

2ej. S



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES  
"ZARAGOZA"

## EFECTO DEL DIAZEPAM SOBRE LA CONCENTRACION DE CALCIO DEL CRANEO DE FETOS DE RATON

TESES CON  
FALLA EN ORDEN  
MEXICO D.F.

T E S I S  
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:  
QUIMICO FARMACEUTICO BILOGO  
P R E S E N T A :  
ENRIQUE BOUCHOT GAMAS

BAJO LA DIRECCION DE:  
DRA. MARIA CRISTINA MARQUEZ OROZCO



## **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.

# INDICE

Pag.

I. INTRODUCCION.	1
1. BENZODIAZEPINAS.	1
GENERALIDADES	1
RELACION ESTRUCTURA-ACTIVIDAD	2
MECANISMO DE ACCION	4
FARMACOLOGIA	4
EFECTOS BIOLOGICOS DE LAS BENZODIAZEPINAS	7
EFECTOS ADVERSOS	8
OTROS USOS TERAPEUTICOS	9
PREPARADOS, VIAS DE ADMINISTRACION Y DOSIS	9
2. EVIDENCIAS DE LOS EFECTOS TERATOGENICOS DEL DIAZEPAM.	10
3. HOMEOSTASIS DEL CALCIO.	18
REGULACION HORMONAL DE LA HOMEOSTASIS DEL CALCIO	19
4. TEJIDO OSEO.	24
MATRIZ OSEA	27
CELULAS OSEAS	28
HISTOGENESIS DEL HUESO	34
MECANISMO DE CALCIFICACION	38
FISIOLOGIA DEL TEJIDO OSEO	38
EFECTOS DE LA NUTRICION SOBRE EL HUESO	40
EFECTO DEL DIAZEPAM EN LA OSIFICACION	42

<b>II. OBJETIVOS.</b>	<b>44</b>
<b>1. OBJETIVO GENERAL</b>	<b>44</b>
<b>2. OBJETIVOS ESPECIFICOS</b>	<b>44</b>
<b>III. HIPOTESIS</b>	<b>44</b>
<b>IV. MATERIALES Y METODOS.</b>	<b>45</b>
<b>1. MATERIALES.</b>	<b>45</b>
<b>2. METODOS.</b>	<b>47</b>
<b>V. RESULTADOS.</b>	<b>52</b>
<b>VI. DISCUSION.</b>	<b>53</b>
<b>VII. CONCLUSIONES Y SUGERENCIAS.</b>	<b>57</b>
<b>VIII. BIBLIOGRAFIA.</b>	<b>58</b>

## **I. INTRODUCCION.**

### **1. BENZODIAZEPINAS.**

#### **GENERALIDADES**

Las benzodiazepinas son un grupo de fármacos prescritos y utilizados en gran cantidad, debido a sus efectos sobre el sistema nervioso central (SNC), de los cuales los más importantes son sedación, hipnosis, disminución de la ansiedad, relajación muscular y actividad anticonvulsivante.

La primera benzodiazepina sintetizada en 1957 por Sternbach fue el clorodiazepóxido (1) y Randall et al, en 1960 describieron su amplio espectro de acción (2). Con su introducción en la clínica en 1961, el clorodiazepóxido inauguró la era de las benzodiazepinas, de las cuales se han sintetizado más de 3000, cerca de 120 se ensayaron para establecer su actividad biológica y aproximadamente 25 tienen uso terapéutico en diversas partes del mundo.

Las que se han comercializado fueron seleccionadas y han alcanzado extraordinaria popularidad por su gran potencial ansiolítico y su baja acción como depresores del SNC, ya que alivian los síntomas de ansiedad interfiriendo levemente sobre la función cognoscitiva y la vigilia. Sin embargo, todas poseen en diversa medida propiedades hipnosedantes que se aprovechan para facilitar el sueño, por eso han desplazado a los barbitúricos (3).

## RELACION ESTRUCTURA - ACTIVIDAD

Las benzodiazepinas, como su nombre lo indica, provienen de la unión de dos anillos, uno bencénico y uno diazepínico de siete miembros, en el que siempre hay un sustituyente 5-arilo, como se muestra en la figura 1 de la fórmula general de las benzodiazepinas.

El sustituyente 5-arilo es uno de los responsables de sus efectos farmacológicos y se requiere un sustituyente en la posición 7, ya sea un halógeno o un grupo nitro, para que el fármaco tenga actividad sedante e hipnótica. La naturaleza química de los sustituyentes en las posiciones 1 a 3 puede variar mucho y comprender anillos triazol o imidazol fusionados en las posiciones 1 y 2. Los grupos aceptores de electrones en la posición 2' (orto) del anillo del sustituyente 5-arilo aumentan su actividad, en tanto que los sustituyentes en otras posiciones la reducen (4).

De esta manera se han sintetizado una enorme variedad de benzodiazepinas y algunas de las más utilizadas son el diazepam, el clordiazepóxido, el oxazepam, el nitrazepam, el midazolam y el triazolam, cuyas fórmulas químicas se ilustran en la figura 2.

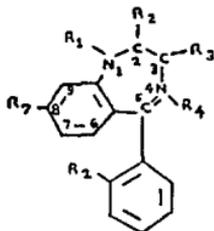
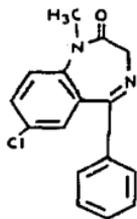
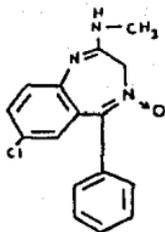


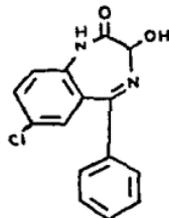
Fig. 1. Fórmula general de las Benzodiazepinas.



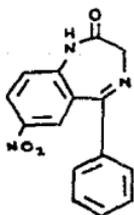
**DIAZEPAM**



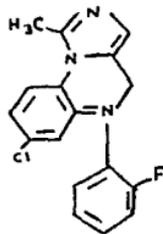
**CLORODIAZEPOXIDO**



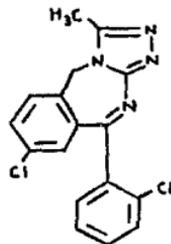
**OXAZEPAM**



**NITRAZEPAM**



**MIDAZOLAM**



**TRIAZOLAM**

**Fig. 2: Estructuras químicas de algunas de las Benzodiazepinas más empleadas en clínica.**

### MECANISMO DE ACCION

Se sabe que las benzodiazepinas actúan sobre el SNC, a nivel de un sitio de reconocimiento del fármaco, el cual forma parte de un complejo oligomérico, constituido por el receptor benzodiazepínico y el sitio de reconocimiento para el ácido  $\gamma$ -amino butírico (GABA) en el canal de cloro (5, 6). Este complejo se localiza sobre la membrana plasmática de las neuronas.

La acción del diazepam a nivel de este complejo es la de facilitar la actividad del GABA, sobre el canal de cloro al estimular el movimiento de los iones cloruro ( $Cl^-$ ), lo que inhibe la respuesta neuronal. El GABA por encontrarse en el 25 al 45 % de todas las terminales nerviosas, es el mayor neurotransmisor inhibitorio en el SNC (7).

Además del complejo receptor benzodiazepínico-receptor GABA del canal de cloro en el SNC, denominado receptor de tipo central, existe otra variante de receptores llamados "periféricos", identificados en órganos como el hígado, el riñón, el timo, el pulmón, la placenta y los huesos; los cuales no tienen que ver con el receptor del GABA y están ligados a las mitocondrias lo que indica que pueden participar en la regulación de la función celular de los tejidos donde se localizan (7, 67).

### FARMACOLOGIA

Las benzodiazepinas tienen algunas propiedades comunes, que han sido estudiadas con mayor detalle para el diazepam y el clordiazepóxido (8).

**A. Absorción:** Cuando son empleadas para tratar la ansiedad o los trastornos del sueño, las benzodiazepinas se administran generalmente por vía oral, y siendo compuestos debilmente básicos son absorbidos con mayor eficacia en un medio con pH más alto, como el del duodeno. Por esta vía el diazepam se absorbe con más rapidez que otras benzodiazepinas, como el oxazepam. La biodisponibilidad de estos fármacos, incluyendo al clorodiazepóxido y el diazepam, es poco confiable después de ser inyectados por vía intramuscular (3, 4).

**B. Distribución:** Su transporte en la sangre es un proceso dinámico, en el cual las moléculas del medicamento entran y salen de los tejidos a velocidades que dependen de la circulación sanguínea, de los gradientes de concentración y de la permeabilidad de las células. La liposolubilidad interviene de manera importante en la determinación de la velocidad a la que entran al SNC. El diazepam es más liposoluble que el clorodiazepóxido y el lorazepam, por lo tanto, los efectos sobre el SNC de los últimos se inician con mayor lentitud.

La mayoría de las benzodiazepinas se fijan en una proporción del 85 al 95 % a las proteínas plasmáticas, los volúmenes de distribución son elevados (de 1 a 3 litros por kilogramo) y en conjunto, establecen interacciones farmacocinéticas mínimas con otras drogas; aunque su metabolismo puede ser inhibido por algunas como la cimetidina, el disulfiram, la isoniazida y los anticonceptivos orales. En recién nacido prematuro y ancianos el diazepam puede tener vidas medias tres a cuatro veces más

prolongadas que en los adultos jóvenes, los niños y los recién nacidos a término (3).

C. Biotransformación: Se lleva a cabo en el hígado, por medio de dos rutas metabólicas: la oxidación microsomal, que incluye la N-desalquilación o hidroxilación alifática, y la conjugación subsecuente por la glucoronil transferasa para formar glucuronatos que se excretan en la orina. Un aspecto importante es la formación de metabolitos activos con efectos sobre el SNC; como se ilustra en la figura 3 (4).

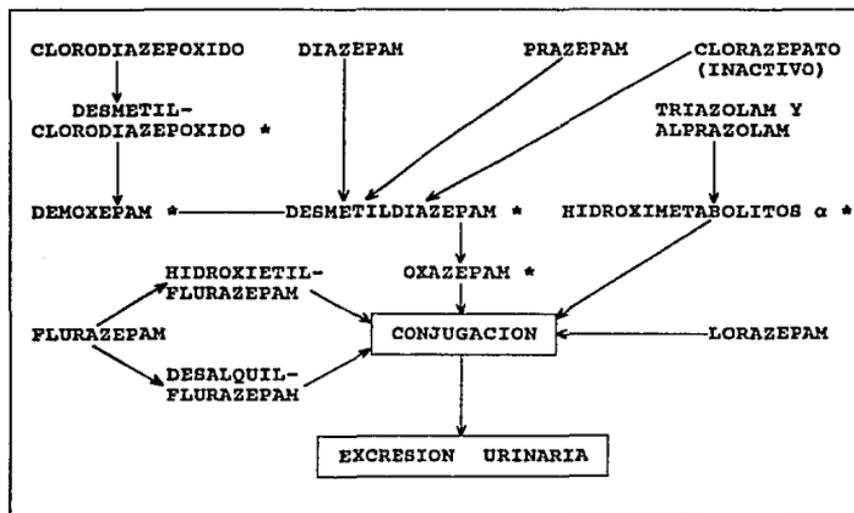


Fig. 3: Biotransformación de las Benzodiazepinas

(\* Metabolito activo).

**D. Excreción:** Los metabolitos hidrosolubles son excretados principalmente por el riñón. En la mayoría de los casos, las alteraciones de la función renal no tienen efecto notable sobre su eliminación, sólo pequeñas cantidades aparecen en la orina sin modificar y una pequeña parte de los metabolitos es eliminada en las heces fecales (4).

#### **EFFECTOS BIOLÓGICOS DE LAS BENZODIAZEPINAS SOBRE:**

**A. Sistema nervioso central:** Las principales acciones de este grupo de fármacos se llevan a cabo en el SNC, al inducir efectos tranquilizante, ansiolítico, anticonvulsivante, sedante e hipnótico. No tienen propiedades antidepresivas, estimulantes o antipsicóticas y facilitan la neurotransmisión GABAérgica (9). Deprimen al sistema límbico, que es el sustrato principal de la emoción y de la conducta, lo cual explica su efecto hipnogénico, al inducir relajación de la angustia, la tensión y la excitación (9).

**B. Sistemas cardiovascular y respiratorio:** Por ser leve su acción sobre estos sistemas, se emplean mucho en pacientes cardíacos.

El diazepam en dosis de 5 a 10 mg/kg de peso corporal, administrado por vía endovenosa, causa una ligera disminución de la frecuencia respiratoria, de la presión arterial, del trabajo sistólico del ventrículo izquierdo y del gasto cardíaco, en cambio aumenta la frecuencia cardíaca. Tampoco se observa depresión significativa de la función cardiovascular cuando se utilizan, por vía oral las dosis terapéuticas habituales (3).

**C. Músculo esquelético:** El diazepam ha sido muy usado como relajante muscular, en dosis terapéuticas, produce una evidente relajación del músculo esquelético al inhibir los reflejos post-sinápticos y a consecuencia de ejercer su acción sobre las sinápsis de la médula espinal. También actúa sobre el miometrio, por lo cual disminuye la duración del trabajo de parto al acelerar y facilitar la relajación del mismo y la de los músculos pélvicos, acciones importantes en la regulación de las contracciones. Aunado a estos efectos se encuentra el de inducir a la parturienta a una relajación mental y a la disminución de la tensión emocional.

#### **EFFECTOS ADVERSOS**

**A. Tolerancia y dependencia física:** Síntomas importantes de abstinencia e incluso convulsiones, aparecen cuando se han administrado dosis superiores a las terapéuticas y durante lapsos muy prolongados de tiempo y luego se suspenden bruscamente. Sin embargo es poco frecuente el síndrome de abstinencia cuando se han administrado las dosis habituales (3). En niños nacidos de madres tratadas con diazepam al final del embarazo, se ha observado un posible síndrome de abstinencia, caracterizado por presentar marcada hipertonía e hiperreflexia después del parto, que puede durar hasta 80 días (10, 11).

**B. Toxicidad y efectos secundarios en el adulto:** En general, la toxicidad es baja, pero se pueden presentar efectos secundarios adversos como somnolencia, confusión, apatía, debilidad muscular, incoordinación motriz, visión borrosa, diplopia y vértigo. Estos

efectos pueden ser más graves si durante el tratamiento se toman otros depresivos y alcohol (9).

#### OTROS USOS TERAPEUTICOS

El clorodizepóxido se ha empleado mucho en el tratamiento del síndrome de abstinencia alcohólica, en cambio el diazepam es más usado como premedicación en la anestesia, en procedimientos de endoscopia, durante el embarazo y el parto, también se ha utilizado con éxito cuando se aplica por vía endovenosa en el tratamiento del tétanos y en las crisis epilépticas.

#### PREPARADOS, VIAS DE ADMINISTRACION Y DOSIS

Los preparados, vías de administración y dosis más usuales de las benzodiazepinas de mayor utilidad en clínica, se encuentran en la figura 4.

NOMBRE GENERICO	NOMBRE COMERCIAL	VIAS DE ADMINISTRACION	DOSIS DIARIA USUAL (mg)
DIAZEPAM	VALIUM	ORAL, ENDOVENOSA	4-40, 2-20
CLORODIAZEPOXIDO	LIBRIUM	ORAL, ENDOVENOSA	15-40, 25-100
OXAZEPAM	SERAX	ORAL	30-60
TRIAZOLAM	HALCION	ORAL	0.25-0.5
LORAZEPAM	ATIVAN	ORAL, ENDOVENOSA	2-4, 2-6

Fig. 4: Preparados y dosis de las Benzodiazepinas más empleadas en clínica.

## 2. EVIDENCIAS DE LOS EFECTOS TERATOGENICOS DEL DIAZEPAM.

Por considerarse al diazepam como un fármaco inocuo, su uso se generalizó como premedicación en el trabajo de parto, en el tratamiento de amenazas de aborto, en casos de placenta previa, en actividad prematura del útero y en la toxemia gravídica, ya que aparentemente no producía efectos indeseables en la madre y en el producto, sin embargo, algunos autores como Charles E. Flowers et al, en 1969 (12), observaron en los hijos de mujeres tratadas con diazepam durante el parto, que al nacimiento tenían hipotonía, hipotermia, depresión neurológica y respiratoria y un Apgar de 5 a 6 al minuto del nacimiento.

Según J. Scher et al, en 1972 (13), en recién nacidos de madres que recibieron durante el parto 20 mg de diazepam, registraron una disminución significativa de la fluctuación de la frecuencia cardíaca, que se recuperaba en 65 minutos y que el Apgar era de 5 a 6 el minuto del nacimiento.

M. André et al, en 1973 (14), encontraron en prematuros, de madres con eclampsia o pre-eclampsia, tratadas durante la gestación con dosis de diazepam de 1.5 a 14.7 mg/kg, evidente depresión respiratoria y neurológica, hipotonía, ausencia de reflejos primitivos y los niños se recuperaron después de varias horas e incluso días.

En 1969, E. Van Der Kleijn (15), al administrar diazepam marcado con carbono 14 a hembras de ratón en gestación, encontró que se acumulaba rápidamente en el cerebro, el riñón, el hígado, el miocardio, el estómago, el intestino y la bilis de los fetos.

También observó que el metabolismo del diazepam se lleva a cabo con rapidez y que sus metabolitos se eliminaban lentamente.

Estudios realizados por J. E. Idänpään Heikkilä et al, en 1971 (16, 17), M. Mandelli et al, en 1975 (18), y R. D. Simmons et al, en 1983 (19), utilizando también diazepam marcado con carbono 14; encontraron que tanto el fármaco como sus metabolitos atraviesan con rapidez la placenta humana, la de hámster, la de mono y la de rata, que circulan en mayor proporción mayor en la sangre materna que en la fetal y se acumulan en los tejidos fetales, de los cuales se eliminan lentamente.

R. Erkkola et al, en 1974 (20) y F. Marucci et al, en 1969 (21) mediante la técnica de cromatografía de gases, obtuvieron resultados similares a los encontrados mediante el uso del carbono 14.

En nuestro laboratorio, M. C. Márquez-Orozco et al, observaron que la administración de diazepam en dosis de 2.7 mg/kg de peso corporal, por día, provocaron alteraciones histológicas en fetos de ratón, de madres tratadas intraperitonealmente del 6o. al 17o. día de la gestación; entre los principales cambios observados mediante preparaciones histológicas vistas al microscopio, fotónico están los de la retina (22), donde se observaron alteraciones del espesor de las capas neuroblásticas y de la ganglionar, que puedan deberse a un retardo del crecimiento y de la diferenciación del bulbo ocular, relacionados probablemente con una disminución de la actividad mitótica y de modificaciones de la membrana celular que impiden su migración normal. Al microscopio electrónico se detectó

un aumento del número de mitocondrias y polirribosomas de los fotorreceptores en desarrollo, el retículo endoplásmico rugoso estaba desorganizado. La cromatina de los núcleos estaba distribuida atípicamente (63).

En el corazón (23), se encontró un incremento del espesor de las paredes ventriculares, las trabéculas carnosas se veían pequeñas y ausentes en algunas zonas. Los mioblastos tenían miofibrillas desorganizadas, que al microscopio electrónico se vieron acortadas y con las bandas Z mal desarrolladas. En el citoplasma el retículo endoplásmico rugoso tenía cisternas dilatadas y existían vacuolas gigantescas, rodeadas por acúmulos de glucógeno (24).

En el hígado fetal (25), se observó una hipertrofia de los hepatocitos que tenían núcleos muy voluminosos, con cromatina formada por grumos muy gruesos, hubo un aumento en el número de megacariocitos. Al microscopio electrónico se identificaron vacuolas muy grandes, rodeadas de abundantes gránulos de glucógeno, cuerpos electrodensos, retículo endoplásmico rugoso distendido y polirribosomas muy abundantes. En el hígado de animales jóvenes, sometidos al mismo tratamiento hubo la persistencia del aumento del tamaño de los hepatocitos, que eran menos numerosos por campo, en cambio se observó un incremento de la población de los hepatocitos binucleados y de los macrófagos.

En el riñón fetal (26), disminuyó el número de nefronas en diferenciación y diferenciadas, las cuales tenían células de mayor tamaño en los túbulos contorneados, las asas de Henle y los conductos colectores. La luz de estos era más pequeña y las células

más altas.

El espesor de la barrera placentaria estaba muy reducido, los espacios intervillosos eran más amplios al igual que la luz de los vasos coriales, sus células gigantes eran más grandes. Al microscopio electrónico se observó un aumento de las microvellosidades entre las capas 1 y 2 de la barrera placentaria, un depósito inespecífico de glucógeno y aumento en el número de lisosomas (27, 39).

En el intestino delgado, la talla celular fue mayor, los núcleos de las células eran más voluminosos y existía una hipertrofia de los tejidos de la submucosa, las capas musculares y la serosa (28).

En el páncreas fetal (29), las células de los acinos y las de los islotes pancreáticos eran más grandes. En las células acinares se observaron gránulos de zimógeno almacenados en mayor proporción que los encontrados en los testigos y los núcleos eran enormes. La cantidad de células de los islotes pancreáticos por campo disminuyó. En el páncreas de ratones de 21 días, persistieron las alteraciones descritas.

En el epitelio del árbol bronquial del pulmón fetal (30, 31, 32), se observó un aumento de su espesor, los alveolos no se distendieron normalmente y había menor cantidad de secreciones. Los cambios detectados en el pulmón fetal persistieron en el adulto, en el cual además aumento la cantidad de fibras colágenas.

En el ovario fetal (33), todos los tejidos estaban hipertrofiados y en los animales en crecimiento y adultos aumentó la atresia folicular y la morfología de los cuerpos lúteos estaba

alterada.

Estudios histológicos del mesencéfalo fetal, de la corteza cerebral, cerebelosa y el cuerpo estriado de crías de ratón 180 días de edad, expuestos al diazepam en dosis diarias únicas de 2.7 mg/kg de peso corporal, del 6o. al 17o. días de la gestación, demostraron un retraso evidente en la diferenciación neuroblástica (34). En el mesencéfalo de los fetos de ratón se observó que las paredes eran más delgadas, de menor densidad celular y cavidad más amplia. La cantidad de núcleos era menor, aún cuando estos eran más voluminosos y tenían la cromatina constituida por granulaciones gruesas, las células tenían menor cantidad de citoplasma y había menos fibras. En la corteza cerebral y en el cuerpo estriado se observó el retardo de la diferenciación neuronal, un empaquetamiento de las neuronas que también tenían un núcleo voluminoso y la cromatina distribuida atípicamente, mayor afinidad tintórea y poco desarrollo del neurópilo. En la corteza cerebelosa las alteraciones fueron muy similares, siendo notable el retardo de la migración de los granos. Estas alteraciones persistieron en los animales adultos, en los cuales también se detectaron trastornos del aprendizaje, de la actividad locomotora y de la conducta de natación (65).

En ratas expuestas prenatalmente a dosis de diazepam de 2.5 mg/kg de peso corporal, del 13o. al 20o. día de la gestación, se detectaron a los 10 días de vida post-natal, concentraciones de oxazepam y metildiazepam, mayores a las maternas, lo que significa que estos metabolitos pueden ser los responsables de las

alteraciones cerebrales y de la conducta, (35, 36).

Al aplicar dosis de 1.0, 2.5 y 10 mg/kg de peso corporal, del 13o. al 20o. día de la gestación, se encontró que los fetos de las ratas presentaban alteraciones en el desarrollo fisiológico de las neuronas norepinefrínicas del hipotálamo, mediadas por modificaciones de los receptores benzodiazepínicos, causantes de un retraso en el crecimiento de las terminaciones nerviosas. En las ratas adultas expuestas al fármaco, durante el período prenatal, al ser sometidas a tensión emocional por inmovilización, se encontró que no hubo cambios en la secreción y liberación de la norepinefrina en las neuronas hipotalámicas y se atenuaron los cambios de los niveles plasmáticos de la corticosterona y de la prolactina, lo que indica que la activación temprana de los sitios neurales específicos de unión a benzodiazepinas, pueden inducir alteraciones neurales que persisten en los animales adultos, que provoquen cambios fisiológicos que pueden involucrar a todo el organismo (37, 38, 19).

También se ha estudiado el efecto del diazepam sobre cultivos de células humanas y en 1970 (40, 41, 42), se encontraron rupturas en los cromosomas de leucocitos, tanto "in vivo", como "in vitro". En fibroblastos se detectaron anomalías consistentes en el aumento de elementos membranosos, que ocupaban grandes espacios en el citoplasma, había mayor cantidad de mitocondrias y el sistema retículo endoplásmico rugoso era exuberante y estaba distendido.

Estudios "in vitro" de ovocitos de ratón cultivados en medio Krebs-Ringer, a concentraciones de diazepam de 1, 10, 30, 50, 100

y 200  $\mu\text{g/ml}$ , incubados por 17 horas, a 37 °C, en una atmósfera con 5 % de dióxido de carbono; demostraron que la mayoría de las células se detenían en la metafase I, también se advirtió la presencia de formas anómalas y se halló una relación dosis-respuesta de la inhibición de la meiosis. La degeneración de los ovocitos podría deberse a un efecto tóxico producido por altas concentraciones del fármaco (43).

En fibroblastos de embrión de pollo cultivados con dosis de diazepam de 50 a 250  $\mu\text{g/ml}$ , se observó que sus prolongaciones citoplasmáticas disminuyeron de acuerdo con una relación dosis-respuesta. Con 150  $\mu\text{g/ml}$ , se encontró que la mayoría de las células eran fusiformes y a concentraciones de 200  $\mu\text{g/ml}$  o más, se notó indicios de citotoxicidad a 12 h del tratamiento, caracterizados por la presencia de un incremento del número y tamaño de las vesículas citoplasmáticas. Por microscopía electrónica, se comprobó que los fibroblastos tratados no tenían extensiones citoplasmáticas laminares, sino que aparecían pequeñas extensiones en forma de clava. Los filamentos de actina eran menos numerosos, desorganizados en su distribución y en su periodicidad, lo que sugiere que el diazepam inhibe la síntesis y acumulación de la miosina pesada, tanto en 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 bandeó, coincidente con la alteración de la periodicidad de la actina y a la interferencia de la incorporación de otras proteínas a la actina. En relación a la reversibilidad de

los efectos por esta droga, cambiando las células a un medio sin diazepam, se vió que se extendían en cerca del 90% (59, 60).

Investigaciones realizadas por Hirata et al (61, 62), prueban que las benzodiazepinas y los ligandos al receptor  $\beta$ -adrenérgico, estimulan la metilación de los fosfolípidos en la membrana, teniendo consecuencias sobre su fluidez, el acoplamiento del receptor  $\beta$ -adrenérgico a la adenil ciclasa, la alteración del número de receptores  $\beta$ -adrenérgicos, la actividad de la bomba ATPásica dependiente de calcio, la quimiotaxis en leucocitos, la secreción de la histamina en las células cebadas y la mitogénesis en los linfocitos.

Se ha observado que la metilación de los fosfolípidos refuerza el acoplamiento de los receptores  $\beta$ -adrenérgicos a la adenil ciclasa, que se produce al descender la viscosidad de la membrana. Los cambios máximos de acoplamiento se evidencian en concentraciones de S-adenosil-L-metionina, que aumenta la fluidez de la membrana, mas no la síntesis de la fosfatidilcolina, también se sabe que la acumulación de la fosfatidilcolina disminuye la viscosidad de la membrana, que favorece el movimiento rápido del complejo receptor  $\beta$ -isoproterenol, lo que facilita el acoplamiento a la adenil ciclasa. Observaciones preliminares indican que las alteraciones en la metilación afectan la estructura y por tanto funciones de las membranas como el flujo iónico, la función celular y las interacciones con otras proteínas (59).

### 3. HOMEOSTASIS DEL CALCIO.

El calcio es el elemento mineral más abundante en el cuerpo humano, y ocupa el 50. lugar de sus componentes. El esqueleto contiene aproximadamente el 98 % de los 1000 a 1200 g de calcio presentes en el adulto, siendo la forma predominante la hidroxiapatita, constituida por una red cristalina de calcio, fósforo e hidróxido cuya fórmula condensada es  $3Ca_3[PO_4]_2CaOH_2$ . Del 2 % restante, la mitad se halla presente en el líquido extracelular y el remanente, en los demás tejidos corporales, en especial en el músculo esquelético. Además de su evidente importancia en la mineralización del esqueleto, desempeña un papel vital en procesos fisiológicos básicos, tales como la coagulación de la sangre, la conducción neuromuscular, el mantenimiento del tono y excitabilidad del músculo esquelético, cardíaco y liso, el acoplamiento de la estimulación de la secreción en las diversas glándulas exocrinas y la preservación de la integridad y permeabilidad de la membrana celular, particularmente en términos del intercambio de sodio y de potasio que intervienen en la llamada bomba de sodio-potasio (45).

El calcio del líquido extracelular está compuesto por tres fracciones, 50 % es calcio ionizado libre, un 5 % forma complejos con una gran variedad de aniones, como citratos y fosfatos; y 45 % está ligado a las proteínas del plasma, especialmente a la albúmina y a las globulinas, pero en grado limitado.

Los cristales óseos además de la hidroxiapatita contienen cantidades considerables de otros iones: 60 % del magnesio corporal, 40 % del sodio y 5 % del potasio (46, 49).

La cantidad de calcio que ingresa en el organismo, depende de su abundancia en la dieta y que normalmente alcanza 25 mmol/día, es decir 1g/día. Sus principales fuentes son la leche, sus derivados y el huevo. El que no se ha absorbido a nivel intestinal, se pierde en la orina y en las heces fecales; cuando existen grandes cantidades de fosfatos, ácidos grasos o fitatos (aportados por los cereales), en la luz intestinal puede transformarse en compuestos insolubles que contribuyen a la malabsorción.

La cantidad de calcio que circula por las nefronas, depende del estado fisiológico del riñón, del nivel de hormona paratiroidea y, en menor grado de la excreción urinaria de fosfatos; la cual aumenta después de una sobrecarga de calcio, debida a una ingesta excesiva de este o por la descalcificación ósea normal, no asociada a deficiencias de calcio (47).

#### REGULACION HORMONAL DE LA HOMEOSTASIS DEL CALCIO

En el metabolismo del calcio intervienen tres hormonas, dos polipeptídicas que son la hormona paratiroidea (PTH) y la calcitonina (CT), y una esteroidea que es la vitamina D (48).

**A.Hormona paratiroidea:** Sintetizada en las 4 glándulas paratiroideas, es un polipéptido lineal, con un peso molecular de 9500, consta de 84 aminoácidos proveniente de un precursor llamado hormona pre-paratiroidea de 113 aminoácidos, que durante la síntesis pierde primero un fragmento de 23 aminoácidos y posteriormente otro de 6.

Los primeros 32 a 34 aminoácidos de la molécula son los responsables de su actividad biológica.

La hormona funcional es almacenada en forma de gránulos en el interior de las células principales de las glándulas paratiroides y una vez vertida a la circulación sanguínea, se escinde en un péptido con un peso molecular aproximado de 7000, sin actividad biológica y otro más pequeño de aproximadamente 2500 que si la tiene.

La función primaria de la PTH consiste en regular la concentración del calcio iónico en el líquido extracelular. Normalmente, su secreción provoca un incremento de la concentración de calcio iónico plasmático y una disminución del fósforo, a través de un mecanismo de retroalimentación efectivo. La hipercalcemia conduce a la supresión de la secreción de la hormona.

Los efectos más importantes de la PTH sobre el riñón se traducen en cambios de la resorción de calcio, que aumenta principalmente en los túbulos distales, y del fósforo que disminuye, tanto en los proximales, como en los distales. La acción de la PTH en el riñón está regulada por la estimulación de la adenilciclase, que conduce a un aumento en la producción de AMP cíclico (48).

Otras funciones son la movilización del calcio y el fósforo óseos para mantener los niveles normales de ambos iones en el líquido extracelular y la regulación la resorción ósea al actuar sobre los osteocitos y los osteoclastos, y a consecuencia de una estimulación prolongada de la PTH, se produce una mayor conversión de las células osteoprogenitoras a osteoclastos.

Algunos de sus efectos adicionales son el incrementar la formación de la colagenasa, que degrada la matriz del ósea y aumentar la degradación de la sustancia base del hueso. Por lo tanto el resultado final de la acción de esta hormona sobre el hueso es, una verdadera resorción y no simplemente un proceso de desmineralización.

Además, en el intestino promueve la absorción del calcio, al estimular la síntesis renal del 1,25-dihidroxicolecalciferol, derivado de la vitamina D (48).

**B. Calcitonina:** Es una hormona peptídica producida por las células C o parafoliculares, de los lóbulos laterales de la tiroides, que forman parte del sistema APUD derivado embriológicamente con las crestas neurales. Su peso molecular es de 3000 y esta constituida por 32 aminoácidos unidos por un enlace disulfuro, localizado entre los aminoácidos 1 y 7. Su secreción es estimulada por el incremento de la concentración del calcio iónico, después de la liberación transitoria inicial de calcio en el hueso, la CT provoca una inhibición de la liberación de este y en consecuencia disminuye transitoriamente las concentraciones plasmáticas de calcio y de fósforo. Además reduce la actividad de los osteocitos y de los osteoclastos, y la generación de estos a partir de las células osteoprogenitoras (48).

Otros efectos fisiológicos de la CT son el incremento de la excreción renal de fósforo, sodio y cloruro a nivel de los túbulos proximales y la inhibición de la transformación del 25-hidroxicolecalciferol en 1,25-dihidroxicolecalciferol inducido por la PTH.

C. **Vitamina D:** Está constituida por un grupo de esteroides llamados provitaminas, que pueden transformarse en compuestos fisiológicamente activos por irradiación con luz ultravioleta. Los dos componentes más importantes son la vitamina D2 o ergocalciferol y la vitamina D3 o colecalciferol; la primera proviene del ergosterol presente en la levadura de cerveza y en una diversidad de sustancias de origen vegetal, y el colecalciferol se encuentra en tejidos y productos animales, como el hígado y las vísceras de pescados, en el hígado de mamíferos que comen pescado, en el huevo y en la mantequilla.

Aproximadamente un 94 % de las vitaminas D2 y D3 del plasma están unidas a una globulina específica, con peso molecular de 60,000. Además de las fuentes dietéticas, la vitamina D3 proviene de la síntesis que se efectúa en la piel a partir del 7-deshidrocolesterol mediante la irradiación por rayos ultravioleta. Este es transportado al hígado, en donde experimenta una hidroxilación y da origen al 25-hidroxicolecalciferol (25-OH-D3), que es el principal metabolito circulante, el cual tiene muy poca actividad biológica y en el riñón es hidroxilado por segunda ocasión para formar al 1,25-dihidroxicolecalciferol (1,25-[OH]2-D3), que es el más activo para el metabolismo del calcio. Esta biosíntesis es inducida por la disminución del nivel de fosfato plasmático, producida por la acción de la PTH. En algunos trastornos metabólicos como la hipocalcemia, se acelera dicho proceso.

Como la vitamina D endógena tiene receptores específicos, en el hueso y el intestino, es considerada una hormona, más que una vitamina. El 1,25-(OH)<sub>2</sub>-D<sub>3</sub> promueve la absorción intestinal del calcio; la incorporación del fosfato en la primera porción del intestino delgado, el transporte de fosfato dependiente del calcio; al estimular la síntesis de una proteína acarreadora para el paso transcelular de este mineral y facilita el efecto de la PTH sobre el hueso; estimulando la movilización del calcio y del fosfato. En los riñones promueve la retención del calcio y la resorción del fósforo (48).

En la figura 5 se muestra la ruta metabólica de la formación del 1,25-(OH)<sub>2</sub>-D<sub>3</sub>.

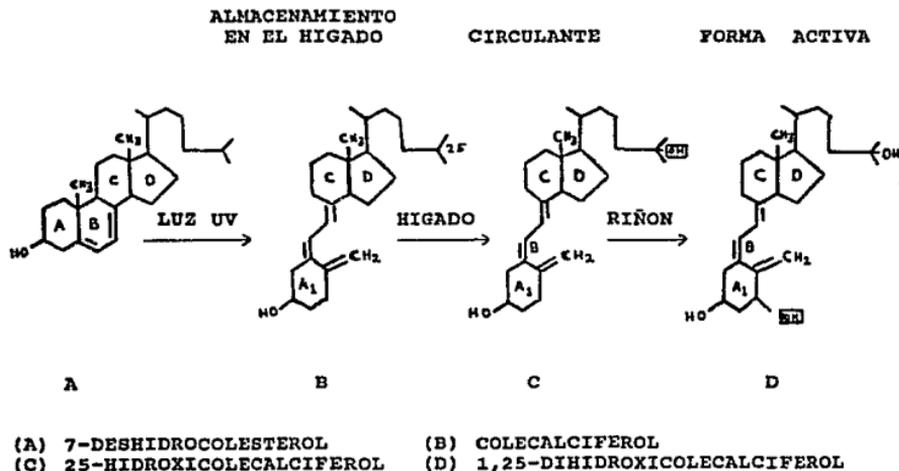


Fig. 5: Formación del 1,25-dihidroxicolecalciferol endógeno a partir del 7-deshidrocolesterol.

#### 4. TEJIDO OSEO.

El hueso, como los restantes tejidos conectivos, esta formado por células, fibras y sustancia fundamental, pero a diferencia de los otros, sus componentes extracelulares calcificados lo convierten en un material duro, firme e idealmente adecuado para su función de soporte y protección, que proporciona apoyo interno al cuerpo y ofrece puntos de inserción a los músculos y tendones, esenciales para el movimiento.

A la vez que protege a los órganos vitales de las cavidades craneal y torácica, incluye en la médula ósea a los elementos formadores de la sangre y desempeña una función importante en el depósito y movilización del calcio óseo para su regulación homeostática y concentración en la sangre y en los líquidos corporales (50).

El hueso tiene una notable combinación de propiedades físicas: alta resistencia a la tracción y la compresión, cierta elasticidad y la ventaja de ser un material de peso relativamente ligero. A pesar de su resistencia y dureza, es un material vivo, dinámico, que experimenta una remodelación permanente durante la vida de un individuo; razón por la que responde de modo sorprendente a las influencias metabólicas, nutritivas y endocrinas.

La falta de movimiento de un individuo es seguida por atrofia y pérdida de sustancia ósea, en cambio el ejercicio excesivo se acompaña de un incremento de la masa ósea (50).

Hay dos tipos de hueso: el esponjoso y el compacto, el primero está constituido por un retículo tridimensional de espículas óseas

ramificadas o trabéculas, que delimitan un sistema laberíntico de espacios intercomunicados ocupados por la médula ósea; el hueso compacto aparece como una masa sólida continua, en la cual sólo se ven espacios con la ayuda del microscopio. Los dos tipos se continúan, es decir que no existen límites nítidos que los separen.

Los huesos largos están constituidos por la diáfisis (tallo), que es un cilindro de pared gruesa de hueso compacto, con una cavidad central voluminosa, ocupada por la médula ósea y por dos extremos llamados epífisis, formados por hueso esponjoso recubierto por una corteza compacta delgada.

En general, los huesos están recubiertos por el periostio, que es una capa de tejido conectivo especializado, con actividad osteogénica, o sea que puede dar origen al tejido óseo.

El revestimiento perióstico está ausente en las áreas de los extremos de los huesos largos cubiertos por cartilago articular; en donde los ligamentos y los tendones se insertan al hueso, en la superficie de la rótula y de los huesos sesamoideos formados en el interior de los tendones y en las áreas subcapsulares del cuello del fémur y del astrágalo.

En estas zonas carentes de periostio, el tejido conectivo que está en contacto con la superficie del hueso, no tiene capacidad osteogénica y por tanto, no contribuye a la regeneración ósea cuando se producen fracturas. La cavidad medular de la diáfisis y los espacios delimitados por las trabéculas del hueso esponjoso están revestidas por el endostio, que es una capa celular delgada que también tiene capacidad osteogénica (50, 51).

El hueso compacto está constituido fundamentalmente por una sustancia intersticial mineralizada o matriz ósea, que se deposita en capas o laminillas de 3 a 7  $\mu\text{m}$  de espesor, interrumpidas por pequeñas cavidades lenticulares llamadas lagunas óseas, espaciadas de modo regular en dicha sustancia. Cada una de las lagunas está ocupada por un osteocito o célula ósea de forma estrellada, cuyas prolongaciones citoplásmicas se proyectan radialmente y se anastomosan con las de sus vecinas. Estas ramificaciones son rodeadas por la matriz ósea que forma las paredes de los llamados canaliculos, que son conductillos extraordinariamente delgados muy ramificados, y aunque las lagunas están separadas por distancias relativamente grandes, contribuyen a la integración de un sistema continuo de osteocitos alojados en las lagunas, interconectados por una red abundante de canales diminutos, esenciales para la nutrición de todos los elementos del tejido óseo, ya que el depósito de sales de calcio en la sustancia intersticial del hueso evidentemente anula su permeabilidad.

En el hueso compacto, de acuerdo a su orientación, se distinguen dos tipos de canales vasculares, unos longitudinales y otros transversales, los longitudinales llamados Haversianos tienen un diámetro de 30 a 70  $\mu\text{m}$ . En estos además de uno a dos vasos sanguíneos, hay nervios y una vaina de tejido conectivo laxo, y en los denominados canales de Volkmann; que son transversales u oblicuos a los Haversianos, en donde hay tejido conectivo laxo y un vaso sanguíneo que comunica a los Haversianos entre sí y los pone en contacto con la superficie periosteal y con la cavidad medular.

El hueso esponjoso está compuesto también por laminillas, pero sus trabéculas son relativamente delgadas y ordinariamente no están rodeando a un vaso sanguíneo, por lo cual no están organizadas en sistemas Haversianos, sino simplemente son un mosaico de piezas angulares de hueso laminar. También en este caso las células óseas se nutren por difusión, a partir de los vasos de la superficie endóstica, mediante los diminutos canales que interconectan las lagunas que llegan hasta la superficie periostal.

Dependiendo de su estado funcional, el periostio presenta cambios considerables en su aspecto microscópico. Durante el desarrollo embrionario y el crecimiento postnatal, existe una capa interna de células formadoras de hueso, integrada por los osteoblastos, que están en contacto directo con el hueso; en cambio en el adulto, los osteoblastos asumen una forma de reposo y se les denomina células osteoprogenitoras, que no se distinguen de las células fusiformes del tejido conectivo; sin embargo, cuando un hueso se lesiona, se reactiva su capacidad osteogénica, adquieren la apariencia de osteoblastos típicos y participan en la neoformación de hueso (50).

#### **MATRIZ OSEA**

La sustancia intersticial del hueso o matriz ósea está constituida por dos componentes, uno orgánico y otro inorgánico; cada uno de los cuales constituye el 50 % del peso seco de la matriz. La parte orgánica está formada por fibras colágenas embebidas en la sustancia fundamental y la inorgánica por depósitos

de un tipo de fosfato cálcico, muy parecido, pero no idéntico a la hidroxiapatita ( $\text{Ca}_{10}[\text{PO}_4]_6[\text{OH}]_2$ ), que al inicio de la mineralización ósea es depositado como fosfato cálcico amorfo y más tarde se reordena para formar hidroxiapatita cristalina, que se distribuye regularmente a lo largo de las fibras colágenas, a intervalos de 60 a 70 nm. Además del fosfato de calcio, el mineral contiene aniones como los citratos y los carbonatos y cationes como el magnesio, el sodio y el potasio. De estas sales, se sabe que los citratos están localizados sobre la superficie de los cristales de hidroxiapatita, sin adherirse a ellos y solo actúan como acarreadores de los iones de calcio (50, 51).

La dureza del hueso se debe fundamentalmente a sus componentes inorgánicos, mientras que su resistencia y su elasticidad dependen de su matriz orgánica y en particular de la colágena. Sin el balance armónico de los dos componentes el hueso sería un material esquelético muy malo, pero cuando están equilibrados forman un tejido notablemente resistente, y bien organizado para realizar, tanto sus funciones bioquímicas como las mecánicas (50, 51).

#### **CELULAS OSEAS**

Durante la etapa de crecimiento del esqueleto, en el tejido óseo se distinguen cuatro tipos de células: las ostoprogenitoras, los osteoblastos, los osteocitos y los osteoclastos; aunque con fines descriptivos los tres primeros se han identificado como tipos celulares distintos, hay pruebas convincentes de que unos pueden transformarse en los otros y es más razonable considerarlos como

estadios funcionales de una misma estirpe, en cambio es un hecho que los osteoclastos tienen un origen relativamente diferente, ya que provienen de células osteoprogenitoras que dan origen a los monocitos en la médula ósea, y después de circular en la sangre se fusionan constituyendo una masa celular multinucleada.

**A. Células osteoprogenitoras:** Son fusiformes, tienen núcleos alargados u ovoides, con poca afinidad tinteada y un citoplasma acidófilo o levemente basófilo. Se localizan en el endostio, en la superficie interna del periostio, en la periferia de los canales Haversianos y sobre las trabéculas de la matriz cartilaginosa en proceso de osificación. Estas células tienen una gran actividad reproductora durante el periodo de crecimiento de los huesos y son estimuladas constantemente en el adulto durante la reorganización interna del hueso, en la cicatrización de las fracturas o en la reparación de otro tipo de lesiones como las de origen infeccioso. En todos los casos, las células osteoprogenitoras se multiplican y se transforman en dos tipos distintos, unas llamadas preosteoblastos, precursores de los osteoblastos formadores de hueso y otras denominadas preosteoclastos, que darán origen a los osteoclastos, remodeladores del mismo (51).

**B. Osteoblastos:** Son responsables de la síntesis y secreción de la matriz ósea no mineralizada o material osteoide, participan en la calcificación del hueso y regulan el flujo del calcio y fosfato dentro y fuera del hueso. Son células con escasa actividad mitótica, se encuentran alrededor de las trabéculas cartilaginosas o del tejido conectivo de los centros de osificación de los huesos

en crecimiento, en los huesos en remodelación y en los que están en reparación.

Durante el depósito activo de nueva matriz, se disponen en una capa epitelióide de células cuboideas o cilíndricas bajas, con núcleos ovoides y con un nucleolo prominente. Frecuentemente el núcleo está colocado en el extremo cercano a la superficie en donde se deposita el material osteoide, que rodea a la zona de matriz mineralizada, en esta zona hay abundantes microvellosidades y en el polo contrario, sobre el núcleo se localiza un aparato de Golgi bien desarrollado, con vesículas secretoras de colágena. En el mismo extremo celular, hay numerosas mitocondrias alargadas y una gran cantidad de retículo endoplásmico rugoso. En su citoplasma intensamente basófilo existe abundante fosfatasa alcalina, que es un marcador celular osteoinductivo, que produce una fuerte reacción histoquímica positiva para esta enzima. La reacción del ácido periódico de Schiff (PAS), permite detectar vacuolas citoplasmáticas pequeñas, que contienen gránulos rosados precursores de la matriz ósea.

En los osteoblastos se sintetizan y secretan importantes biomoléculas como: colágena del tipo I, proteínas de la matriz de naturaleza diferente a la colágena, osteocalcina, osteonectina, proteínas de matriz M1 de 24,000 y 62,000, un proteoglicano específico del hueso, factores de crecimiento específicos, prostaglandinas E1, E2 e I2, colagenasa y un activador de la secreción de plasminógeno tisular (51).

Los osteoblastos son células blancas y poseen receptores para la PTH y la  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ , la primera inhibe la actividad de la fosfatasa alcalina y la segunda estimula la síntesis de osteocalcina. También actúan sobre estas los glucocorticoides, los factores sistémicos de crecimiento, la insulina y las prostaglandinas.

C. Osteocitos: Son las células principales del hueso completamente formado, residen en las lagunas situadas en el interior de la matriz calcificada, su cuerpo celular adopta una forma lenticular en el interior de las cavidades que ocupan y emiten numerosas prolongaciones delgadas que se extienden por los canalículos de la matriz, para ponerse en contacto con las expansiones de los osteocitos vecinos, en esas zonas las membranas de dichas prolongaciones se especializan para formar anastomosis o uniones de hendidura, de tal manera que las células óseas no se encuentran aisladas en sus lagunas, sino que están en comunicación unas con otras, lo que permite el flujo de iones, de moléculas pequeñas de nutrientes y productos metabólicos de desecho, que también pueden formar un infiltrado que ocupa el espacio localizado entre los osteocitos y las paredes de las lagunas. Las características nucleares y citoplasmáticas son semejantes a las de los osteoblastos, sin embargo la estructura de las cisternas y lagunas del complejo de Golgi es menos marcada y el retículo endoplásmico rugoso y el citoplasma muestra menos afinidad para los colorantes básicos.

Los osteocitos juegan un papel importante en la liberación del calcio del hueso a la sangre y por ello participan en la regulación

homeostática de la concentración de este mineral en los líquidos del cuerpo. La administración de PTH tiene efectos microscópicamente visibles sobre estos y las reacciones tintoriales de la matriz ósea adyacente. La elevación de los niveles del calcio sanguíneo como respuesta a la PTH, es demasiado rápida para ser atribuida a la erosión osteoclástica del hueso, por esto se considera que la acción primaria de esta hormona es la de estimular la osteólisis osteocitaria, que es un proceso fisiológico activo, mediante el cual la matriz ósea que rodea inmediatamente a los osteocitos, es modificada y los minerales, son reabsorbidos (49).

D. Osteoclastos: Son células gigantes de 20 a 100  $\mu\text{m}$  de diámetro y pueden tener de 2 a 50 núcleos, se encuentran en las áreas de reabsorción ósea, frecuentemente en cavidades poco profundas de la superficie del hueso llamadas lagunas de Howship, las cuales se forman por la acción erosiva de los osteoclastos. En la renovación y remodelación que tiene lugar durante el crecimiento de los huesos, siempre son abundantes en las zonas en reabsorción.

Los núcleos de los osteoclastos son ovoides o alargados, su citoplasma de aspecto espumoso es acidófilo, contiene pequeñas cantidades de retículo endoplásmico rugoso, múltiples complejos de Golgi distribuidos entre los núcleos, y un par de centriolos por cada núcleo, que se reúnen en una región centrosómica. Las mitocondrias en forma de bastoncillo o de filamentos cortos son muy abundantes y se encuentran dispersas en el citoplasma. A diferencia de las otras células óseas tienen numerosas vacuolas y gránulos que dan una reacción histoquímica positiva a la fosfatasa ácida, la

cual es un marcador enzimático para la identificación de los lisosomas.

La superficie del osteoclasto que está en contacto directo con la del hueso tiene un aspecto rugoso, que al microscopio electrónico se identifica como una membrana muy plegada, con un aspecto de cerdas que pueden ayudar al transporte de los materiales que atraviesan la membrana. Observaciones realizadas en cultivos de osteoclastos, demuestran que este borde tiene una gran movilidad en la cercanía de la superficie de reabsorción ósea. El borde rugoso está rodeado por una zona citoplásmica llamada zona clara o filamentosa, libre de organelos pero rica en filamentos de actina. Esta zona parece ser un sitio de adhesión de la célula a la superficie ósea y puede actuar como una capa permeable para mantener un microambiente adecuado para la resorción del hueso. Si el osteoclasto pierde su borde rugoso, es incapaz de efectuar su función.

La acción de estas células, por medio de su borde rugoso parece ser la erosión mecánica o una fagocitosis intensa por la segregación de enzimas hidrolíticas, entre ellas las colagenasas, que son las responsables de la digestión de los componentes de la matriz ósea. Las hidrolasas ácidas de los lisosomas osteoclasticos, juegan un papel activo en la reabsorción de la matriz orgánica del hueso y la producción local aumentada de ácido solubiliza el mineral óseo, al tiempo que crea un pH adecuado para la acción de dichas hidrolasas. Además de estas enzimas, los osteoclastos tienen fosfatasa ácida resistente al tartrato, grupos específicos de

deshidrogenasas, actividad de anhidrasa carbónica, receptores para la calcitonina y responden a la acción de la PTH y del  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ . Como no tienen receptores para la PTH, se piensa que su respuesta a esta hormona es mediada por osteoblastos que ejercen su influencia sobre la localización, inducción, estimulación e inhibición de la resorción osteoclástica.

La administración de PTH despolariza de la membrana del osteoclasto y aumenta la velocidad de síntesis de RNA, mientras que la CT polariza, la membrana celular inhibe el efecto de la PTH sobre la síntesis de RNA y provoca la separación de los osteoclastos de la superficie del hueso, al inhibir el movimiento del borde rugoso. El  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  estimula la reabsorción ósea, al favorecer la transformación de los precursores de los osteoclastos, en osteoclastos. La vida máxima de estas células es de 7 semanas y la media de 6 a 10 días. El hueso deja de reabsorberse cuando los osteoclastos migran de la superficie del endostio a los espacios medulares, en donde degeneran y se desintegran (51).

#### HISTOGENESIS DEL HUESO

El hueso se desarrolla siempre por sustitución de un tejido conectivo preexistente. En el embrión se observan dos tipos de osteogénesis: la directa o intramembranosa que tiene lugar a partir de láminas de tejido conectivo primitivo, y la cartilaginosa o endocondral que se realiza sobre moldes de cartilago (49, 50).

A. Osificación intramembranosa: Algunos huesos del cráneo como el frontal, los parietales, parte de los occipitales y de los

temporales, la maxila y la mandíbula, se desarrollan por osificación intramembranosa, por lo que se denominan huesos de membrana.

El proceso se inicia con la condensación del ectomesénquima para formar una capa de tejido conectivo primitivo ricamente vascularizada, en la cual las células se unen entre sí por largas y delgadas prolongaciones citoplásmicas, que en los espacios intercelulares van depositando delicados haces de colágena orientados al azar, los cuales quedan incluidos en una matriz extracelular semejante a un gel poco denso. El primer signo de la formación de hueso, consiste en la aparición de unas bandas de matriz eosinófila más densa, que tienden a depositarse en puntos equidistantes de los vasos sanguíneos vecinos, formando una red. Las trabéculas más tempranas de la matriz ósea, también se desarrollan como si fueran agujas que se van ramificando; cuando aparecen las primeras bandas del material eosinófilo, se producen cambios en las células del tejido conectivo vecino, las cuales se disponen sobre la superficie de las trabéculas, adquieren una forma cuboidea o cilíndrica y permanecen íntimamente unidas. Estas células van siendo cada vez más basófilas y corresponden a los osteoblastos; con actividad sintética y secretora que les permite depositar la matriz osteoide, que al aumentar provoca que las trabéculas se hagan cada vez más largas y gruesas (50, 51).

Los osteoblastos segregan los proteoglicanos de la matriz osteoide, moléculas de colágena que se polimerizan extracelularmente y forman un gran número de fibrillas entrelazadas

al azar a lo largo de las trabéculas de la matriz osteoide. Este hueso inicial se denomina "hueso reticular", para distinguirlo del "hueso laminar" formado por remodelación posterior, el cual presenta la colágena dispuesta en fibras paralelas, bien ordenadas.

El hueso reticular es recorrido por canales relativamente tortuosos, ocupados por vasos sanguíneos y por tejido conectivo, con osteocitos orientados al azar en el interior de las trabéculas en desarrollo, las cuales forman láminas paralelas uniformemente distribuidas; esto es contrario a lo que ocurre en el hueso laminar, en donde los osteocitos se disponen en forma concéntrica, regular, en torno a los vasos sanguíneos, relativamente rectilíneos, que ocupan los canales Haversianos.

En la fase inicial, la sustancia intercelular del tejido conectivo primitivo, va siendo sustituida por la matriz osteoide y posteriormente, sobre esta se deposita el fosfato cálcico para calcificarla a corto plazo. A medida que las trabéculas se engrosan por aposición de nuevo tejido osteoide, los osteoblastos quedan empotrados en la matriz recientemente depositada, así uno por uno van quedando atrapados y se convierten en osteocitos, los cuales conservan sus contactos con los osteoblastos de la superficie y con otros osteocitos por medio de sus delgadas prolongaciones citoplásmicas. Los canaliculos óseos se forman cuando se deposita la matriz alrededor de dichas prolongaciones.

Con la misma rapidez a la que se diferencian las capas de osteoblastos de la superficie de las trabéculas, en osteocitos, se restaura su número a partir de las células osteoprogenitoras,

localizadas en el tejido conectivo vecino (50, 51).

**B. Osificación endocondral:** Los huesos de la base del cráneo, los de la columna vertebral, de la pelvis y de las extremidades se llaman huesos cartilagosos, porque se forman inicialmente sobre un molde de cartilago hialino, que es remplazado por hueso.

La primera señal de que se ha establecido un centro de osificación endocondral, es la hipertrofia de los condrocitos y de las lagunas de la diáfisis o parte media del tallo del molde cartilagosos. Durante la osificación, los condrocitos hipertrofiados, acumulan glucógeno en su interior, su citoplasma se hace muy vacuolado y se ensanchan en el interior de sus lagunas, a expensas de su matriz, la cual se va reduciendo hasta transformarse en finas trabéculas perforadas, sobre las que se van depositando poco a poco granulos y nidios de cristales de fosfato cálcico. A medida que se producen estos cambios, la capacidad osteogénica de las células del pericondrio se activa, se deposita una delgada capa de hueso llamada banda perióstica, los vasos sanguíneos de la capa envolvente de tejido conectivo crecen hacia la diáfisis e invaden las cavidades irregulares de la matriz cartilaginosa. Con el tejido que rodea a los vasos sanguíneos invasores, son arrastradas hacia el interior del cartilago células pluripotenciales, algunas de estas se diferencian en elementos hematopoyéticos de la médula ósea y otras en osteoblastos que se disponen en una capa epitelioides sobre las superficies irregulares de la matriz cartilaginosa y comienzan a depositar sobre ellas matriz osteoide, por tanto, las trabéculas más precoces tienen un eje de cartilago calcificado y

una capa externa de hueso de espesor variable (50, 51).

#### **MECANISMO DE CALCIFICACION**

El inicio de la mineralización del hueso es análogo a la nucleación heterogénea, que es el proceso de cristalización en el seno de una solución saturada, inducido por la siembra de un cristal-semilla o el raspado de la pared del recipiente, lo que actúa como materia extraña perturbando el equilibrio de la solución y causando una acumulación de moléculas, que da por resultado la formación de pequeños cristales, capaces de crecer para formar depósitos de mayor tamaño. En el hueso, las fibras colágenas de la matriz, actúan como catalizadores de la nucleación, al inducir al calcio y al fosfato disueltos en los líquidos tisulares a acumularse a lo largo de estas. En el curso de su montaje, se disponen como polímeros lineales, que se superponen a corta distancia y cuando se agrupan lateralmente para formar las fibrillas, lo hacen de tal manera que se producen discontinuidades o agujeros entre los extremos de las moléculas sucesivas, en los cuales se van formando los depósitos minerales del hueso (51).

#### **FISIOLOGIA DEL TEJIDO OSEO**

Por ser el principal componente del sistema esquelético, los huesos funcionan como soporte de las partes blandas, están unidos por diversos tipos de articulaciones, permiten la inserción de los músculos implicados en la locomoción y forman una cubierta rígida, protectora al sistema nervioso y al tejido hematopoyético. Además

de estas funciones mecánicas, desempeñan un papel importante en el depósito de calcio y de fósforo, que pueden ser movilizados para mantener sus niveles normales en la sangre y atender las necesidades minerales de otros tejidos (51).

**A. Forma y función:** La relación entre la forma y la función la observaron por primera vez en el fémur Meyer y Culmann en 1867 y formularon la "teoría trayectorial de la formación ósea", en la que señalan que la alineación de las trabéculas óseas sigue principios definidos de ingeniería. En la dirección de las columnas reconocibles de elementos óseos orientados, se dibujan líneas, las cuales muestran una estructura similar a la de una grúa. Muchas de estas trayectorias se cruzan en ángulo recto, lo que configura una disposición excelente para resistir los múltiples esfuerzos a que se halla sometido el fémur. Esta teoría fue desarrollada para demostrar que el fémur está estructurado de acuerdo con los mejores principios de la ingeniería. Incluso el hecho de que el cuerpo del fémur sea un tubo hueco, en lugar de una barra maciza, denota su mayor capacidad para resistir los esfuerzos de tensión y cortadura a que se encuentra sometido (64).

**B. Leyes de la ortogonalidad y de la transformación ósea:** Julius Wolff en 1870, expuso que la alineación trabecular del hueso se debía sobre todo a las fuerzas funcionales y la modificación en la intensidad y dirección de esas fuerzas conducía a un cambio demostrable en su arquitectura interna y forma externa. Esta observación era susceptible de expresarse por leyes mecánicas y matemáticas definidas, por lo que se le denominó como "ley de la

ortogonalidad". Roux introdujo factores funcionales y desarrolló la llamada "ley de la transformación del hueso", que en esencia establece que los esfuerzos de tensión o presión ejercidas sobre el hueso estimulan la formación del mismo (64).

Se ha demostrado, que tanto la tensión como la presión, pueden acarrear pérdidas de tejido óseo, que no todas las trabéculas se cruzan en ángulo recto, sino que lo hacen en ángulos distintos, y aún cuando forman líneas predominantemente rectas, muchas de las trayectorias son irregulares y ondulantes, pero la estructura del hueso es muy adecuada para resistir los esfuerzos a que se hallan sometidos y además varía de un hueso a otro, de acuerdo a las fuerzas que soportan. Las alteraciones funcionales que modifican dichas fuerzas, provocan cambios mensurables en la arquitectura ósea, los cuales se encuentran dentro de los límites del patrón morfogenético. La falta de función conduce a una disminución de la densidad del tejido óseo (osteoporosis), en cambio las demandas funcionales acrecentadas pueden provocar una mayor densidad ósea, en una región particular (osteosclerosis) (64).

#### EFFECTOS DE LA NUTRICION SOBRE EL HUESO

El crecimiento del hueso depende mucho de los factores nutricionales, en este tejido es en donde la deficiencia de minerales o de vitaminas esenciales se detecta antes que en cualquier otro. Una deficiencia dietética, tanto en calcio, como de fósforo lleva a una susceptibilidad a las fracturas. Si la ingestión de estos elementos es adecuada, pero hay una deficiencia

de vitamina D puede alterarse su absorción intestinal y producir raquitismo, enfermedad en que está perturbada la osificación de los cartílagos epifisarios, por lo que los huesos se deforman fácilmente, al no poder soportar el peso y la fuerza normal de las vísceras y músculos (47, 51).

En la carencia de calcio y de vitamina D de larga duración, los huesos del adulto contienen un exceso de tejido osteoide no calcificado, lo que produce la enfermedad conocida como osteomalacia.

La ingesta insuficiente de vitamina C produce cambios profundos en los tejidos de origen mesenquimatoso y causa la enfermedad conocida como escorbuto, en la que el defecto primario, consiste en una incapacidad de producir y de mantener la sustancia intercelular del tejido conectivo y en el hueso, da como resultado una deficiencia en la producción de colágena y de matriz ósea, causando por consiguiente un retraso del crecimiento y la consolidación de los huesos fracturados (47, 51).

La hipovitaminosis A produce una disminución de la velocidad del crecimiento del esqueleto, ya que controla la actividad, distribución y coordinación de los osteoblastos y los osteoclastos durante el desarrollo, por lo tanto, cuando se da esta alteración también falla la reabsorción y remodelación del cráneo que no puede ensanchar su cavidad y la del canal espinal, a velocidad suficiente para contener al cerebro y la médula espinal cuando crecen, y provocan graves lesiones del SNC.

En la hipervitaminosis A, la erosión de las columnas cartilaginosas se acelera, sin que se compense adecuadamente la velocidad de multiplicación de las células de la zona proliferativa, en consecuencia, las placas epifisarias se calcifican antes de tiempo y el crecimiento puede cesar prematuramente (51).

#### EFFECTO DEL DIAZEPAM EN LA OSIFICACION

En 1984 Márquez-Orozco et al. (44), en los fetos de ratón obtenidos de las hembras tratadas con dosis diarias únicas de diazepam de 2.7 mg/kg de peso corporal, del 60. al 150. día de la gestación, observaron alteraciones en la osificación de la tibia, que consistieron en la distribución atípica de los condrocitos de los moldes cartilaginosos, que al inicio del proceso de osificación se hipertrofiaban, lo que tenía como consecuencia una desorganización de las trabéculas óseas, que eran toscas, rodeadas por tejido osteoide en donde, por el método de la alizarina se teñían con mayor intensidad, lo que indicaba que tenían mayor concentración de calcio. Como este tipo de prueba es cualitativo, se consideró necesario determinar la concentración de calcio, por medio de un método colorimétrico como el del Arsenazo III, para demostrar que la cantidad de este mineral óseo era mayor en los fetos tratados "in útero" con diazepam.

La obtención de la tibia libre de los tejidos muscular y tendinoso fue imposible, debido a que a los 16 días de gestación, es un hueso pequeño, frágil y difícil de manipular; por lo cual se

prefirió utilizar la bóveda craneana o calota de los fetos, constituida por los frontales, los parietales y parte del occipital; área que es fácil de obtener intacta y libre de otros tejidos extraños al hueso, que pudieran interferir en la cuantificación del calcio óseo.

### III. OBJETIVOS.

#### 1. OBJETIVO GENERAL.

Investigar si el diazepam administrado en dosis de 2.7 mg/kg de peso corporal, a hembras en periodo de gestación, altera los niveles de calcio del cráneo de los fetos de 16 días.

#### 2. OBJETIVOS ESPECIFICOS.

A. Cuantificar por medio de un método colorimétrico, las concentraciones de calcio del cráneo de dos grupos de fetos de ratón, uno experimental, tratado con diazepam y uno testigo, inyectado con solución salina al 0.9%.

B. Determinar si existen diferencias estadísticamente significativas, entre los niveles de calcio del cráneo de los fetos de ambos grupos.

C. Discutir los resultados obtenidos, aceptando o rechazando la hipótesis planteada.

### III. HIPOTESIS.

La administración de diazepam en dosis de 2.7 mg/kg de peso corporal por vía intraperitoneal, a hembras gestantes, provoca en los fetos de 16 días, un incremento en la concentración de calcio del cráneo, en comparación con la detectada en los fetos de un grupo testigo, a los cuales se les inyectó solución salina al 0.9% en volumen equivalente al administrado con el diazepam.

#### **IV. MATERIALES Y METODOS.**

##### **1. MATERIALES.**

###### **A. MATERIAL BIOLÓGICO.**

Ratones de la cepa CD-1, de dos meses de edad, de ambos sexos.

###### **B. MATERIAL DE LABORATORIO.**

Tubos de ensayo de plástico.

Matraces volumétricos de 500, 250, 100, 50 y 20 ml.

Vasos de precipitados de 500, 250, 100 y 50 ml.

Vidrios de reloj.

Pipeta automática de 200  $\mu$ l.

Puntas para pipeta automática.

Pipetas volumétricas de 10, 5 y 1 ml.

Pipetas graduadas de 10 y 5 ml.

Espátula.

Estuche de disección.

Microjeringas de 50  $\mu$ l.

Agujas No. 26 X 15 mm.

Celdas de cuarzo para espectrofotómetro.

Frascos de 30 ml.

Agitadores de vidrio.

Pesafiltros.

Algodón.

Mechero de alcohol.

Cajas de policarbonato para ratón.

Rejillas metálicas.

Bebedores de vidrio.

Mesas de acero inoxidable, para quirófano.

Ropa de quirófano estéril.

Guantes quirúrgicos estériles.

Alimento Purina Chow para roedores.

Cama para ratones.

#### C. EQUIPO.

Espectrofotómetro Zeiss, UV-visible.

Balanza analítica.

Horno secador.

Parrilla de agitación y calentamiento.

Autoclave.

#### D. REACTIVOS.

Solución salina fisiológica al 0.9%.

Diazepam (Valium) solución inyectable de 10 mg.

Acido perclórico concentrado, Q.P.

Acido clorhídrico concentrado, Q.P.

Carbonato de calcio, R.A.

Hidróxido de sodio, Q.P.

Arsenazo III (ácido 2,2'-[dihidroxi-3,6-disulfo-2,7-naftaleno-bis(azo)]bencenoarzóico), Sigma.

MES (ácido 2-[N-morfolino]etano sulfónico), ácido libre y sal sódica para solución amortiguadora, Sigma.

Acido nítrico concentrado, Q.P.

Alcohol etílico absoluto, Q.P.

## 2. METODOS.

### A. OBTENCION DE LOS ESPECIMENES PARA EL ESTUDIO.

Se aparearon hembras vírgenes de la cepa CD-1, de dos meses de edad, de las 5:00 a las 5:30 a.m., en proporción de 3 hembras por macho, se observó la presencia del tapón vaginal, lo que se tomó como el inicio de la gestación. Los animales que lo presentaron, se distribuyeron al azar en un grupo experimental y uno testigo, dejando que continuara el desarrollo de manera normal, hasta el 60. día en que se inició el tratamiento. Del 60. al 150. día de la gestación, al grupo experimental se le aplicaron por vía intraperitoneal dosis únicas diarias de 16  $\mu$ l de diazepam (Valium, elaborado por Productos Roche S.A. de C.V., según fórmula de Hoffman-La Roche & Cie, Basilea/Suiza) equivalentes a 2.7 mg/kg de peso corporal. El grupo testigo recibió solución salina al 0.9%, en el mismo volumen que el aplicado con el diazepam. Al 160. día, las hembras de ambos grupos fueron sacrificadas por dislocación cervical y decapitación, se les practicó laparotomía media, supra e infraumbilical del abdomen, se hizo una incisión longitudinal del útero, se abrieron los sacos coriónicos y amnióticos para obtener los fetos, a los cuales se les decapitó, se retiró la piel del techo de la cabeza y por medio de un corte circular se les extrajeron las calotas o bóvedas craneanas, las cuales se limpiaron

en seco, con papel filtro para eliminar la sangre y el tejido conectivo adyacente al óseo, se desecaron primero a temperatura ambiente y posteriormente en un horno a 105°C, se pesaron en una balanza analítica, se registró su peso y se procedió a la cuantificación del calcio presente en ellas.

#### **B. PREPARACION DE SOLUCIONES.**

Para la preparación de las soluciones, así como para todas las operaciones a seguir en el procedimiento de la determinación de calcio, se utilizó cristalería que fue lavada con un detergente no iónico, enjuagada con agua corriente, agua destilada, solución de ácido nítrico 0.01 M y agua desionizada, para evitar que se contaminara, ya que las cantidades de calcio a determinar fueron del orden de 5 a 25  $\mu$ M. Posteriormente fue secada en horno.

Todos los reactivos utilizados durante el experimento fueron analíticos (R.A.) o químicamente puros (Q.P.) y en la preparación de todas las soluciones se usó agua desionizada.

**Solución de ácido nítrico 0.01 M:** 0.35 ml de ácido nítrico concentrado, se aforaron con agua a 500 ml en un matraz volumétrico.

**Solución de ácido perclórico al 35% v/v:** 50 ml de ácido perclórico concentrado (al 70 % de pureza), se aforaron con agua a 100 ml en un matraz volumétrico.

**Solución de hidróxido de sodio 3.5 M:** 1.4 g de hidróxido de sodio, se disolvieron en 50 ml de agua y se aforaron con agua a 100 ml, en un matraz volumétrico.

**Solución de arsenazo III 1 mM (52, 53):** 38.8 mg de arsenazo III, se disolvieron en 20 ml de agua y se aforaron con agua a 50 ml en un matraz volumétrico,

**Solución amortiguadora MES de pH 6.5 (53, 54):** La solución 1 se preparó disolviendo 0.488 g de MES ácido libre en 50 ml de agua y la solución 2 se hizo disolviendo 0.543 g de MES sal sódica en 50 ml de agua. Ambas soluciones se mezclaron y aforaron con agua a 250 ml, en un matraz volumétrico.

**Solución patrón de carbonato de calcio 50 mM:** En un pesafiltros se secaron 2 g de carbonato de calcio, a 150°C durante 2 h y se dejó enfriar en un desecador. Se pesaron 0.265 g, se disolvieron en 0.44 ml de ácido clorhídrico concentrado y se aforaron con agua a 50 ml, en un matraz volumétrico.

**Solución de trabajo de carbonato de calcio 25  $\mu$ M:** 10  $\mu$ l de la solución patrón se aforaron con agua a 20 ml, en un matraz volumétrico.

**Preparación de la curva patrón:** En tubos de ensaye marcados como blanco (B), 5, 10, 15, 20 y 25  $\mu$ M, se transfirieron 0, 1, 2, 3, 4, y 5 ml de la solución de trabajo respectivamente, se les agregaron 5, 4, 3, 2, 1 y 0 ml de solución amortiguadora MES respectivamente y 100  $\mu$ l de solución 1 mM de arsenazo III, obteniéndose así soluciones con las concentraciones de calcio indicadas en la tabla 1, las cuales fueron transferidas a celdas de cuarzo y se leyó la absorbancia en un espectrofotómetro Zeiss UV-visible a 650 nm de longitud de onda.

TUBO	B	1	2	3	4	5
Solución de trabajo (ml)	0	1	2	3	4	5
Amortiguador MES pH 6.5 (ml)	5	4	3	2	1	0
Arsenazo III 1 mM ( $\mu$ l)	100	100	100	100	100	100

Tabla No. 1. Preparación de la curva patrón de concentraciones de calcio de 0 a 25  $\mu$ M.

### C. DETERMINACION DE LA CONCENTRACION DE CALCIO EN LAS CALOTAS.

Una vez desecadas y pesadas, las calotas se transfirieron individualmente a tubos de ensaye de plástico, se les agregaron 0.5 ml de solución de ácido perclórico al 35% y se calentaron a baño maría a 60°C, hasta que se completó la disolución del hueso, se dejaron enfriar y cuando estuvieron a temperatura ambiente se neutralizaron con 0.8 ml de hidróxido de sodio 3.5 M, añadiendo 3.6 ml de solución amortiguadora MES se ajustó el pH a 6.5. Una vez ajustado el pH, se les agregaron 100  $\mu$ l de arsenazo III 1 mM, se agitaron las mezclas, se pasaron a celdas de cuarzo para espectrofotómetro, se midieron a una longitud de onda de 650 nm y se registraron las absorbancias. En la tabla 2 se muestra el resumen del procedimiento empleado.

Las cantidades de calcio de las calotas de los fetos de los grupos experimental y testigo, se calcularon mediante la extrapolación en la curva patrón obtenida previamente. Las concentraciones así determinadas, se dividieron entre el peso seco de cada una de las calotas para obtener los  $\mu$ mol/mg de hueso y se

registraron. Los promedios y las desviaciones estándar de los niveles de calcio de las calotas de ambos grupos, se compararon por medio de la prueba de "t" de Student, para determinar si había diferencias estadísticamente significativas.

TUBO	E	T
Acido perclórico 35% (ml)	0.5	0.5

Calentar en baño maría a 60°C, hasta completa disolución del hueso, enfriar a temperatura ambiente.

Hidróxido de sodio 3.5 M (ml)	0.8	0.8
Amortiguador MES (ml)	3.6	3.6
Arsenazo III (µl)	100	100

Mezclar, transferir a cubetas de cuarzo y leer las absorbancias en un espectrofotómetro a 650 nm.

Tabla No. 2. Determinación de la concentración de calcio en las calotas de los fetos de los grupos experimental (E) y testigo (T).

## V. RESULTADOS.

Los fetos obtenidos de las hembras tratadas con dosis diarias únicas de diazepam de 2.7 mg/kg de peso corporal, tenían una coloración cianótica, evidente depresión respiratoria, se movían muy poco y sobrevivían por períodos no mayores de 20 minutos; en cambio los fetos de las hembras que fueron inyectadas con solución salina al 0.9% tenían un color sonrosado, presentaban movimientos respiratorios enérgicos, se movían activamente y sobrevivían hasta que era necesario sacrificarlos para obtener los cráneos.

La morfología externa de los fetos del grupo experimental, hasta donde se apreció, no estaba alterada. De igual manera las calotas obtenidas de los fetos de ratón del grupo experimental no diferían de los testigos en forma, tamaño y peso, inclusive, al determinar la concentración de calcio, no se notaba claramente una diferencia, sin embargo, al calcular la cantidad de calcio por mg de hueso, y comparar los promedios de los dos grupos mediante la aplicación de la prueba de "t" de Student, se demostró que la desigualdad, era estadísticamente significativa ( $p < 0.01$ ), como se muestra en la tabla 3.

	E	T
Concentración de calcio ( $\mu\text{M}/\text{mg}$ )	25.77 $\pm$ 1.55	20.53 $\pm$ 2.09
No. de determinaciones	40	30

E = experimental

T = testigo

$p < 0.01$

Tabla No. 3. Cantidad de calcio en  $\mu\text{M}/\text{mg}$  de hueso, en los grupos experimental y testigo.

## VI. DISCUSION.

La coloración cianótica de la piel de los fetos del grupo tratado con diazepam, con una dosis de 2.7 mg/kg de peso corporal, seguramente es efecto de la depresión respiratoria tan severa, se debe a la acción directa del fármaco sobre el pulmón (30, 31, 32), así como su efecto sobre el SNC y el músculo esquelético, lo cual también explica la disminución de la motilidad fetal y la corta supervivencia, que son efectos similares a los observados por Flowers et al, 1969 (12), André et al., 1973 (14), McCarthy et al. (54), Cree et al., 1973 (55) y Márquez-Orozco et al., 1985 (32).

Es conocida la existencia de receptores benzodiazepínicos periféricos a nivel del tejido óseo; en los osteoblastos y en los osteocitos (5, 6, 7), los cuales predominan en la lámina nuclear (56, 57, 58). Al interaccionar estos fármacos con el núcleo, se puede aumentar su toxicidad, lo que podría explicar las rupturas cromosómicas que pueden ser provocadas por el diazepam, como las que han sido observadas por Stenchever et al., 1969, 1970 (41, 42, 43), en fibroblastos cultivados con esta droga y en leucocitos humanos de adultos sometidos al tratamiento con diazepam.

Si el material nuclear de los osteoblastos se altera, posiblemente la síntesis de la colágena indispensable, para la matriz orgánica del hueso también se altere y produzca, ya sea una menor cantidad de la proteína o un péptido diferente de mala calidad, que no funcione para la formación de hueso, y por lo tanto, la matriz ósea no se calcifique y esto tenga como consecuencia que el calcio que llegue al centro de osificación, no

se incorpore al tejido y se acumule, pero sin un orden ni una estructura definida, como los acúmulos de calcio observados por Márquez-Orozco et al. (44), en la osificación de la tibia. El efecto sobre los osteocitos, podría ser que acelere el proceso de la osteólisis osteocitaria que aumente la degradación de la matriz orgánica y por tanto, la liberación excesiva del mineral, que parcialmente sería removida por la acción de la PTH, pero el exceso permanecería adherido al tejido osteoide.

El rompimiento de los cromosomas puede originar la desorganización de los organelos, entre ellos al retículo endoplásmico y al aparato de Golgi, ya que las células óseas contienen gran cantidad de dichos organelos, que si se alteran, se acumula gran cantidad de calcio en su interior y se dilatan, hallazgo encontrado por Márquez-Orozco et al op cit., en la osificación de la tibia.

Hirata et al., en 1979 (60, 61, 62), observaron que el diazepam afecta la metilación de los fosfolípidos de la membrana celular y por lo tanto las características de permeabilidad selectiva de dicha membrana, efecto que podría facilitar la entrada del calcio y otros minerales a las células. El hecho de que el diazepam actúe en forma directa sobre el canal de calcio en diversos tejidos, como son la glándula pituitaria, el corazón y el intestino delgado (66), apoya esta hipótesis.

Por otro lado, el diazepam afecta la síntesis de la miosina y de la actina, esenciales para el citoesqueleto (59), provocando que las prolongaciones de los fibroblastos de embrión de pollo

disminuyan, acción que también podría llevarse a cabo en el hueso, esto puede tener como consecuencia, que las células óseas no consigan generar prolongaciones normales y por lo tanto se produzca un abigarramiento de células alrededor de las trabéculas como las agrupaciones celulares observadas por Márquez-Orozco et al op cit., en los cortes histológicos examinados durante el estudio de la tibia fetal.

Otra posible causa de la elevación de los niveles óseos de calcio, sería que el diazepam aumente la actividad osteoclástica y que el incremento en la erosión del hueso recién formado, provoque la acumulación del mineral en el tejido.

Estos efectos del fármaco sobre las células óseas pueden provocar que al no mineralizarse o al desmineralizarse el hueso, fetal se desorganicen sus trabéculas, se hipertrofien y se rodeen por tejido osteoide; como lo observaron Márquez-Orozco et al op cit. (44), en la tibia.

La alteración de la estructura del hueso recién formado, tendrá como consecuencia, que se afecte su fisiología, ya que como se sabe, existe una relación entre la forma y la función que es conocida desde 1870 (63), por lo que los efectos del diazepam sobre el tejido óseo puedan ser irreversibles.

También el fármaco produce alteraciones sobre los condroblastos y los condrocitos, lo que afecta el proceso de osificación endocondral aún cuando el cráneo sometido al estudio, se desarrolla a partir de membrana, por osificación directa, las alteraciones observadas en la tibia podrían presentarse en cualquier hueso, ya

que todos tienen su origen en el mesodermo, que finalmente se diferencian en osteoblastos y osteocitos. En la tibia, el cartilago es sustituido por hueso, y las modificaciones observadas en los condroblastos y los condrocitos, probablemente producen que la matriz cartilaginosa sea sintetizada de manera anómala, lo que se traducirá en una mayor resistencia a la degradación, que por lo tanto, dificultaría la calcificación; al impedir que el calcio no se incorpore de manera normal durante el desarrollo del hueso.

Otro probable mecanismo, sería que al hipertrofiarse las células cartilaginosas, degraden excesivamente la matriz, provocando que no se tenga un molde adecuado de cartilago para la formación del tejido óseo y por lo tanto, el calcio que es destinado para la osificación, no encuentra un sitio donde acumularse ordenadamente y se quede en los alrededores formando depósitos del mineral al azar.

Lo mismo puede suceder si las células del mesénquima, que originan las membranas de tejido conectivo, sobre las que se deposita el calcio en el hueso de origen membranoso, como el de la bóveda craneana o calota de los ratones estudiados, no pudieran expandir sus prolongaciones citoplásmicas en forma adecuada, lo que produciría una matriz ósea anormal.

## VII. CONCLUSIONES Y SUGERENCIAS.

De lo anterior se puede concluir que el diazepam produce depresión respiratoria, coloración cianótica de la piel y disminución de la actividad locomotora de los fetos tratados con diazepam en dosis de 2.7 mg/kg de peso corporal, administrado a la madre por vía intraperitoneal, del 60. al 150. día de la gestación, lo que provoca una corta supervivencia de los mismos.

A la misma dosis, causa alteraciones, tanto en las células cartilaginosas como en las óseas, lo que da como resultado un proceso anómalo de osificación.

En los fetos expuestos "in útero" a diazepam, se comprobó un incremento en la cantidad de calcio en las calotas, en comparación con el cuantificado en los fetos testigos.

Es probable que este tipo de trastornos persistan después del nacimiento, puesto que, tanto la estructura como la función del hueso se establecen desde etapas fetales y mientras no se compruebe que estos efectos farmacológicos del diazepam, administrado durante el embarazo no se presentan en el hombre, se sugiere evitar su uso durante la gestación humana.

### VIII. BIBLIOGRAFIA.

1. Sternbach, L. H., Koechlin, B. A. & Reeder, E.: Quinazolines and 1,4-benzodiazepines. (VIII). The photoisomerization of 7-chloro-2-methylamino-5-phenyl-3H-1,4-benzodiazepine-4-oxide. *J. Org. Chem.* 27: 4671-4672, 1962.
2. Randall, L. O., Heise, G. A., Schallek, W., Bagdon, R. E., Banziger, R., Boris, A., More, R. A. & Abrams, W. B.: Pharmacological and clinical studies on Valium, a new psychotherapeutic agent of the benzodiazepine class. *Curr. Ther. Res.* 3: 405-425, 1961.
3. Goodman, G. A., Goodman, L. S., Ralph, T. W. & Murad, F.: *Las bases farmacológicas de la terapéutica*. 7a. Edición. Editorial Médica Panamericana. México. Pag: 335-363, 1989.
4. Katzung, B. G.: *Farmacología básica y clínica*. 3a. Edición. Editorial El Manual Moderno. México. Pag: 249-261, 1987.
5. Schwartz, R.: The GABA receptor-gated ion channel: Biochemical and pharmacological studies of structure and function. *Biochemical Pharmacology*. 37: 3369-3375, 1988.
6. Tallman, J. F. & Gallagher, D. W.: The GABA-ergic system: A locus of benzodiazepine action. *Ann. Rev. Neurosci.* 8: 21-44, 1985.
7. Schlumpf, M., Ramseier, H., Abriel, H., Youmbi, M., Baumann, J. B. & Lichtensteiger, W.: Diazepam effects on the fetus. *Neurotoxicology*. 10: 501-516, 1989.
8. Dundee, J. W. & Haslett, W. H. K.: The benzodiazepines. *Brit. J. Anaesth.* 42: 217-230, 1970.

9. Valium Roche Lab. Valium diazepam. The journal of family practice. 6 (I): 1-57, 1978.
10. Mazzi, E.: Possible neonatal diazepam withdrawal: a case report. Am. J. Obstet. Gyn. 129 (5): 586-587, 1977.
11. Athinarayanan, P., Pierog, S. H., Nigam, S. K. & Glass, L.: Chlordiazepoxide withdrawal in the neonate. Am. J. Obstet. Gyn. 124: 212-215, 1976.
12. Flowers, C. E., Rudolph, C. E. & Desmond, M. M.: Diazepam (Valium) as an adjunct in obstetric analgesia. Obstet. Gynecol. 34 (1): 68-81, 1969.
13. Scher, J., Hailey, D. M. & Board, R. W.: The effects of diazepam on the fetus. J. Obstet. Gynecol. Brit. Comm. 79: 635-638, 1972.
14. André, M., Sibout, M., Petri, J. M. et Vert, P.: Dépression respiratoire et neurologique chez le prématuré nouveau-né de mere traité par Diazépan. J. Gyn. Biol. Repr. 2 (4): 357-366, 1973.
15. Van der Kleijn, E.: Kinetics of distribution and metabolism of diazepam and chlordiazepoxide in mice. Arch. Int. Pharmacodyn. 178 (1): 193-215, 1969.
16. Idänpään-Heikkilä, J. E., Jouppila, J. O., Poulakka, J. O. & Vorne, M. S.: Placental transfer and fetal metabolism of diazepam in early human pregnancy. Am. J. Obstet. Gynecol. 109: 1011-1016, 1971.
17. Idänpään-Heikkilä, J.E., Taeka, R.J., Allen, H.A. & Schoolar, J.C.: Placental transfer of diazepam C 14 in mice, hamster and monkeys. J. Pharmac. Exp. Therap. 176 (3): 752-757, 1971.

18. Mandelli, M., Morselli, P. L., Nordio, S., Sereni, F., Pardi, G., Principi, N. & Tognoni, G.: Placental transfer of diazepam and its disposition in the newborn. *Clin. Pharmacol. Ther.* 17 (5): 564-572, 1975.
19. Simmons, R. D., Miller, R. K. & Kellogg, C. K.: Prenatal diazepam: Distribution and metabolism in perinatal rats. *Teratology*. 28: 181-183, 1983.
20. Erkkola, R., Kanto, J. & Sellman, R.: Diazepam in early human pregnancy. *Acta Obstet Gynec Scand.* 53: 135-138, 1974.
21. Marucci, F., Fanelli, R., Mussini, E. & Garattini, S.: Further studies on species difference in diazepam metabolism. *European J. of Pharmacol.* 9: 253-256, 1970.
22. Correa-García, L., Márquez-Orozco, M. C. & Márquez-Orozco, A.: Effects of administration of diazepam (Valium) on fetal mice retina. *Res. IX Congr. Inter. Anatomía*, 9: 165, 1980.
23. De la Fuente-Juárez, G., Márquez-Orozco, M. C. & Márquez-Orozco, A.: Alterations of fetal mice heart produced by treatment of diazepam (Valium) during gestation. *Res. IX Congr. Inter. Anatomía*, 9: 169, 1980.
24. Márquez-Orozco, M. C., Gazca-Ramírez, 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.

25. Márquez-Orozco, M. C., Márquez-Orozco, A. y Sámano-Bishop, A.: Alteraciones del hígado fetal de ratón, causadas por administración de diazepam (Valium), durante la gestación. Res. Reu. Nacl. Morfol. 5: 31. 1983.
26. Márquez-Orozco, M. C., Márquez-Orozco, A. y Sámano-Bishop, A.: Efecto del diazepam (Valium) en riñones fetales in vivo. Bol. Soc. Mex. Cienc. Fisiol. 7 (I): 16-20. 1984.
27. Márquez-Orozco, M. C., Márquez-Orozco, A. & Flores-Olvera, H.: Histological alterations produced by diazepam (Valium) in mice placenta. Res. Congr. Int. Anat. 12: 218. 1980.
28. Márquez-Orozco, M. C., Dorantes-Sierra, L., Márquez-Orozco, A. & Sámano-Bishop, A.: Alteraciones histológicas del intestino delgado de fetos de ratón, causadas por la administración materna de diazepam (Valium). Res. Congr. Nacl. Anat. 10: 29. 1984.
29. Márquez-Orozco, M. C. y Márquez-Orozco, A.: Modificaciones de la parte exócrina del páncreas fetal de ratón causadas por diazepam. Res. Congr. Nacl. Cienc. Fisiol. 28: 39C. 1985.
30. Márquez-Orozco, M. C., Márquez-Orozco, A. y Sámano-Bishop, A.: Estudios de las alteraciones pulmonares de fetos de ratón de 18 días de gestación producidas por la administración de diazepam (Valium). Arch. Mex. Anat. 20 (I): 21-30. 1983.
31. Márquez-Orozco, M. C. y Márquez-Orozco, A.: Alteraciones ultraestructurales del pulmón fetal del ratón provocadas con diazepam in vivo. Res. Congr. Nacl. Cienc. Fisiol. 28: 31-2C. 1985.

32. Márquez-Orozco, A. y Márquez-Orozco, M. C.: Hallazgos histológicos en el pulmón de ratones adultos expuestos a diazepam durante la gestación. Res. Congr. Nacl. Cienc. Fisiol. 28: 31-3C. 1985.
33. Hernández-Alvarez, L. A. I., Márquez-Orozco, M. C. & Márquez-Orozco, A.: Effects of prenatal administration of diazepam on the ovary of mice. Proc. West. Pharmacol. Soc. 34: 379-382. 1991.
34. Márquez-Orozco, M. C. y Márquez-Orozco, A.: Efectos del diazepam sobre el mesencéfalo de fetos de ratón. Res. Congr. Nacl. Cienc. Fisiol. 28: 20-2C. 1985.
35. Kellogg, C., Tervo, D., Ison, J. & Miller, R.: Prenatal exposure to diazepam alters behavioral development in rats. Science. 207: 205-207. 1980.
36. Kellogg, C., Crisholm, J., Simmons, R. D., Ison, J. & Miller, R.: Natural and behavioral consequences of prenatal exposure to diazepam. Monogr. Neural. Sci. 9: 119-123. 1983.
37. 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. Res. 293: 39-46. 1984.
38. Simmons, R. D., Miller, R. K. & Kellogg, C. K.: Prenatal diazepam exposure in rats. Long-lasting, receptor mediated effects on hypothalamic containing neurons. Brain. Res. 293: 73-83. 1984.
39. 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., Méx. 39: 21-27. 1991.

40. Breen, P. C. & Stenchever, M. A.: Some effects of diazepam on the fine structure of human fibroblasts in tissue culture. *Amer. J. Obstet. Gynecol.* 108 (4): 520-527. 1970.
41. Stenchever, M. A., Frankel, R. S. & Jarvis, J. A.: Effects of diazepam on chromosomes of human leukocytes in vivo. *Amer. J. Obstet. Gynecol.* 17: 456-460. 1970.
42. Stenchever, M. A., Frankel, R. S., Jarvis, J. A. & Veress, K.: Some effects of diazepam in human cells in vitro. *Amer. J. Obstet. Gynecol.* 103: 836-842. 1969.
43. Stenchever, M. A. & Smith, W.: The effect of diazepam on meiosis in the CD-1 mouse. *Teratology.* 23: 279-282. 1981.
44. Márquez-Orozco, M. C., Márquez-Orozco, A., Alvarez-Fernandez, G. y Sámano-Bishop, A.: Acción del diazepam sobre la osteogénesis de la tibia fetal de ratón. *Bol. Soc. Mex. Cienc. Fisiol.* 7(I): 10-15. 1984.
45. Zilva, J. F., Pannal, P. R.: *Bioquímica clínica en el diagnóstico y en el tratamiento.* 2a. Ed. Edit. Salvat. España. 1988. p.p.: 327-376.
46. Davidsohn, I. y Henry, J.: *Diagnóstico y tratamiento clínicos por el laboratorio.* 2a. Ed. Edit. Salvat. España. 1988. p.p. 270-335.
47. Badui, L.: *Química de los alimentos.* 2a. Ed. Edit. Universidad. México, 1990. p.p. 327-376.
48. Bikle, D. D.: *Assay of Calcium-Regulating Hormones.* Edit. Springer-Verlag. U. S. A., 1983. p.p.: 1-19.

49. Kokko, J. P. y Tannen, R. L.: Líquidos y electrolitos. 1a. Ed. Edit. Médica Panamericana, Argentina, 1988. p.p.: 548-581.
50. Weiss, L.: Cell and tissue Biology: A textbook of Histology. 6a. Ed. Edit. U & S. Germany, 1988. p.p.: 211-253.
51. Fawcett, D. W.: Tratado de Histología. 11a. Ed. Edit. Interamericana-McGraw-Hill, México, 1989. p.p.: 188-238.
52. Kessler, G., Wolfman, M.: An automated procedure for the determination of Ca. Clin. Chem. 10: 686-703. 1964.
53. Gavarrón, F. F., Brand, J. G. & Rabinowitz, J. L.: A simple spectrophotometric assay for  $\mu\text{M}$  amounts of Ca. J. Bone. Min. Res. 2: 412-425. 1987.
54. McCarthy, G. T., O'Connell, B. & Robinson, A. E.: Blood levels of diazepam in infants of two mothers given large doses of diazepam during labour. J. Obstet. Gynecol. Brit. Comm. 80: 349-352, 1973.
55. Cree, J. E., Meyer, J. & Hailey, D. M.: Diazepam in labour: Its metabolism and effect on the clinical condition and thermogenesis of the newborn. Brit. Med. J. 4: 251-255, 1973.
56. Marangos, P. J., Patel, J., Bourlanger, J. P. & Clark-Rozenberg, R.: Characterization of peripheral-type benzodiazepine binding sites in brain using I3H/Ro5-4864. Mol. Pharmacol. 22: 26-32, 1982.
57. Regan, J. W., Yamamura, H. I., Yamada, S. & Roeske, W. R.: High affinity renal I3H/flunitrazepam binding: characterization, localization and alteration in hipertension. Life. Sci. 28 (9):991-998, 1981.

58. Bosmann, H. B., Penney, D. P., Case, K. R. & Averill, K.: Diazepam receptor: Specific nuclear binding of I3H/flunitrazepam. Proc. Nat. Acad. Sci. US-Biol. Sci. 77 (2): 1195-1200, 1980.
59. Nagele, R. G., Pietrolungo, J. F., Kosciuk, M. C., Lee, H. & Roisen, F. J.: Diazepam inhibits the spreading of chick embryo fibroblasts. Exp. Cell. Res. 143: 153-162, 1983.
60. Strittmatter, W. J., Hirata, F., Axelrod, J., Mallorga, P., Tallman, J. F. & Henneberry, R. C.: Benzodiazepaine and  $\beta$ -adrenergic receptor ligands independently stimulate phospholipid methylation. Nature. 282: 857-859, 1979.
61. Hirata, F., Strittmatter, W. J. & Axelrod, J.:  $\beta$ -Adrenergic receptor agonists increase phospholipid methylation, membrane fluidity, and  $\beta$ -adrenergic receptor-adenylate cyclase coupling. Proc. Natl. Acad. Sci. 76 (1): 368-372, 1979.
62. Hirata, F., Axelrod, J.: Enzimatic methylation of phosphatidyl-ethanolamine increases erythrocyte membrane fluidity. Nature. 275: 219-220. 1978.
63. 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.
64. Falkner, F.: Desarrollo humano. 1a. Edición. Edit. Salvat. Barcelona, España. 1969. p.p. 621-624.

65. 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.
66. Rampe, D. & Triggle, D. J.: Benzodiazepines and calcium channel function. TIPS, 461-464, 1986.
67. Antkiewicz-Michaluk, L., Guidotti, A. & Krueger, K. E.: Molecular characterization and mitochondrial density of a recognition site for peripheral-type benzodiazepine ligands. Am. Soc. Pharm. Exp. Ter. 34: 272-278, 1988.