haciendo contrastes ortogonales por medio de la prueba de Scheffé.

DESARROLLO DE LOS PULMONES

Los pulmones se originan del esbozo laringo-traqueal, que surge del epitelio de la pared del intestino interior. Este empieza adoptando la forma de un saco alargado, que se localiza por delante de la unión del esófago con la faringe primitiva, de las que pronto se aísla mediante un par de surcos laterales. La separación es caudo craneal y se detiene a nivel del extremo cefálico, para quedar unido a la faringe. El esbozo tubular que así se constituye, es precursor de la laringe, la tráquea y de las yemas pulmonares, las cuales se forman cuando su extremo caudal; en un principio único; por proliferación celular se bifurca.

Los esbozos o yemas pulmonares, son asimétricos con respecto a la línea media, teniendo un ángulo mayor el izquierdo que el derecho y representan los primordios de los dos bronquios principales.

La división celular continúa, por lo cual, poco después cada uno de estos brotes endodérmicos ciegos se dividen monopódicamente, de manera que en el brote endodérmico derecho, aparecen dos nuevos divertículos que originarán los bronquios principales de los lóbulos superior y medio, quedando el tronco principal como el bronquio del lóbulo inferior. Así, el esbozo pulmonar derecho posee tres tubos bronquiales, mientras que el izquierdo tiene únicamente dos, ya que sólo surge una rama del esbozo endodérmico izquierdo.

El desarrollo avanza y el árbol bronquial se divide dicotómicamente hasta unas dieciocho generaciones, que en general son desiguales. De esta manera, los bronquios principales originales, por la proliferación continua de las células de la porción distal y de sus paredes, producen los bronquios secundarios, que al ramificarse en sus extremos ciegos forman los bronquios de menor calibre. Las ramas siguientes, son aún más irregulares y dan origen a los bronquiolos y a los sacos alveolares, de los que brotarán los

alveolos, por divisiones polipédicas de éstos últimos.

El esbozo laringo-traqueal desde su aparición y antes de formar el árbol bronquial, crece dentro del mediastino, que es el mesodermo esplácnico que rodea el esófago.

Los bronquios principales y sus ramificaciones son cubiertas por dicho tejido, que se divide parcialmente por medio de surcos, para constituir los esbozos de los lóbulos pulmonares definitivos. Del mismo mesodermo, se originarán el músculo liso y los anillos cartilaginosos del árbol bronquial, al igual que el tejido conectivo vascularizado de los pulmones y una capa mesotelial externa, que es la pleura visceral. El mesodermo somático formará la pleura parietal, quedando entre ambas la cavidad pleural, que durante la gestación es un espacio real y postnatalmente será virtual.

Durante la mayor parte de la vida fetal, el epitelio de los bronquiolos, los sacos alveolares y de los alveolos es cuboide y de acuerdo al aspecto histológico que presenta en general todo el árbol respiratorio, el desarrollo pulmonar se ha dividido convencionalmente en tres estadios, que son los periodos glandular, canalicular y alveolar.

El primero o glandular, se caracteriza por ser la etapa en la que se establecen las principales divisiones bronquiales y las células de los conductos son cilíndricas, altas, con núcleos oscuros, con una luz muy estrecha y el tejido conectivo laxo, presenta una cantidad muy reducida de vasos sanguíneos, tanto los conductos como el tejido mesenquimático, están en activa proliferación celular y todo esto constituye, a que el aspecto histológico del pulmón, en este momento, sea muy semejante al de una glándula.

En el segundo estadio o canalicular, se delinearán con mayor precisión las porciones respiratorias, las células son más cuboi-

des que cilíndricas, la luz de los conductos es mayor, a lo que se debe el aspecto canalicular. El tejido conectivo adquiere más vasos sanguíneos, sin embargo éstos permanecen entre el estroma y -- están poco relacionados con las ramas terminales del árbol bron-- quial.

Durante el último período del desarrollo pulmonar, que es el alveolar, el epitelio de los alveolos se aplana, quedando --- constituido por células pavimentosas, de citoplasma claro y núcleo que sobresale ligeramente del mismo. Algunas células de los alveolos presentan un aspecto diferente, no son tan planas y su cito--- plasma es granuloso, éstas son las encargadas de secretar el factor tensoactivo, que empieza a formarse al mismo tiempo que se diferencián los alveolos. Los vasos sanguíneos originan abundantes capilares, que se adhieren íntimamente al epitelio alveolar, quedando con esto constituido un pulmón eficiente para el intercambio gaseoso postnatal. En principio, el pulmón no es un saco vacío -- que se llena de aire al nacimiento, sino que es un árbol bronquial que contiene líquido, que tendrá que ser substituido por aire, en las primeras horas de la vida postnatal, avanzando el proceso de -- la reabsorción de la porción central, a la periférica.

RESULTADOS HISTOLOGICOS

En los fetos de ratón de 16 días, cuyas madres fueron inyectadas durante la gestación con suero fisiológico, se observó -- que la estructura histológica del pulmón era la siguiente.

A bajo aumento se pueden identificar todos los tipos de ramificaciones del árbol bronquial, como son los bronquios principales, bronquios secundarios, bronquiolos y los conductos alveolares. Fig 1.

A ésta edad, aún no se han diferenciado los alveolos, por lo que las porciones terminales del árbol bronquial son los conductos alveolares, que en los cortes histológicos están distendidos, al igual que el resto de las ramas, lo que le da el aspecto canalicular típico. Fig. 2 .

Los bronquios principales presentan una luz amplia, limitada por un epitelio pseudoestratificado, cilíndrico ciliado, que forma pliegues en los que se observa que en las cimas hay de 3 a 4 hileras de núcleos, localizados a diferentes alturas, aún cuando -- tienden a ser apicales, dando la impresión de ser un epitelio es-- tratificado, en cambio en los valles el epitelio es más delgado y sólo tiene de 1 a 2 hileras de núcleos, que también se encuentran a diferente nivel . En él se pueden distinguir dos tipos de células, unas que tienen núcleo ovalado o un poco alargado, con la -- cromatina constituida por gránulos pequeños distribuidos irregularmente en el jugo nuclear y 1 a 2 nucleolos no muy grandes. El citoplasma de éstas células es escaso, con granulaciones de corto -- diámetro. El segundo tipo de células que constituyen al epitelio, son las caliciformes, que son un poco más cortas, con núcleo grande, esférico o ligeramente ovalado, con la cromatina en grumos pequeños, jugo nuclear abundante y 1 a 2 nucleolos, su citoplasma es más claro, con escasas granulaciones. En el ápice de estas células se distinguen con claridad proyecciones citoplásmicas y globulitos de secreción que se encuentran en la zona periférica de la

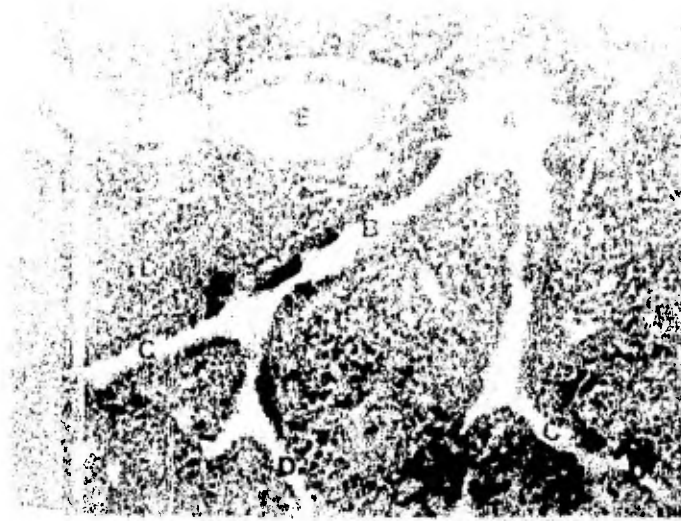


Fig. 1. Corte histológico del pulmón de un feto de ratón de 15 días, del grupo tratado con suero fisiológico, en el que se observan un bronquio principal (A), bronquios secundarios (B), bronquiólos (C), conductos alveolares (D), vasos sanguíneos (E), el estroma pulmonar (G), a la pteura visceral (G). 500X.

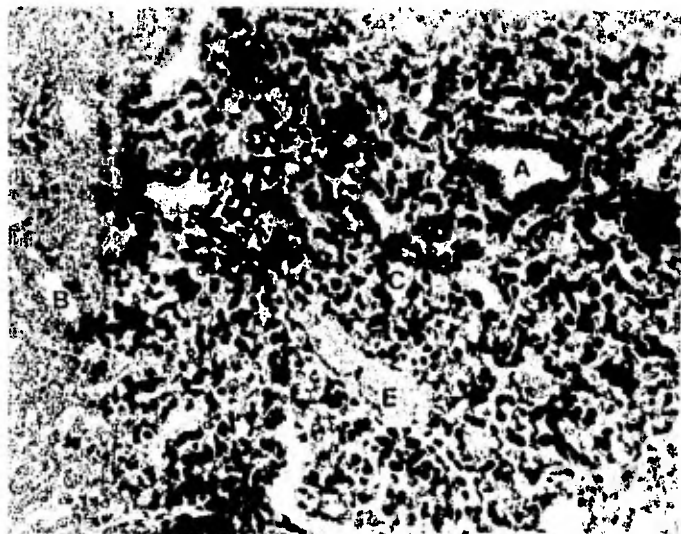


Fig. 2. Aspecto histológico que presentan los bronquios secundarios (A), los bronquiólos (B) y los conductos alveolares (C), el estroma pulmonar (D) y los vasos sanguíneos (E), del pulmón de fetos de hembras de ratón inyectadas con suero fisiológico, del 6º al 15º días de la gestación. 925X.

luz y en contacto con las células. Estas secreciones mucosas tienen finas granulaciones basófilas y en general enmascaran a los cilios de las células epiteliales. Fig. 3.

El epitelio descansa sobre una fina membrana basal anhistológica, que lo separa del tejido conectivo del estroma pulmonar que se condensa alrededor de los bronquios principales. Dicho tejido está formado por 2 a 3 capas de células, de las cuales la mayoría son de forma alargada, con el eje paralelo a la membrana basal, - su núcleo es redondo o fusiforme con la cromatina constituida por gránulos finos que se tiñen intensamente con las hematoxilinas de Harris y Weigert y con la fucsina básica. En general presentan de 2 a 3 nucleolos grandes. El citoplasma es acidófilo y contiene fibrillas. Entre las prolongaciones citoplásmicas de las células se alcanza a distinguir abundante material intercelular de estructura fibrilar. Este tejido penetra en el eje de los pliegues epiteliales, constituyendo así, el eje de los mismos. Fig. 3 .

Los bronquios secundarios presentan una luz menor que la de los bronquios primarios, el epitelio es cilíndrico pseudoestratificado, ciliado con un número aproximado de 2 a 3 hileras de núcleos, las células con de menor longitud que las del epitelio de los bronquios primarios y aún cuando no se encuentra plegado, su espesor no es uniforme a lo largo de éstos. También en este caso existen los mismos tipos celulares que se describieron en el epitelio de los bronquios principales, sólo que las células caliciformes son más abundantes y un poco más cortas. Los globulitos de secreción se observan en una proporción mayor que la que se encuentra en los bronquios principales, son más grandes y en ocasiones se encuentran unidos por medio de pedúnculos al ápice de las células. Fig. 4.

Los bronquiolos son conductos con una luz más estrecha -- que la que presentan los bronquios secundarios, están revestidos por un epitelio pseudoestratificado bajo, ciliado, en el que los núcleos se encuentran colocados a diferentes niveles, dando la --



Fig. 3. Corte histológico de un bronquio principal del pulmón de un feto de 16 días, del grupo que recibió suero fisiológico en el que se pueden identificar el epitelio plegado, constituido por unas células con citoplasma escaso y núcleo alargado (A) y por otras más cortas con el núcleo más grande y esférico (B), los glóbulos de secreción (C) y el tejido conectivo que refuerza la pared. (D). 1850X.

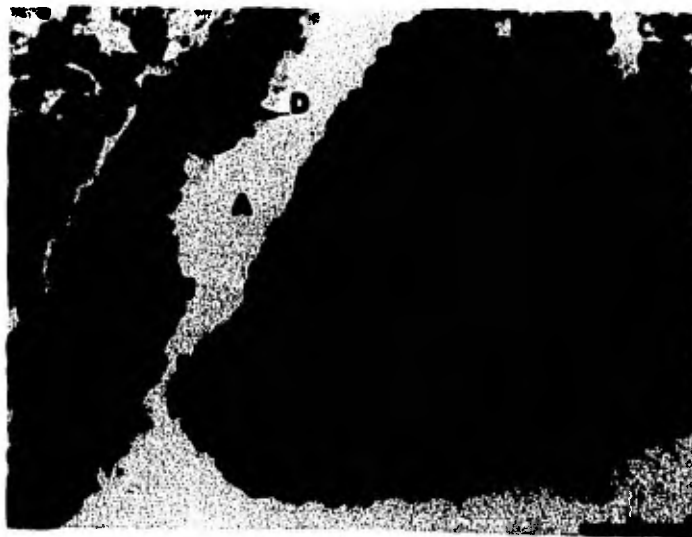


Fig. 4. Pared de los bronquios secundarios del pulmón de un feto de ratón del grupo testigo, con la luz más estrecha (A), el epitelio con las células de núcleo alargado y el citoplasma oscuro (B) y otras con núcleo esférico y citoplasma claro (C), los glóbulos de secreción (D), el tejido conectivo (E) y conductos alveolares (F). 1850X.

apariencia de formar hasta dos hileras. En el epitelio se distinguen dos tipos de células, unas que presentan un citoplasma claro, con pocas granulaciones y otras en las que existen abundantes gránulos pequeños. En las dos clases de células, la porción apical está ocupada por el citoplasma, ya que el núcleo es basal. En las que presentan una gran cantidad de granulaciones citoplásmicas, el núcleo es voluminoso y ocupa más de la mitad de la longitud de las células, su forma es redondeada u ovalada, con la cromatina constituida por gránulos medianos y tiene 2 a 3 nucleolos. Fig. 5 .

En contacto con la porción apical de éstas, existe una gran cantidad de glóbulos de secreción, que en algunos casos parecen estar adheridos a las células por medio de un pedúnculo y en otros, están libres en la luz del conducto. En las células de citoplasma más claro, el núcleo es más pequeño, esférico, con la cromatina formada por granos finos y 1 a 2 nucleolos. Fig. 5 .

La membrana basal es muy delgada y está en contacto con el epitelio y el tejido conectivo que rodea a los bronquiolos, que en este caso es un poco más escaso que en los bronquios principales y se condensan como una hilera de células alargadas, con núcleos pequeños, esféricos u ovalados con la cromatina semicomcompacta. Fig. 5 .

Los conductos alveolares son tubos delgados, revestidos por epitelio cuboide más bajo que el de los bronquiolos, que en algunos casos es ligeramente aplanado y presentan únicamente una hilera de núcleos. El borde interno de las células es redondeado lo que hace que en algunos casos den la apariencia de tener forma ovalada. El núcleo es muy grande, redondeado, con la cromatina formada por gránulos medianos y 2 a 3 nucleolos grandes. El citoplasma es claro, dando la apariencia de ser una vacuola situada sobre el núcleo, con la porción apical un poco más densa, debido a la presencia de una gran cantidad de granulaciones. Dicho citoplasma, en algunas células secretan globulitos que se localizan -

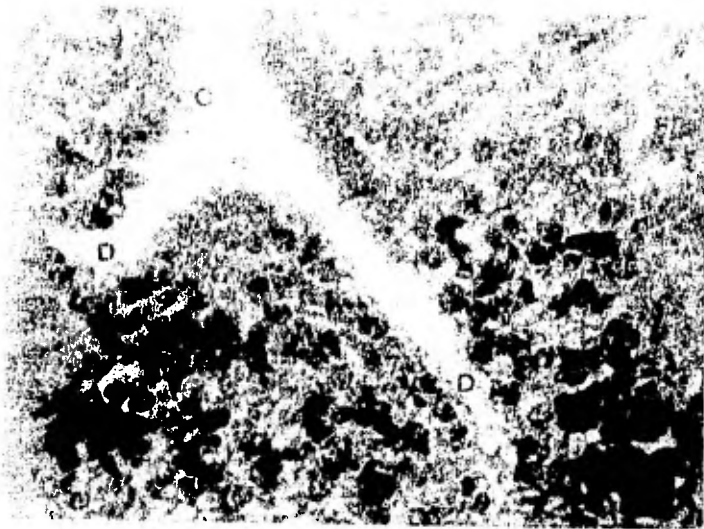


Fig. 5. Bronquicelo de un feto de ratón del grupo tratado con suero fisiológico, en el que se pueden identificar el epitelio con dos tipos celulares (A) y (B) con globulitos secretados (C). Este conducto se ramifica en los conductos alveolares (D) que se localizan entre el tejido conectivo (E) con vasos sanguíneos (F). 1350X.

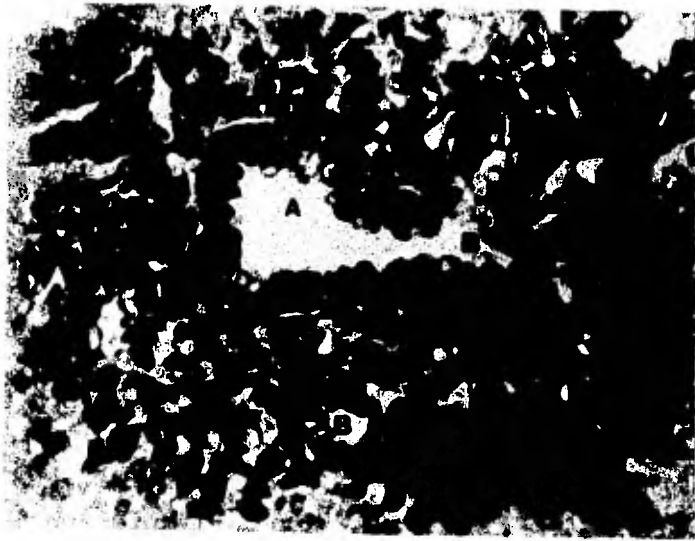


Fig. 6. Corte de pulmón de un feto del grupo inyectado con suero fisiológico, en el que se distingue la porción terminal de un bronquicelo (A), ramificandose en los conductos alveolares (B) con epitelio monoestratificado constituido por células bajas con núcleo esférico (C). Entre los conductos está el estroma pulmonar (D) con vasos sanguíneos (E). 1350X.

en su borde apical y pueden o no estar unidos a la pared celular. La membrana basal por ser tan fina, es difícil de identificar.

El tejido conectivo que forma parte de la pared de estos conductos, está constituido por una capa de fibroblastos que tienen núcleo esférico o ligeramente ovalado, con la cromatina en gránulos con gran afinidad tintórea y 2 a 3 nucleolos. Fig. 6 .

La yema terminal de los conductos alveolares, tiene una estructura histológica muy semejante a la descrita anteriormente y serán las porciones que originarán a los alveolos, que aún no se han diferenciado en los fetos de dieciséis días de gestación, ya que se encuentra en la etapa canalicular. Fig. 7 y 8 .

La única diferencia que se puede observar es una ligera disminución del espesor del epitelio y que el citoplasma de las células es más claro. Fig. 6 y 7 .

Entre las ramas del árbol respiratorio se localiza el estroma pulmonar, que está constituido por tejido conectivo vascularizado.

Los fibroblastos del tejido conectivo son estrellados y sus prolongaciones citoplásmicas se mezclan entrelazándose para formar una red semicompacta, en la que se depositan las fibras colágenas y elásticas. Los núcleos de estas células tienen forma que varía desde la esférica a la fusiforme, siendo en ocasiones irregulares, la cromatina tiene granulación y fibrillas que forman finas redes y presentan hasta 5 nucleolos grandes, que se tiñen intensamente. Fig. 7 y 8.

Entre esta trama se encuentran los vasos sanguíneos tanto arteriales como venosos, que no son muy abundantes, sobre todo los capilares, y estos últimos aún están alejados de las ramas terminales del árbol bronquial . Fig. 7 .

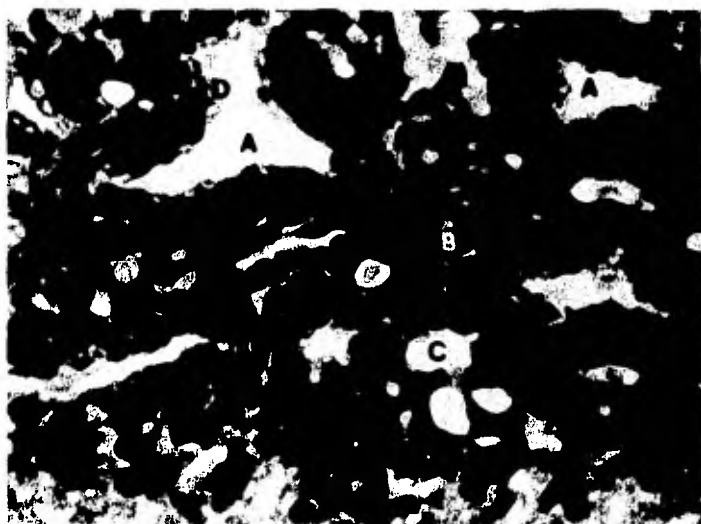


Fig. 7. Porciones terminales de los conductos alveolares (A) del pulmón de un feto del grupo inyectado con suero fisiológico, localizados entre el extremo pulmonar (B), con abundantes vasos sanguíneos (C). Las células epiteliales muestran actividad secretora en la porción apical (B). 1850X.

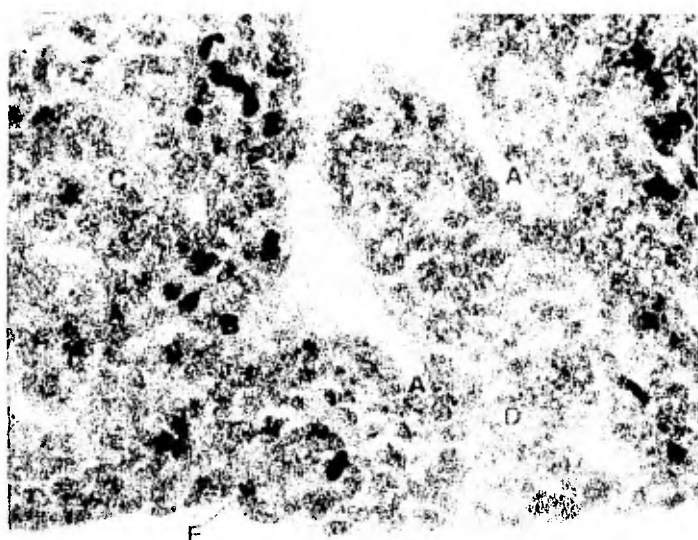


Fig. 8. Yemas terminales de los conductos alveolares (A) del pulmón de feto de ratón del grupo tratado con suero fisiológico, con el epitelio monostromatico (B), al extremo pulmonar (C), con vasos sanguíneos (D) y tejido conectivo (E). 1850X.

La estructura de la pared de los vasos es primitiva y está constituida por un endotelio pavimentoso, con núcleos que sobresalen hacia la luz del mismo, siendo más voluminoso y casi esférico en el endotelio de las arteriolas y fusiformes en los capilares. En las arteriolas el endotelio está rodeado por varias capas de tejido conectivo, que se diferenciarán en las capas definitivas de las arteriolas, en cambio en los capilares la pared es exclusivamente endotelial. Figs. 1 y 7.

Los elementos sanguíneos que se observan en los vasos son principalmente eritrocitos y escasos eritoblastos, que se distinguen por tener un pequeño núcleo picnótico. Fig. 7. También se pueden identificar a los leucocitos, siendo más frecuentes hallar entre el tejido conectivo a los polimorfonucleados y macrófagos tisulares, al igual que algunas células con múltiples granulaciones de gran tamaño, que parecen ser células cebadas.

Formando la capa más externa del pulmón se localiza la pleura visceral, que es un mesotelio monoestratificado, con aspecto semejante al del endotelio, ya que sus células son pavimentosas con núcleos alargados y escaso citoplasma claro. Figs. 1 y 8.

En el pulmón de los fetos de ratón del grupo que fue tratado con el disolvente del diazepam, no se observaron diferencias histológicas al ser comparados con el de los fetos cuyas madres fueron inyectadas con suero fisiológico, lo cual puede comprobarse en las figuras 9 a la 13.

En los cortes histológicos del pulmón de los fetos del grupo al que se inyectó con diazepam se distingue con claridad que el aspecto es diferente aún a menor aumento. Fig. 14., puesto que en general el árbol bronquial tiene una luz más estrecha, lo que es más evidente en las regiones periféricas, pues en los conductos alveolares es muy reducida y en ocasiones está ausente, lo que le da un aspecto glandular más que el canalicular que es característico de fetos de 16 días de gestación. Fig. 15.

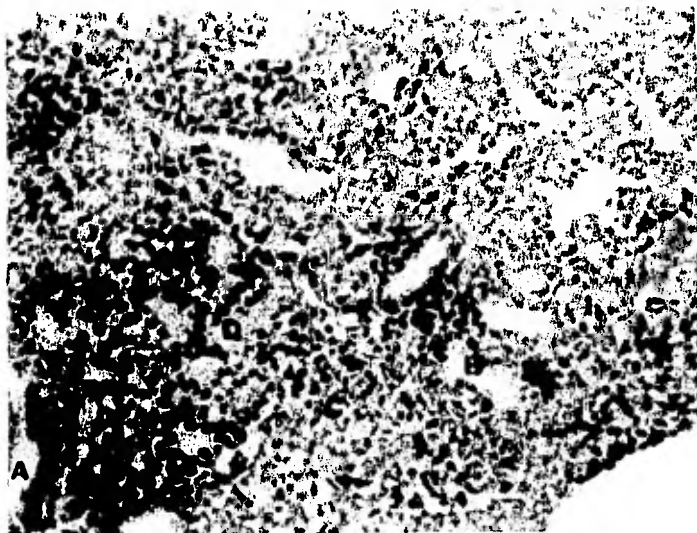


Fig.9. Corte histológico del pulmón de un feto de ratón de 16 días, cuya madre fue tratada con el disolvente del diazepam, en el que se distingue parte de un bronquiolo (A), conductos alveolares distendidos normalmente (B) y el estroma pulmonar (C) con vasos sanguíneos (D). 925X.

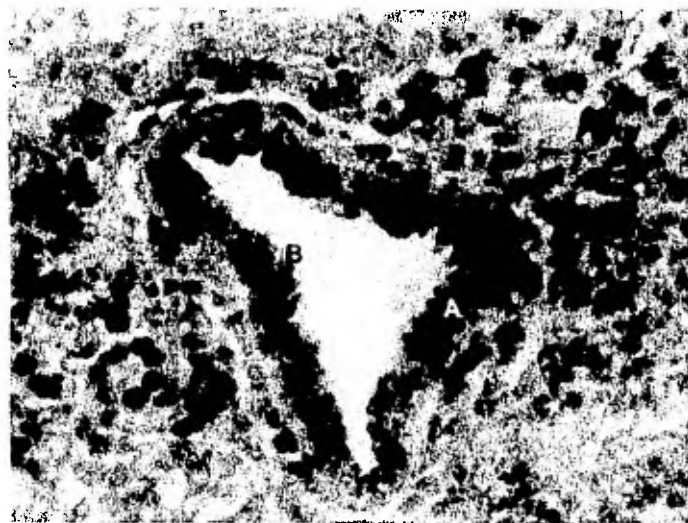


Fig.10. Bronquio secundario de un feto de ratón del grupo inyectado con el disolvente del diazepam, en el que se observa el epitelio (A) con globulitos secretados (B) y tejido conectivo (C), que morfológicamente son iguales a los del grupo que fue tratado con suero fisiológico. 1850X.

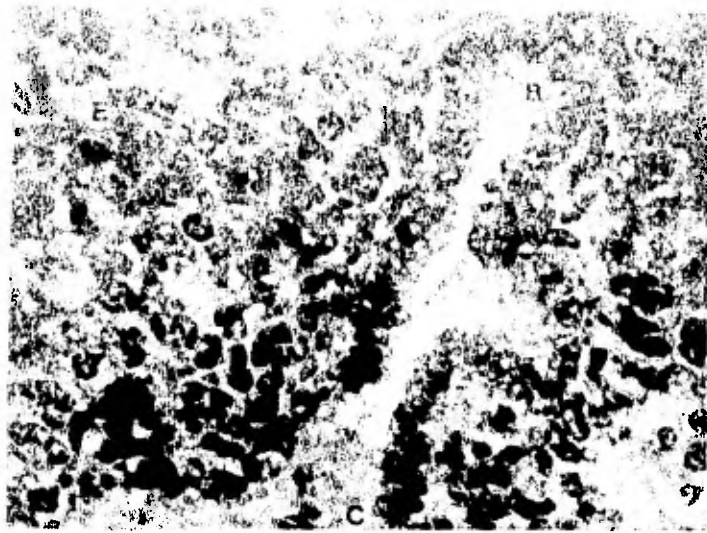


Fig.11. Corte de pulmón de un feto de ratón de una hembra inyectada con el disolvente del diazepam, que muestra la porción terminal de un bronquiólo (A), con epitelio monoestratificado productor de secreciones (B). Este se ha dividido originando conductos alveolares (C), localizados entre el tejido conectivo (D) con vasos sanguíneos (E), con apariencia normal. 1850X.

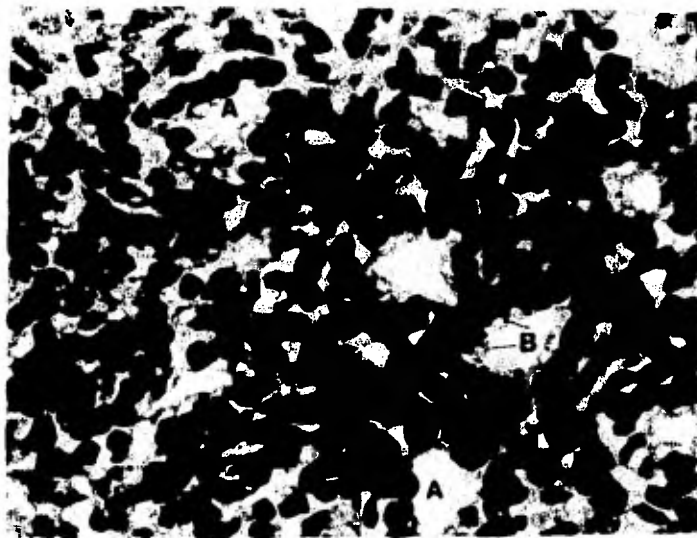


Fig.12. Como se puede observar en esta fotomicrografía, al aspecto del pulmón de los fetos del grupo inyectado con el disolvente del diazepam es normal, ya que los conductos alveolares (A) tienen células secretoras (B) con núcleos esféricos y están distendidos normalmente. 1850X.

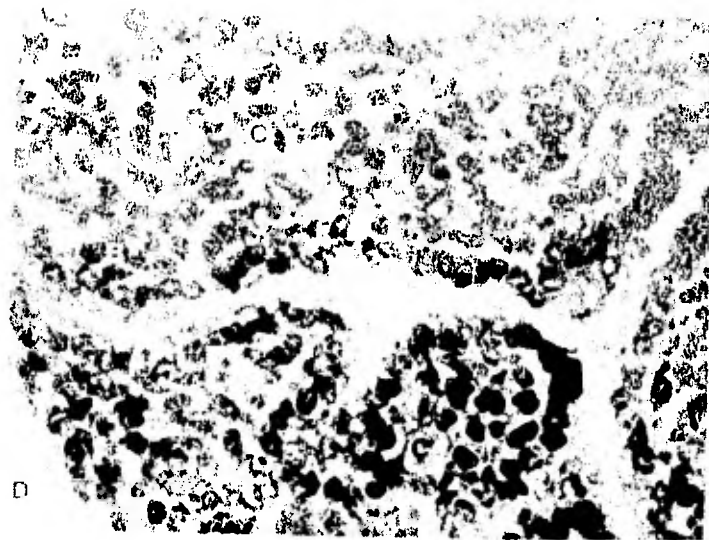


Fig. 13. Corte de pulmón de un feto del grupo tratado con el disolvente del diazepam en el que se pueden identificar las yemas terminales de un conducto alveolar (A), constituidos por un epitelio cuboide secretor, con núcleos esféricos y tejido conectivo (B) con abundantes vasos sanguíneos (C). También se observa la pleura visceral (D). 1850X.



Fig. 14. Corte histológico de pulmón de feto de ratón de 16 días, del grupo tratado con diazepam a una dosis de 2.666 mg/Kg en el que se pueden identificar bronquios secundarios (A), bronquiolos (B) y conductos alveolares (C), los cuales tiene una luz reducida o ausente (D) y el estroma (E) con vasos sanguíneos (F). 592X.



Fig. 15. Como se puede observar en este corte del pulmón de un -- feto del grupo tratado con diazepam, la distención de -- las ramas del árbol bronquial es mínima, lo que le da -- una apariencia más bien de tipo glandular que canalicu-- lar. En éste se legran identificar un bronquio secunda-- rio (A), un bronquiolo (B), conductos alveolares (C), el estroma pulmonar (D) y vasos sanguíneos (E). 925X.

En los bronquios principales el epitelio es pseudoestrati-- ficado, sólo que en las cimas de los pliegues tiene de 2 a 3 hile-- ras de núcleos en lugar de las 3 a 4 que se observan en los contro-- les y en algunos valles hay una hilera, siendo más frecuente dis-- tinguir dos, llamando la atención que el espesor del epitelio se -- mantiene con cambios poco notables.

Los tipos celulares son los mismos y en el que presenta nú-- cleos un poco más ovalados, el citoplasma se tiñe con mayor inten-- sidad, pudiéndose identificar en él gránulos basófilos, gruesos, -- distribuidos irregularmente y en general es notable que las céllu-- las de este epitelio tienen una mayor afinidad tintórea, observán-- dose con frecuencia vacuolas de diferentes tamaños, localizadas -- preferentemente hacia el polo apical. La superficie interna de estas células da la impresión de ser lisa, más teñida y producen una menor cantidad de secreciones, existiendo sólo algunos glóbu-- los localizados en la luz cerca de su porción apical. La membrana



Fig. 16-1. Bronquio principal de un feto del grupo tratado con diazepam, a una dosis de 2.666 mg/kg. 1850X.

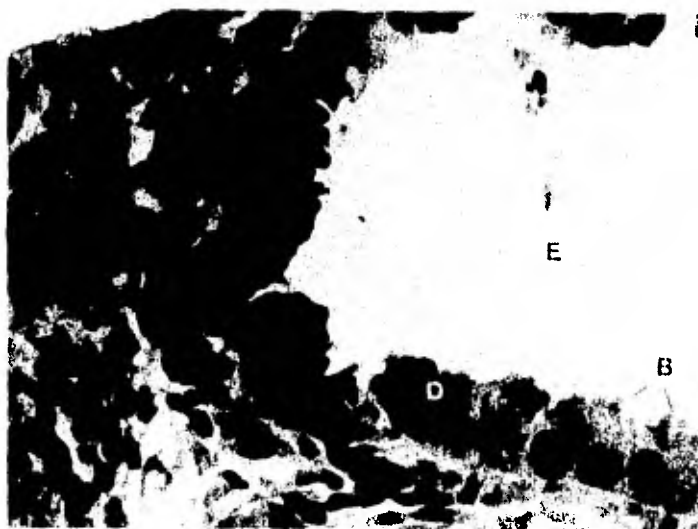


Fig. 16-2. Bronquio principal de un feto del grupo inyectado con suero fisiológico. 1850X.

Al comparar las figuras 16-1 y 2 se observa que el epitelio en el primero está menos plegado, es más delgado, presenta menor cantidad de células glandulares (A), produce escasa secreción (B), por lo que el borde apical es liso (C), las células con núcleos alargados son más cortas (D), la luz es más estrecha (E) y el estroma pulmonar tiene una apariencia normal (F). 1850X.

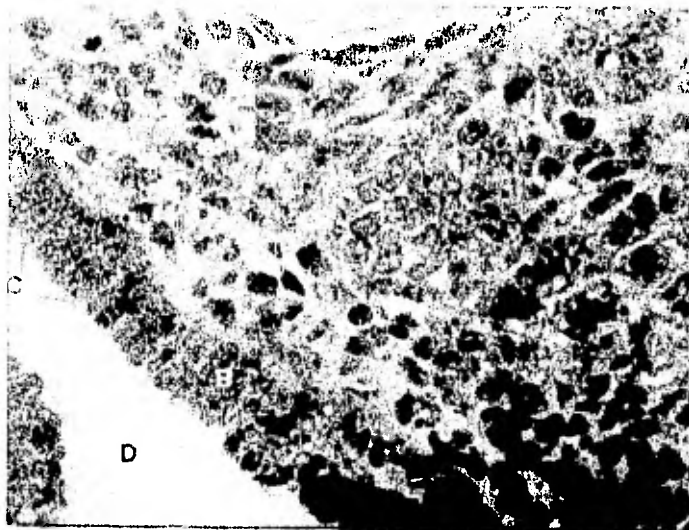


Fig. 17-1. Corte de la pared de un bronquio secundario del pulmón de un feto de ratón del grupo tratado con diazepam. 1850X.



Fig. 17-2. Corte de la pared de un bronquio secundario del pulmón de un feto de ratón, cuya madre fue inyectada con suero fisiológico. 1850X.

Comparando las figuras 17-1 y 2 se distingue con claridad que en el epitelio es más bajo en el feto del grupo experimental que tiene un número reducido de células secretoras (A) en comparación con las no secretoras (B), los glóbulos secretados (B) son escasos y la luz (D) es estrecha.

y el tejido conectivo que refuerzan su pared aparentemente no muestran alteraciones morfológicas . Fig. 16 - 1.

En los bronquios secundarios el epitelio es más delgado, - pseudoestratificado en el que los núcleos se distribuyen en 1 a 2 hileras, dando la impresión de estar formando una empalizada, -- pues son alargadas y delgadas. El citoplasma también está más teñido y las células contienen granulaciones basófilas, gruesas, distribuidas en el citoplasma, acentuándose en la porción apical en la que se nota una gran disminución de la cantidad de secreciones producidas por el epitelio, observándose algunas zonas lisas. Figs. 17 - 1 y 18 .

En los bronquiolos se distingue un epitelio pseudoestratificado, cilíndrico, bajo, en el que los núcleos se disponen basalmente y en un sólo nivel, éstos presentan varias formas que son la alargada que ocupa prácticamente toda la longitud de la célula, -- con la cromatina constituida por gránulos gruesos dispersos en el jugo nuclear y con 1 a 2 nucleolos, la ovalada que es más corta, -- con la cromatina en gránulos de menor tamaño que forman una red, -- presentando 2 a 3 nucleolos voluminosos y los que tienden a ser esféricos, son basales, con la cromatina en grumos muy pequeños, jugo nuclear claro con 2 a 3 nucleolos grandes. Las células a las que pertenecen estos núcleos en general tienen escaso citoplasma, que contiene granulaciones basófilas condensadas principalmente -- hacia el segmento apical. En general el borde interno del epitelio se ve liso, no se distinguen los cilios y sólo en pequeñas zonas pueden observarse glóbulos de secreciones. En las células que tienen el núcleo más esférico, el citoplasma es un poco más abundante, claro, con menor cantidad de granulaciones. La luz de estos conductos es más estrecha que la que se observa en los controles. Fig, 19 - 1 .

El tejido conectivo que refuerza la pared es aparentemente normal en cuanto a morfología de sus células, notándose que son so

lamente una a dos capas de fibroblastos las que la constituyen. --
Fig. 19 - 1 .

Una de las diferencias más notables que existen entre el -
epitelio de los conductos alveolares de los fetos de hembras trata-
das con el diazepam, es que su espesor es mayor que el de los fe-
tos de grupo control, tendiendo a ser mas cilíndrico que cúbico y
la luz está reducida a la mitad. Los núcleos tienen las mismas --
formas y características descritas en el epitelio de los bronquio-
los aunque son más abundantes los redondeados. El citoplasma tie-
ne una gran cantidad de vacuolas con un contenido claro, lo que -
contrasta con el citoplasma que se localiza entre estas, el cual -
se condensa en el borde interno y contiene gránulos basófilos teñi-
dos intensamente . Esta disposición de las vacuolas y los gránu-
los al citoplasma le da un aspecto reticular. El ápice de las cé-
lulas es más bien liso en contraste con el de los controles y no -
se observan glóbulos de secreción. Figs. 20 - 1 y 21 .



Fig. 18 . Corte transversal de un bronquio secundario del pulmón
de un feto del grupo experimental en el que se ve la -
luz (A) muy reducida y la disminución de los glóbulos
secretados (B). 1850X.



Fig. 19-1. Bronquiolo y conductos alveolares de un feto del grupo tratado con diazepam. 1850X.



Fig. 19-2. Bronquiolo y conductos alveolares de un feto del grupo inyectado con suero fisiológico. 1850X.

Observando las figuras 19-1 y 2 se distingue que en el feto que recibió diazepam a una dosis de 2.666 mg/Kg el epitelio bronquial (A) es más alto, no produce secreciones (B), la luz (C) es muy estrecha, al igual que la de los conductos alveolares (D). El epitelio de dichos conductos (E) es más alto, el estroma (F) tiene apariencia normal y los vasos (G) son menos abundantes.

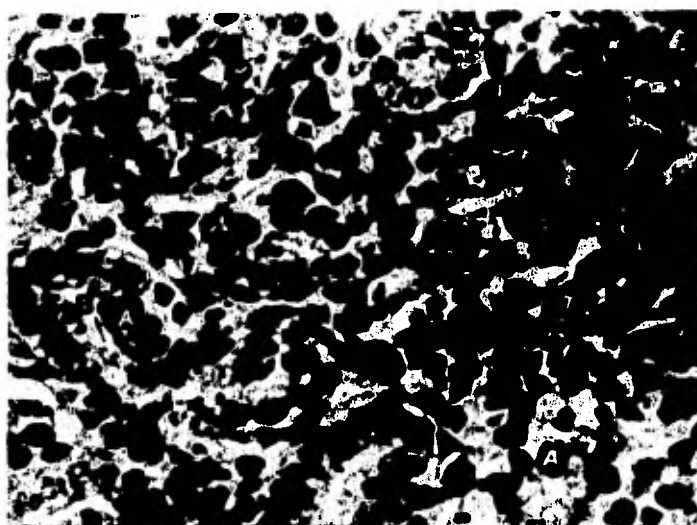


Fig. 20-1. Conductos alveolares del pulmón de un feto de 16 días de gestación del grupo tratado con diazepam. 1850X.

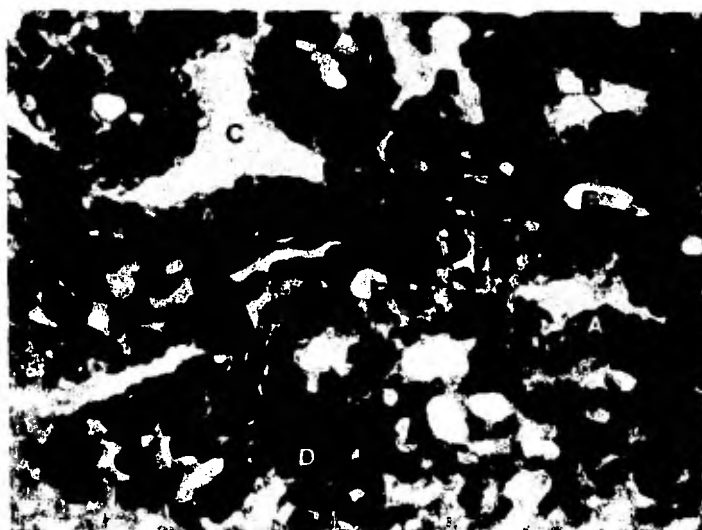


Fig. 20-2. Conductos alveolares del pulmón de un feto del grupo tratado con suero fisiológico. 1850X.

Comparando las figuras 20-1 y 2 se nota claramente que los conductos alveolares de los fetos del grupo experimental son de menor diámetro, con células (A) de mayor longitud cuyos ápices (B) llegan a tocarse. La luz (C) es muy reducida, el estroma pulmonar (D) en apariencia es normal y los vasos sanguíneos (E) son menos abundantes.

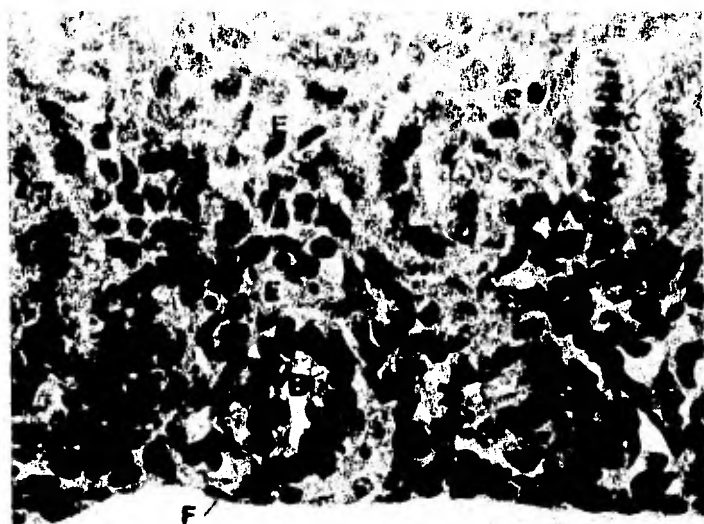


Fig. 21. Cortes transversales de la porción distal de los conductos alveolares de un feto del grupo inyectado con diazepam, con un epitelio (A) más bien cilíndrico que cuboide, con vacuolas claras (B) y superficie apical lisa (C). El estroma pulmonar (D) tiene un menor número de vasos sanguíneos (E) y la pleura visceral (F) es de aspecto normal,. 1850X.

En contacto con la membrana basal hay de una a dos capas de fibroblastos aparentemente normales.

El epitelio de las ramas terminales de los conductos alveolares tiene un aspecto radicalmente diferente al que presenta el grupo control, pues sus células son cilíndricas, con núcleos voluminosos, ovalados o esféricos, con la cromatina en grumos -- gruesos y 2 a 3 nucleolos grandes. En el citoplasma hay vacuolas claras y zonas condensadas, con granulaciones basófilas, por lo que también en este caso parece formar una red. No todas las células tienen la misma afinidad tinteora y unas se tiñen más que otras. Fig. 22 - 1 ,

Al igual que el resto del árbol bronquial la luz es muy estrecha o ausente, tocándose en este caso el borde interno de -- las células que forman al conducto. En los que tienen luz, dicho

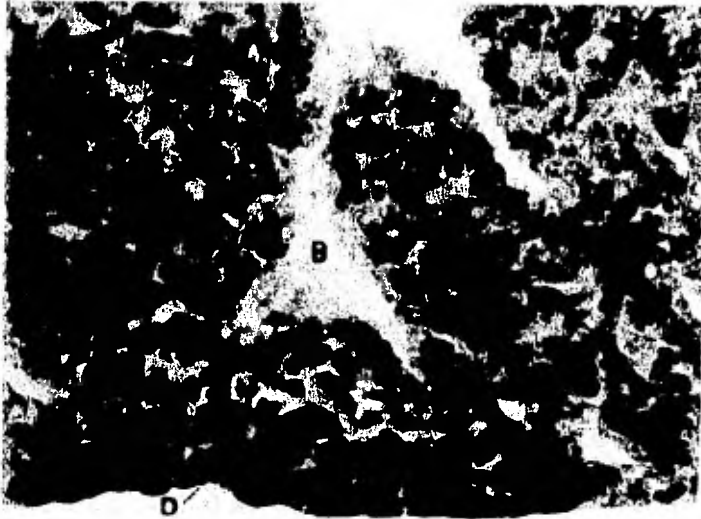


Fig. 22-1. Yemas terminales de los conductos alveolares del pulmón de un feto de ratón cuya madre fue tratada con diasepan, 1850X.

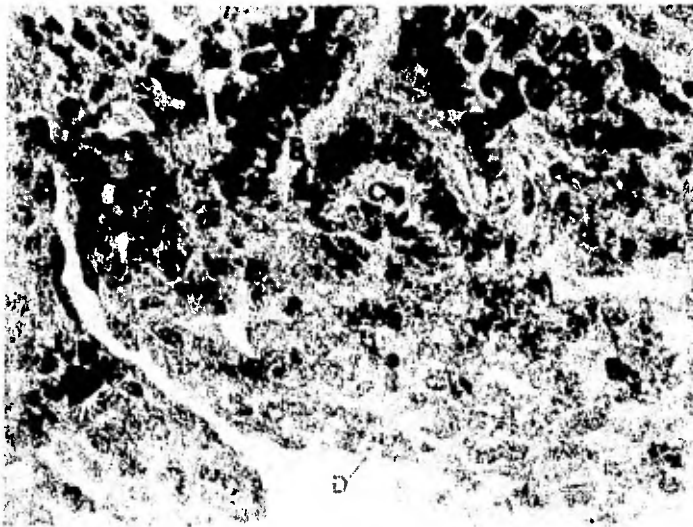


Fig. 22-2. Porciones terminales de los conductos alveolares del pulmón de un feto del mismo grupo tratado con sílice gelificada, 1850X.

Comparando las figuras 22-1 y 2 se ve que en la primera los conductos alveolares (A) tienen una luz (B) más reducida, el sistema pulmonar (C) y la pleura visceral (D) tienen un aspecto similar.

borde está aplanado y se continúa con el de las células vecinas.
Fig. 20 - 1 .

Existe aproximadamente una capa de fibroblastos que re--
fuerzan a la membrana basal y el estroma pulmonar es muy semejan--
te al del pulmón de los fetos del grupo control, notándose un li--
gero aumento de tamaño de los núcleos.

Aparentemente existe una disminución del número de vasos
sanguíneos y en la estructura de la pleura visceral no se obser--
van diferencias morfológicas, a nivel de microscopía fotónica.--
Fig. 22 - 1 .

RESULTADOS ESTADISTICOS

Los datos obtenidos, de la medición del diámetro de los conductos alveolares, de la longitud de sus células y del diámetro de su luz, que se presentan en los cuadros 1, 2 y 3 y en los histogramas de las figuras 23, 24 y 25 fueron sometidos a la prueba estadística de análisis de varianza y se hicieron contrastes ortogonales por medio de la prueba de Scheffé, comprobándose por estos métodos, que existen diferencias significativas, entre el grupo tratado con suero fisiológico (C₁) y el que recibió diazepam (E), no siendo este el caso de los grupos que fueron inyectados con suero fisiológico y el disolvente de diazepam (C₂) respectivamente.

C U A D R O 1

VALORES ESTADISTICOS DEL DIAMETRO DE LOS CONDUCTOS ALVEOLARES

	C ₁	C ₂	E
MEDIA	33.60	32.67	28.64
DESVIACION ESTANDAR	1.95	2.15	1.90

C U A D R O 2

VALORES ESTADISTICOS DE LA LONGITUD DE LAS CELULAS DE LOS CONDUCTOS ALVEOLARES.

	C ₁	C ₂	E
MEDIA	11.33	11.08	11.84
DESVIACION ESTANDAR	0.84	0.77	0.89

VALORES ESTADÍSTICOS DEL DIÁMETRO DE LA LUZ DE LOS CONDUCTOS ALVEOLARES.

	C ₁	C ₂	E
MEDIA	10.99	10.64	4.62
DESVIACION ESTANDAR	1.27	0.97	1.20

Comparando el diámetro de los conductos alveolares por -- análisis de varianza, se obtuvo una F de 85.53 por lo que la hipótesis nula se rechaza a un nivel alfa de 0.05, siendo significativa a un nivel $\ll 0.000\ 001$ (Tabla 1).

FUENTE DE VARIACION	T A B L A - I SUMA DE CUADROS	GRADOS DE LIBERTAD	CUADRO MEDIO	F
ENTRE	451.54	2	255.77	85.53
DENTRO	388.01	147	2.65	
TOTAL	839.56	149	5.63	

Resultado del análisis de varianza, realizado con las medidas del diámetro de los conductos alveolares, de los fetos de los grupos tratados con diazepam, suero fisiológico y disolvente del diazepam.

En relación a la longitud de las células de los conductos alveolares, se encontraron diferencias significativas, al nivel -- alfa de 0.05, con una F calculada de 10.32, que es significativa a un nivel de 0.000 19 (Tabla 2).

T A B L A - 2

FUENTE DE VARIACION	SUMA DE CUADRADOS	GRADOS DE LIBERTAD	CUADRADO MEDIO	F
ENTRE	9.61	2	2.80	10.32
DENTRO	68.47	147	0.46	
TOTAL	78.09	149	0.52	

Resultado del análisis de varianza efectuado con la longitud de las células de los conductos alveolares, de los fetos de los grupos tratados con diazepam, suero fisiológico y disolvente del diazepam.

Analizando los datos del diámetro de la luz de dichos conductos, se verificó que existían diferencias altamente significativas, ya que la F obtenida fue de 471.62, con lo que se rechaza la hipótesis nula a un nivel alfa de 0.05, que es significativa a un nivel $\ll 0.000\ 001$ (Tabla 3).

T A B L A - 3

FUENTE DE VARIACION	SUMA DE CUADRADOS	GRADOS DE LIBERTAD	CUADRADO MEDIO	F
ENTRE	833.66	2	416.83	471.62
DENTRO	129.92	147	0.88	
TOTAL	963.59	149	6.46	

Resultado del análisis de varianza verificado con las medidas del diámetro de la luz de los conductos alveolares, de los fetos de los grupos tratados con diazepam, suero fisiológico y disolvente de diazepam.

Con la finalidad de encontrar cuáles son los grupos que generan las diferencias halladas al efectuar el análisis de varianza, se hicieron contrastes ortogonales utilizando la prueba de Scheffé.

Cotejando los datos del diámetro de los conductos alveolares, de los fetos del grupo tratado con suero fisiológico, con los de los animales que recibieron el disolvente del diazepam, se demostró que no existen diferencias significativas, a un nivel alfa de 0.05, en cambio los contrastes entre estos dos grupos y los tratados con el diazepam son altamente significativos, a un nivel alfa $\ll 0.000\ 001$, con lo cual se comprueba que la F calculada por medio del análisis de varianza se debe a que los conductos alveolares de los fetos del grupo tratado con el diazepam, son significativamente más pequeños. En la tabla 4 se presentan los datos obtenidos al aplicar la prueba de Scheffé.

Equiparando los datos de la longitud de las células que constituyen los conductos alveolares, se confirmó que no hay diferencias estadísticamente significativas, entre la media de los grupos control y si las hay, a un nivel alfa $\ll 0.05$ cuando se comparan dichos grupos con el experimental, que fue inyectado con diazepam, a un dosis de 2.666 mg/Kg.

Los datos del diámetro de la luz de dichos conductos, al ser contrastados, arrojaron resultados iguales a los obtenidos al comparar el diámetro de los conductos alveolares y la longitud de sus células, siendo significativa la diferencia sólo entre los grupos control y el que recibió diazepam.

T A B L A - 4

COMPARACION ENTRE	DIFERENCIA DE MEDIAS	ERROR ESTANDAR	ESTADISTICA DE PRUEBA	VALOR DE TABLAS	CONCLUSION LA Ho.
SUERO Y DIAZEPAM	4.95	0.4031	12.2976	2.4631	se rechaza
DISOLVENTE Y DIAZEPAM	4.03	0.4031	10.0061	2.4631	se rechaza
SUERO Y DISOLVENTE	0.92	0.4031	2.2915	2.4631	no se rechaza

Resultados de la prueba de Scheffé, aplicada a las medidas del diámetro de los conductos alveolares, de los fetos de los grupos experimental y control.

T A B L A - 5

COMPARACION ENTRE	DIFERENCIA DE MEDIAS	ERROR ESTANDAR	ESTADISTICA DE PRUEBA	VALOR DE TABLAS	CONCLUSION LA Ho.
SUERO Y DIAZEPAM	0.5082	0.1694	3.0001	2.4631	se rechaza
DISOLVENTE Y DIAZEPAM	0.7546	0.1694	4.4547	2.4631	se rechaza
SUERO Y DISOLVENTE	0.2464	0.1694	1.4546	2.4631	no se rechaza

Resultado de la prueba de Scheffé, practicada en las medidas de la longitud de las células de los conductos alveolares, de los fetos de los grupos experimental y control.

T A B L A - 6

COMPARACION ENTRE	DIFERENCIA DE MEDIAS	ERROR ESTANDAR	ESTADISTICA DE PRUEBA	VALOR DE TABLAS	CONCLUSION: LA Ho.
SUERO Y DIAZEPAM	6.3756	0.2333	27.3243	2.4631	se rechaza
DISOLVENTE Y DIAZEPAM	6.0214	0.2333	25.8062	2.4631	se rechaza
SUERO Y DISOLVENTE	0.3542	0.2333	1.5180	2.4631	no se rechaza

Resultado de la prueba de Scheffé, aplicada a las medidas del diámetro de la luz de los conductos alveolares, de los fetos de los grupos experimental y control.

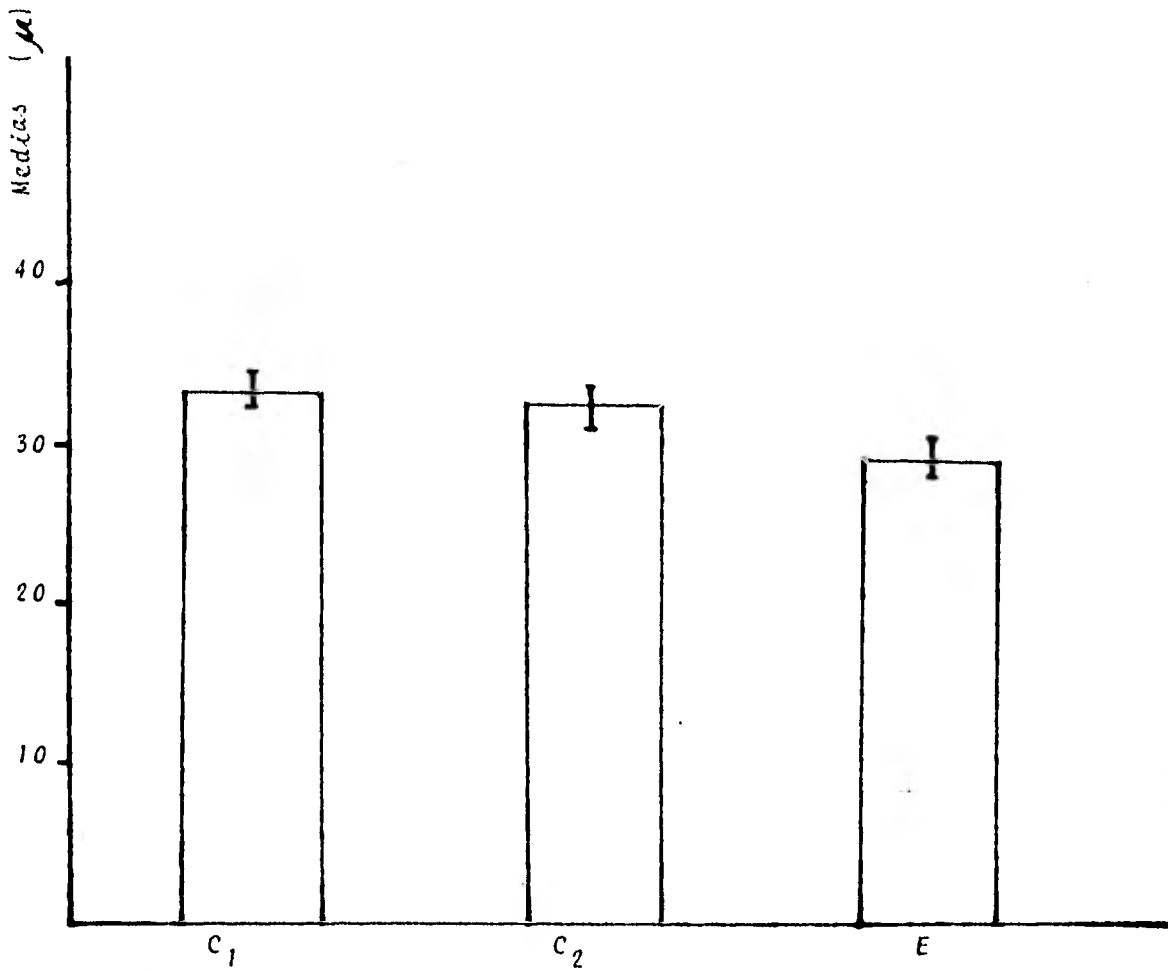


Fig. 23.- Promedio del diámetro de los conductos alveolares de los grupos tratados con suero fisiológico (C₁), disolvente del diazepam (C₂) y diazepam (E) a una dosis de 2.666 mg/Kg.

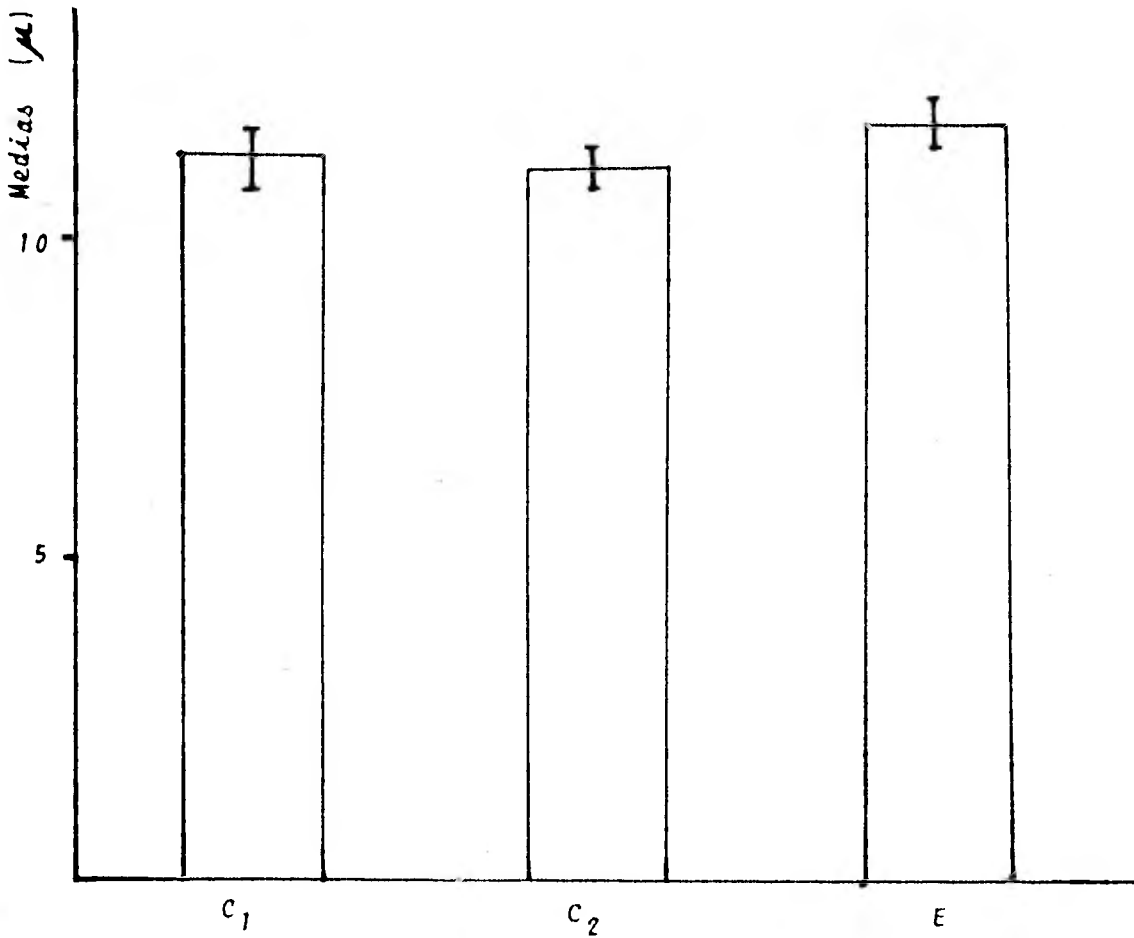


Fig. 24,- Promedio de la longitud de las células de los conductos alveolares de los grupos tratados con suero fisiológico (C₁), disolvente del diazepam (C₂) y diazepam a una dosis de 2.666 mg/Kg (E).

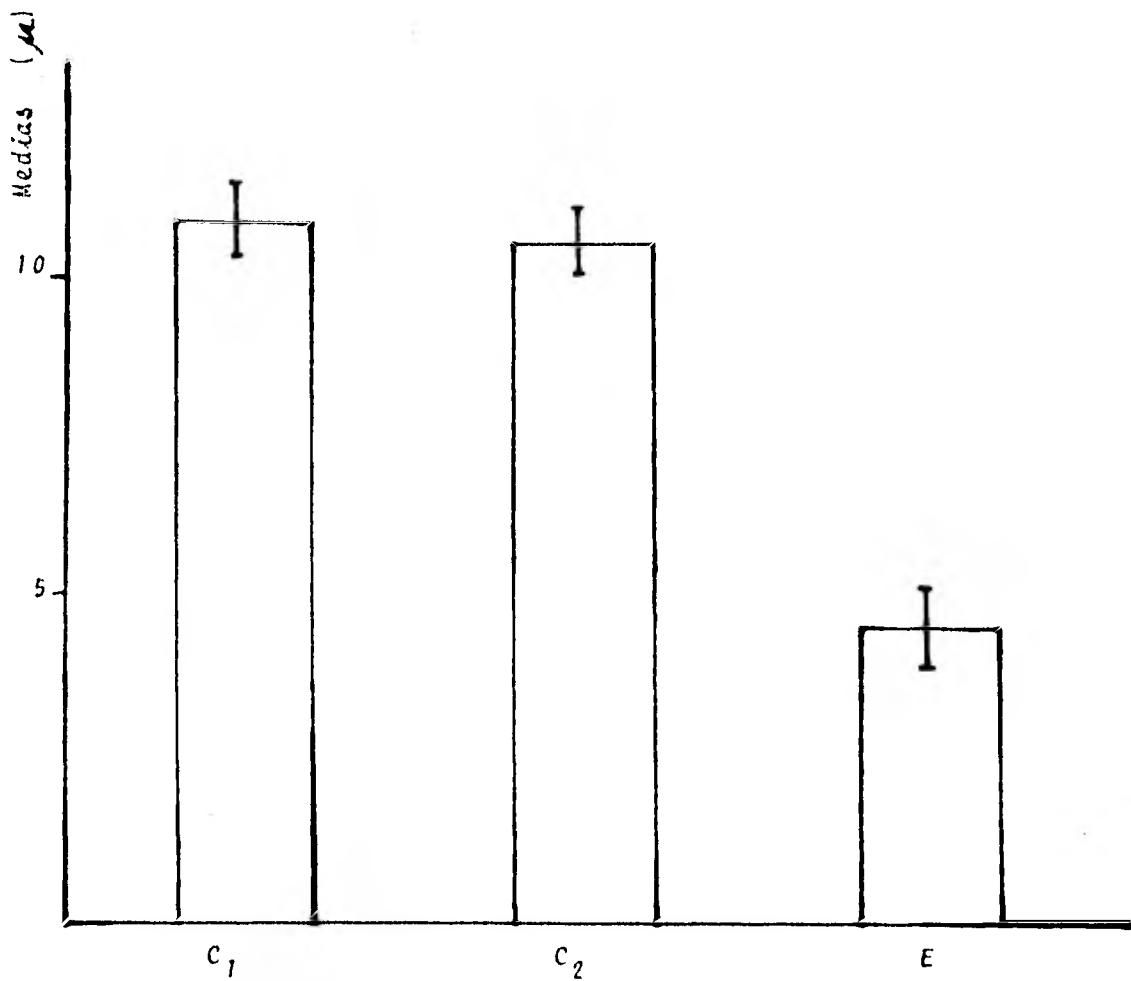


Fig. 25.- Promedio del diámetro de la luz de los conductos alveolares de los grupos tratados con suero fisiológico (C₁), disolvente del diazepam (C₂) y diazepam a una dosis de 2.666 mg/Kg (E).

DISCUSION Y CONCLUSIONES

La estructura histológica del pulmón de los fetos de ratón de hembras tratadas con una dosis de diazepam de 2.666 mg/Kg está alterada, siendo el epitelio del árbol bronquial el que presenta más modificaciones.

Como ya se describió en el capítulo referente a resultados histológicos, la capacidad de secreción del epitelio está disminuida, lo cual puede ser indicio de que los organelos citoplásmicos podrían estar dañados y de hecho al observar al microscopio fotónico el epitelio de los conductos alveolares de los fetos tratados, se puede comprobar que el citoplasma está vacuolizado, presenta granulaciones oscuras y los globulitos de secreción son muy escasos. Por estas características se podría pensar que el retículo endoplásmico tal vez esté distendido, formando cisternas irregulares rodeadas por una gran cantidad de gránulos.

De ser así los resultados obtenidos coincidirían con las investigaciones hechas al microscopio fotónico por Breen y Stenchever (1970) en cultivos de fibroblastos a los que se les agregó diazepam a una dosis de 20 μ /ml, observando que en las células se formaban acúmulos de gránulos basófilos, el citoplasma está vacuolizado y existe una disminución del depósito de colágena.

Los mismos autores estudiaron la ultraestructura de los fibroblastos, hallando que el retículo endoplásmico rugoso estaba distendido y presentaba material electrodensó, había elementos membranosos y grandes complejos vesiculares que no se observaban en los controles. El complejo de Golgi era muy abundante, llegando a encontrar hasta tres grupos de cisternas en cada célula y el material fibrilar era muy escaso en comparación con el que presentaba los controles.

Este tipo de alteraciones se detectaron en los cultivos a los que se les agregaron tanto 0.1 μ /ml como 20 μ /ml, difiriendo

el resultado sólo en el número de células afectadas, las cuales aumentaron al incrementar la dosis, por lo que los autores señalan que no hay una relación dosis-respuesta en cuanto al tipo de modificaciones celulares producidas por el diazepam.

A nivel de microscopía fotónica se ha investigado el efecto de este fármaco, a las mismas dosis aplicadas a los cultivos de fibroblastos y en fetos de ratón, observándose alteraciones histológicas en la retina, Correa (1979), en el corazón, De la Fuente (1979), en el riñón, Ortega (1979) y en la placenta, Flores (1980), obteniendo como factor común en todos los casos, que la diferenciación y el crecimiento de los órganos estaba alterado, siendo uno de los principales hallazgos, que en la placenta el citoplasma de las células gigantes tenía grandes vacuolas, abundantes granulaciones densas y la barrera placentaria era muy delgada.

En el riñón el número de corpúsculos renales es significativamente menor, al igual que la talla y el peso de los niños. El peso y la talla del corazón de estos fetos era menor, las trabéculas carnosas de los ventrículos eran escasas y en ocasiones estaban ausentes y en la retina el espesor era menor, aún cuando las capas neuroblásticas y ganglionar tenía un número de hileras mayor y el crecimiento del globo ocular estaba retardado.

Todas estas observaciones parecen corroborar que el diazepam, produce una disminución del ritmo de la multiplicación celular, debida probablemente a la alteración de los organelos citoplásmicos y a las rupturas cromosómicas, efecto que fue probado en cultivo de fibroblastos por Breen y Stenchever (Op. cit.) y en cultivo de leucocitos humanos Stenchever y col (1969 y 1970) y aún cuando "in vivo" podría variar el efecto del diazepam con respecto al producido "in vitro", ya que en el primero existen mecanismos homeostáticos que podrían acelerar la eliminación del fármaco, esto no sucede, sino que por el contrario por las investigaciones de Van der Kleijn (1969), Idänpään-Heikkilä y col.

(1971) y Erkkola (1974) se sabe que el diazepam se acumula en los tejidos fetales, que las cantidades del fármaco que circulan en la sangre fetal son mayores que las presentes en la sangre materna y que la eliminación es más lenta en el feto que en la madre.

Otro hecho comprobado es que la cantidad de diazepam que circula en la sangre fetal, es equivalente al que se aplicó a los cultivos de fibroblastos y leucocitos humanos, pudiendo ser mayor en los tejidos en que se acumula en una gran cantidad como es el caso del pulmón, de acuerdo a los estudios de Van der Kleijn (Op cit.) .

En el caso del tejido pulmonar, el corroborar que el diámetro de los conductos alveolares está disminuido al igual que la luz y que las células epiteliales de los conductos son de mayor -- longitud, permite suponer que la función respiratoria de los fetos del grupo experimental no debe ser normal, lo que tal vez produciría hipoxia del recién nacido, con el consecuente peligro de -- daño cerebral.

En la literatura consultada Flowers (1969), existe un dato que nos permite pensar que en el hombre, el diazepam podría influir en la función respiratoria de los recién nacidos, puesto que el administrarles a mujeres embarazadas, durante el trabajo de parto 20 mg de diazepam, los productos nacieron con depresión respiratoria y al minuto postpartum tenían un Apgar de 5 a 6 o menos, este efecto desde luego podría deberse a una depresión de los centros -- respiratorios, aunque probablemente se debe a hipotonía provocada por el mismo diazepam, sin embargo en los casos en que se administra en períodos más prolongados durante el embarazo, es probable que influya en la diferenciación del epitelio del árbol respiratorio o del estroma pulmonar, ya que la depresión respiratoria también se observa en estos productos al nacimiento.

En una investigación realizada por M. Andre, M. Sibout, -- J.M. Petry et P. Vert (1973), en productos prematuros que nacieron

de 6 1/2 a 8 meses, cuyas madres fueron tratadas con diazepam a dosis que variaron de 1.5 a 14.7 mg /Kg, se indica que los productos presentaron una evidente depresión neurológica, que afectaron seriamente al centro respiratorio, asociado a hipotonía y ausencia de los reflejos primitivos, pudiéndose recuperar después de varias horas o días.

Por otra parte la disminución de la actividad secretora -- del epitelio respiratorio es un hallazgo importante, debido a que este no solo debe formar moco que colabora en la eliminación del polvo y pequeñas partículas extrañas, sino que además debe secretar el factor tensoactivo o surfactasa, indispensable para que se lleve a cabo el intercambio gaseoso.

En cuanto a la aparente disminución de la cantidad de vasos sanguíneos del estroma pulmonar, también podría explicarse por las alteraciones del ritmo de multiplicación celular y sería un motivo más para suponer que la capacidad respiratoria del feto se encuentre afectada al no tener un número normal de vasos asociados al epitelio alveolar.

De lo anteriormente expuesto, se puede concluir que:

No se encontraron diferencias significativas en la estructura histológica del pulmón de los fetos del grupo control inyectado con suero fisiológico y el tratado con el disolvente de diazepam.

El tejido pulmonar de los fetos de ratón de hembras tratadas durante la gestación, con una dosis de 2.666 mg/Kg presenta -- alteraciones, consistentes en la disminución del diámetro de la -- luz del árbol respiratorio, que es más notable en los conductos alveolares, así como un aumento de la longitud de su epitelio. Estos datos fueron sometidos a pruebas estadísticas de análisis de varianza y se hicieron contrastes ortogonales por la prueba de Scheffé, demostrando que existen diferencias significativas entre el grupo experimental y los controles.

El espesor del epitelio de los bronquios y bronquiolos es menor en los fetos del grupo tratado con el diazepam.

Este fármaco disminuye la capacidad de secreción del árbol bronquial, encontrándose zonas del epitelio con la superficie interna lisa.

Al microscopio fotónico se observa que el citoplasma de estas células epiteliales está vacuolizado y presenta abundantes gránulos basófilos.

Aparentemente está disminuido el número de vasos sanguíneos del estroma pulmonar.

De acuerdo con las observaciones realizadas y la literatura consultada, es probable que las modificaciones de la morfología del epitelio pulmonar presentes en los fetos tratados, puedan deberse a que el diazepam altera al retículo endoplásmico, a los ribosomas, al complejo de Golgi, a la membrana citoplásmica y causa rupturas cromosómicas, lo cual podría ser comprobado estudiando este tejido al microscopio electrónico.

Por el aumento del epitelio respiratorio de los conductos alveolares es probable que los fetos presenten depresión respiratoria, lo que sería necesaria comprobar mediante un estudio fisiológico. De ser así, habría hipoxia, lo que repercutiría sobre el sistema nervioso central causando muerte neuronal.

No obstante que las investigaciones efectuadas en animales de laboratorio no son extrapolables al hombre, son útiles para suponer que en éste, se podrían presentar alteraciones semejantes.

En el presente caso se sabe que niños recién nacidos de madres a las que se les ha administrado el diazepam durante el embarazo o en el parto, presentan depresión respiratoria y un Apgar de 5 a 6 o menos al minuto de nacimiento.

El tipo de malformaciones histológicas observadas mediante el presente trabajo, difícilmente podrían estudiarse en los recién nacidos, puesto que sería necesario obtener biopsias pulmonares, - lo cual podría hacerse sólo en los productos que fallecieron al nacimiento, sin embargo los resultados obtenidos permiten recomendar que se evite hasta donde sea posible, la administración del diazepam durante el embarazo, puesto que podría provocar alteraciones pulmonares, siendo más peligroso su uso al no existir una correlación directa dosis-respuesta en cuanto al tipo de alteraciones producidas y dosis relativamente pequeñas, tal vez puedan dañar al pulmón fetal, que es un órgano vital para el correcto funcionamiento postnatal del sistema nervioso central del recién nacido.

B I B L I O G R A F I A

- Andre, M., M. Sibout, J.M. Petry et P. Vert, 1973. Dépression - respiratoire et neurologique chez le prématuré -- nouveau-né de mère traitée par Diazepam. J. Gyn. - Obst. Biol. Repr. 2(4): 357 - 366.
- Bertalanffy, F.D. 1961. The Modern concept of respiratory tissue structure. Acta Cytol. 5(6): 385-389.
- Bertalanffy, F.D., 1964 a. Respiratory tissue: structure, histophysiology and cytodynamics. Part I. Review and basic - citomorphology. Int. Rev. Cytol. 16:233-328.
- Bertalanffy, F.D. 1964 b. Respiratory tissue: structure, histophysiology and cytodynamics. Part II. New approaches -- and interpretations. Int. Rev. Cytol. 17:213-297.
- Breen, P.C. and M.A. Stenchever, 1970. Some effects of diazepam on the fine structure of human fibroblasts in 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.
- De la Fuente, J.G., 1979. Determinación de alteraciones morfológicas del corazón fetal de ratones de la Cepa CD - 1 producidas por la aplicación del diazepam (Valium). Tesis profesional de Biólogo. Facultad de Ciencias. UNAM. México.
- Erkkola, R., J. Kanto and R. Sellman, 1974. Diazepam in early human pregnancy. Acta Obstet Gynee. Scand. 53:135-138.

- Flores, M. H., 1980, Estudio morfológico de la placenta de *Mus musculus* de la Cepa CD-1 tratados con diazepam (Valium). Tesis profesional de Biólogo, Facultad de Ciencias. UNAM. México .
- Flowers, C.E., A.J. Rudolph and M.M. Desmond, 1969. Diazepam (Valium) as an adjunct in obstetric analgesia. Obstet Gynecol. 34 (1): 68-81.
- Green. L., 1966. Biology of the laboratory mouse, Mc Graw Hill, - N.Y., Toronto, Sydney, London., sec. ed.
- Ham, A.W. 1975. Tratado de Histología. Ed. Interamericana., México 6a. ed.
- Ham, A.W. and K.W. Baldwin, 1941. A histological study of the development of the lung with particular reference to the nature of alveoli. Anat. Rec. 81:363-379.
- Idänpään-Heikkilä, J.E., R.J. Taska, H.A. Allen and J.C. Schoolar, 1971. Placental transfer of diazepam ¹⁴C in mice, hamsters and monkeys. J. Pharmac. Exp. Therap. 176 (3) :752-757.
- Idänpään-Heikkilä, J.E., P.I. Jouppila, J.O. Poulakka and M.S. --- Vorne, 1971. Placental transfer and fetal metabolism of diazepam in early human pregnancy. Am. J. Obstet. Gynecol. 109: 1011-1016.
- Leeson, T.S. and C.R. Leeson, 1964. A light and electron study of developing respiratory tissue in the rat. J. Anat. 98(2) : 183 - 193.
- Leeson, T.S. and C.R. Leeson, 1970 . Histología. Ed. Interamericana, Mex., 2a. ed.

- Low, F. N. and M. M. Sampaio, 1957. The pulmonary alveolar epithelium as an entodermal derivative. Anat Rec. 127:51-64.
- Mandelli, M., P. L. Morselli, S. Nordio, G. Pardi, N. Principi, F. Sereni and G. Tognoni, 1975. Placental transfer of diazepam and its disposition in the newborn. Clin. Pharmacol. Ther. 17(5): 564-572.
- Miller, R.P. and B.A. 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. Méx.
- Rojas Ramírez, J.A. 1975. Benzodiazepinas. Rev. Fac. de Med. 18(1): 32-35.
- Rugh, R. 1968. The mouse: its reproduction and development. Burgess Pub. Co., U.S.A.
- Scher, J., D.M. Hailey and R.W. Beard, 1982. The effects of diazepam on the fetus. J. Obstet. Gynecol. Brit. Comm., 79:635-638.
- Stecker, P.G. 1968. The Merck Index. An encyclopedia of chemical and drugs. Merck and Co. Ind. 8th ed.
- Stenchever, M.A. and R.B. Frankel, 1969. Some effects of diazepam in human cells in vitro. Am. J. Obstet. Gynecol. - 103: 836-842.

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

Stenchever, M.A., R.S. Frankel and J.A. Jarvis, 1970. Effect of diazepam on chromosomes of human leukocytes in vivo. AM. J. Obstet. Gynecol. 107: 456 - 460.

A G R A D E C I M I E N T O S

Deseo expresar mi más sincero agradecimiento a la M. en C. Ma. Cristina Márquez Orozco por la dirección de este trabajo, así como por sus valiosas indicaciones.

A la M. en C. Ma. del Carmen Uribe, a la M. en C. Marcela Aguilar, a la Biol. Leonor Peralta y a la Biol. Silvia Carrasco por la revisión crítica del manuscrito y sus acertados comentarios.

Al personal del Departamento de Embriología de la Facultad de Medicina de la UNAM, por las facilidades otorgadas para la realización del presente trabajo. Asimismo, a la Quím. Amalia Márquez Orozco, por su inestimable ayuda.

A la Srta. Denise Hoffman por su colaboración para llevar a cabo la presente tesis y por su amistad.

Al Sr. Tomás Cruz Mendez, del Departamento de Histología de la Facultad de Medicina de la UNAM, por su ayuda en el procesamiento de revelado e impresión del material fotográfico incluido en este trabajo.