

## Efecto del Diazepam sobre la Actividad de la Succínico Deshidrogenasa, la ATPasa Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup> dependiente y la Fosfatasa Alcalina Placentaria. Su importancia en Neonatología.

María de los Angeles BOFFILL CÁRDENAS \*, Jesús Alfonso RODRIGUEZ  
y Lourdes MONTERO MÉNDEZ

Laboratorio de Investigaciones Bioquímicas,  
Instituto Superior de Ciencias Médicas de Villa Clara, Apdo. 860 Villa Clara, Cuba

---

**RESUMEN.** El diazepam se absorbe rápida y completamente después de la administración oral y atraviesa la barrera placentaria; su tasa de penetración en el tejido placentario es de 31,5% a las 4 horas, su vida media es prolongada y la existencia de metabolitos activos hace que su efecto sea acumulativo. Este estudio se efectuó en un modelo *in vitro* usando 20 placentas humanas, en donde se estudió el efecto del diazepam sobre la actividad de la succínico deshidrogenasa, la ATPasa Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup> dependiente y la fosfatasa alcalina. Se comprobó que el diazepam produce inhibición sobre las 3 enzimas estudiadas; este efecto fue más intenso sobre la ATPasa Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup> dependiente y menos intenso sobre la fosfatasa alcalina; en todos los casos la afectación de la actividad dependió de la concentración del diazepam en el medio de reacción. Estos resultados pueden explicar desde el punto de vista molecular las afecciones que provoca dicho fármaco en cuanto a la disminución del peso al nacer y a la inmunodepresión de los neonatos cuyas madres han usado diazepam durante la gestación.

**SUMMARY.** "Effect of Diazepam on Succinic Dehydrogenase, Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup> dependent ATPase and Alkaline Phosphatase activities. Its importance in Neonatology". The diazepam is completely and rapidly adsorbed after oral administration and goes through placental barrier; its penetration rate is 31.5% at 4h, its half time life is long and has accumulative effect because of active metabolites. The present study was carried out in 20 human placentas using a *in vitro* model, in which the effect of diazepam on succinic dehydrogenase, Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup> dependent ATPase and alkaline phosphatase activities were studied. It was shown that diazepam produces inhibition on the three studied enzymes being more intense on ATPase and less intense on alkaline phosphatase. Inhibition in all cases depended on diazepam concentration in the reaction media. From a molecular point of view these findings could explain the metabolic way through which in the gestational period this drug induces a low birth weight and immunodepression in neonates whose mothers had used diazepam during gestation.

---

**PALABRAS CLAVES:** Diazepam, enzimas placentarias, inhibición

**KEY WORDS:** Diazepam, placental enzymes, inhibition.

\* Autor a quien dirigir la correspondencia

## INTRODUCCION

Por medio de estudios epidemiológicos se conoce que el número de mujeres que ingieren fármacos durante la gestación es extraordinariamente grande <sup>1-3</sup>. Sin embargo, no se le presta mucha atención a esta situación y en la práctica sólo se le da cierta importancia al efecto teratógeno de los fármacos sin tener en cuenta otras reacciones adversas que pueden afectar la gestación y repercutir sobre la calidad de vida del neonato. En este sentido se debe tener en cuenta que durante la gestación se producen cambios en la farmacocinética y farmacodinámica de los fármacos, lo que puede significar un mayor peligro para la unidad madre-feto <sup>4,5</sup>.

Además se ha demostrado que los fármacos al atravesar la placenta pueden actuar sobre el embrión o feto, los que en los primeros períodos de la gestación pueden provocar un efecto embriotóxico <sup>6</sup> y que cuando son suministrados en el período fetal pueden ocasionar alteraciones del crecimiento y desarrollo funcional del feto, pudiendo desencadenar una enfermedad postnatal <sup>7</sup>.

El diazepam se absorbe rápida y completamente después de la administración oral y atraviesa la barrera placentaria, siendo su tasa de penetración de 31,5 % a las 4 horas. Su vida media es prolongada y la existencia de metabolitos activos hace que su efecto sea acumulativo <sup>8</sup>. Su uso a dosis de 2,7 mg/kg provoca alteraciones en la estructura fina de las células trofoblásticas <sup>9</sup>, decrece además la respuesta inmune del neonato cuando se suministra a ratas en dosis de 4,25 mg/kg/día entre los 14 y 20 días de gestación <sup>10</sup> y en humanos el tratamiento fetal tardío puede provocar inmunodepresión hasta los 2 meses <sup>11</sup> y afectación en el metabolismo energético celular <sup>12</sup>. Los efectos teratógenicos se producen en humanos con una dosis de 30 mg diarios 3 meses antes y durante la gestación, provocando numerosas malformaciones y daño cromosómico <sup>13</sup>.

Como hemos expresado anteriormente, se ha comprobado que la ingestión de numerosos fármacos provocan efectos perjudiciales sobre el desarrollo fetal. Sin embargo, no se han determinado las causas moleculares que provocan éstos, aun cuando se conoce que muchas drogas actúan específicamente sobre una enzima o grupo de enzimas combinándose con su centro activo, variando la afinidad por sus cofactores o sustratos, así como modificando su conformación. En consecuencia el presente trabajo ha sido realizado en un modelo in vitro con el objetivo de determinar el efecto del diazepam sobre la actividad de las enzimas placentarias succínico deshidrogenasa, fosfatasa alcalina y la ATPasa Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup> dependiente, en un intento por determinar las posibles modificaciones que podría producir el fármaco en las vías metabólicas en las cuales participan estas enzimas y que pudieran afectar el normal desarrollo fetal.

## MATERIALES Y METODOS

Para realizar este trabajo utilizamos 20 placentas de madres normales que fueron atendidas en el Hospital Provincial Docente Ginecoobstétrico "Mariana Grajales" de Santa Clara, Cuba. Para seleccionar las mismas se efectuó una encuesta a la madre en donde se determinó su edad, paridad, edad gestacional, peso del recién nacido y si la madre presentaba alguna enfermedad durante el embarazo. Para su inclusión en este trabajo el neonato tuvo un apgar dentro de los límites normales y un peso superior a los 2.500 gramos y además la madre no presentó ninguna enfermedad durante el embarazo que requiriera el uso de medicamentos y su parto fue fisiológico y a término.

Se determinó la actividad de las enzimas succínico deshidrogenasa (SDH), fosfatasa alcalina (FA) y ATPasa  $\text{Na}^+\text{K}^+$  dependiente (ASP). La determinación de las actividades se realizó teniendo en cuenta la estabilidad de la enzima en el homogeneizado y la cantidad de la misma en la preparación, para lo cual utilizamos un homogeneizado que contenía de 0,2 a 0,3 mg de proteínas/ml para la determinación de la FA y de la ASP y de 2,0 a 3,0 mg de proteínas/ml para la SDH.

La determinación de las actividades enzimáticas en presencia del diazepam se efectuó adicionando el mismo en el volumen del buffer utilizado en cada técnica, de forma tal que en la mezcla de incubación se obtuviera las concentraciones de 10, 50 y 100  $\mu\text{g/ml}$ , las cuales están por debajo del rango de las dosis utilizadas por Bree <sup>14</sup> en cultivos de fibroblastos que provocaron alteraciones en la estructura fina de estas células.

Cada placenta fue recogida inmediatamente después del parto, manteniéndola en agua destilada en un baño de hielo mientras se le cambió el agua varias veces para eliminar la mayor cantidad de sangre posible. Se cortó en pequeños fragmentos, se continuó lavando con agua a 4 °C durante 3 horas, con cambios cada 1 hora. El tejido placentario obtenido se dejó en solución salina 24 horas a 4 °C; transcurrido este tiempo se eliminó el sobrenadante por centrifugación, inmediatamente se lavó durante 3 ocasiones con solución isotónica de sacarosa 0,25 M durante 10 minutos a 4 °C a 3 000 rpm en una centrífuga refrigerada, después se secó con papel de filtro, se pesó y por cada gramo de la placenta se le añadió 2,5 ml de solución 0,25 M de sacarosa, agregándole 0,15 ml de Tritón X-100 al 0,1% por cada 10 ml de solución de sacarosa utilizada. A continuación se homogeneizó en un homogeneizador de cuchillas, conservándose el tejido en un baño de hielo para evitar la inactivación enzimática. Después este homogeneizado se centrifugó a 3000 rpm durante 10 minutos a 4 °C para obtener el sobrenadante, el cual se dividió en alícuotas de 2 ml y se congeló en un freezer a -20 °C.

La medida de las actividades enzimáticas se efectuó según las técnicas que se describen a continuación, en donde se tuvieron en cuenta las características diferenciales de dichas enzimas en el tejido placentario, de acuerdo a determinaciones previas realizadas en nuestro laboratorio <sup>15</sup>.

La actividad de la SDH se determinó inmediatamente después de preparado el homogeneizado, midiendo la reducción del 2-6 diclorofenolindofenol a 25 °C en una cubeta de 1 cm de paso de luz a la que se añadió 3 ml de una solución que tenía la siguiente composición: buffer fosfato 0,25 M, diclorofenolindofenol 0,1 mM, succinato de sodio 1,5 M, cianuro de potasio 2,5 mM y EDTA 0,7 mM; cada reactivo tenía el pH ajustado a 7,4 y la mezcla se preparó en el momento de usarse. La reacción se inició con la adición de 0,1 ml del homogeneizado a la mezcla reaccionante e inmediatamente se leyó en un espectrofotómetro a tiempo 0 y 3 minutos a 625 nm. Paralelamente se efectuó en iguales condiciones la medición de la reducción del colorante en la reacción inhibida por el malonato en ausencia del succinato, para eliminar el efecto de otras deshidrogenasas presentes en la preparación placentaria.

La actividad de la FA se determinó a las 24 horas de preparado el homogeneizado, utilizando  $\beta$ -glicerofosfato 16 mM como sustrato en buffer veronal 0,02 M a pH 8,6. La reacción comenzó cuando se le añadió 0,4 ml del homogeneizado a 0,1ml de la mezcla de buffer y sustrato; la mezcla de reacción se incubó a 37 °C

durante 1 hora. La reacción enzimática se detuvo por la adición de 2,5 ml de ácido tricloroacético al 10%; posteriormente se centrifugó a 3000 rpm durante 10 minutos y el fósforo liberado por la acción de la enzima se cuantificó para calcular su actividad.

La determinación de la actividad de la ASP se realizó a las 48 horas de preparado el homogeneizado, basado en la inhibición de la enzima por la uabaína. Para ello se incubó a 37 °C en un tubo durante 30 minutos la siguiente mezcla de reacción, que contenía 0,1 ml de ATP 30 mM, 0,1 ml de ClK 0,25 M, 0,1 ml de ClNa 0,5 M y 1 ml de una mezcla de reacción constituida por Cl<sub>2</sub>Mg 1,3 mM, EDTA 1,3 mM, imidazol 50 mM y glicil-glicina 5 mM, a la que se le añadió 1 ml del homogeneizado. La actividad ATPasa inhibida por la uabaína se determinó en otro tubo que contenía una mezcla de reacción similar, pero sin añadir ClNa y ClK, los que se sustituyeron por 0,1 ml de agua destilada y 0,1 ml de uabaína 5 mM. Posteriormente se detuvo la reacción con 2,5 ml de ácido tricloroacético al 10% y se centrifugó durante 10 minutos a 3000 rpm; la actividad de las ATPasas se calcula a partir del fósforo liberado, y la actividad de la ASP se calculó restando a la actividad total la actividad ATPasa Mg<sup>+2</sup>. El fósforo inorgánico liberado por la acción de la FA y la ASP se cuantificó por el método de Fisker y Subbarow <sup>16</sup>.

Todas las determinaciones de las enzimas se efectuaron con un blanco enzima para corregir las interferencias que pudiera provocar otros componentes del homogeneizado. Las concentraciones de las proteínas en las preparaciones de tejido placentario fueron determinadas por el método de Lowry, usando como patrón albúmina bovina (0,1 mg/ml) <sup>17</sup>.

El nivel de significación de la actividad de las enzimas en ausencia de fármaco y en presencia de las 3 concentraciones utilizadas se obtuvo mediante el método de distribución del Test T para muestras apareadas, después de haber comprobado la distribución normal de los datos mediante el método de Kolmogorov Smirnov. Los datos fueron procesados en una microcomputadora XT, IBM compatible, auxiliándonos del paquete estadístico SYSTAT.

## RESULTADOS Y DISCUSION

En la Tabla 1 y en la Figura 1 (a, b y c) se puede observar el comportamiento de las tres enzimas estudiadas en presencia del diazepam, destacándose el efecto inhibitorio sobre ellas. La presencia del diazepam condujo a una disminución altamente significativa de la SDH con la concentración menor y muy altamente significativa con las concentraciones intermedia y alta, manifestándose una mayor reducción de la actividad de esta enzima a medida que se incrementó la concentración del fármaco. El hecho de que la succínico deshidrogenasa se afecte puede provocar una alteración en el metabolismo energético, ya que esta enzima participa tanto en la cadena respiratoria como en el ciclo de Krebs, lo cual podría explicar la aparición del crecimiento intrauterino retardado <sup>12</sup> al no contar la placenta con el ATP necesario para realizar los procesos que requieren energía.

La disminución de la actividad de la ASP fue muy altamente significativa con todas las concentraciones de fármaco utilizadas y este efecto se incrementó a medida que incrementó la concentración del diazepam, lo que pone de manifiesto la gran afectación que produce sobre esta enzima. El hecho de que la ASP sea afectada tan severamente limitaría considerablemente los procesos de transporte activo

Enzima	Concentración de diazepam (mg/ml)	Actividad (mU/mg de proteína)	Medida de la diferencia	TC	p
SDH	0,00	0,555 ± 0,163	-	-	-
	0,01	0,458 ± 0,168	0,096	3,551	< 0,01
	0,05	0,428 ± 0,160	0,126	8,690	< 0,001
	0,10	0,381 ± 0,161	0,174	6,482	< 0,001
FA	0,00	35,72 ± 15,82	-	-	-
	0,01	34,83 ± 15,03	0,89	1,108	> 0,05
	0,05	32,45 ± 14,31	3,27	2,434	< 0,05
	0,10	30,93 ± 12,15	4,79	2,902	< 0,01
ASP	0,00	1,67 ± 0,49	-	-	-
	0,01	1,44 ± 0,43	0,229	4,386	> 0,001
	0,05	1,09 ± 0,46	0,577	8,276	< 0,001
	0,10	0,74 ± 0,41	0,932	15,48	< 0,001

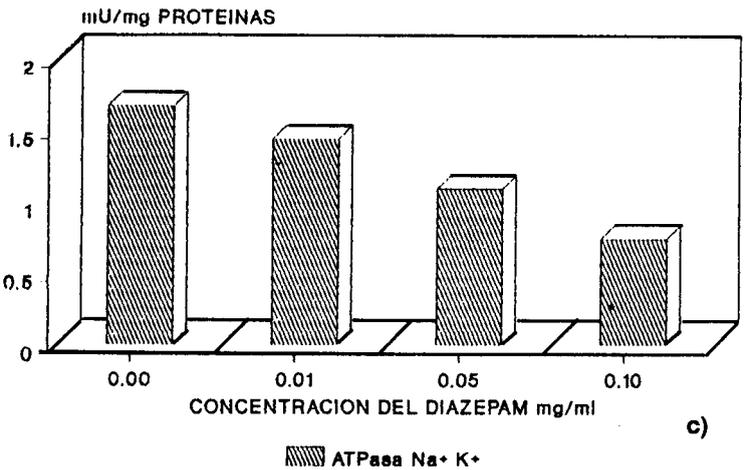
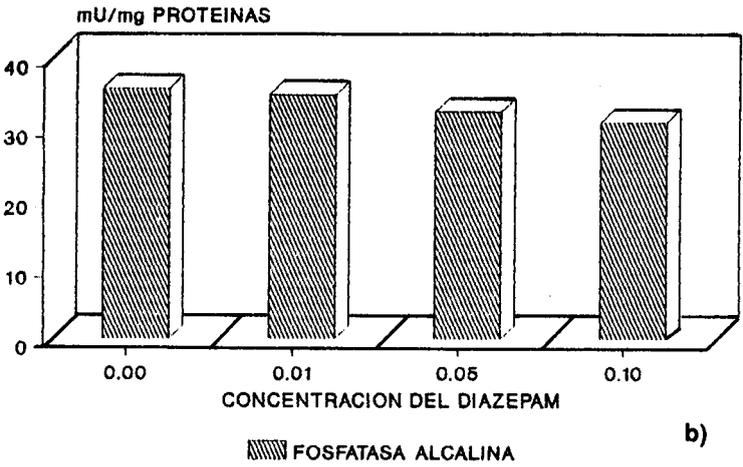
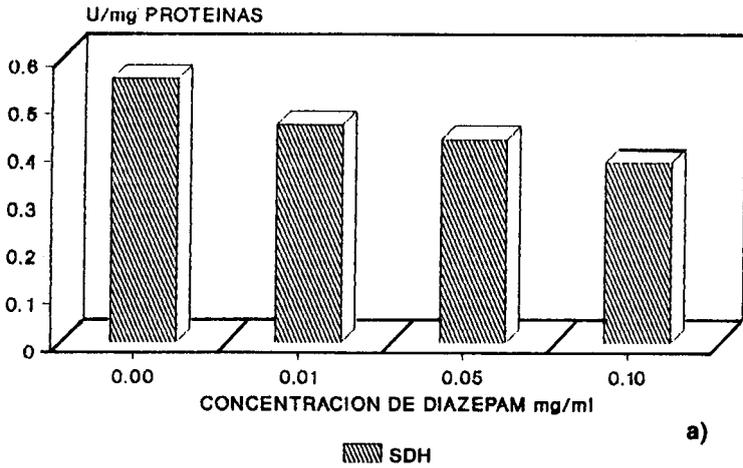
**Tabla 1.** Efecto del diazepam sobre la actividad de enzimas placentarias. SDH: succínico deshidrogenasa; FA: fosfatasa alcalina; ASP: ATPasa Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup> dependiente. N = 20.

en los cuales participa esta enzima <sup>18</sup>, lo que redundaría negativamente en cuanto al desarrollo fetal, que requiere del suministro de nutrientes en forma ininterrumpida <sup>19</sup>.

El diazepam disminuyó significativamente la actividad de la FA cuando el fármaco se puso en el medio de reacción en concentraciones de 0,05 mg/ml y de forma altamente significativa en presencia de 0,10 mg/ml, por lo que podemos plantear que fue la enzima que menos se afectó con el fármaco, ya que no se produjo inhibición con la menor concentración utilizada; no obstante, a medida que aumentó la concentración se incrementó el efecto inhibitorio, lo que puede conducir a la disminución de los procesos de transfosforilación y transporte activo que garantiza el fósforo y el calcio, ambos de gran importancia para mantener la adecuada mineralización del esqueleto fetal <sup>20,21</sup>, así como a la transferencia de las inmunoglobulinas <sup>22</sup>, lo cual podría explicar el decrecimiento de la respuesta inmune de los neonatos cuyas madres recibieron diazepam durante la gestación.

Especial importancia adquiere en este entorno la comparación de los niveles del diazepam en el plasma materno y fetal, ya que estos niveles pueden dar una idea de la exposición del feto a la administración materna <sup>23</sup>, así como si pueden o no alterar el metabolismo placentario y en especial su función de transporte, ya que como hemos manifestado anteriormente los efectos sobre las enzimas están muy correlacionados con la concentración del diazepam.

Aunque el diazepam se usa durante la gestación en el tratamiento de la eclampsia, se conoce en estos momentos que el tratamiento más efectivo es el sulfato de magnesio <sup>24</sup>, por lo que recomendamos que el mismo no sea utilizado durante la gestación, como una medida de proteger al feto de trastornos en la vida postnatal.



**Figura 1.** Efecto del diazepam sobre la actividad de enzimas placentarias. a) succínico deshidrogenasa; b) fosfatasa alcalina; c) ATPasa Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup> dependiente

**REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS**

1. Hertz, P., V. Hopen Hanyn, N. Columb & A. Koopenk (1990) *Epidemiol. Rev.* **12**: 108-47
2. Sumani, S. & P. Gupta (1988) *J.Clin. Pharmacol. Ther. and Toxicol.* **26**: 21-33
3. Sibai, B.M., T. Gordon & E. Thom (1995) *Am. J. Obstet. Ginecol.* **172**: 642-8
4. Rymark, P. et al (1994) *J. Perinat. Med.* **22**: 205-11
5. Asymbekara, G.U., P.D. Banartsr, T.B. Ochau, B.E. Rizenfeld, A.K. Saniv. I.J. Polveva & S.U. Parlovich ( 1995) *Eksp. Klin. Farmakol.* **28**: 35-39
6. Skasyreva, A.M. (1985) *Akush. Ginecol.* **42**: 35-7
7. Chobanov, N.G., TA. Varonim, B.J. Liubirov, N.M. Saol Nikova & E.P. Nimova (1993) *Eksp. Clin. Farmakol.* **56**:36-7
8. Jorgensen N.P., E. Thurmonn-Nielser & R.A. Walslad (1989) *Acta Obst. Gynecol. Scand.* **2**: 467-71
9. Márquez Orozco M.C., A. Márquez Orozco & M.V. Gazca Ramírez (1991) *Bol. Est. Méd. Biol. Mexic.* **39**: 21-7.
10. Schlumph M., W. Lichtensteiger & H. Van Loveren (1994) *Toxicology* **94**: 223-30
11. Schulmpf, M., H. Ramseir, H. Abriel, M. Youmbi, J.B. Baumann & W. Lichtensteiger (1989) *Neurotoxicología* **10**: 501-16
12. Sutton L.R. & S.A. Hinderliter (1990) *Clin. Pediatr. (Phila)* **29**: 108-11
13. Lizcano Gil, I.A., D. García Cruz & J. Sánchez Conona (1995) *Arch. Med. Res.* **26**: 95-6
14. Breen P.C. & M.A. Stenchever (1970) *Amer. J. Obstet. Gynecol.* **108**: 520-4
15. Boffill M., J. Alfonso, I. Miranda, L., Montero, M. Pérez, C. Mora y L. León (1991) *Rev. Cub. Invest. Bioméd.* **10**: 114
16. Fisker H. & Y. Subbarow (1925) *J. Biol. Chem.* **66**: 375-400
17. Lowry D.F. (1951) *J. Biol. Chem.* **193**: 265-75
18. Moe A.J. (1995) *Am. J. Physiol.* **268 C**: 1321-31
19. Barker, D.J. (1995) *Prac. R. Soc. Land. Biol. Sci.* **262**: 37-43
20. Messer H.H., Y. Shami & D.H. Copp (1975) *Biochim. Biophys. Acta* **391**: 61-6
21. Boyer S.H. (1981) *Science* **134**: 1002-4
22. Beckman G., L. Beckman, S. Halon, C. Sikshon & G. Wenrbern (1995) *Hum. Hered.* **45**: 1-5
23. Simone C., L.D. Derewlany & B. Koren (1994) *Clin. Perinatol.* **21**: 463-81
24. Fournier A., P. Fievet, I. el Esper, N. el Esper, P. Valiant & J. Gondry (1995) *Schevciz. Med. Wachenschr.* **25**: 2273-98