

15
2ej



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

ESTUDIO HISTOLOGICO DEL CEREBELO DE FETOS DE RATON
EXPUESTOS DURANTE LA GESTACION A DIAZEPAM (VALIUM)

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

B I O L O G O

P R E S E N T A :

RAQUEL ANDRADE MARTINEZ

CIUDAD UIVERSITARIA

1993

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



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 está 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

I.-RESUMEN	1
II.-ANTECEDENTES DE LOS COMPUESTOS BENZODIAZEPINICOS	3
III.-METABOLISMO	5
IV.- MECANISMO DE ACCION	13
V.- TERATOGENESIS	18
A) ALTERACIONES ANATICAS	18
B) ALTERACIONES HISTOLOGICAS	20
C) ALTERACIONES CROMOSOMICAS	27
VI.- HISTOGENESIS DEL CEREBELO	31
VII.-HIPOTESIS	36
VIII.-OBJETIVOS	36
IX.-MATERIAL Y METODO	37
A) OBTENCION DE LOS ESPECIMENES	37
B) PROCESAMIENTO DEL MATERIAL	38
X.- RESULTADOS	40
A) RESULTADOS HISTOLOGICOS	40
B) RESULTADOS ESTADISTICOS	51
XI.- DISCUSION	58
XII.-CONCLUSIONES	66
XIII.-REFERENCIAS	68

I. RESUMEN

El diazepam es una droga utilizada en problemas ginecobstétricos y durante el parto. Por su carácter lipofílico y bajo peso molecular, el fármaco y sus metabolitos atraviezan la barrera placentaria con rapidez, se depositan en los tejidos del sistema nervioso central y periférico, en especial en las cortezas cerebral y cerebelar de los fetos, en las cuales persiste postnatalmente.

Considerando que el cerebelo es una estructura en la que la migración celular es un proceso muy susceptible de ser alterado por diversos fármacos durante la etapa prenatal, es de interés investigar si el diazepam administrado a hembras gestantes de ratón, altera el desarrollo histológico del cerebelo de los fetos de 18 días de gestación.

Para lo cual se aparearon hembras de ratón de la cepa CD-1 de dos meses de edad, con machos de la misma edad. Las que presentaron tapón vaginal se distribuyeron al azar en tres grupos, de los cuales el primero fue tratado con dosis únicas diarias de diazepam de 2.7 mg/kg de peso corporal, administradas por vía subcutánea del sexto al decimoséptimo día de la gestación, el segundo grupo recibió por la misma vía solución salina al 0.9%, en volúmenes equivalentes a los aplicados con el fármaco (16 μ l) y el tercero no fue tratado. Al día dieciocho, las hembras de todos los grupos fueron sacrificadas en una atmósfera de CO₂ para extraer los cerebelos fetales que se

fijaron con glutaraldehído al 2% (diluído en amortiguador de cacodilatos 0.15M), se postfijaron con tetróxido de osmio al 1% (diluído en amortiguador de cacodilatos 0.3M). se incluyeron en resina epóxica Poly/Bed 812 de Polysciences, y se hicieron cortes semifinos que se tifieron con azul de toluidina y se observaron al microscopio fotónico.

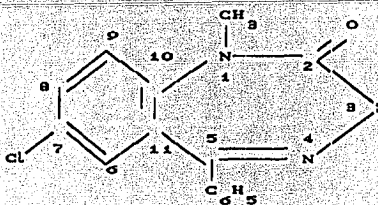
En los cortes de cerebelo, de los fetos tratados con diazepam se encontró que las células del cerebelo mostraron núcleos poco diferenciados y evidente retardo en su migración, la cromatina distribuida atípicamente, numerosas figuras mitóticas y citoplasma basófilo. El espesor de la capas granulosas externa ($p < 0.0003$) e interna ($p < 0.001$) era mayor y la capa molecular era mas angosta ($p < 0.001$) con respecto a los grupos controles.

Los resultados demuestran que el diazepam, cuando se administra durante la gestación, retrasa el desarrollo de la corteza cerebelar, probablemente por inhibición de la mitosis y por alteración en la síntesis de miosina y actina que participan en la formación del citoesqueleto, indispensable para la migración de las células gliales y neuroepiteliales, ya que el diazepam actúa sobre este tipo de células mediante los receptores benzodiazepínicos, asociados a los del GABA.

II. ANTECEDENTES DE LOS COMPUESTOS BENZODIAZEPINICOS.

Las benzodiazepinas son un grupo de compuestos sintéticos, su fórmula química se caracteriza por tener un núcleo heterocíclico denominado 1,4-benzodiazepina (1), que les confiere la capacidad de suprimir la ansiedad y actuar como anticonvulsivantes, hipnóticos y relajantes musculares al deprimir el sistema límbico, que es el sustrato principal de las emociones y de la conducta. Entre las de mayor uso terapéutico están: el diazepam (Fig.1), el clordiazepóxido, el oxazepam, el medazepam, el nitrazepam, el lorazepam y el flunitrazepam, cada una con acciones farmacológicas específicas sobre el sistema nervioso central. El clordiazepóxido, el diazepam y el nitrazepam, deprimen las fibras espinales τ con acción primaria en la formación reticular del tallo cerebral. Se caracterizan por tener un mayor umbral a menor dosis que la necesaria para relajar o sedar; por el contrario, el oxazepam y el medazepam tienen acción relajante poco significativa y son anticonvulsivantes a dosis altas.

FIGURA 1: D I A Z E P A M



7 CLORO 1,3 DIHIDRO-1-METIL-5 FENIL-2H-1,4-BENZODIAZEPIN-2-ONA

En ginec obstetricia el diazepam se ha utilizado con éxito durante el trabajo de parto, en amenazas de aborto, en casos de contracción prematura del útero, placenta previa, preeclampsia y eclampsia (2) debido a que actúa sobre el miometrio y los músculos pélvicos, regulando sus contracciones con lo que disminuye la duración del trabajo de parto, al acelerar y facilitar la relajación del mismo y de los músculos pélvicos, además de producir en la madre relajación mental y disminución de la tensión emocional (3).

En general las benzodiazepinas son sustancias incoloras, cristalinas, e hidrosolubles, a excepción del nitrazepam y el diazepam que se disuelven en alcohol y en lípidos respectivamente. Este último es también soluble en una mezcla especial elaborada por los laboratorios Roche compuesta por 40% de propilenglicol, 10% de alcohol etílico, 5% de benzoato de sodio y 1.5% de alcohol bencílico (4). El clorodiazepóxido es fotosensible a la luz e inestable en solución. Se administran por vía oral, intramuscular y en algunos casos por vía endovenosa.

Los efectos colaterales que produce la administración de diazepam, son depresión del sistema nervioso central (S.N.C.), sedación, somnolencia, confusión, apatía, relajación, debilidad muscular, incoordinación motriz, visión borrosa, vértigo y ataxia (5). Su uso frecuente puede producir efectos contrarios, ocasionando dependencia psicológica y fisiológica caracterizadas por depresión, agitación, pérdida del apetito e incluso convulsiones.

III. METABOLISMO

El diazepam administrado por vía oral, intramuscular o endovenosa es transformado en el hígado humano y en el de la rata por desmetilación en N-desmetildiazepam y por hidroxilación en oxazepam. Ambos metabolitos se conjugan con el ácido glucourónico para formar los respectivos compuestos glucourónidos y se excretan en la orina y heces fecales, en donde pueden ser detectados aún dos semanas después de la administración del fármaco. La vida media del diazepam es de 24 a 48 horas, la del N-desmetildiazepam de 42 a 96 horas y la del oxazepam de 9 a 11 horas (6).

Estudios metabólicos realizados en ratas expuestas a diazepam, marcado con carbono 14 (2.5 mg/kg; 10 μ Ci) durante los días 13 al 20 de la gestación, mostraron que el 52% del total de la radioactividad fue excretada el día 21: 10% en la orina y 42% en las heces fecales. Las concentraciones más altas de radioactividad se encontraron en el hígado y el riñón materno, por ser los sitios en donde se metaboliza y elimina respectivamente (6).

Van Der Kleijn y col. en 1969 (7), observaron que cada región del cerebro de ratones gestantes, presentaban un patrón de distribución específico después de la administración oral de diazepam marcado con carbono 14, a dosis de 30 mg/kg de peso corporal (200 μ Ci) o bien, 15 mg/kg de peso corporal (200 μ Ci) aplicados por vía endovenosa. En la sustancia gris de la corteza

cerebral de los núcleos medulares, talámico y en los colículos, encontraron un aumento progresivo de radioactividad que alcanzó su máximo entre la primera y la segunda horas. La radioactividad en la sustancia blanca, especialmente del cuerpo calloso, el mesencéfalo, la médula espinal y el cerebelo, se detectó 30 minutos después de la administración oral. Otros tejidos que presentaron altas concentraciones a los 14 segundos de la aplicación por vía endovenosa, fueron el músculo esquelético y las paredes de los vasos sanguíneos mientras que 6 horas después, los niveles disminuyeron.

En las paredes mucosas del estómago se detectó en el primer minuto y a los 9 minutos en el contenido estomacal, lo cual provocó que a los 30 minutos se detectara abundante radioactividad en el intestino delgado, el colon y el recto.

En los ojos, la radioactividad se registró durante varias horas en la coroides y las glándulas lacrimales, lo que a la vez determinó la presencia de diazepam marcado en las cavidades nasales.

En los ovarios, el cuerpo lúteo mostró gran cantidad de material marcado, aún después de 6 horas de la administración intravenosa del fármaco.

En los pulmones fue mayor que en la sangre y comparable con la registrada en el músculo esquelético, de origen esplácnico y en el páncreas.

En los nódulos linfáticos y el timo, la acumulación fue lenta, mientras que en los folículos pilosos de la piel, se detectó a los cinco minutos.

En el tejido adiposo se registraron concentraciones bajas antes de los dos minutos de la inyección y aumentaron progresivamente hasta los 30; después de este tiempo el diazepam fue biodegradado rápidamente y predominaron sus metabolitos, este proceso es inverso a lo que sucede en otros tejidos.

En la grasa corporal se encontró a los 15 minutos y desapareció a las 2 horas. En el músculo esquelético la radioactividad se fue incrementando con lentitud hasta los 10 minutos, en cambio, en los músculos cervicales hubo una gran afinidad desde el primer minuto y permaneció constante después de 10 alcanzando niveles más altos que en la sangre.

Por su carácter lipofílico y bajo peso molecular, el diazepam y sus metabolitos cruzan la barrera placentaria con rapidez, se depositan en los tejidos fetales y en especial en el cerebelo, la médula espinal y los nervios periféricos, en donde permanecen por lo menos 10 días después de su administración. Se ha detectado en concentraciones mayores en el plasma fetal que en el materno, siendo eliminados lentamente a través del tracto urinario y heces fecales en la rata (8), en el hombre (9) y en el mono (10). Por el contrario, en ratones y en hamsters las concentraciones de diazepam son mayores en el plasma materno que en el fetal (10). En la vena del cordón umbilical también

son mayores que en las arterias, lo cual refleja la transferencia placentaria de la droga y una lenta eliminación por parte del feto (3).

Otros estudios demuestran que en el hígado de fetos humanos prematuros existe una baja, pero constante actividad enzimática, que metaboliza aproximadamente el 3% del fármaco, mientras que en el grupo control, constituido por ratas adultas, la actividad enzimática es del 30% (10).

En fetos humanos de 12 a 16 semanas de edad gestacional, las concentraciones mas altas se encontraron a los 60 minutos para todos los tejidos fetales: en el tracto gastrointestinal (estómago y recto con su contenido) hubo 59.0 ng/ml de tejido, en la placenta 39 ng/ml, en el líquido amniótico 13.8 ng/ml, en el cordón umbilical 47.5 ng/ml y en el cerebro 29.0 ng/ml (9).

Por el contrario, estudios de metabolismo realizados en ratas, mediante la cuantificación de radioactividad de diazepam, marcado con carbono 14 (2.5 mg/kg; 10 μ Ci), de sus metabolitos (desmetildiazepam y oxazepam) y de sus compuestos glucourónidos, en el cerebro materno y el de fetos recién nacidos, no se encontraron diferencias significativas. En el neonato de esta edad las concentraciones mas altas se registraron en los colículos y fueron de 4.2 pmolas de diazepam y sus metabolitos en 100 mg de tejido, mientras que en el cerebelo no fueron detectados. En el día 10 neonatal los niveles de radioactividad en el cerebro fueron iguales a los encontrados en el día 0;

en cambio, en el cerebelo fueron de 3.7 pmoles de diazepam, N-desmetildiazepam y oxazepam en 100 mg de tejido, que son equivalentes a las registradas en el cerebelo materno. En los demás tejidos fetales no se detectaron (11).

Aproximadamente la mitad de la actividad del carbono 14 en el cerebro materno y en el neonatal se encontró en la fracción correspondiente a los glucourónidos, solamente el 24% en la de diazepam y 25% en la de N-desmetildiazepam. El oxazepam se detectó en el cerebro de los fetos de 10 días. Los compuestos con mayor actividad de carbono 14 fueron el N-desmetildiazepam con 39%, el 32% en la fracción de los glucourónidos, el 19% en la del diazepam y 12% en la de oxazepam (6). Por lo tanto en las crías de 10 días, aproximadamente el 70% del carbono 14 se encontró en los tres compuestos farmacológicamente activos lo que es significativamente mayor que el 50% que se detectó en el cerebro de los neonatos. En las crías de 20 días de edad ya no se detectó radioactividad en el cerebro ni en los demás tejidos estudiados: hígado, riñón, pulmón, corazón, ovarios, útero, músculo y plasma (6,11).

En niños recién nacidos de mujeres a las cuales se les administraron 10 mg del fármaco, por vía intramuscular o endovenosa, 24 horas antes del trabajo de parto, se encontró que la vida media de la droga en el neonato fue de 31.0 ± 2.2 horas. No se detectó el oxazepam y la actividad de hidroxilación fue limitada (9).

En fetos muertos "in utero" a las 31 semanas de edad

(con peso de 910 g), de madres que recibieron de manera crónica la droga durante 27 semanas consecutivas, se observó que las concentraciones tisulares de diazepam nunca excedieron a los 80 ng/g. Los niveles de N-desmetildiazepam estuvieron presentes en un rango de 78 a 284 ng/g y las concentraciones mas altas se encontraron en el pulmón y el corazón (12).

TABLA 1:

TABLA 1.- Concentraciones tisulares en (ng/g) de diazepam (DZ) y N-desmetildiazepam (NDZ) en fetos humanos de 31 semanas de edad después de la administración crónica de DZ.

TEJIDO	DZ	NDZ
cerebro	48	120
corazón	76	155
pulmón	28	284
riñón	32	78
hígado	60	110
placenta	8	80

Por otra parte se ha demostrado que el diazepam y sus metabolitos activos, pasan de la sangre a la leche materna por lo que estos compuestos han sido encontrados y medidos en las crías de ratas amamantadas por madres, que recibieron dosis de diazepam de 10mg/kg de peso corporal del cuarto al vigésimo día de la gestación (8).

Desde 1969, en los recién nacidos de mujeres que fueron tratadas durante el trabajo de parto con dosis iniciales de 20 mg de diazepam o menos, de acuerdo con el grado de sedación por vía intravenosa, se observó la presencia de hipotonía, lo cual se relacionó con el Apgar registrado en el primero y cinco minutos

del nacimiento: de 39 recién nacidos, el 7.8% registró un Apgar de 1 a 4, los cuales fueron considerados niños severamente deprimidos, el 15.3% se encontraron moderadamente deprimidos (Apgar 5-6) y el 76.5% en buenas condiciones (Apgar 7-10). A los cinco minutos el 2.6% estaban severamente deprimidos, el 10.3% moderadamente deprimidos y el 97.1% en buenas condiciones. Además, se presentaron problemas de hipotermia, depresión neurológica y respiratoria, una conducta neonatal anormal, que consistió en dificultad para la succión (13), alteraciones en el ritmo cardiaco, una respiración lenta e irregular que en ocasiones fue necesario corregirla por intubación traqueal. Estos síntomas llegaron a manifestarse aún después de 10 días del nacimiento (3)

Owens (14) registró un descenso en la temperatura rectal y corporal (abdominal y axilar) en niños recién nacidos provenientes de madres tratadas con diazepam durante el trabajo de parto. En el registro de la temperatura rectal se encontraron diferencias significativas con respecto al grupo control durante las primeras tres horas posteriores al nacimiento. Las temperaturas registradas después del parto en las regiones abdominal y axilar fueron significativamente menores: ($p < 0.001$) a la primera hora y ($p < 0.005$) a las dos horas para la región abdominal; para la axilar a la primera hora ($p < 0.01$) y a las dos horas ($p < 0.005$). La diferencia de temperatura entre las dos regiones es de 0.3°C y con respecto al grupo control de 1°C .

En neonatos de madres que recibieron 20 mg del fármaco durante el trabajo de parto, se observó una disminución significativa de la frecuencia del ritmo cardiaco, de la cual se recuperaron 65 minutos después (15).

Los hijos de mujeres con eclampsia y preeclampsia que fueron tratadas con dosis de diazepam entre 1.5 y 14.7 mg/kg de peso corporal, de acuerdo con la gravedad del padecimiento, presentaron depresión respiratoria y neurológica, hipotonía y ausencia de reflejos simples. la recuperación de estos niños fue desde 3 a 4 horas hasta 7 a 10 días.(16).

IV.MECANISMO DE ACCION.

Mediante la administración prenatal y postnatal de diazepam en ratas, se ha podido cuantificar la acción de la droga durante las diferentes fases de migración y diferenciación de las células que constituirán el cerebro, así como el desarrollo de receptores benzodiazepínicos, ya que el estado de maduración del cerebro durante el último periodo de la gestación humana, es comparable al de la rata en la primera semana postnatal (17).

Por otra parte, el cerebro de ratas recién nacidas, es equiparable bioquímicamente con el de fetos humanos de 20 semanas de gestación, así como también, los niveles plasmáticos de diazepam encontrados en ratas preñadas gestantes, a las que se les aplicaron dosis de 2.5 mg/kg de peso corporal, fueron similares a los niveles plasmáticos de diazepam y sus metabolitos detectados en mujeres, a las que se les administraron 10 a 30 mg del fármaco durante el trabajo de parto. (18).

También se sabe, que las benzodiazepinas actúan en el cerebro a través de sitios específicos de reconocimiento de la droga, las cuales forman parte del complejo oligomérico de los canales de calcio localizados en la membrana plasmática neuronal, constituidos por cuatro sitios de reconocimiento que son el de la progesterona, el de los estrógenos, el de las benzodiazepinas y el del ácido γ -aminobutírico (GABA) que es un neurotransmisor inhibitorio del sistema nervioso central. La asociación de los dos últimos explica porqué el diazepam (valium), facilita la

acción de GABA_A en dichos canales, produciendo el movimiento de iones cloro y una respuesta inhibitoria de las células receptoras (18)

Las benzodiazepinas también actúan mediante receptores de tipo periférico, detectados en una gran variedad de tipos de células como las renales, las cardiacas, las cebadas, los linfocitos, las pulmonares, las hepáticas y en las plaquetas (19, 20), en donde el sitio de unión de las benzodiazepinas no está ligado al receptor de GABA_A sino a mitocondrias, por lo que juega un papel importante en la regulación del metabolismo celular(18). El diazepam y otra benzodiazepina denominada temazepam se unen tanto a receptores de tipo periférico como central (19).

Los receptores de benzodiazepinas y el de GABA_A han sido identificados en el cerebro de ratas al empezar la tercera semana de gestación en la corteza cerebral, el hipotálamo, el cuerpo estriado, el hipocampo, la médula espinal y en particular en el cerebelo (20) así como en el cerebro de fetos humanos de doce semanas de gestación (17), lo que le confiere al diazepam la característica de ejercer un efecto ansiolítico en las ratas recién nacidas y la capacidad de incrementar el transporte máximo de iones cloro en preparaciones de cerebro íntegro de ratas de 21 días de gestación y en las de corteza cerebral de ratas de 7 días de vida postnatal, colocados en un sustrato con GABA_A, en cambio, se ha observado que en ausencia de este inhibidor dicho fármaco no tiene ningún efecto (21).

Experimentos análogos, realizados previamente con diazepam tritulado demostraron que los receptores benzodiazepínicos, están presentes en el cerebro de la rata al octavo día prenatal, que fue la edad más temprana que se estudió. En esta época, la unión fue de un 5.2% y el número de receptores por cerebro fue solamente de 0.1% del valor registrado en los animales adultos. Al nacer, la concentración de los receptores aumentó hasta un 35.4% y el número de receptores al 2.5% y siete días después del nacimiento, la concentración máxima de receptores fue de 22.1 pmol/g de tejido que correspondió a la registrada en los adultos y el número total de receptores encontrada en etapas adultas se obtuvo hasta la cuarta semana de edad (22,23).

En ratas tratadas con dosis diarias de diazepam de 2.5 y 10 mg/kg/día del décimotercero al vigésimo día de gestación, no se detectaron alteraciones en la unión de benzodiazepinas al cerebro de las recién nacidas y de las adultas jóvenes, mientras que en los animales de un año, a los que se les administraron prenatalmente dosis de diazepam de 5 mg/kg/día durante la última semana de la gestación, se encontró una reducción significativa en el número de receptores benzodiazepínicos comparado con los valores control, tanto en el cerebro anterior como en el cerebelo (24).

En ratas que recibieron dosis de diazepam de 20 mg/kg/día, en etapas tempranas o tardías de la gestación, la densidad de receptores benzodiazepínicos se incrementó en su corteza cerebral del primero al vigésimo primer día postnatal. En las ratas

tratadas al nacimiento, los receptores aumentaron sólo a los 90 días de edad, lo cual indica que de acuerdo con la etapa del desarrollo en la que se exponen los animales a la droga se modifica el periodo de maduración de los receptores benzodiazepínicos (24).

Rothe et al, en 1989 (24), al administrar a ratas dosis de diazepam de 1 mg/kg/día, por vía subcutánea durante los siguientes periodos: del séptimo al vigésimo día de la gestación, del décimoquinto día de la gestación al sexto postnatal y del séptimo al vigésimo postnatal, encontró que en el primer grupo (tratado prenatalmente), el fármaco produjo en la corteza cerebral de los animales de 90 días un incremento del 20% en las uniones de flunitrazepam radioactivo; en el hipocampo de las ratas de 60 días neonatales hubo una reducción del 14% y en la misma área se registró un aumento del 18% a los 90 días. En cuanto a la exposición perinatal, el diazepam no provocó cambios en la unión de flunitrazepam en el hipocampo de las crías jóvenes, mientras que en el cerebelo de las ratas de 28 días de edad (tratamiento postnatal) hubo un decremento en la unión de flunitrazepam del 20%.

La detección de receptores benzodiazepínicos mediante la unión específica del flunitrazepam tritiado, se realizó en el hígado, la placenta y el cerebro de fetos humanos de 12, 13 y 15 semanas de gestación, obtenidos de mujeres que no habían recibido ningún tratamiento de diazepam durante el embarazo. Los tejidos extraídos de los fetos fueron homogenados y se midió en tres

fetos la unión de flunitrazepam tritiado al tejido cerebral completo. La constante de disociación fue de 1.5 nM a las doce semanas, 2.0 nM a las trece y 1.8 nM a las quince y una unión máxima (B_{máx}) de 2.3, 3.8 y 3.1 fmol/mg de tejido respectivamente. Para la corteza cerebral de un feto de 15 semanas de gestación la constante de disociación fue de 1.8 nM y la B_{máx} de 1.0 fmol/mg de tejido. En el hígado y la placenta la constante de disociación y la B_{máx} fueron menores que la registrada para el cerebro (25).

Candy et al, en 1978 (26), mencionan que Altman determinó que la edad en la cual los receptores benzodiazepínicos alcanzan los valores adultos en la corteza cerebral y el cerebelo, está relacionada con la maduración de las células de Purkinje, la capa molecular y la densidad de neurotransmisores GABA que son escasos al nacimiento. En particular las células de Purkinje en el recién nacido son los elementos celulares mas numerosos, algunos contactos sinápticos se establecen en el soma de las células, en donde se localizan los receptores de benzodiazepinas, que en caso de alterarse en los estadios críticos del desarrollo del cerebelo, le producirían trastornos considerables.

V. TERATOGENESIS

A) ALTERACIONES ANATOMICAS

En cuanto a los efectos teratogénicos del diazepam, Miller et al (27), encontraron que los ratones tratados con dosis de 50 a 500 mg/kg son mas susceptibles al fármaco del décimoprimeró al décimoquinto día de la gestación, produciendo en este tiempo, osificación incompleta que los autores atribuyen mas a un retardo en el crecimiento que a una acción teratogénica real, ya que la condricación en el ratón comienza en el día 11 de la gestación, la osificación al día 14 y se prolonga hasta el 16, por lo que el sistema esquelético durante este periodo presenta una mayor probabilidad a ser alterado.

La dosis oral de 500 mg/kg de diazepam administrada a ratones durante tres días consecutivos de la gestación: 8, 9 y 10 ú 11, 12 y 13 provocaron que el 50% de los fetos tuvieran diferentes grados de aletargamiento. Utilizando la misma dosis, el día 8 o el 9 murieron 6 fetos de 53 y 6 de 57 respectivamente, siendo el número de embriones reabsorbidos significativamente mayor cuando ingirieron la droga durante un solo día, entre el décimosegundo y el décimo quinto día de la gestación, sin embargo, la dosis de 400 mg/kg no produjo reabsorciones cuando se administró por el mismo periodo y vía, pero ambas dosis causaron inmovilización de las crías recién nacidas y abstinencia a ingerir agua y alimento por un periodo de 36 horas, normalizandose después de 26 horas.

Cuando se aplicaron 140 mg/kg del fármaco por vía oral, en el día 13, el 4% de los embriones se reabsorbieron, lo cual no representa un aumento estadísticamente significativo (29).

La principal malformación producida en los fetos de ratón por las diversas dosis del fármaco, fue el paladar hendido, encontrándose que con los tratamientos de 50 y 100 mg/kg de peso corporal durante los días 8 al 10, no se presentó ninguna alteración, en cambio, al emplear los mismos 100 mg/kg el día 14 hubo un aumento significativo de esta malformación, que también ocurrió cuando se administraron 140 mg de la droga en los días 11 a 13 ó el 14 de la gestación y 500 mg/kg el día 15 (27).

En los fetos que recibieron 500 mg/kg en los días 10, 11, 12, 13, 14 ó 15 también se observaron otras anomalías esqueléticas como la falta de osificación o subdivisión de las esternebras, osificación incompleta de las falanges de los dedos de los miembros escapulares y anomalías en la osificación de la parte central de las vértebras cervicales (27).

Estudios realizados en hamsters por Tarlok et al, en 1981 (28), revelaron que también en este tipo de animales se produjeron malformaciones, sólo que la dosis que las causaron fue de 280 mg/kg de peso corporal, administradas del octavo al décimosegundo día de la gestación. De un total de 222 fetos, 15 presentaron malformaciones, lo que representa el 6.8% y hubo un 5.9% de fetos reabsorbidos. Los principales problemas que se detectaron fueron anencefalia, criniosquisis y paladar hendido. Según los autores, esta última anomalía es el mayor

problema reportado en los hijos de mujeres gestantes tratadas con diazepam, durante los estadios críticos del desarrollo.

B) ALTERACIONES HISTOLOGICAS.

En los últimos años los estudios teratológicos y toxicológicos acerca del diazepam, se han encaminado a la observación minuciosa de cada uno de los órganos fetales, por lo cual ha sido necesario el estudio microscópico de los diferentes tejidos.

Márquez-Orozco et al. han demostrado que el diazepam a dosis de 2.7 mg/kg de peso corporal administrado por vía subcutánea a partir del sexto día de gestación, provoca alteraciones histológicas en la placenta, la retina, el corazón, los riñones, los pulmones, el hígado, el mesencéfalo, la corteza cerebral, el cerebelo, el estómago, el intestino, el páncreas y la tibia.

En ratones tratados con dosis de diazepam de 2.7 mg/kg de peso corporal durante doce días a partir del sexto día de gestación y sacrificados 180 días después del nacimiento, se observó que el cerebelo presentaba un retardo en la migración neuronal, lo cual fue evidente por la acumulación de neuroblastos en la granulosa externa y en la molecular. El número de neuroblastos en la granulosa externa, fue de 23.35 ± 1.38 y para el grupo control fue de 12.73 ± 1.52 , por el contrario, la densidad neuronal en la granulosa interna de los animales

tratados fue significativamente menor. Las células de Purkinje del grupo tratado con diazepam mostraron signos de inmadurez como fueron un escaso árbol dendrítico y poco desarrollo del neuropilo, lo cual puede estar relacionado con alteraciones funcionales en la natación y la actividad motora espontánea (29). En la corteza cerebral, los núcleos de las neuronas de la capa II y III eran mas pequeños, la cromatina estaba en grumos y atípicamente distribuida. Los haces de fibras y el desarrollo del neuropilo fueron escasos, mientras que el número de núcleos por campo (27.3 ± 1.2) se incrementó con respecto al de los animales testigo (21.4 ± 1.2).

En la capa V, los núcleos de las células piramidales fueron de menor tamaño y al contrario, de las capas anteriores, el número de núcleos por campo fue menor en el grupo tratado (diazepam 2.4 ± 0.7 ; testigo 3.1 ± 0.5). Las neuronas piramidales presentaron dendritas basales y apicales mal orientadas y con pocas espinas (30).

La administración de diazepam en la misma dosis provocaron alteraciones en la retina de fetos de ratón expuestos "in utero" al fármaco del sexto al decimoséptimo día de la gestación. Los principales cambios observados al microscopio electrónico fueron un aumento del número de mitocondrias y polirribosomas de los fotorreceptores en desarrollo, la heterocromatina se encontró atípicamente distribuida y dispersa en el núcleo, el retículo endoplásmico rugoso estaba desorganizado, existía una acumulación anormal de gránulos de glucógeno en las células pigmentarias las

cuales tenían grandes vacuolas con material electrodensó. Todas las células de las capas de la retina presentaron numerosas mitocondrias, polirribosomas y aparato de Golgi (31).

Las observaciones ultraestructurales de corazón de fetos de ratón, expuestos del sexto al decimoséptimo día de la gestación a dosis diarias de diazepam de 2.7 mg/kg de peso corporal, mostraron alteraciones en las células del miocardio, en las cuales la heterocromatina se encontraba en acúmulos y dispersa en el núcleo. En el citoplasma, el retículo endoplásmico rugoso tenía vacuolas gigantescas con material electrodensó rodeado por glucógeno. Los mioblastos presentaron miofibrillas desorganizadas, las cuales estaban acortadas y con las bandas Z mal desarrolladas (32).

En el epitelio del árbol bronquial del pulmón fetal, se observó un aumento en su espesor, los alveolos no se distendieron normalmente y había menor cantidad de secreciones. La capa muscular que rodea al epitelio era muy delgada y se confundía con el tejido del estroma pulmonar, el cual presentaba fibroblastos con núcleos voluminosos y la cromatina en grumos distribuidos en la periferia.

La luz de los bronquios principales estaba reducida y las células epiteliales eran mas altas que las del grupo testigo. En los bronquios de menor calibre, éstas se encontraban disminuidas en espesor hasta que en los bronquiolos el tejido epitelial era cilíndrico simple, con núcleos alargados, distribuidos irregularmente y el citoplasma con granulaciones basófilas y algunas vacuolas.

La luz de los conductos alveolares estaba muy reducida y los bordes internos de las células se tocaban entre sí, las cuales tenían forma cilíndrica en lugar de cuboide con núcleos ovalados y esféricos y la cromatina con grumos gruesos (33).

La estructura microscópica de la placenta de ratones de la cepa CD-1, que recibieron dosis únicas diarias de diazepam de 2.7 mg/kg de peso corporal, por vía intraperitoneal, del sexto al decimoséptimo día de la gestación, mostraron que los espacios intervellosos estaban dilatados y los vasos coriales eran mas profusos. El citoplasma de las células trofoblásticas de la barrera placentaria, presentaba vacuolas, que le daban una apariencia diferente a las del grupo testigo. Sus núcleos eran mas grandes y la cromatina presentaba un aspecto diferente. La heterocromatina se encontró atípicamente distribuída en la cariolinfa, así también, los gránulos intercromatínicos, fueron menos abundantes y las células gigantes presentaron citoplasma vacuolizado, núcleos grandes con gránulos cromatínicos burdos dispersos en la cariolinfa, por el contrario, las células gigantes del grupo testigo, tenían vacuolas pequeñas y en menor cantidad distribuídas en el citoplasma y en los núcleos había gránulos intercromatinianos de aspecto normal, esparcidos entre la cariolinfa (34).

En los ovarios de crías de ratón de 63 días, provenientes de madres expuestas a dosis únicas diarias de diazepam, de 2.7 mg/kg de peso corporal, del día sexto al decimoséptimo de la gestación, se encontró una distribución atípica de la

heterocromatina en el núcleo de las células foliculares, las luteínicas, las de la teca y en los ovocitos. Además, se observó un mayor número de folículos primarios y secundarios atrésicos y por lo tanto, una disminución de los maduros. El porcentaje de folículos primarios encontrados en el grupo testigo, fue de un 35% mientras que para el grupo tratado, fue de un 44.19%. Los folículos secundarios jóvenes en el grupo testigo, fue de un 7.50% y para el experimental, de un 13.95%. Para los folículos secundarios maduros, el 40% correspondió al grupo testigo, mientras que en el experimental fue del 9.3%.

El número de células del cuerpo lúteo, fue de 48 ± 7.3 en los tratados y de 21 ± 5.6 para los testigos. La cantidad de células luteínicas en los animales experimentales fue de 412 ± 11.8 y de 363 ± 37.2 en los testigos. (35)

En los fetos de ratón de la cepa CD-1 expuestos "in utero" a dosis de diazepam, de 2.7 mg/kg de peso corporal del sexto al décimoquinto día, se observó un aumento de calcio por miligramo de hueso craneal, que fue de 25.71 μ moles/mg, en comparación, con el testigo que hubo 20.53 μ moles/mg, lo cual puede alterar procesos celulares dependientes de calcio, como son las contracciones de los diferentes tipos de músculo o la neurotransmisión.

En la tibia, el cartílago estaba hipertrofiado, presentaba grandes núcleos en los condrocitos y los centros de osificación de la diáfisis eran mas grandes, los vasos sanguíneos se encontraron hipertrofiados, además, se observaba

una desorganización de las trabéculas que consistió en la presencia de grandes espacios intratrabeculares. También, hubo una disminución de los osteocitos encerrados en la matriz intercelular, sus núcleos estaban hipertrofiados y tenían la cromatina atípicamente distribuida (36, 37).

En el riñón, de los fetos tratados con dosis de diazepam, de 0.17, 0.67, 1.35 y 2.7 mg/kg de peso corporal, del sexto al decimoséptimo día de la gestación, se observó disminución en el número de nefronas desarrolladas o en desarrollo, las cuales tenían células de mayor tamaño, en los túbulos contorneados, las asas de Henle y los conductos colectores, además de que la luz de éstos era mas pequeña y había un incremento en la longitud de las células.

Las células de los corpúsculos renales, las de los túbulos de las nefronas y la de los túbulos colectores, tenían en común la presencia de citoplasma vacuolizado, con aspecto edematizado y afinidad tintórea disminuída. Las estructuras renales presentaban núcleos voluminosos con la cromatina distribuída atípicamente (38, 39).

Los cambios ultraestructurales en el hígado de fetos de ratón, causados por dosis de diazepam de 2.7 mg/kg de peso corporal, del sexto al décimoquinto día de la gestación, provocaron un aumento de volúmen de los hepatocitos, los cuales presentaban núcleos grandes, la cromatina formaba acúmulos que se adherían a la membrana nuclear. En el citoplasma, el retículo endoplásmico rugoso estaba distribuído irregularmente, había

múltiples conjuntos de polirribosomas y las mitocondrias eran numerosas. Entre los organelos citoplasmáticos se observaron numerosos gránulos de glucógeno (40).

Estudios realizados en embriones de pollo del estadio 8, incubados con o sin diazepam, observándose que mientras los animales testigo presentaron una morfología normal y características del estadio de desarrollo 8 e incluso del 9, el 80% de los embriones que crecieron en un medio que contenía dosis de diazepam de 400 $\mu\text{g/ml}$, mostraron retraso en el crecimiento y defectos en la diferenciación del tubo neural, que consistieron en que los pliegues neurales no tenían señales de contacto a lo largo del neuroepitelio, siendo la región mas afectada la mesencefálica. En algunos embriones, un lado del tubo neural estaba mas dañado que el otro y las células del epitelio superficial presentaron signos de colapsamiento, sin embargo, el desarrollo de las somitas no se alteró. Las observaciones en el microscopio electrónico, revelaron que en embriones testigo, la superficie apical de las células neuroepiteliales estaba sumamente plegada y tenían abundantes haces de microfilamentos, en cambio, en los tratados, la superficie era casi lisa y los haces de microfilamentos mas delgados y menos conspicuos. Además, hubo un incremento en el grosor del neuroepitelio en estos embriones, ya que fue de 200 μm , en lugar de los 130 μm que tenía el de los testigos (41).

C) ALTERACIONES CROMOSOMICAS

Diversas investigaciones han demostrado que el diazepam inhibe la proliferación celular e induce una acumulación anormal de figuras mitóticas.

Células en cultivo de Dunaliella bioculata, una alga unicelular, fueron empleadas para estudiar el crecimiento celular cuando está presente el medazepam y el diazepam; las concentraciones de 1.85/10 μM y 1.8/10 μM respectivamente, indujeron acumulación de mitosis anormales con usos mitóticos unipolares, además, la concentración utilizada para el diazepam, inhibió el crecimiento celular del alga, que es la misma a la cual se impidió la proliferación celular de los fibroblastos humanos estudiados "in vitro". En ésta última línea celular, se encontró que se produjo un bloqueo en prometafase sin afectar la integridad microtubular e inhibición de la separación del centriolo, cuando se administraron 80 $\mu\text{g/ml}$ -1 durante 12 horas (44).

El rompimiento cromosómico en leucocitos humanos se incrementó conforme se aumentó la dosis de diazepam, así las concentraciones de 10 $\mu\text{g/ml}$ registraron 82 rupturas cromosómicas y con 20 $\mu\text{g/ml}$ se presentaron 111 de 500 metafases analizadas para cada concentración, lo cual corresponde al 16.4% y 22.2% respectivamente, mientras que para el grupo testigo fue de 4.8%. Las alteraciones que se encontraron se localizaron en las cromátidas y en las isocromátidas (43).

Los linfocitos humanos de 23 pacientes, cuyo tiempo de exposición a diazepam varió de dos semanas a treinta y seis

meses, fueron cultivados para analizar los daños cromosómicos. Uno de los enfermos que recibió la dosis de 30 mg/día durante 18 meses, registró un aumento significativo de alteraciones cromosómicas del 15.3%. De 321 metafases, 41 células presentaron cromosomas con cromátidas rotas y 8 con una o más isocromátidas dañadas por lo que el tratamiento fue suspendido y 6 meses después las alteraciones resultaron de 1.9% de un total de 424 metafases. Por otro lado, un paciente que recibió 30 mg/día durante dos semanas y otro 15 mg/día por un mes, así como también un testigo, presentaron cromosomas tetrarradiales (45).

Se sabe que las benzodiazepinas que se unen a sitios de unión de tipo periférico inhiben la proliferación celular de las células del timo, del neuroblastoma y las eritroleucémicas, lo cual fue estudiado mediante los análisis de inhibición de timidina tritiada de estos compuestos. En las células del timo este efecto se produjo 8 horas después de la incubación en los rangos de concentración de 6 μM a 180 μM . Este retardo celular puede llegar a producir alteraciones fisiológicas (19).

Estudios realizados "in vitro" demostraron que el diazepam tiene efectos en la miogénesis del músculo espectral de embriones de pollo de 12 días, que consistió en una inmediata y completa relajación de las fibras musculares, que se encontraban atrofiadas y con una marcada reducción de miosina pesada del 80% dentro de las 24 a las 48 horas posteriores a la aplicación de la droga. Los efectos fueron reversibles cuando los cultivos celulares estuvieron expuestos al fármaco como máximo 48 horas.

Cuando se agregó una única dosis mayor a $50 \mu\text{M}$ se observó que las contracciones musculares se detuvieron inmediatamente y permanecieron sin actividad contráctil durante 48 horas.

Las fibras musculares tratadas por un periodo mayor a las 24 horas no presentaban estriaciones y se encontró que había flacidez muscular, sin embargo, al retirar el diazepam del medio de cultivo, nuevamente se observaron las contracciones y las estriaciones fueron visibles después de 24 horas posteriores al tratamiento, así como también, los niveles de miosina pesada se normalizaron entre los días 10 y 12.

En las células tratadas con $100 \mu\text{M}$ en el día tres o cuatro, se redujo la acumulación del péptido en un 60% de las 24 a las 48 horas después del tratamiento, siendo reversible en los medios de cultivo que recibieron esta dosis por 2 días y alcanzando su estado normal 2 ó 3 días mas tarde. Las alteraciones que se presentaron fueron la formación incompleta de los miofibrilos y anomalías en las contracciones o bien, la pérdida de éstas. (46).

En los cultivos que crecieron por 5 días con $10 \mu\text{M}$ de diazepam hubo inhibición de la síntesis de miosina pesada, sin embargo, tuvo un efecto menor sobre la síntesis de proteína total (47).

En fibroblastos de embrión de pollos cultivados con dosis de diazepam de $150 \mu\text{g/ml}$ se observó que los filamentos de actina eran menos numerosos, desorganizados en su distribución y en su periodicidad, lo que sugiere que el fármaco inhibe la síntesis y acumulación de la miosina pesada, tanto en los cultivos de

células musculares, como no musculares, lo que probablemente se deba a su acción sobre la saturación de la miosina pesada, que da por resultado la alteración del patrón de bandeado coincidente con la alteración de la periodicidad de la actina y a la interferencia de la incorporación de otras proteínas a la actina (48).

VI. HISTOGENESIS DEL CEREBELO

El cerebelo deriva de los labios rómicos o placa cerebelar localizada en la parte dorsal de las placas alares del mesencéfalo, que al fusionarse en la línea media originan al vermis. Los hemisferios o partes laterales al inicio del desarrollo crecen a mayor ritmo en la parte interna, se proyectan hacia el IV ventrículo y posteriormente por crecimiento diferencial se desarrolla la parte externa produciéndose la llamada "eversión" del cerebelo. El cerebelo así formado por el mismo proceso empieza a formar las cisuras, siendo la posterolateral la primera en aparecer y separa la parte flóculonodular, filogenéticamente mas antigua del vermis y los hemisferios cerebelares mas recientes. El proceso continúa hasta que las folias y los surcos adquieren sus características definitivas.

Mientras estos cambios se llevan a cabo, se inicia la histogénesis por modificación de sus capas, que originalmente son la ependimaria o germinal mas interna, la del manto que es en la que están la mayor parte de los somas de las células neuroepiteliales y la marginal externa, constituida principalmente por sus prolongaciones celulares, que forman la membrana limitante externa y las mismas células hacia la capa germinal dan origen a la membrana limitante interna.

De la capa del manto se producen dos migraciones celulares, la primera que forma la corteza superficial transitoria o capa granulosa externa, en donde las células continúan dividiéndose y

la segunda cuyos neuroblastos se diferenciarán en las células de Purkinje que migran menos superficialmente y se conectan con los núcleos profundos del cerebelo, derivados de los neuroblastos que permanecen en la parte interna del manto, y por lo tanto se diferencian "in situ" en los núcleos dentados, fastigiales, globosos y emboliformes. Cuando las células de Purkinje ocupan su sitio definitivo, las de la granulosa externa se profundizan para integrarse a la granulosa interna, en la que se diferencian en las células de Golgi y en las células de los granos; también los neuroblastos formados durante la primera migración originan las células en canasta, las estrelladas y las de Lugaro, que en todos los casos se localizan en la parte interna de la capa molecular. A medida que los granos se sitúan en la posición definitiva, sus axones en T forman en la capa molecular las fibras paralelas. La migración de los granos concluye postnatalmente y de esta manera la corteza cerebelar queda constituida por una capa molecular superficial, la de células de Purkinje y la granulosa interna. Por lo tanto, en las capas de la corteza del cerebelo bien desarrollado, se localizan en la molecular, las células en canasta y las estrelladas, las dendritas de todos los tipos celulares excepto la de los granos, cuyos axones, distribuidos en la misma capa molecular forman las fibras paralelas que establecen sinapsis con las dendritas de las células de Purkinje, con las de Golgi, las células en canasta y las estrelladas, éstas últimas se unen a las dendritas de las células de Purkinje a las que también llegan las fibras trepadoras, llamadas así por su

similitud con una enredadera.

La capa de células de Purkinje tiene enormes somas en forma de botella y un árbol dendrítico, similar a un gran penacho, con el cual se conectan los axones de las células en canasta. Por esta capa también ascienden los axones de los granos, las fibras trepadoras y las dendritas de las células de Golgi.

En la granulosa interna se encuentran los pequeños somas de los granos y los grandes de las células de Golgi que se relacionan entre sí y reciben impulsos de las células musgosas. Las fibras trepadoras derivan de las olivas inferiores y las musgosas de los núcleos pontinos, de la formación reticular y en baja proporción de los vestibulares. Ambos tipos de células al igual que las paralelas, son excitatorias, en cambio los axones de las células en canasta, las estrelladas, las de Golgi y las dendritas de éstas, son inhibitorias.

Las células de Purkinje durante su descarga de reposo inhiben a los núcleos cerebelares y cuando se activan los inhiben mas fuertemente, en cambio cuando son inhibidas por las células de Golgi, las células en canasta y las estrelladas se desinhiben (49).

Estudios autorradiográficos con timidina tritiada, permitieron observar en el ratón la histogénesis del cerebelo durante la etapa fetal y su desarrollo postnatal. Estos trabajos describen como del noveno al décimoprimer día de la gestación, el cerebelo está constituido solamente por células germinales que se caracterizan por ser multipotenciales. La mayoría de

las células de Purkinje están presentes en la granulosa interna entre el décimoprimer y décimosegundo día de la gestación (50). aún cuando, Fujita et al, en 1966 (51), describieron que a esta edad gestacional había glioblastos y neuroblastos, éstos últimos sólo las pudieron identificar como células de Purkinje y de Golgi hasta la etapa postnatal.

La capa de la granulosa externa aparece aproximadamente en el décimotercer día de la gestación y continúa proliferando hasta el segundo o tercer día postnatales.

En el decimoquinto, se diferencian la mayor parte de los neuroblastos, perdiendo durante esta etapa la capacidad de síntesis de DNA.

A partir de que ha terminado la producción de neuroblastos y hasta el día tres posnatal las células se diferencian en neurogliales (52). Desde el punto de vista citogenético, todas las células de la granulosa interna, excepto los neuroblastos son precursores de las células neurogliales.

Al nacimiento, todas las células germinales se han transformado en las ependimarias y en los glioblastos, los últimos se localizan en todo el parénquima cerebelar. Posteriormente, del tercero al décimo octavo días, las células gliales proliferan activamente en la granulosa interna, mientras que las de la granulosa externa lo hacen hacia la superficie del cerebelo y van originando los oligodendrocitos y los astrocitos.

Los neuroblastos migran de la granulosa externa hacia la

interna, pasando algunas horas por la molecular para formar los granos. Del décimo octavo al vigésimo día postnatal continúa la migración de los granos hacia el interior hasta que la capa granulosa externa desaparece definitivamente y se completa el desarrollo de la corteza cerebelar, que queda constituida por la capa molecular, la granulosa interna que está en contacto con la sustancia blanca y desaparece la capa de la granulosa externa.

VII.HIPOTESIS

Considerando los estudios realizados en el ratón acerca de los efectos teratogénicos del fármaco, producidos durante los estadios críticos del desarrollo del sistema nervioso central, se espera que en los fetos de ratón expuestos a dosis de diazepam de 2.7 mg/kg de peso corporal del sexto al decimoséptimo día de la gestación, se produzcan cambios en la estructura histológica de su cerebelo.

VIII.OBJETIVO

Determinar si el diazepam administrado por vía subcutánea en dosis únicas diarias de 2.7 mg/kg de peso corporal, del sexto al decimoséptimo día de la gestación altera la diferenciación celular del cerebelo de fetos de ratón de 18 días.

IX. MATERIAL Y METODO

A) OBTENCION DE LOS ESPECIMENES

Se aparearon hembras vírgenes de ratón de la cepa CD-1, de las 5:00 a las 5:30 a.m.; en proporción de 3 hembras por macho. La presencia de tapón vaginal se consideró como el día cero de la gestación.

Las hembras gestantes se distribuyeron al azar en dos grupos controles y uno experimental. Los del primer grupo control recibieron del sexto al décimoséptimo día de la gestación, por vía subcutánea 0.16 μ l de solución salina isotónica una vez al día. El segundo grupo control estuvo integrado por animales que no recibieron ningún tratamiento. Al grupo experimental, se le inyectaron dosis diarias de diazepam (valium) de 2.7 mg/kg de peso corporal, durante el mismo periodo y vía de administración.

Todos los grupos tomaron agua esterilizada mediante filtro Millipore y alimento Purina Chow, ad libitum. Permanecieron en un cuarto con temperatura controlada que osciló entre los 20 y 22°C y fotoperiodos de doce horas de luz y doce horas de obscuridad que se inició a las 7:00 a.m.

B) PROCESAMIENTO DEL MATERIAL.

El día 18 de la gestación las hembras fueron sacrificadas en una atmósfera de dióxido de carbono. Se obtuvieron los fetos por laparotomía media ventral y por crancotomía, se les extrajeron los cerebelos, los cuales fueron lavados con amortiguador de fosfatos 0.15 M, fijados durante una hora y media con glutaraldehído al 2.5% en amortiguador de cacodilatos 0.16 M a pH 7.0, fraccionados longitudinalmente, postfijados con tetróxido de osmio al 1% (diluído en amortiguador de cacodilatos 0.3M) durante dos horas. Después de este tiempo, fueron lavados con amortiguador de cacodilatos 0.15 M. y deshidratados en alcoholes graduales de 60°, 70°, 80°, 90° G.L. permaneciendo 10 minutos en cada uno de ellos hasta terminar con dos cambios de alcohol absoluto de 10 minutos cada uno. Se pasaron a óxido de propileno puro por 30 minutos, se preincluyeron en una mezcla de óxido de propileno-Poly/Bed 1:1 por 48 horas y se incluyeron en resina epóxica Poly/Bed 812 de Polysciences, Inc. en una estufa a 60°C por 72 horas.

De los bloques obtenidos de cada grupo, se realizaron un promedio de 200 cortes semifinos de 0.35 μ m de espesor con el Ultracut, Reichert-Jung (los 200 cortes se obtuvieron de un mínimo de 10 cerebelos de fetos de cada uno de los tres grupos). Se tifieron con azul de toluidina y se observaron con un microscopio fotónico de comparación American-Optical, One-ten.

Las fotos de los cortes histológicos fueron tomadas con un microscopio Polivar, Reichert-Jung, con película Kodacolor Gold de 35 mm, 100 .ASA.

En el microscopio de comparación American-Optical, Reichert-Jung, calibrado con un ocular y una regla de 1 mm cuadrado, subdividido en 100, se midió el espesor de las capas granulosas externa e interna y de la molecular del cerebelo; y con un ocular micrométrico, Reichert-Jung que tiene una área de 1 mm cuadrado dividido en 100 cudrantes, se contó el número de células por campo para las dos primeras capas mencionadas. Los resultados del grupo experimental fueron comparados con los dos grupos controles, mediante la prueba estadística de ANOVA y la prueba de Scheffé.

X. RESULTADOS

A) RESULTADOS HISTOLOGICOS

Los fetos de 18 días, obtenidos de las hembras tratadas con diazepam al ser extraídos del útero tenían una coloración cianótica, evidente depresión respiratoria, se movían muy poco, presentaban hipotonía e hipotermia, en cambio, los fetos de los grupos controles, es decir los inyectados con solución salina y los que no recibieron tratamiento, tenían un color rosado, movimientos respiratorios enérgicos, su temperatura corporal fue normal al igual que su tono muscular y los movimientos eran normales y vigorosos

Al microscopio fotónico los cortes semifinos del cerebelo de los fetos de ratón, de las hembras tratadas con diazepam, se observó que había un retardo en la diferenciación de todas sus estructuras con respecto al cerebelo de los fetos de los dos grupos controles, entre los cuales no existían diferencias morfológicas. Los surcos del cerebelo de los fetos experimentales eran más superficiales y las células que se internalizaban eran menos abundantes (Figura 1 y 2).

En el estudio histológico, se comprobó que las capas de la corteza cerebelar, la sustancia blanca y los núcleos profundos del cerebelo tenían un grado de diferenciación menor al normal, por lo que parecían ser de fetos más jóvenes (Figura 1)..

Al comparar la capa granulosa externa del cerebelo de los fetos de las hembras tratadas con diazepam con los de los grupos

controles, se encontró que había un número mayor de células (tabla 4) con núcleos mas voluminosos, con la cromatina en grumos gruesos dispersos entre la cariolinfa, que presentaba mayor afinidad tintorial o se adherían a la membrana nuclear y se encontraban con frecuencia de tres a cuatro nucleolos en lugar de uno a tres. El citoplasma estaba vacuolizado y era basófilo por lo que se teñía intensamente (Tabla 2; Figuras 3, 4 y 5). En ésta capa, en la que normalmente se multiplican las células neuroepiteliales también se observó un mayor número de figuras mitóticas (Figuras 4 y 5). En los controles esta capa tenía el espesor normal (Tabla 3) y los núcleos eran mas pequeños (Tabla 2; figuras 3, 4 y 5).

La capa molecular en el cerebello de los animales experimentales, era mas angosta (tabla 3) y tenía numerosos núcleos de las células que estaban migrando hacia la granulosa interna. Su citoplasma vacuolizado se enmascaraba con las prolongaciones citoplásmicas de las células ya diferenciadas que constituían el neuropilo de esta capa. En cambio, en los animales de los grupos controles era mas amplia (Tabla 3), las células en migración menos numerosas y el neuropilo mas abundante (Tabla 2; figuras 3, 4 y 5).

La capa granulosa interna de los fetos experimentales, también mostraba retardo en su diferenciación, lo que fue evidente porque los núcleos de las células de los granos, de las células en canasta, las estrelladas y sobre todo las de Purkinje presentaban características primitivas desde el punto de vista

morfológico, aún había células migrando del manto hacia esta capa y su posición era irregular ya que no se colocaban en un estrato bien definido (Figura 2, 3, y 6). Los núcleos de las células que no se habían diferenciado eran mas pequeños con mayor cantidad de nucleolos (tres a cinco), con la cariolinfa mas teñida al igual que su citoplasma, que frecuentemente estaba vacuolizado y era mas escaso que el de las células de los animales controles, por lo cual se observaba que estaban mas cercanas unas a otras. El neuropilo mas teñido también tenía un desarrollo menor que el observado en los controles (Tabla 2; figura 6).

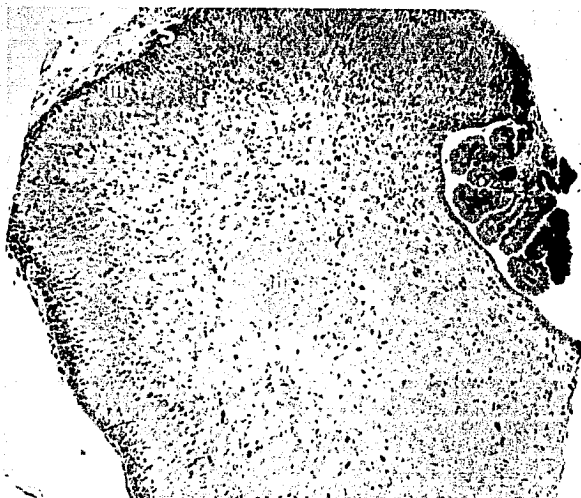
Hacia el interior de la corteza, la primitiva capa marginal y futura sustancia blanca, en los cerebelos de los fetos del grupo experimental se observaba una mayor densidad de células en migración a la granulosa interna, dichas células tenían núcleos de menor talla, intensamente teñidos y el neuropilo era menos abundante que en los fetos de los grupos controles, en los que se observó una apariencia normal (Tabla 2; figura 3).

En los núcleos profundos del cerebelo y en particular en el dentado de los fetos de ratones tratados con diazepam, los neuroblastos mostraron núcleos menos voluminosos de contorno irregular, con nucleolos conspicuos, menor cantidad de citoplasma vacuolizado, que se disponía en acúmulos densos separados por un neuropilo con menor grado de diferenciación que el observado en los controles, los cuales tenían neuroblastos con abundante citoplasma bien estructurado, dispersos entre el neuropilo con una organización típica (Tabla 2; figura 7).

TABLA 2.-Características de los organelos del cerebelo de los fetos de ratón de 18 días tratados con diazepam y el de los controles.

CAPA GRANULOSA EXTERNA		
ORGANELO	CONTROLES	EXPERIMENTAL
núcleos (cél. neuroepiteliales)	aspecto normal	voluminosos, > fig mitóticas
nucleolos	1-3	3-4
cromatina	apariciencia normal	en grumos gruesos
citoplasma	apariciencia normal	vacuolizado, basófilo
CAPA MOLECULAR		
núcleos	aspecto normal	voluminosos
nucleolos	1-3	3-4
cromatina	apariciencia normal	en grumos gruesos
citoplasma	apariciencia normal	vacuolizado y difuso.
neuropilo	abundante	escaso
CAPA GRANULOSA INTERNA		
núcleos	apariciencia normal, bien diferenciados	pequeños, < diferenciados
nucleolos	1-3	3-5
cromatina	aspecto normal	en grumos gruesos
citoplasma		vacuolizado, basófilo
neuropilo	abundante bien desarrollado	escaso y con un desarrollo menor
SUSTANCIA BLANCA		
núcleos	menor tamaño	voluminosos
neuropilo	abundante	> teñidos escaso
NUCLEO DENTADO		
núcleos	apariciencia normal	menos voluminosos
nucleolos	1-3	> fig. mitóticas
cromatina	aspecto normal	3-4
citoplasma	apariciencia normal	en grumos gruesos
neuropilo	más diferenciados	vacuolizado, basófilo
		menos diferenciados

CONTROL



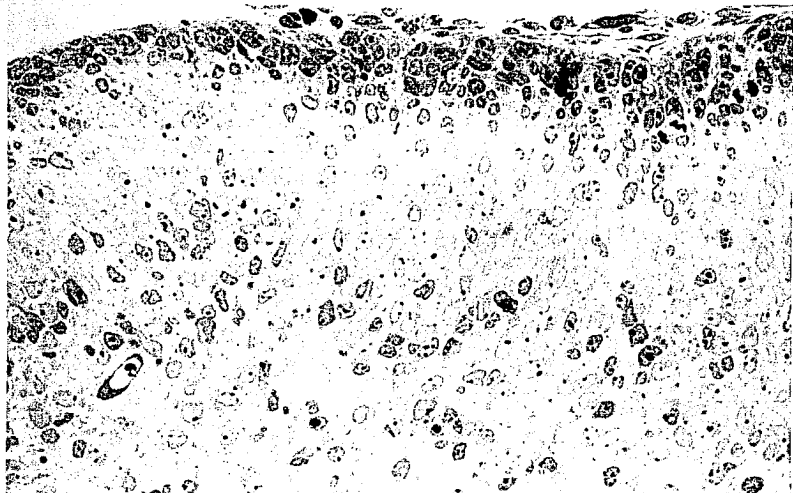
EXPERIMENTAL



FIGURA 1.-CORTES SEMIFINOS DEL CEREBELO DE FETOS DE RATONES DE 18 DIAS.

En el experimental se observa un retardo en la diferenciación y migración de las células que constituyen las capas granulosa externa (e), la molecular (m), la granulosa interna (i), la sustancia blanca (b) y los núcleos profundos del cerebelo (d) con respecto a los grupos controles que tienen capas con apariencia normal. 98X.

CONTROL



EXPERIMENTAL

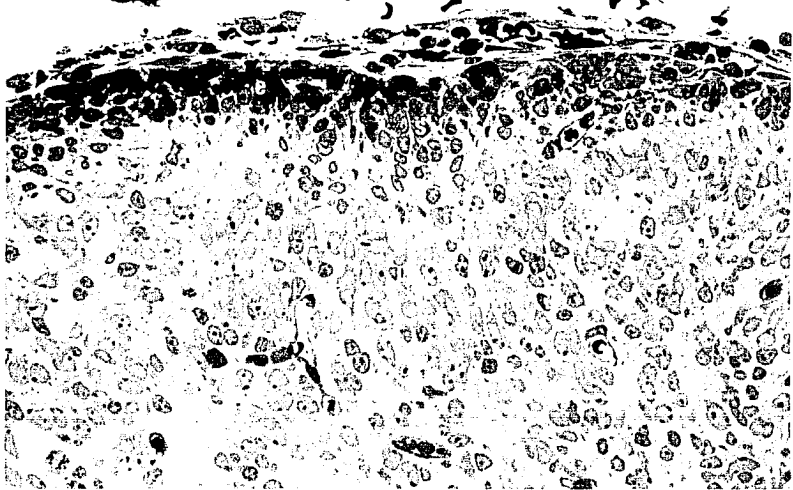


FIGURA 2.- CORTES SEMIFINOS DE LAS CAPAS GRANULOSA EXTERNA E INTERNA DEL CEREBELO DE FETOS DE RATONES DE 18 DIAS.

En el experimental, se muestra un surco (s) poco profundo con menos cantidad de células de la capa granulosa externa (e) internalizándose. En la capa granulosa interna (i) se observa el retraso en la diferenciación y migración celular comparada con las mismas capas de los animales controles. 395X.

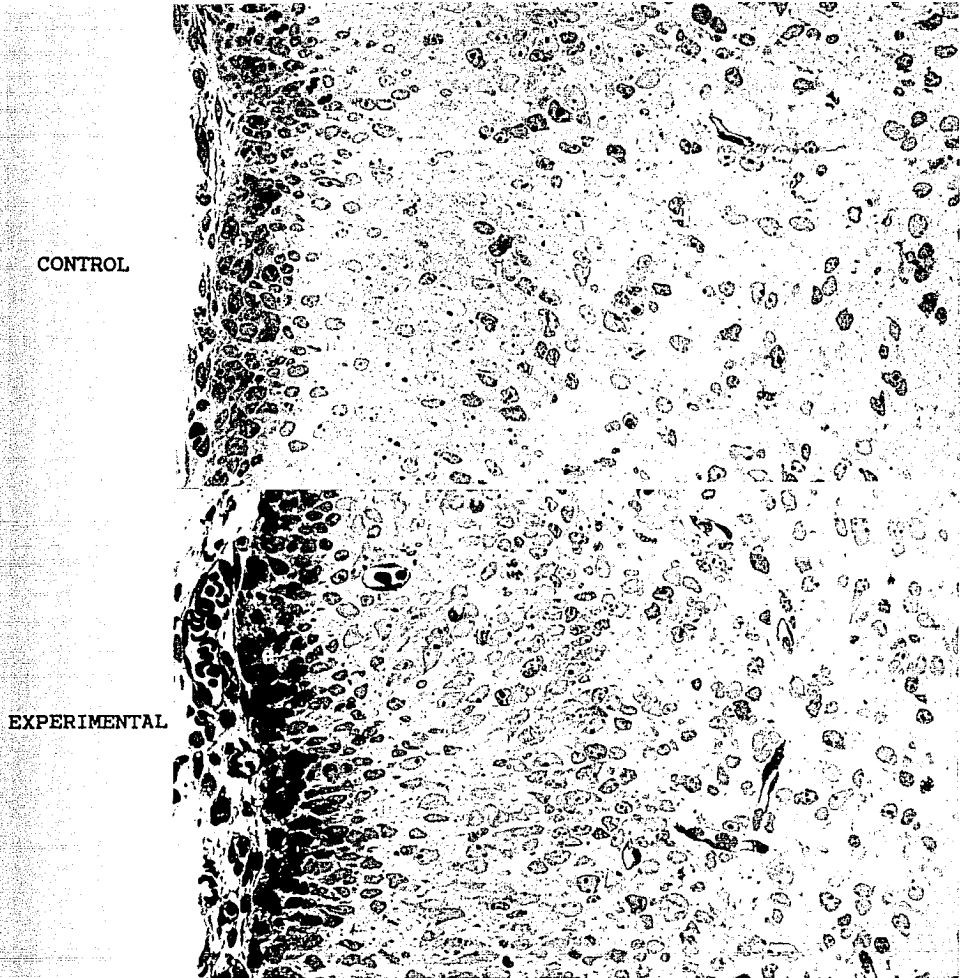
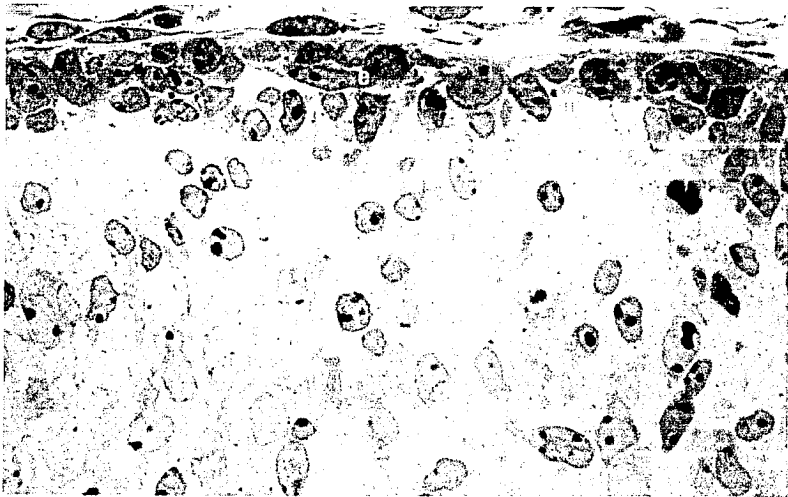


FIGURA 3.-CORTES SEMIFINOS DE LAS CAPAS GRANULOSA EXTERNA, MOLECULAR Y GRANULOSA INTERNA DEL CEREBELO DE FETOS DE RATONES DE 18 DIAS.

En los animales tratados con diazepam, se observa que en la capa granulosa externa (e) el citoplasma de las células está vacuolizado y tiene mayor afinidad tinteórea. La capa molecular (m), la del manto primitivo y la marginal ó futura sustancia blanca (b) muestran numerosos grupos de células en migración hacia la capa granulosa interna (i). En cambio, en los mismos estratos de los cerebelos de los fetos controles el desarrollo es normal. 395X.

CONTROL



EXPERIMENTAL

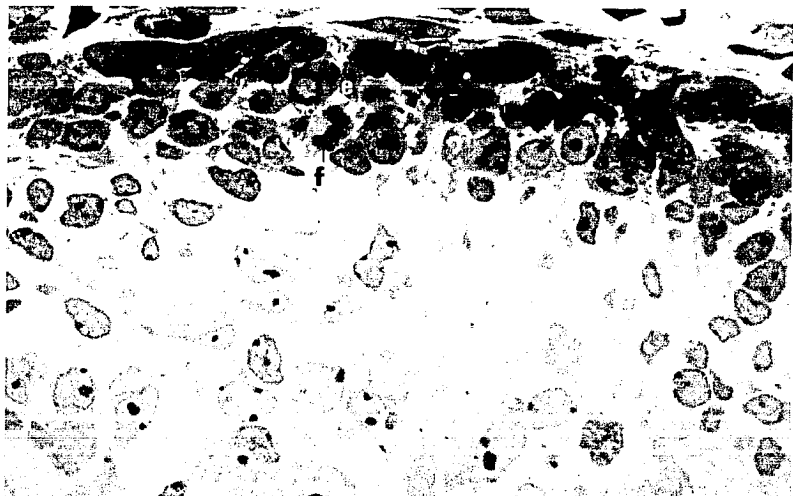
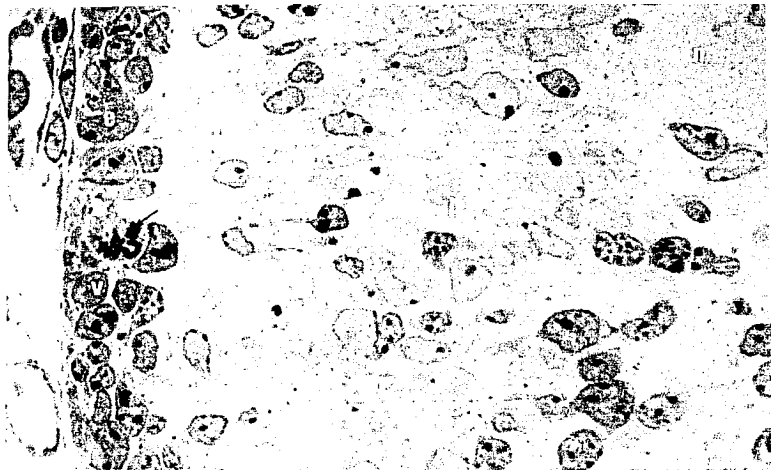


FIGURA 4.-CORTES SEMIFINOS DE LA CORTEZA DEL CEREBELO DE RATONES DE 18 DIAS.

En los experimentales, la granulosa externa (e) presenta mayor cantidad de células neuroepiteliales con numerosas figuras mitóticas (f). En la capa molecular (m), el citoplasma se observa vacuolizado (c) y el neuropilo (n) es menos abundante comparado con el de los grupos controles que tienen una apariencia normal. 985X.

CONTROL



EXPERIMENTAL

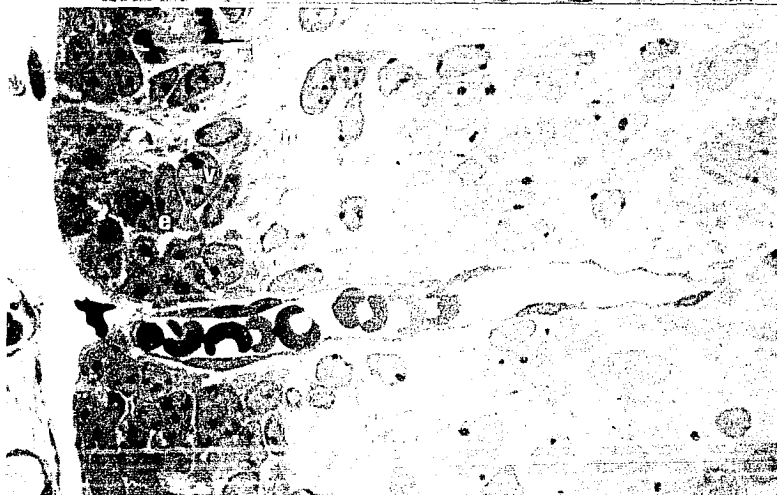
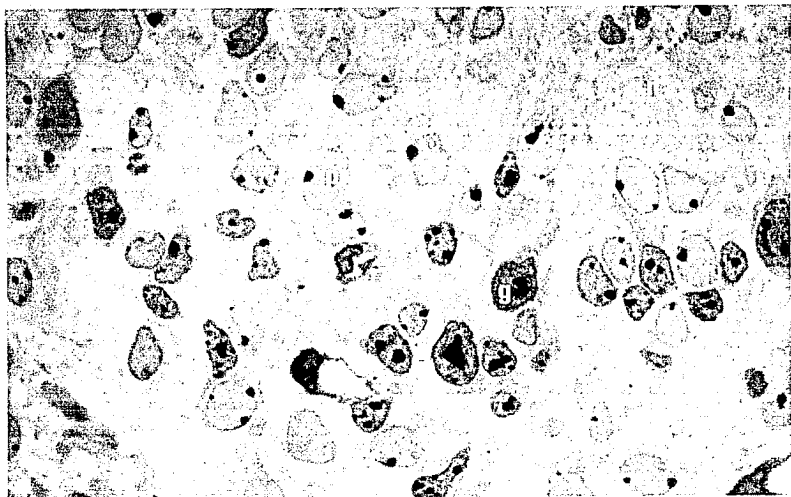


FIGURA 5.- CORTES SEMIFINOS DE LAS CAPAS GRANULOSA EXTERNA Y LA MOLECULAR DE FETOS DE RATONES DE 18 DIAS.

En los experimentales, la capa granulosa externa (e) presenta núcleos voluminosos (v) con la cromatina dispersa en grumos bien teñidos, y un incremento en el número de nucleolos con respecto al observado en los controles. También se observan figuras mitóticas (f) en el grupo experimental y controles. En la molecular (m) las células en migración hacia la granulosa interna (i) son más numerosas y el neuropilo (n) menos abundante con respecto a los grupos controles. 985X.

CONTROL



EXPERIMENTAL

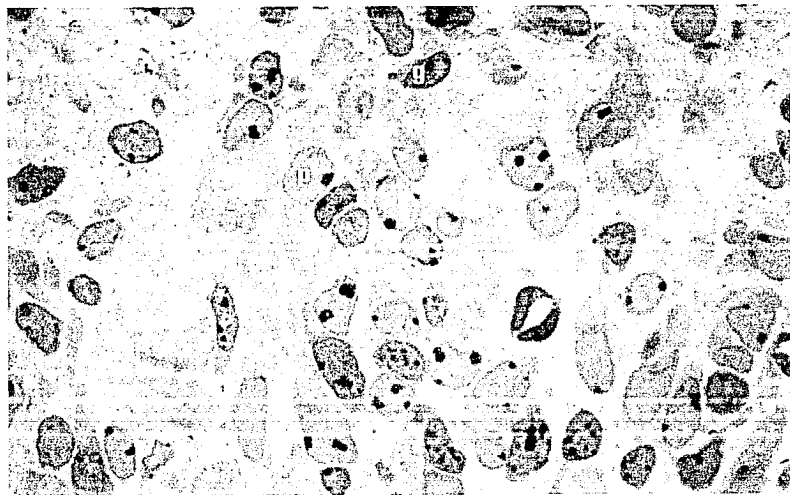
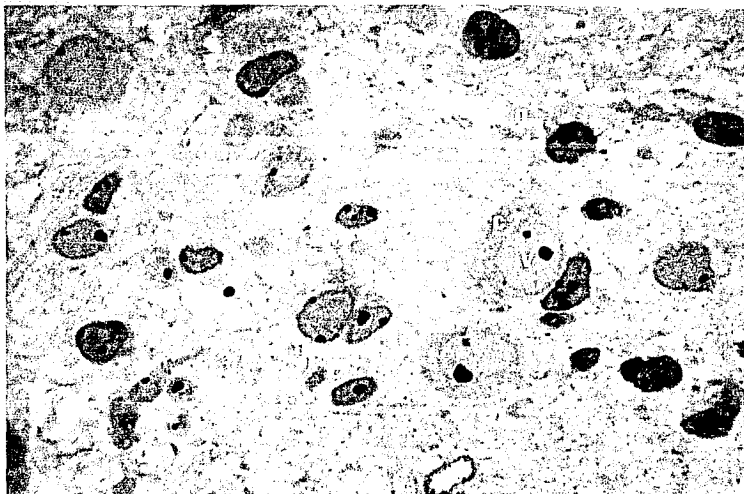


FIGURA 6.-CORTES SEMIFINOS DE LA CAPA GRANULOSA INTERNA DEL CEREBELO DE FETOS DE RATONES DE 18 DIAS.

En los experimentales se identifican los núcleos de las células de Purkinje (p) y de los granos (g) menos diferenciados los cuales son mas pequeños y con mayor cantidad de nucleolos, el neuropilo (n) tiene un desarrollo menor que el observado en los controles. 985X.

CONTROL



EXPERIMENTAL

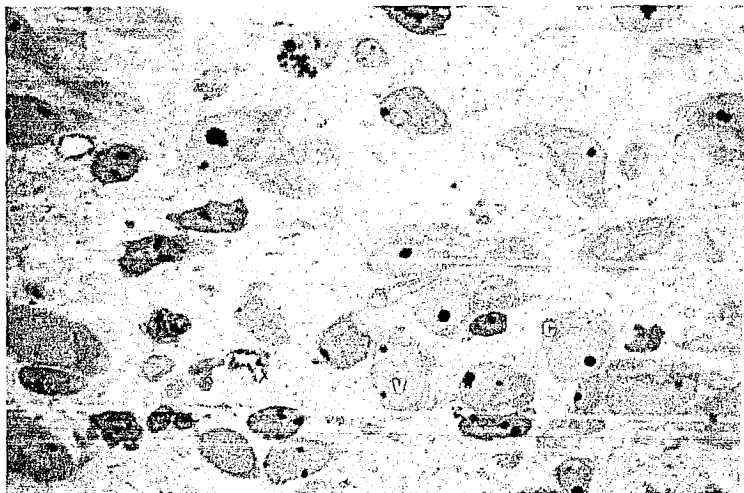


FIGURA 7.-NEUROBLASTOS DEL NUCLEO DENTADO DE FETOS DE RATONES DE FETOS DE RATONES DE 18 DIAS.

En el experimental, los neuroblastos de esta región forman acúmulos densos, cuyas células tienen núcleos menos voluminosos (v) con nucleolos conspicuos y citoplasma escaso (c), el neuropilo (n) menos diferenciado que el de los animales controles, en los cuales las células nerviosas son de mayor talla y están mas diferenciadas. 985X.

B) RESULTADOS ESTADISTICOS

En relación con el análisis de los datos numéricos, obtenidos de los cortes histológicos, en la tabla 3 y en la figura 8 se muestran los resultados de la medición del espesor de la capa granulosa externa, de los cerebelos de los fetos de los grupos controles, comparados con el de los experimentales, en los cuales esta capa es mas amplia ya que, por la prueba de análisis de varianza (ANOVA) y la prueba de Scheffé se comprobó que había diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.0003$) al igual que existían diferencias ($p < 0.001$) en cuanto al número de células por campo que era también mayor en los animales tratados "in utero" con diazepam (Tabla 4; figura 9). La comparación de los dos grupos controles en cuanto al espesor y la densidad de esta capa no mostraron diferencias estadísticamente significativas ($p > 0.001$).

Utilizando las mismas pruebas se comprobó que la capa molecular en el cerebelo de los fetos experimentales fue mas angosta que la presente en los dos grupos controles ($p < 0.001$), lo que se puede observar en la tabla 3 y en la figura 10.

De la capa granulosa interna se midió el espesor y la densidad de núcleos por campo y en ambos casos utilizando la prueba de ANOVA y Scheffé se demostró que había diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.001$) entre los fetos experimentales con respecto a los controles y que entre estos

últimos las diferencias no eran significativas desde el punto de vista estadístico ($p > 0.001$). En el caso del espesor de esta capa, el nivel de significación fue $p < 0.003$. (Tabla 3; figura 11) y en cuanto a la densidad celular se encontró una $p < 0.002$ como se muestra en la tabla 4 y la figura 12.

TABLA 3.-Espesor promedio en μm , de las capas granulosas externa e interna y de la molecular del cerebelo de fetos de ratones de 18 días tratados con diazepam y el de los controles.

CAPA	CS	CNT	DIAZEPAM
granulosa externa	$8.0 \pm 2.1 \mu$	$10.6 \pm 1.9 \mu$	$16.4 \pm 5.9 \mu$ *
granulosa interna	$43.1 \pm 9.7 \mu$	$42.8 \pm 9.4 \mu$	$111.9 \pm 5.9 \mu$ **
molecular	$20.4 \pm 4.0 \mu$	$16.8 \pm 2.9 \mu$	$9.5 \pm 1.7 \mu$ **

* $p < 0.0003$; n=10 control salino =CS control no tratado =CNT
 ** $p < 0.001$

TABLA 4.- Número de células por campo de las capas granulosa externa e interna del cerebelo de fetos de 18 días tratados con diazepam y el de los controles.

CAPA	CS	CNT	DIAZEPAM
granulosa externa (e)	7.9 ± 1.2	9.6 ± 1.8	12.8 ± 2.3 *
granulosa interna (i)	6.2 ± 1.2	5.6 ± 0.8	7.5 ± 1.4 *

* $p < 0.001$; n=10 control salino =CS; control no tratado =CNT

**ESPESOR PROMEDIO DE LA CAPA
GRANULOSA EXTERNA DEL CEREBELO
DE FETOS DE RATON**

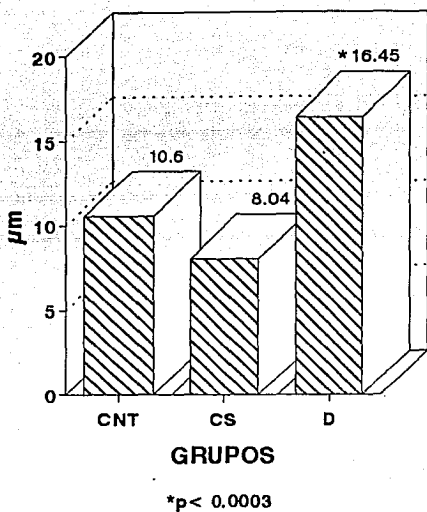


Figura 8.- Representación gráfica del espesor promedio en μm de la capa granulosa externa obtenida de los cerebelos de los fetos de ratones de 18 días de los grupos controles, el no tratados (CNT) y el del grupo control inyectado con solución salina (CS) y al que se le aplicó diazepam (D).

**DENSIDAD CELULAR PROMEDIO POR CAMPO DE
LA CAPA GRANULOSA EXTERNA DEL CEREBELO
DE FETOS DE RATON**

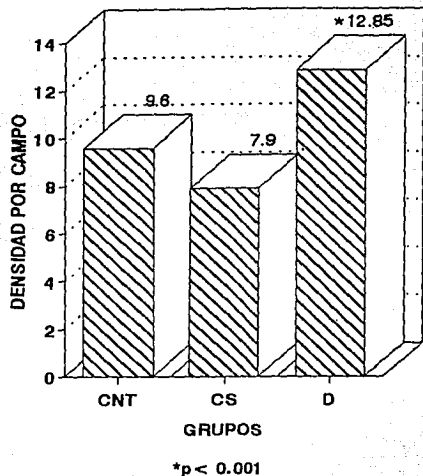
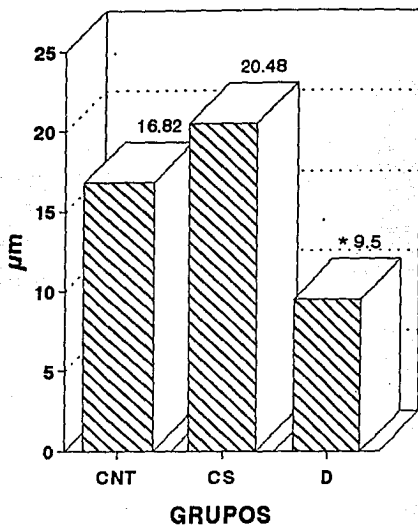


Figura 9.- Representación gráfica de la densidad celular promedio por campo de la capa granulosa externa obtenida del cerebelo de los fetos de ratones de 18 días, de los tres grupos: el no tratado (CNT), el inyectado con solución salina (CS) y al que se le aplicó diazepam (D).

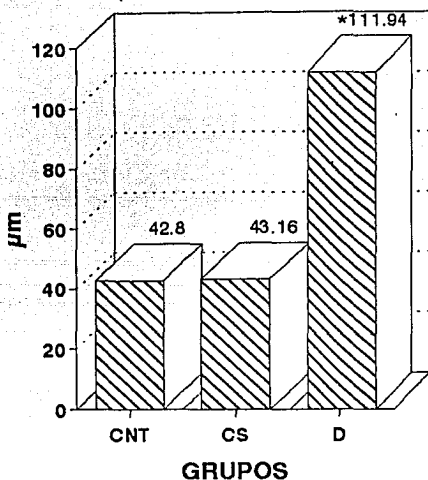
ESPESOR PROMEDIO EN μm DE LA CAPA MOLECULAR DEL CEREBELO DE FETOS DE RATON



* $p < 0.001$

Figura 10.- Representación gráfica del espesor promedio en μm de la capa molecular del cerebelo de fetos de ratones de 18 días del no tratado (CNT), del grupo control inyectado con solución salina (CS) y el experimental, al que se le aplicó diazepam (D).

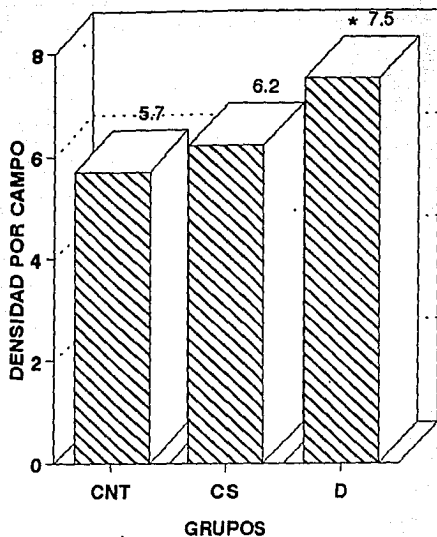
ESPESOR PROMEDIO EN μm DE LA CAPA GRANULOSA INTERNA DEL CEREBELO DE FETOS DE RATON



* $p < 0.001$

Figura 11.- Representación gráfica del espesor promedio en μm de la capa granulosa interna obtenida del cerebelo de los fetos de ratones de 18 días del grupo control no tratado (CNT), el inyectado con solución salina (CS), y al que se le aplicó diazepam (D).

DENSIDAD CELULAR PROMEDIO POR CAMPO
DE LA CAPA GRANULOSA INTERNA DEL
CEREBELO DE FETOS DE RATON



* $p < 0.001$

Figura 12.- Representación gráfica de la densidad celular promedio por campo de la capa granulosa interna obtenida del cerebelo de los fetos ratones de 18 días, de los grupos: control no tratado (CNT), control inyectado con solución salina (CS) y experimental, al que se le aplicó diazepam (D).

XI. DISCUSION

La coloración cianótica de la piel de los fetos de 18 días, que estuvieron expuestos a dosis de diazepam de 2.7 mg/kg de peso corporal, del sexto al decimoséptimo día de la gestación, se debe probablemente a un efecto directo del diazepam sobre el pulmón fetal, de acuerdo con Márquez-Orozco et al, 1985 (35), quien describió alteraciones histológicas en el árbol bronquial, el cual estaba colapsado, las células epiteliales presentaban mayor espesor y menor cantidad de secreciones, lo que parece indicar que existe una disminución del factor tensoactivo, que causaría depresión respiratoria y dificultad para la succión como fue reportado por Schulumpf et al, 1989 (52). Además del efecto directo sobre el pulmón probablemente existe otro indirecto a través del SNC, ya que Kellogg, 1988 (17) demostró la presencia de la droga en el cerebro de las crías de ratas recién nacidas expuestas in utero a dosis de diazepam de 2.5 mg/kg de peso corporal del décimotercero al vigésimo día de la gestación.

Los cambios en la estructura de las células del cerebelo de los fetos tratados, su distribución atípica y la diferencia en el espesor de sus capas, probablemente se deben a que el diazepam altera en algunos casos de manera simultánea y en otras en forma secuencial varios procesos fisiológicos, tanto a nivel citoplasmático como nuclear, así las alteraciones celulares observadas en el cerebelo fetal para las capas granulosa externa,

molecular e interna, como es el aspecto vacuolizado del citoplasma, el mayor número de nucleolos en estas dos últimas capas y los núcleos voluminosos con la cromatina en grumos atípicamente distribuída de la capa granulosa externa, también han sido descritas por Márquez-Orozco et al. con el microscopio fotónico en el riñón (38), la placenta (34), la tibia (37), la retina (31), la corteza cerebral (30) y el pulmón (33), y podrían deberse a alteraciones de los organelos citoplasmáticos similares a las encontradas con el microscopio electrónico en el hígado (40), el corazón (32), el pulmón (33), la retina (31) y el cerebelo (30) de fetos de ratón tratados prenatalmente con diazepam, en los cuales había aumento del número de polirribosomas, distensión del retículo endoplásmico rugoso, presencia de cuerpos electrodensos, un aumento considerable de las cisternas y vesículas del complejo de Golgi, desorganización de las prolongaciones citoplásmicas y de las mitocondrias. También, Breen et al; 1970 (53), encontraron en fibroblastos humanos cultivados con dosis de diazepam de 0.1, 1.0, 10.0 y 20.0 $\mu\text{g/ml}$, distensión del retículo endoplásmico rugoso, elementos membranosos, gránulos electrodensos, aumento de cisternas y vesículas del complejo de Golgi, retardo en el crecimiento de los cultivos y disminución de la síntesis de colágena.

Otros estudios relacionados sobre el efecto del diazepam sobre tejidos fetales son los de Nagele et al; 1989 (41), quienes encontraron en embriones de pollo, incubados durante seis horas

con dosis de diazepam de 400 $\mu\text{g/ml}$, defectos en el cierre del tubo neural, que consistieron en que los pliegues neurales no tenían señales de contacto a lo largo del neuroepitelio de los bordes del surco neural, siendo la región mesencefálica la más afectada. Con el microscopio electrónico, se observan alteraciones en la superficie apical de las células neuroepiteliales, la cual era casi lisa y sus haces de microfilamentos eran más delgados y menos conspicuos con respecto a los controles.

Las observaciones de los núcleos voluminosos, con la cromatina distribuida atípicamente de las células del cerebelo fetal, podría correlacionarse con lo descrito por Stenchever et al en 1969 (44), quienes realizaron estudios in vitro en leucocitos de personas sometidos a tratamiento con dosis de diazepam de 10 mg/ml y 20 mg/ml y en 1970 (45) in vivo en linfocitos humanos de 23 pacientes, cuyo tiempo de exposición varió entre 0.5 a 36 meses, demostrando interrupciones en las isocromátidas, que predominaron en los cromosomas del grupo C y en el cromosoma X, en el A, y en menor proporción en el B, D, E y mínimo en el F y G, presencia de anillos, cromosomas dicéntricos, figuras mitóticas tri o tetrarradiadas y células tetraploides.

El aumento de la frecuencia de figuras mitóticas que se observaron en las células de la capa granulosa externa del cerebelo, coincide con lo que ha sido descrito por Andersson et al 1981 (43), en cultivos de fibroblastos humanos expuestos durante 12 horas a dosis de diazepam de 80 $\mu\text{g/ml}$, quienes

encontraron un aumento del 30% en el número de figuras mitóticas, debida a una inhibición de la separación de los centriolos en prometafase, sin alteración en la aparición de los microtúbulos del huso acromático.

La posible alteración en el mecanismo que se requiere para dirigir a las células embrionarias hasta su destino final, puede ser la secreción de un producto químico que atraiga a las células en migración (quimiotactismo) o bien el establecimiento de una ruta específica en la matriz extracelular que guíe las células en migración (54) podría explicar el retardo en la migración de las células de la capa marginal hacia la granulosa interna y la posición irregular de las células que constituyen esta capa, las cuales aún no ocupan el estrato definitivo, así como también los numerosos núcleos de células de la capa molecular y de la granulosa externa migrando hacia la granulosa interna, esta idea es apoyada por los trabajos de Rakic, quien en 1975 (55), describió para el cerebelo, el mecanismo por el cual las neuronas de la granulosa se desplazan a través de la glía de Bergmann, que consiste en que la membrana de la célula neuronal hace contacto con la membrana de la "glía monorriell", a través de la cual se elonga y enreda en una sola dirección mediante una proteína de adhesión llamada astroactina (56). Haftén; 1990, (57) también menciona que las neuronas jóvenes alcanzan la posición determinada mediante la guía glial. Otros estudios son los de Wang et al; 1984 (19), quienes encontraron que concentraciones de diazepam de 200 nM inhiben la proliferación de células tónicas de

ratón, siendo reversible al diluir el medio con otro que no contiene el fármaco. El efecto antiproliferativo no solamente ha sido observado en las células del timo sino también en células 3T3 (58), en las cuales se produjo con concentraciones de diazepam de 30 nM.

Es probable que las células del cerebelo fetal también muestren retardo en su migración, debido a que el citoesqueleto por el cual se desplazan de una capa a otra aún no se ha terminado de formar, por disminución en la síntesis y acumulación de miosina pesada, además de tener efecto en la síntesis de proteína total, como ha sido reportado por Bandman et al; 1978 (47), en células embrionarias de músculo esquelético de pollos cultivadas con una concentración de diazepam 50 nM. Así también Walker et al; 1979 (46), demostró que el fármaco a concentraciones 100 nM inhibe las contracciones espontáneas en fibras musculares de embriones de pollo, encontrando que el 80 % de los cultivos se había inhibido la síntesis de miosina pesada y la tasa de degradación se incrementó con respecto a los controles, siendo estos efectos reversibles cuando la exposición al fármaco se limita a 48 horas. Nagele et al; 1983 (48), observó en fibroblastos de pollo cultivados con dosis de diazepam de 150 $\mu\text{g/ml}$, que los filamentos de actina eran menos numerosos y que estaban desorganizados en su distribución y periodicidad, lo cual podría estar interfiriendo con la incorporación de otras proteínas a la actina.

Por otra parte, se ha observado que el diazepam tiene gran afinidad de unión por los receptores benzodiazepínicos de tipo central y periférico del cerebro, siendo que estos últimos están involucrados en la proliferación celular.

Los movimientos lentos observados en los mismos fetos podría deberse a una depresión neurológica, relacionada con una respuesta inhibitoria de las células nerviosas, producida por el movimiento de iones cloro debida a la acción del diazepam sobre el GABA_A, que está en un 25% a 45% en estas células (18). Mallorga et al; 1980 (23), los pudieron detectar en la rata desde el octavo día de la gestación. En cambio, en el cerebelo los receptores benzodiazepínicos y el GABA_A, han sido identificados en la rata al principio de la tercera semana de la gestación (20, 59, 22) y en fetos humanos de doce semanas (25, 17), por lo que es posible que el diazepam pueda actuar sobre estas estructura cerebral.

Además del GABA_A se ha demostrado la presencia del GABA_B, involucrado en el movimiento de iones calcio y potasio a través de un segundo mensajero (60), ambos tipos de receptores se encuentran distribuidos de manera específica en el cerebelo, el GABA_B se encuentra principalmente en la capa molecular mientras que el GABA_A predomina en la capa granulosa (61). La presencia de diazepam podría modificar la permeabilidad de la membrana plasmática neuronal de las células que constituyen el cerebelo fetal, y por lo tanto, el intercambio iónico, lo que

explicaría la presencia de núcleos menos voluminosos de las células indiferenciadas que se encuentran en la granulosa interna y la futura sustancia blanca, que a la vez provoca un aumento del espesor y en el número de células por campo en esta capa. El citoplasma basófilo de las células de la granulosa externa también sería causado por la modificación de la permeabilidad de la membrana plasmática, asociado a la presencia de hidrolasas ácidas, localizadas en los lisosomas, las cuales están inactivadas y permanecen latentes hasta que la membrana del organelo es dañada o algún sustrato apropiado entra al lisosoma, los cuales presentan una secuencia de cambios en la que funcionan como sistemas digestivos intracelulares (62).

Los daños celulares generados en etapas fetales, como las observadas en el cerebelo, es probable que persistan postnatalmente modificando la conducta y la coordinación de los movimientos, como ha sido descrito por Márquez-Orozco et al;1992 (63) quienes observaron que las crías de ratón de seis a sesenta días postnatales, que estuvieron expuestos a dosis de diazepam de 2.7 mg/kg de peso corporal del sexto al decimoséptimo día de la gestación presentaron una actividad locomotora espontánea menor a la de los animales controles, además de que sus movimientos de exploración eran vacilantes y lentos, y en su patrón de natación había incoordinación de los movimientos de los miembros y dificultad para mantener la nariz fuera del agua. Así también, Kellogg et al; 1980 (59), reportaron que la respuesta locomotora y los reflejos auditivos estaban ausentes en la tercera semana postnatal en las crías de ratas que estuvieron

expuestas "in utero" al fármaco, del décimotercero al vigésimo día de la gestación. Estos cambios en la conducta sugieren que debe haber alteraciones en el desarrollo neuronal durante periodos en el que se lleva a cabo la diferenciación y migración celular (64).

XII. CONCLUSIONES

La administración de dosis diarias de diazepam de 2.7 mg/kg de peso corporal del sexto al decimoséptimo día de la gestación produce en los fetos de ratón de la cepa CD-1, de 18 días:

1. Depresión respiratoria, que se manifiesta por la coloración cianótica de la piel.
2. Disminución de la temperatura corporal de los fetos tratados.
3. Movimientos corporales lentos, debido a la acción de la droga sobre el sistema nervioso central.

A nivel de cerebelo, con respecto a los animales control, se encontró:

4. Retraso en la migración de las células de las capas granulosa externa y la del manto a la granulosa interna.
5. Incremento estadísticamente significativo del espesor y número de células por campo de las capas granulosa interna ($p < 0.001$) y externa ($p < 0.003$).
6. Menor espesor de la capa molecular ($p < 0.001$).
7. Aumento de volumen de los núcleos de las células de la capa granulosa externa .

8. Núcleos de menor volumen en las células de Purkinje y en las del manto, que migran hacia la granulosa interna, lo que es un indicador del retraso en la diferenciación celular.

9. Núcleos de las células cerebelares, con la cromatina en grumos gruesos dispersos entre la cariolinfa y citoplasma basófilo, con mayor afinidad tintorial.

XIII.-REFERENCIAS

1. Valium Roche Lab. Valium diazepam. The Journal of Family Practice. 6 (1): 1-57, 1978.
2. Goodman, L.S., Gilman, Y.A. Bases farmacológicas de la terapéutica. Nueva Editorial Interamericana, S.A. de C.V; México, pp 144-146.
3. McAllister, C.B.:Placental transfer and neonatal effects of diazepam when administered to woman just before delivery. Br. J. Anaesth. 52: 423-427, 1980.
4. Wali, F.A.:Effects of diazepam at the neuromuscular junction. Life Sciences. 37 (17): 1559-1561, 1985.
5. Rojas, J.A.:Benzodiazepinas. Rev. Fac. de Med. 18 (1): 32-35, 1975.
6. Simmons, R.D., Miller, R.K., Kellogg, C.K.:Prenatal diazepam: distribution and metabolism in perinatal rats.Teratology. 28: 181-188, 1983.
7. Van Der Kleijn, E.:Kinetics of distribution and metabolism of diazepam and chlordiazepoxido in mice. Arch. Int Pharmacodyn. 178(1), 193-215, 1969.
8. Frieder, B., Meshorer, A., Grimm, V.:The effect of exposure to diazepam through the placenta or through the mothers milk. Neuropharmacology; 23 (9): 1099-1104, 1984.
9. Idänpään-Heikkilä, J.E., Pentti, I., Jouppila, M.O.: Placental tranfer and fetal metabolism of diazepam in early human pregnancy. Amer. J. Obstet. Gynec. 109 (7): 1011-1016, 1971.
10. Idänpään-Heikkilä, J.E., Ronald, J., Taska, H.:Placental transfer of diazepam - ¹⁴C in mice, hamster and monkeys. The journal of pharmacology and experimental therapeutics. 176 (3): 752-757, 1971.

11. Kellogg, C.K., Chisholm, J., Simmons, R.D., Ison J.R., Miller, R.K.: Neural and behavioral consequences of prenatal exposure to diazepam. *Monograf Neural Sci*; 9: 119-129, 1983.

12. Mandelli, M., Biol. D., Morselli, P.L., Nordio, M.D., Pardi, M.D., Principi, M.D., Sereni, M.D., Tognoni, M.D.: Placental transfer of diazepam and its disposition in the newborn. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*. 17 (5): 564-572, 1975.

13. Flowers, C.F., Rudolph, A.J., Desmond, M.: Diazepam (valium) as an adjunct in obstetrics analgesis. *Obstetrics Gynecology*. 34 (1): 68, 1969.

14. Owens, J.R., Irani, S.F., Blair, A.W.: Effect of diazepam administered to mothers during labour on temperature regulation of neonate. *Archives of Disease in Childhood*. 47: 107-110, 1972.

15. Sher, J; Hailey, D.M., Beard, R.M.: Effects of diazepam on the fetus. *J. Obstet. Gyn. Brit. Comm.* 79: 635, 1972.

16. Mc Carthy, G.T., O' Connell, B.O., Robinson, A.E.: Blood levels of diazepam in infants of two mothers given large doses of diazepam during labour. *I. Obstet. Gyn. Br. Comm.* 8: 349, 1973.

17. Kellogg, C.K.: Benzodiazepinas : influence on the developing brain. *Progress in Brain Research*. 73: 207-228, 1988 .

18. Kellogg, C.K.: Postnatal effects of prenatal exposure to psychoactive drugs. *Pre and Peri- natal Psychology*; 5: 233-251, 1991.

19. Wang, K.T., Morgan, J.I., Sydney, S.: Benzodiazepines that bind at peripheral sites inhibit cell proliferation. *Proc. Natl. Acade. Sci* 81: 753-756, 1984.

20. Mohler, H., Okada, T.: Benzodiazepine receptor : Demonstration in the Central Nervous System. *Science*; 198: 849-851, 1977.

21. Kellogg, C.K., Plegler, G.: GABA_A-stimulated chloride uptake and enhancement by diazepam in synaptoneurosomes from rat brain during prenatal and postnatal development. *Development Brain Research*. 49: 87-95, 1989.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

22. Braestrup, C., Nielsen, M.: Ontogenetic development of benzodiazepine receptors in the rat. *Brain Research*. 141: 170-173, 1978.
23. Mallorga, P., Hamburg, M., Tallman, J. F., Gallager, D.W.: Ontogenetic changes in GABA modulation of brain benzodiazepine binding. *Neuropharmacology*. 19:405-408, 1980.
24. Rothe, T., Bilgl V.: The ontogeny of benzodiazepine receptors, in selected regions of the rat brain: effect of perinatal exposure to diazepam. *Neuropharmacology*. 28:503-508, 1989.
25. Aaltonen, L., Erkkola, R., Kanto, J.: Benzodiazepine receptors in the human fetus. *Biol. Neonate*. 44: 54-57, 1983.
26. Candy, J.M., Martin, J.L.: The postnatal development of benzodiazepine receptor in the cerebral cortex and cerebellum of the rat. *Journal of the Neurochemistry*; 32 : 665-658, 1978.
27. Miller, P.R., Becker, A.B.: Teratogenicity of oral diazepam and diphenylhydantoin in mice. *Tox. Appl. Pharm*; 32: 53-61, 1975.
28. Tarlok, S.G., Mulkiat, S., William, F.G. Comparative study of the teratogenic effects of chlordiazepoxide and diazepam in the fetal hamster. *Life Science*. 29: 2141-2147, 1981.
29. Márquez, M.C., Márquez, A., Escobar, A.: Diazepam induced long term delay in the migration of external granular layer of the cerebellum: an experimental study in the mouse. *Bol. Estud. Méd. Biol; Méx*; 36: 19-24, 1988.
30. Márquez-Orozco, A., Márquez-Orozco, M. C., Alcántara-Ortigoza, M. A.: Effects of prenatal administration of diazepam on the cerebral cortex of adult mice. *Proc. West. Pharmacol. Soc*. 35: 47-52, 1992.
31. Márquez-Orozco, M.C., Márquez-Orozco, A., Gazca-Ramírez, M. V. Ultrastructural changes in photoreceptors and retinal layers of the mouse fetus exposed to diazepam. *Proc. West. Pharmacol. Soc*. 35: 43-46, 1992.
32. Márquez-Orozco, M.C., Gazca-Ramírez, M. V., Márquez-Orozco, A.: Ultrastructural alterations of fetal mice heart produced by treatment with diazepam during gestation. *Proc. West. Pharmacol. Soc*. 26: 83-84, 1983.

33. Márquez-Orozco, M.C., Márquez-Orozco, A., Becker-Fincowsky, Z.B.: Alteraciones histológicas del pulmón por administración prenatal de diazepam (valium) en fetos de ratón. Bol. Soc. Mex. Cienc. Fisiol. 9 (1): 4-7, 1985.
34. Márquez-Orozco, M.C., Márquez-Orozco, A., Gazca-Ramírez, M.V.: Diazepam effect upon the microscopic structure of the mouse placenta. Bol. Estud. Méd. Biol. Mex. 39: 21-27, 1991.
35. Hernández-Alvarez, L.A.I., Márquez-Orozco, M.C., Márquez-Orozco A.: Efectos de la administración prenatal de diazepam en el ovario de ratón. Proc West Pharmacol Soc. 34 : 379-382, 1991.
36. Márquez-Orozco, M.C., Márquez-Orozco, A., Bouchot-Gamas, I., Fernández-Gabarrón, F.: Increase of bone calcium by prenatal exposure to diazepam in mice. Proc. West. Pharmacol. Soc. 34: 383-385, 1991
37. Márquez-Orozco, M.C., Márquez-Orozco, A., Alvarez Fernández, G., Sámano Bishop, A.: Acción del diazepam sobre la osteogénesis de la tibia fetal de ratón. Bol. Soc. Mex. Cienc. Fisiol. 7 (1): 10-15, 1984.
38. Márquez-Orozco, M.C., Márquez-Orozco, A., Alvarez Fernández, G., Sámano Bishop, A.: Efecto del diazepam (valium) en riñones fetales "in vivo". Bol. Soc. Mex. Cienc. Fisiol. 7 (1): 16-20, 1984.
39. Ortega, R.M., Márquez, M.C., Márquez, A.: Cambios histológicos del riñón de fetos de ratón tratados durante la gestación con diversas dosis de diazepam. Bol. Med. Hosp. Infant. Méx. 49: 129-130, 1992.
40. Márquez-Orozco, M.C., Márquez-Orozco, A.: Cambios ultraestructurales de hepatocitos fetales causados por diazepam (valium). Bol. Soc. Mex. Cienc. Fisiol. 8 (3): 7-11, 1985.
41. Nagale, R.G., Bush, K.T., Hunter, E.T., Koseruk, M.C., Lee, H.: Biochemical basis of diazepam-induced neural tube defects in early chick embryos: a morphometric study. Teratology, 40: 29-36, 1989.
42. Miernick, A., Santa-Maria, A., Marano, F.: The antimitotic activities of some benzodiazepines. Experientia. 42: 956-958, 1986.

43. Andersson, L. C., Lehto, V., Stenman, S., Badley, R.A., Virtanen, I.: Diazepam induces mitotic arrest at prometaphase by inhibiting centriolar separation. *Nature*. 291 : 247-248, 1981.
44. Stenchever, M.A., Frankel, R.S., Jarvis, J.A.: Effects of diazepam in human cells in vitro. *Am. J. Obst and Gynec*. 103 (6): 836-842, 1969.
45. Stenchever, M.A., Frankel, R.S., Jarvis, J.A., Veress, K. Effects of diazepam on chromosomes of human leukocytes in vivo. *Amer. J. Obstetric. Gynec*. 107 (3): 456-460, 1970.
46. Walker, R.C., Bandman, E., Strohmman, C.R.: Diazepam induces relaxation of chick embryo muscle fibers in vitro and inhibits myosin synthesis. *Experimental Cell Research*. 123: 285-291, 1979.
47. Bandman, E., Walker, C.R., Strohmman, R.C.: Diazepam inhibits myoblast fusion and expression of muscle specific protein synthesis. *Science*. 200: 554-561, 1978.
48. Nagele, R.G., Pietrolungo, J.F., Kosciuk, M.C.: *Experimental Cell Research*. 143: 153-162, 1983.
49. Márquez-Orozco, M.C. Bases Morfológicas y Fisiológicas del desarrollo del Sistema Nervioso Central. En: *Ontogenia Neural* (primera edición). Coordinación de la Investigación Científica, UNAM y Soc. Mex. Cienc. Fisiol. Editor M. Salas. México, D.F. Méx. 1991. pp 73-128.
50. Inouye, M., Murakame.: U. Temporal and spatial patterns of Purkinje cell formation in the mouse cerebellum. *J. Comp. Neurol*. 194: 499-503, 1980.
51. Fujita, S., Shimada, M., Nakamura, T. H^3 -Thymidine autoradiographic studies on the cell proliferation and differentiation in the external and the internal granular layers of the mouse cerebellum. *J. Comp. Neurol*. 128: 191-208, 1966.
52. Schlumpf, M., Ramseier, H., Abriel, H., Youmbi, M., Baumand, B.J., Lichtensteiger, W.: Diazepam effects on the fetus. *Neurotoxicology*. 10: 501-516, 1989.
53. Breen, P.C., Stenchever, M.A.: Some effects of diazepam on the fine structure of human fibroblast in tissue cultur. *Amer. J. Obstet. Gynecol*. 108 (4): 520, 1970.

54. Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Watson, J.D. Molecular Biology of the cell. Second edition. Garland Publishing. New York. 1989.

55. Rakic, P. Cell migration and neuronal ectopias in the brain. En: D. Bergsma (ed). Morphogenesis and malformations of face and the brain. Birth defects original article. Series II (7): 95-129.

56. Edmonson, J.C., Liem, R.K.H., Kuster, J.C., Hatten, M.E.: Astroactin: A novel neuronal cell surface antigen that mediates neuronal astroglial interactions in cerebellar microcultures. J. Cell Biol. 106: 505-517, 1988.

57. Hatten, M.e.: Rinding the glial monorail: A common mechanism for glial-guided neuronal migration in different regions of the mammalian brain. Trends Neurosci. 13:179-184, 1990.

58. Clarke, G.D., Ryan, P.J.: Tranquillizer can block mitogenesis in 3T3 cells and induce differentiation in friend cells. Nature. 287: 160-161, 1980.

59. Kellogg, C.K., Tervo, D., Ison, J., Parisi, T., Miller, R. K.: Prenatal exposure to diazepam alters behavioral development in rats. Science. 207: 205-207, 1980.

60. Sieghart, W.: Multiplicity of GABA_A benzodiazepine receptors. Trends Pharmacol. Sci. 10: 407-411, 1989.

61. Bowery, N.: GABA_B receptors and their significance in mammalian pharmacology. Trends Pharmacol Sci. 10: 401-407, 1989.

62. Avers, C.J., Biología Celular. Segunda Edición. Grupo Editorial Iberoamérica. México, D.F., 1983. pp 532.

63. Márquez, A., Márquez, M.C., Zarco, I., Gazca, M.V., Alcántara, M.A.: Alteraciones histológicas y fisiológicas del cerebro de ratones adultos expuestos prenatalmente a diazepam. Bol. Med. Hosp. Infant. Mex. 49: 129, 1992.

64. Simmons, R.D., Miller, R.K., Kellogg, C.K.: Prenatal exposure to diazepam alters central and peripheral responses to stress in adult rat offspring. Brain Research. 307: 39-46, 1984