

121
2ej.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE ODONTOLOGIA

*ESTUDIO BIOQUIMICO EN GLANDULA
SUBMAXILAR DE RATONES DE LA CEPA CD-1
TRATADOS CON BENZODIAZEPINAS
(DIAZEPAM).*

T E S I S

PARA OBTENER EL TITULO DE:
CIRUJANO DENTISTA
P R E S E N T A N :
**GOMEZ ARCINIEGA V. ARTURO
LOPEZ PASCUAL ALEJANDRO**

*DIRECTOR DE TESIS: DR. JUAN CARLOS HERNANDEZ
GUERRERO
ASESORES: DR. JOSE DOMINGO MENDEZ.
CD. RICARDO PEREZ AGUILAR*



CD. UNIVERSITARIA,

1994

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

AGRADECIMIENTOS

*A la Universidad Nacional Autónoma de México
y especialmente a nuestra querida Facultad de Odontología
por brindarnos la oportunidad de realizarnos profesionalmente.*

A los doctores:

Juan Carlos Hernández Guerrero

José Domingo Méndez

Ricardo Pérez Aguilar

Constantino Ledezma Montes

Gerardo Maupomé Carvantes

*Nuestro más sincero agradecimiento
y reconocimiento por su invaluable
ayuda, paciencia y tiempo, que
hicieron posible la culminación de
este trabajo.*

Al doctor:

*Octavio Godínez Neri por su ayuda
para la obtención de Diazepam.*

DEDICATORIAS

De Arturo

*Gracias a Dios por derramar
en mí, todas sus bendiciones.*

A mis padres Rosaura y Vicente:
*Que han sido para mí ejemplo de esfuerzo,
trabajo y honradez, les dedico con amor este
humilde trabajo que ha sido fruto de lo que
ustedes sembraron en mí. Los amo.*

**A mis hermanos Hector, Bety, Blanca, Mony,
Victor, y a Raul y Ruben (que los quiero como
tales): Gracias por estar conmigo en las buenas
y en las malas; Descubriendo lo maravilloso de
la vida. Los quiero mucho.**

**A mis sobrinos Rosaura, Cesar, Dany
Valeriy Miguel: Les dedico el presente con
la esperanza de que quien sus pasos con
fervor, hacia el estudio y la superación y con
esto logren una personalidad triunfadora.**

A Nayeli:
*Por compartir el gusto por la
vida, pero sobre todo por su amor.*

De Alejandro

A mis padres

*Gracias por su incondicional apoyo,
cariño y ejemplo de siempre,
a ustedes dedico mi esfuerzo y trabajo.*

***A mis hermanos Tere, Ceci, Conchita,
Cesar, Pepe, Carlos y Cuau: Por la
confianza que con la gran unión de
hermanos siempre en mi depositaron.***

A mi abuelita:

*Te brindo este trabajo como muestra de
agradecimiento por todo el incomparable
cariño que me has dado y por tus sabios consejos.*

A ti Laura:

*Por tu compañía y palabras de aliento
que me das en los momentos más difíciles.*

Ambos

Al honorable sínodo:

***Ante quien exponemos este modesto trabajo,
sujetandonos a su amable consideración.***

INDICE

I RESUMEN	3
II INTRODUCCION	4
III GLANDULA SUBMAXILAR	
3.1 HISTOLOGIA Y ANATOMIA.....	5
HUMANO	
RATON.....	10
3.2 FISIOLOGIA EN HUMANO.....	12
IV BENZODIAZEPINAS	
4.1 GENERALIDADES	14
4.2 DIAZEPAM.....	16
4.3 ASPECTOS TERATOGENICOS	19
V BIOQUIMICA.....	
5.1 PROTEINAS	21
5.2 ENZIMAS	22
5.3 ARGINASA.....	26
VI FASE EXPERIMENTAL	
6.1 JUSTIFICACION	27
6.2 OBJETIVOS.....	27
6.3 MATERIALES Y METODOS.....	28
6.4 RESULTADOS	36
6.5 DISCUSION.....	37
6.6 CONCLUSIONES	40
VII BIBLIOGRAFIA.....	41

I. RESUMEN

La arginasa es la enzima terminal del ciclo de la urea, se encuentra principalmente en el hígado, pero existe en otros tejidos extrahepáticos y su presencia se ha asociado con la síntesis de poliaminas, moléculas que participan en la regulación de múltiples funciones celulares.

En este estudio se analizaron los efectos del diazepam sobre la actividad de arginasa en las glándulas submaxilares de 30 ratones de la cepa CD-1, los cuales se dividieron en grupo experimental, (15 ratones hembras y 5 machos) y en grupo control (5 ratones machos y 5 hembras).

El grupo experimental se subdividió de la siguiente manera:

Grupo 1.- 5 hembras - 5 días de administración.

Grupo 2.- 5 machos - 10 días de administración.

Grupo 3.- 5 hembras - 15 días de administración.

Grupo 4.- 5 hembras - 20 días de administración.

El grupo control se subdividió en 5 machos y 5 hembras, junto con la actividad de arginasa también se analizaron las concentraciones de materia orgánica total (peso seco) y proteínas en estas mismas glándulas.

Los resultados observados en este estudio muestran que la administración de diazepam causa disminución significativa ($P < 0.05$) en la actividad de arginasa de la glándula submaxilar en los 4 grupos tratados (6.09 ± 1.3 ugr. urea/ug prot/min) cuando se comparan con el grupo control (15.45 mgr urea/mg prot/min); así como también se observó una diferencia significativa en el peso seco, mientras que los valores de los otros parámetros no cambiaron significativamente.

Esto nos permite concluir que la función de la glándula submaxilar puede ser afectada por el diazepam y como consecuencia la actividad de enzimas, que como en el caso de la arginasa contribuye a la buena calidad de la saliva a través de la formación de ornitina, sustrato natural para la síntesis de poliaminas.

II. INTRODUCCION

Las benzodiazepinas son una serie de sustancias químicas ampliamente utilizadas en el campo de los fármacos ansiolíticos. De éstos, el diazepam (dz) se considera el prototipo de este grupo y destaca por sus usos como anticonvulsivante y relajante muscular. Este fármaco ha sido ampliamente utilizado como sedante-hipnótico e inductor del sueño y también en el tratamiento de la pre-eclampsia.

Algunos efectos adversos han sido descritos, los cuales son dosis-dependientes. En modelos experimentales se han detectado alteraciones en el sistema respiratorio y malformaciones congénitas a diferentes niveles. De gran importancia son las malformaciones que se presentan a nivel de la cavidad bucal, donde se reporta labio y/o paladar hendido, entre otras.^(15,23,26) Sin embargo la información sobre posibles alteraciones bioquímicas a nivel de glándulas salivales es nula de acuerdo a una revisión bibliográfica que realizamos de los últimos diez años.

Por lo que este estudio fue diseñado para investigar posibles cambios en la actividad de arginasa, una enzima implicada en la biosíntesis de poliaminas cuya presencia es importante para la regulación del funcionamiento glandular.

III GLANDULA SUBMANDIBULAR

3.1 ANATOMIA E HISTOLOGIA EN HUMANO

La glándula submandibular humana es de secreción mixta, ocupa la región suprahióidea. Está situada junto a la cara interna de la mandíbula inmediatamente por encima de la porción media del músculo digástrico y por así decirlo, llenando el espacio angular que circunscriben entre sí los vientres anterior y posterior de este músculo. En reposo, la glándula tiene un color gris amarillento, esta coloración se convierte en gris rosada cuando funciona y pasa al rojo más o menos obscuro en casos de estasis venosa. Su peso es aproximadamente de 7 a 8 gramos. La glándula submandibular es de forma irregularmente prismática triangular, con su eje mayor dirigido de atrás hacia adelante y de afuera hacia adentro, en dirección paralela a la mandíbula. En ella podemos considerar tres caras: 1) externa, 2) interna y 3) inferior.

Su principal conducto excretor es el conducto de Wharton, mide aproximadamente 5 cm de longitud y abandona la superficie profunda de la glándula para correr hacia adelante y abrirse en la punta de la papila sublingual, en el piso de la boca junto al frenillo lingual.

El aporte sanguíneo a esta glándula proviene principalmente de las arterias lingual y facial. ⁽¹⁾

La glándula está innervada por fibras mielínicas y amielínicas. Las excitaciones secretoras proceden del simpático y el parasimpático. A lo largo de la adventicia de los vasos y conductos excretorios, así como en el espacio que hay entre ambos, se disponen haces de fibras amielínicas trenzadas, procedentes del simpático. Todas estas fibras en el tejido conjuntivo intersticial dan lugar a un verdadero plexo de fibras entrecruzadas, del cual parten fibras independientes que se dirigen a la membrana basal del acino, donde se ramifican repetidamente, hasta que sus ramas terminales se apoyan en la membrana plasmática de las células secretoras.

Las glándulas salivales están constituidas por una porción secretora terminal y un sistema de conductos: intralobulares, extralobulares y excretorios. Las células de la porción secretora terminal son de forma piramidal y se disponen alrededor de un lumen central. Cada lóbulo está separado por una estructura neurovascular y tejido conjuntivo intralobular. Los canaliculos intercelulares (capilares secretorios) están presentes y se continúan con el lumen en la interfase entre las células acinares. Las células acinares están sobre una membrana basal, mientras que las células

mioepiteliales están interpuestas entre la membrana basal y las células acinares. Los conductos intralobulillares iniciales son túbulos delgados ramificados, llamados conductos intercalares. Las ramificaciones del siguiente orden superior, también intralobulillares, tienen epitelio con estriación vertical, y se llaman conductos estriados. Morfológicamente, las glándulas salivales se clasifican en mucosas, serosas o mixtas; de acuerdo a la proporción relativa de los diferentes tipos de células acinares. El lumen que está rodeado por células acinares mucosas, es más grande que el que está rodeado por células serosas. En la glándula mixta (submandibular), las células serosas se dirigen a la porción distal de la pieza terminal secretora, estas células serosas están comprimidas por las células mucosas hasta el punto en que adoptan una forma semilunar, por lo que se les llama semilunas de Gianuzzi.

El sistema ductual intralobular incluye a células del conducto estriado y del conducto intercalar, dicho sistema se continúa con el sistema ductual extralobular, los conductos excretorios, los cuales desembocan en la cavidad bucal.

A continuación mencionaremos los principales rasgos histológicos de los siguientes tipos de células:

CELULAS ACINARES. Se clasifican de acuerdo a la acidez o neutralidad relativa de los polisacáridos, por lo tanto, pueden distinguirse los siguientes tipos de células: células mucosas que contienen gran cantidad de carbohidrato ácido y células serosas que contienen en gran parte carbohidrato neutro. Las células serosas producen una secreción acuosa, mientras que la secreción de las células mucosas es viscosa y rica en mucopolisacáridos.⁽²⁾

CELULAS MUCOSAS. En las glándulas mucosas puras las células están dispuestas en una capa sobre la membrana basal y tiene una forma cuboidea irregular. En estado fresco, su citoplasma contiene muchas gotas pálidas de mucígeno, el precursor de la mucina. El núcleo está cerca de la base de la célula y, cuando hay una acumulación grande de mucígeno, suele ser de aspecto anguloso y comprimido. El aparato de Golgi, las mitocondrias y el retículo endoplásmico se localizan en la base de la célula, por debajo de los gránulos de mucígeno. En esta situación vacía, las células mucosas pueden confundirse con las células serosas, pero la ausencia de canalículos secretorios intercelulares permite distinguir las glándulas serosas de las mucosas. Sin

embargo, la demostración de estos canaliculos requiere técnicas especiales de tinción o el uso del microscopio electrónico. Con la iniciación del ciclo secretor, los organelos celulares sufren cambios morfológicos que se correlacionen con la actividad celular. Raras veces en condiciones fisiológicas, las células mucosas descargan todos sus gránulos. Por lo general, no muestran signos de degeneración y al parecer se recuperan por completo después de descargar su secreción.

CELULAS SEROSAS. Son de forma cuboidea y rodean una luz lobular pequeña. Después de que la glándula haya secretado durante un cierto tiempo, las células serosas disminuyen de tamaño y los pocos granulos residuales se localizan en el citoplasma yuxtaluminal. El aparato de Golgi ordinariamente se encuentra en la posición apical o paranuclear y las cisternas del reticulo endoplásmico son muy abundantes en la porción basal de las células. Las mitocondrias están dispersas entre las cisternas en la base y también por el citoplasma apical. La superficie luminal de las células serosas tienen pocas microvellosidades. Entre las células se encuentran canaliculos intercelulares revestidos de microvellosidades. En la glándula submandibular humana, las células acinares serosa tienen muchas prolongaciones basales que se interdigitan y forman un complejo laberinto basal, característico de las células que transportan líquidos y electrolitos.

CELULAS DE LAS GLANDULAS MIXTAS. Las proporciones relativas de los dos tipos de células glandulares presentes en las glándulas mixtas varía dentro de amplios límites. Por regla general, las células mucosas se localizan cerca de los conductos, mientras que las serosas se localizan en el extremo de la porción secretora terminal. Es muy probable que las células mucosas de las glándulas mixtas se originen por diferenciación de las células de los conductos más pequeños. Si las células mucosas no son numerosas, la porción secretora mostrará una mezcla irregular de células mucosas pálidas y células serosas oscuras. Si predominan las células mucosas, las células serosas quedan desplazadas a la porción terminal o forman pequeñas expansiones saculares de los acini. Aquí, forman pequeños grupos, que en los cortes aparecen como medias lunas teñidas fuertemente (medias lunas de Gianuzzi), que cierran los extremos de los túbulos de células mucosas.

CELULAS MIOEPITELIALES Aparecen como elementos estrellados o fusiformes muy delgados, estas células están interpuestas entre las células acinares y la membrana basal. Tienen gran similitud morfológica y funcionalmente con las células del músculo liso. Entre los principales rasgos ultraestructurales están: el núcleo es elongado y ocupa la parte central de la célula, contiene numerosos miofilamentos que miden aproximadamente 50 Amstrongs de diametro, los cuales están distribuidos paralelamente al eje mayor de la célula, la cual es contractil y facilita el desplazamiento de la secreción hacia los conductos.⁽³⁾

CONDUCTOS GLANDULARES

CELULAS DEL CONDUCTO INTERCALAR: Son de forma cuboidal. La célula está sobre una membrana basal y el núcleo se encuentra al centro. Ultraestructuralmente, es característica por la escasez de organelos citoplásticos. Sin embargo, por lo general se observan el retículo endoplásmico y gránulos secretorios unidos a la membrana, mientras que el aparato de Golgi tiende a ser prominente.

CELULAS DEL CONDUCTO ESTRIADO: Son células columnares bajas, que se apoyan en una membrana basal y se tiñen de un color eosinofílico brillante con hematoxilina y eosina. El núcleo tiende a ocupar la parte central. Las mitocondrias se ordenan de cierta forma dentro de la célula, distribuyéndose en filas paralelas a la porción basal. El retículo endoplásmico y el aparato de Golgi no ha sido bien estudiado.

CELULAS DEL CONDUCTO EXCRETOR: Los rasgos histológicos de las células que forman el sistema ductual excretor varían con la localización. Las células del conducto excretor en el epitelio bucal son escamosas estratificadas, en el estroma del tejido conjuntivo de la lámina propia pueden ser pseudoestratificadas o simplemente columnares altas. Es característico del conducto excretor una estructura de doble capa.⁽²⁾

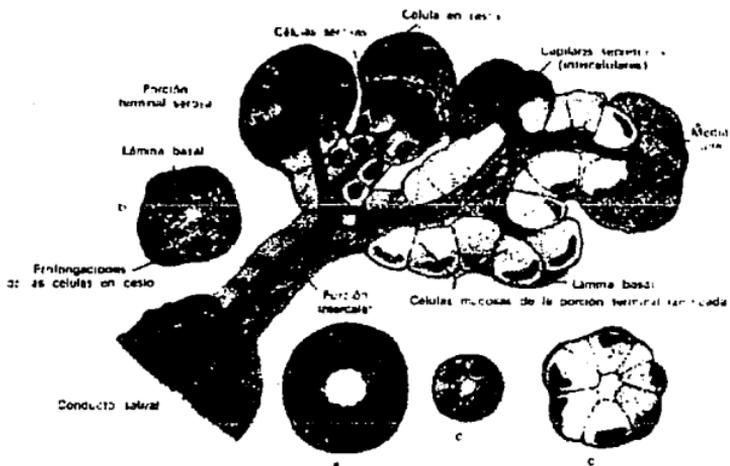


Fig. 1. Porción terminal de una glándula submandibular con su conducto. b) corte transversal de una porción terminal puramente serosa, que muestra la lamina basal. c) corte transversal a través de una porción terminal puramente mucosa. d) corte transversal de un conducto intercalar. e) corte transversal a través de un conducto salival (Tomado del Tratado de histología de Bloom)

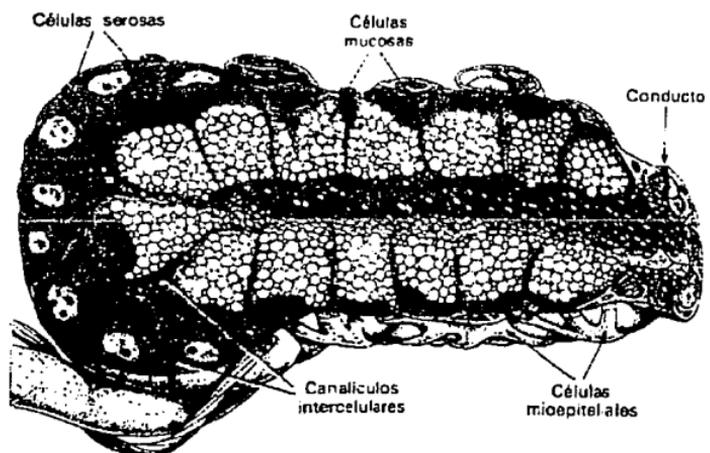


Fig. 2. Pieza terminal, tubulo-acinar de una glándula saliv. mixta, que muestra células mucosas con una media luna serosa terminal (Glándula submandib. del humano tomado de: Tratado de histología de Bloom)

EN EL RATON

Las glándulas submandibulares son dos lóbulos largos, por dentro, cada uno se encuentra dividido en varios lobulillos, los cuales están rodeados y separados unos de otros por membranas de tejido conjuntivo. Las glándulas tienen un sistema ductual extenso, el conducto principal de cada lóbulo desemboca en el piso de boca, el orificio del conducto se encuentra tapizado por epitelio escamoso estratificado, mientras que los conductos interlobulillares están tapizados por células epiteliales columnares. Los alveolos están compuestos por células serosas, las cuales son de forma piramidal. ⁽⁴⁾

A diferencia del humano, en el ratón la glándula submandibular es de tipo seroso, que no contiene células mucosas.

Tamarin y Sreebny observaron 5 zonas parenquimatosas en esta glándula:

- 1) Acini: Están formados por las células secretoras, interespaciadas con células mioepiteliales, las cuales están interconectadas al lumen principal por medio de canaliculos.
- 2) Conductos intercalares: Están localizados por arriba de las células cuboidales y conectan el acino con el conducto principal de la glándula.
- 3) Conductos granulares: Se encuentran por arriba de los tres tipos de células columnares: a) células angostas oscuras, b) células granulares claras y c) células granulares oscuras.
- 4) Conductos estriados: Los conductos granulares se fusionan y forman los conductos estriados, los cuales están tapizados por células columnares altas, que contienen poco retículo endoplásmico con o sin gránulos y un gran número de mitocondrias. Esta porción de la glándula no es secretora, pero participa activamente en el metabolismo del agua y electrolitos.
- 5) Conductos excretores: Estos conductos están formados por células columnares altas, algunas de las cuales pueden ser claras u oscuras. ⁽⁵⁾

DIMORFISMO SEXUAL: La glándula del macho es más grande y más opaca, son lobuladas y bien vascularizadas. Los túbulos intercalares y algunos alveolos tienen una estructura diferente en el macho adulto que en las hembras y machos jóvenes. En el macho adulto, las células columnares son altas, tienen localizado basalmente el núcleo y el citoplasma es granular eosinófilo

vacuolado. En las hembras y machos jóvenes, las células columnares no son tan altas y el núcleo está localizado en el centro.

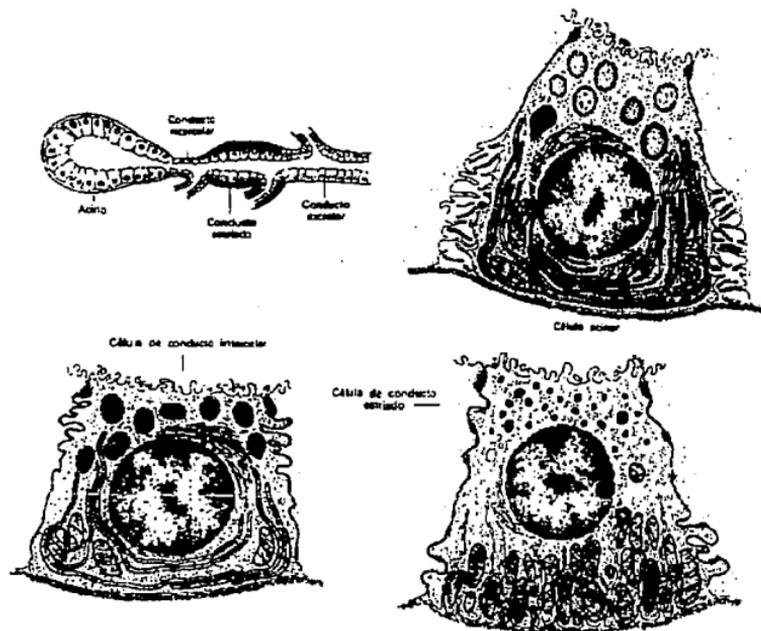


Fig. 3. Representación esquemática de las características ultraestructurales de los diferentes tipos celulares de la glándula submandibular del ratón (Tomado del Tratado de histología de Bloom).

3.2 FISILOGIA EN HUMANO

La secreción de la saliva se encuentra bajo el control del sistema nervioso autónomo. En general existe secreción continua, aunque el nivel en reposo es muy pequeño. Este flujo constante de saliva sirve para humedecer y proteger la mucosa bucal. La demanda sobre las glándulas aumenta durante la alimentación.

Los nervios parasimpáticos se distribuyen en todas las glándulas salivales, la estimulación de tales nervios produce el mayor flujo salival capaz de obtenerse de una glándula, por lo tanto al aumentar la actividad nerviosa, también lo hace el flujo salival. La saliva parasimpática se secreta en dos etapas. Durante la primera, se produce el paso de líquido y electrolitos desde el compartimiento vascular hacia los acini glandulares. Este líquido, llamado saliva primaria, contiene sodio y potasio en concentración semejante a la plasmática. Los acini también son el sitio único del sistema ductal en que se produce la entrada de agua hacia la saliva. En la segunda etapa, la saliva fluye por el sistema ductal, donde el sodio y el Cl^- es reabsorbido y se secreta potasio y CO_3H^- . La tasa de reabsorción de sodio es fija, sin ser dependiente de la intensidad de la estimulación glandular.

La saliva producida mediante estimulación simpática difiere de la saliva parasimpática en cuanto a su concentración iónica, las concentraciones de sodio y cloruro siempre son bajas, mientras que las de bicarbonato y potasio son mayores.

La secreción de proteínas por las glándulas salivales es similar a su secreción por otras glándulas, notablemente el páncreas. La síntesis proteica se efectúa en los ribosomas asociados al retículo endoplásmico. Las proteínas recientemente sintetizadas son liberadas por los ribosomas, penetran en las cisternas del retículo endoplásmico y aparecen entonces en el aparato de Golgi. Allí, las enzimas son compartimentalizadas en forma de vacuolas. Las vacuolas emigran hacia el ápice de la célula y, luego de sufrir un proceso de concentración de sus constituyentes, se reconocen como gránulos de zimógeno. Cuando la célula es estimulada, tales gránulos se descargan en el lumen de los conductos glandulares.

Dado que la secreción salival es el resultado de una estimulación del sistema nervioso autónomo, es necesaria la existencia de una serie de eventos que acoplen la llegada de impulsos nerviosos a la glándula con la secreción de saliva. Durante el reposo, el interior de una célula acinar es electronegativo con respecto al exterior. Este potencial de membrana alcanza entre -20 y -35 Mv. Durante la estimulación se observa un cambio de este potencial, causado por el neurotransmisor liberado. Una vez liberado el neurotransmisor, se une a un sitio receptor de la membrana de la célula acinar. Existen tres tipos de receptores: a) alfaadrenérgico, b) betaadrenérgicos y c) colinérgicos.

El acoplamiento entre el potencial de acción y la secreción de saliva por lo tanto es, complicado y consiste en un cierto número de etapas en las que están involucrados compuestos intermedios diferentes. No están claras todas las interrelaciones entre estas etapas y los hechos conocidos se basan en investigaciones efectuadas en una sola especie. En vista de la variación en la secreción salival, estos mecanismos de secreción pueden no ser aplicables a todas las glándulas, aunque son importantes para nuestro conocimiento sobre la fisiología salival.

Como las células mioepiteliales contienen elementos contráctiles, es razonable suponer que sirven para la expulsión de la saliva de las glándulas. Cuando se produce la activación de estas células, se observa un aumento de la presión intraductal, que podría ser particularmente importante en la expulsión de la saliva viscosa.

Puede inducirse secreción copiosa de saliva mediante la estimulación de la formación reticular lateral en la porción caudal de la protuberancia y porción rostral del bulbo, la estimulación de la porción rostral induce secreción de la submaxilar. Distintas modalidades gustativas inducen diferentes flujos salivales cuando actúan sobre la lengua. El flujo más abundante se produce por el gusto ácido. Además de la existencia de reflejos periféricos, se conocen desde hace tiempo las influencias centrales sobre los centros de control salival. Los experimentos clásicos de Pavlov quien condiciona la secreción salival a la visión de un alimento o al sonido de una campana, constituyen ejemplos notables. La boca seca del miedo constituye otro ejemplo¹⁷.

IV. BENZODIAZEPINAS

4.1 GENERALIDADES

Las benzodiazepinas (BZD) y sus derivados dominan en la actualidad el campo de los fármacos ansiolíticos, estos fármacos como su nombre lo indica, reducen los síntomas de la ansiedad interfiriendo mínimamente en la función cognoscitiva, acompañada de cierta relajación muscular, además de ser potentes anticonvulsiantes ^(8,9)

Comercialmente se seleccionaron en base a sus efectos clínicos sobre el sistema nervioso central ⁽⁸⁾, y promocionados para este uso se encuentran disponibles el alprazolam, el cloracepato, el clordiazepóxido, el diazepam, el halacepam, el loracepam, el oxacepam y el pracepam. ⁽⁹⁾

La comercialización de ciertas benzodiazepinas está favorecida en cuanto a las diferencias en la cinética de su distribución y metabolismo, sin embargo sus efectos clínicos son similares. Por ejemplo, el fluracepam, el temacepam y el triazolam son promocionados como hipnóticos, mientras que el clonazepam se ofrece como anticonvulsivo. ^(8,9,10)

Además de tener las indicaciones terapéuticas en la inducción del sueño y la sedación.

CINETICA. Tras la administración oral de benzodiazepinas se alcanza un pico en los niveles sanguíneos al cabo de 1 a 4 horas.

La mayoría de las benzodiazepinas, a excepción del clordiazepóxido, el loracepam, y el oxacepam, experimentan biotransformación por el sistema microsomal hepático hasta uno o más metabolitos, algunos de los cuales son activos y se eliminan con lentitud.

MECANISMO DE ACCION. En la actualidad se desconoce, pero se han observado interacciones interesantes entre benzodiazepinas, picrotoxina y el neurotransmisor inhibidor ácido Gama-aminobutírico (GABA) en numerosos receptores del cerebro. Los efectos electrofisiológicos del GABA se favorecen en presencia de benzodiazepinas. Además in vitro se han demostrado lugares de fijación con alta afinidad para el GABA y las benzodiazepinas. ^(8,9)

La duración de la acción de una benzodiazepina determinada depende en gran parte de la tasa y la cuantía de la redistribución de sus metabolitos hacia los tejidos periféricos desde el

sistema nervioso central. Así, una redistribución más rápida y extensa determina una actividad más corta.^(9,10,12)

ABSORCION El período de actividad mediada es aproximadamente de 24 horas suprimida la medicación, la cantidad de fármaco en la sangre disminuye lentamente en el curso de varios días. El fármaco se excreta en la orina . 1 a 2 % aparece inalterado y 3 a 6 % como conjugado. Dos metabolitos son farmacológicamente activos: una lactama y un derivado desmetilado.^(11,12)

EFFECTOS ADVERSOS. Las benzodiazepinas causan somnolencia, ataxia, síncope, excitación paradójica, exantemas, náuseas y alteraciones de la libido. Debe actuarse con precaución cuando se usan otros depresores del sistema nervioso central (barbitúricos, etanol, opiáceos, hipotensores, anticonvulsivos, etc.).^(8,9,10,11,13)

La anestesia anterógrada por una benzodiazepina no es infrecuente, sobre todo después de la administración parenteral y constituye una de las razones para incluir las benzodiazepinas en el régimen prequirúrgico de anestesia equilibrada.^(9,11)

Las benzodiazepinas rara vez producen por sí solas la muerte, la incidencia de toxicidad verdadera debe considerarse muy baja tomando en cuenta que las benzodiazepinas se han usado en todo el mundo durante varias décadas.^(8,9)

La capacidad de adicción a las benzodiazepinas parece ser inferior a la del Meprobamato o a la mayoría de los barbitúricos sin embargo se aconsejan las siguientes precauciones:

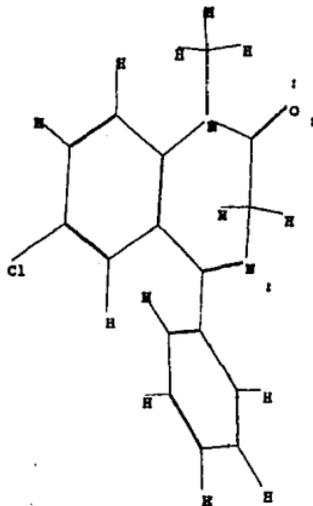
a) Normalmente no se administran a individuos que hayan abusado de alcohol o de fármacos.

b) La dosis debe ajustarse de acuerdo con las necesidades de cada paciente, que no sea innecesariamente grande.

c) Debe fijarse desde el comienzo la duración esperada de tratamiento para que la ingesta de estos fármacos no se prolongue por falta de planificación.^(10,14)

4.2 DIAZEPAM

El diazepam (7-cloro, 1,3-dihidro-1-metil-5 Fenil 2H-1,4 benzodiazepin-2-uno), fué sintetizado en 1961 por Sterbach y Reeder.⁽¹⁰⁾



El aspecto físico de este fármaco es incoloro más bien cristalino, insoluble en el agua, pero soluble en alcohol, es una droga lipídica de un peso molecular de 284.7, la cual atraviesa fácilmente la barrera placentaria^(12,15).

El diazepam es un fármaco que se utiliza por vía intravenosa como tratamiento primario para el estado epiléptico y las convulsiones inducidas por fármacos o toxinas.⁽⁹⁾

El diazepam también relaja la musculatura esquelética al deprimir las vías reflejas, se usa para mejorar los espasmos musculares espontáneos y los asociados con intervenciones como la endoscopia. Además de que con grandes cuidados se puede utilizar esta droga para tratamientos de pre-eclampsia.^(15,24)

Puede que las actividades de relajación muscular y anticonvulsiantes sean de algún valor en aquellos pacientes que reciben anestesia local o para prevenir los efectos secundarios de los relajantes despolarizadores de músculos; las náuseas anteriores y posteriores a la operación pueden disminuirse.⁽¹⁶⁾

Para su administración parenteral este fármaco se disuelve con un solvente no acuoso como es el propilenglicol . después de su aplicación intravenosa (dosis de 10 a 20 mg) se obtiene una sedación profunda en unos cuatro minutos y la recuperación ocurre en término de una hora, lo cual coincide con la disminución de sus niveles en sangre .⁽¹⁷⁾

La vida media distributiva del diazepam es más o menos de una hora y el tiempo de eliminación es inicialmente de uno a cinco días⁽⁸⁾, durante varios días después de la última dosis continúa la excreción de cantidades mensurables. Las concentraciones séricas obtenidas por concentración de diazepam en sujetos normales depende de la vía de administración Después de la inyección intravenosa los niveles máximos son aproximadamente 1600 ng x mm en 15 minutos. La administración oral e intramuscular, los niveles máximos para la primera son de 490 ng x mm en un tiempo de 30 minutos y para la segunda de 290 ng x mm en un tiempo de 60 minutos. Para la vía intramuscular los efectos clínicos son precisamente en relación a los niveles de concentración séricos en altos niveles de diazepam en el suero, los efectos sedativos fueron acompañados por un marcado deterioro de varias funciones mentales y de coordinación La aguda administración de dosis sencillas de diazepam no ha producido cantidades significativas de metabolitos N-desmetildiazepam por lo tanto fue poco prometedor contribuir a efectos clínicos.⁽¹⁶⁾

Los principales metabolitos del diazepam son:

el N-desmetildiazepam, el oxazepam y glucoronido ; después de su ingesta su absorción es rápida y al término de una hora alcanza los niveles máximos en sangre de adultos, sin embargo en los niños se absorbe en un lapso de 15 a 30 minutos⁽¹⁸⁾; su eliminación de la sangre sigue dos fases: la primera con una vida media de dos horas y la segunda de 20 a 50 horas dependiendo de la edad y las funciones hepáticas del individuo⁽¹⁹⁾

El diazepam y el N-desmetildiazepam se hidrolizan con lentitud a otros metabolitos activos como el oxazepam; la vida media plasmática del diazepam es en promedio de 1 a 2 días y la del N-desmetildiazepam es de aproximadamente de 6 horas ⁽⁸⁾ el más importante de estos metabolitos es el N-desmetildiazepam el cual posee una vida media de unas 96 horas, sus niveles son semejantes o mayores que los del diazepam, además se forman otros dos metabolitos activos. el temacepam y el oxacepam, que se excretan en forma de glucuronatos o de sulfatos en menor grado. el oxazepam es insoluble en agua y posee una vida media más breve que el diazepam y un 80 % es excretado en la orina en término de 72 horas. ⁽²⁰⁾

Tabla 1 EFECTO CLINICO Y CONCENTRACION PLASMATICA DESPUES DE UNA DOSIS UNICA POR VIA ORAL.⁽¹³⁾

DENOMINACION		TIEMPO MAXIMO		
		muy rapido	lento	fracción reabsorbida
Diazepam	Valium	0.5-1.5		80-90
Clorazepato	Tranxene	1-4		-
Clobazam	Urbanyl	1-4		82
Clordiazepóxido	Librium		5	90-100
Prazepam	Lysanxia		4-6	-
Lorazepam	Temesta		2-4	91-95
Oxazepam	Seresta		2-4	90

Tiempo máximo en horas.

Fracción reabsorbida en porcentaje.

Dosis 20 mg

4.3 ASPECTOS TERATOGENICOS

Investigaciones previas han demostrado que la administración de diazepam durante la gestación causa alteraciones en el desarrollo de humanos ^(21,25) y animales de laboratorio ^(17,21,22) por lo tanto actúa como agente teratogénico.

La administración de diazepam durante la gestación desencadena una serie de alteraciones entre las más frecuentes se encuentran: una alta incidencia de paladar hendido ^(21,22,23), hipoplasia mandibular, úvula bifida, separación excesiva entre los ojos ^(19,22,24,25), anomalías en la corteza cerebral ⁽²⁵⁾, hipotermia e hipertermia del recién nacido (Floppy infant syndrome) ^(15,27,26,32,33)

Se ha demostrado que la administración prenatal de diazepam durante la tercera semana de gestación induce a pronunciadas alteraciones en el desarrollo del comportamiento que

normalmente tienen lugar en la tercera semana posnatal. este periodo puede ser un tiempo de gran sensibilidad a drogas que actúan sobre el S.N.C. y puede ser una inducción crítica de tratamientos teratológicos.⁽²⁷⁾

Laegreid et al.⁽²⁸⁾ reportó 8 caso de niños con anomalías físicas y mentales marcadas, por ejemplo: seis pacientes con nariz corta y puente nasal corto, los ocho pacientes presentaron también ojos inclinados y pliegues epicánticos, paladar hendido y úvula bifida.

Los hallazgos generales de las diversas investigaciones antes mencionadas revelan que el DZ por ser una BZD de bajo peso molecular atraviesa la barrera placentaria con facilidad^(26,29), y además es fácil de detectarlo en la sangre fetal después de 5 minutos de su administración^(30,31), el atravesar con facilidad la barrera placentaria y además de excretarse por la leche materna^(22,24) incrementa las posibilidades de trastornos teratogénicos

V. BIOQUIMICA

5.1 PROTEINAS

Las proteínas tienen un papel básico en la función y en la estructura celular. Están constituidas básicamente por monómeros de bajo peso molecular llamados aminoácidos. Pese a que no existe un sistema universalmente satisfactorio de clasificación de las proteínas, varios sistemas que se contradicen persisten en la actualidad. Sin embargo, la persistencia de estos sistemas y términos hacen necesaria una breve consideración. Las que se describen a continuación son características sobresalientes de los sistemas de clasificación de las proteínas basados en su solubilidad, forma, función y estructura tridimensional.

Solubilidad: Las líneas de demarcación entre las clases no son rigurosas. Por ejemplo, no se puede hacer una distinción clara entre las albúminas y globulinas únicamente en base a sus solubilidades en agua o en soluciones salinas. Las globulinas, por lo tanto, se subdividieron en pseudoglobulinas, que son francamente solubles en agua, y euglobulinas, que son insolubles en agua exenta de sales.

Clasificación de las proteínas basada en su solubilidad

Albúminas	Solubles en agua y en soluciones salinas. Sin aminoácidos distintivos.
Globulinas	Escasamente solubles en agua pero solubles en soluciones salinas. Sin aminoácidos distintivos.
Protaminas	Solubles en etanol a 70-80% pero insolubles en agua y en alcohol etílico absoluto.
Histonas	Solubles en soluciones salinas.
Escleroproteínas	Insolubles en agua o en soluciones salinas.

Forma general. Pueden distinguirse dos extensas clases

- a) Proteínas globulares que tienen proporciones axiales (la relación entre amplitud y longitud) menores de 10 y por lo general no exceden de tres a cuatro. Se caracterizan por estar plegadas en

forma compacta y con las cadenas polipeptídicas enrolladas, los ejemplos incluyen insulina, albúminas y globulinas plasmáticas y numerosas enzimas.

b) Proteínas fibrosas, que tienen proporciones axiales mayores de 10 y se caracterizan porque sus grupos de cadenas polipeptídicas están enrollados en una espiral o hélice y poseen entrecruzamientos a base de enlaces covalentes o de hidrógeno, los ejemplos incluyen a la queratina, miosina, colágeno y fibrina.

Función: Se puede clasificar de acuerdo a sus funciones biológicas, por ejemplo, como proteínas estructurales, catalíticas o de transporte. Las proteínas catalíticas (enzimas) comprende el grupo más numeroso, por lo tanto, se clasifican a su vez según el tipo de reacción que catalizan.

Estructura tridimensional: Las semejanzas en la ultraestructura proporcionan una base potencialmente valiosa para la clasificación de las proteínas. Por ejemplo, las proteínas que se unen a los nucleótidos comparten una estructura terciaria común de dominio de unión a nucleótidos, y todas estas proteínas pueden estar relacionadas desde su evolución.

5.2 ENZIMAS

Las enzimas son catalizadores proteínicos para las reacciones bioquímicas, la mayor parte de las cuales ocurrirían muy lentamente si no fuera por la catálisis enzimática. Las enzimas son catalizadores altamente específicos de las reacciones. Esencialmente todas las reacciones bioquímicas son catalizadas por enzimas.

Un sistema enzimático consta de los siguientes componentes: a) Substrato, que es la molécula sobre la que actúa la enzima y cuya transformación está condicionada por ella. b) Producto, que es la molécula resultante de la acción de la enzima sobre el o los sustratos; a menudo se obtienen varios productos como resultado de las reacciones catalizadas por las enzimas.

Clasificación: En un principio se designó a las enzimas añadiendo el subfijo *asa* al nombre del sustrato sobre el que actuaban. Por lo tanto las enzimas que hidrolizan al almidón se denominaron amilasas, las que hidrolizan los lípidos, lipasas y las que hidrolizan proteínas, proteinasas. Mas tarde, las enzimas que catalizan reacciones semejantes recibieron nombres que indican el tipo de reacción química catalizada. Estas son las deshidrogenasas, oxidasas, descarboxilasas, etc. Muchos de estos nombres son de uso corriente.

El sistema de nomenclatura de la Unión Internacional de Bioquímica, es inequívoco. Su principio fundamental, de nombrar y clasificar a las enzimas de acuerdo al tipo de reacción química y a su mecanismo de acción, puede facilitar materialmente la integración de conocimientos desde áreas bastante divergentes del metabolismo. Las características principales del sistema de la UIB son las siguientes:

1) Las reacciones y las enzimas que las catalizan se dividen en 6 clases principales, cada una con 4 a 13 subclases.

2) El nombre de la enzima tiene dos partes: la primera es el nombre del o los sustratos; la segunda, con terminación *asa*, indica el tipo de reacción catalizada.

3) Información adicional, si es necesario aclarar la reacción, puede seguir en paréntesis. Por ejemplo, la enzima que cataliza la reacción $L\text{-malato} + \text{NAD}^+ = \text{piruvato} + \text{CO}_2 + \text{NADH} + \text{H}^+$, conocida como enzima málica, se designa como 1.1.1.37 L-malato: NAD⁺ oxidorreductasa (descarboxilante).

4) Cada enzima tiene un número clave (E.C.) que caracteriza al tipo de reacción según la clase (primer dígito), subclase (segundo dígito) y sub-subclase (tercer dígito). El cuarto dígito es para la enzima específica. Así, E.C. 2.7.1.1. denota la clase 2 (una transferasa), subclase 7 (transferencia de fosfato), sub-subclase 1 (una función alcohol como aceptor de fosfato). El último dígito denota a la enzima hexocinasa o ATP: D-hexosa-6-fosfotransferasa, enzima que cataliza la transferencia de fosfato desde el ATP al grupo hidroxilo del carbono 6 de la glucosa.

La capacidad de una enzima para catalizar una reacción específica y esencialmente ninguna otra, es quizá su propiedad más significativa.

MEDICION CUANTITATIVA DE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA:

Las cantidades extremadamente pequeñas de enzimas presentes en la célula crean problemas para determinar la cantidad de una enzima en líquidos o extractos de tejidos: son muy diferentes de aquellos para determinar la concentración de las sustancias orgánicas o inorgánicas más abundantes. Por fortuna, la actividad catalítica de una enzima provee un dispositivo sensible y específico para su propia medición.

Para medir la cantidad de una enzima en una muestra de extracto tisular o de algún líquido biológico, se mide la velocidad de la reacción catalizada por ella. En circunstancias apropiadas, la velocidad medida es proporcional a la cantidad de enzima presente. Dado que es difícil determinar el número de moléculas o la masa de enzima presente, los resultados se expresan en unidades enzimáticas. Las cantidades relativas de la enzima se pueden entonces comparar en diferentes extractos.⁽³⁴⁾

CICLO DE LA UREA

El ciclo de la urea ha sido bien identificado en su conjunto y ahora se sabe que consta de 5 pasos, regulados enzimáticamente:

- 1 - La conversión de bicarbonato y amonio en carbamilsulfato.
- 2.- Formación de citrulina a partir de ornitina y carbamilsulfato.
- 3.- Conversión de citrulina y aspartato en arginosuccinato.
- 4.- Hidrólisis de arginino-succinato para formar arginina

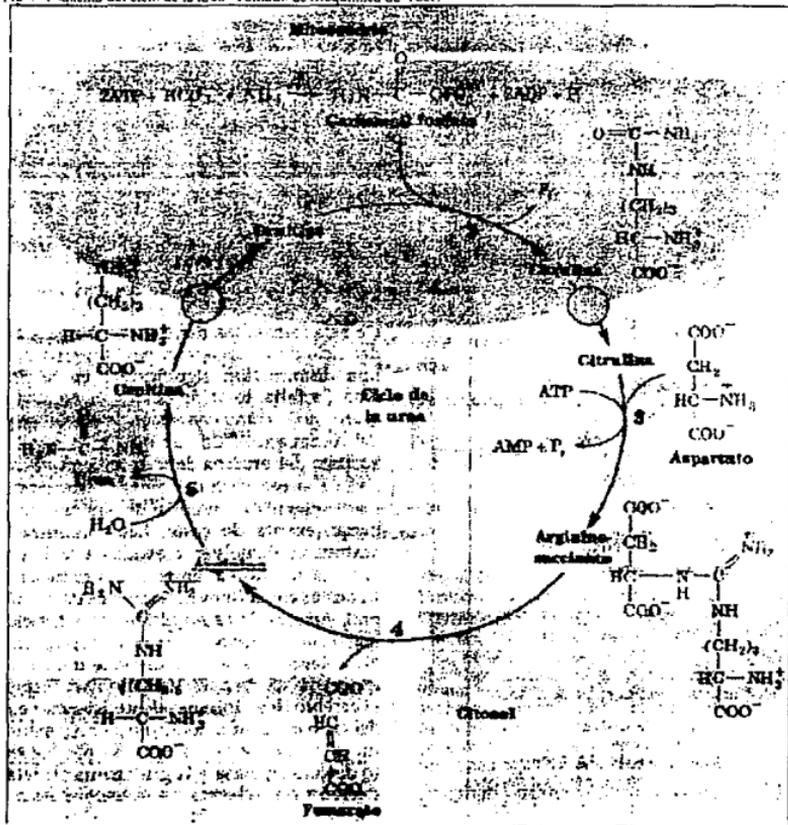
5.- Degradación de arginina para formar urea y ornitina. La ornitina así formada está nuevamente disponible para su reutilización en el paso 2 y la urea es excretada.

Los dos pasos iniciales son catalizados por las enzimas mitocondriales, carbamilsulfato sintetasa 1 y ornitina transcarbamilasa, mientras que los tres últimos pasos por las enzimas citoplasmáticas, arginosuccinato sintetasa, arginosuccinasa y arginasa, respectivamente.

Todas estas enzimas están presentes en el hígado, intestino y riñón, pero solamente en el hígado están en niveles suficientes para llevar a cabo la urogenénesis

La función del ciclo de la urea es captar al grupo amino de aminoácidos y representa un sistema anabólico que requiere energía y permite la formación de esqueletos de carbono, necesarios para el metabolismo oxidativo.

Fig. 5 Esquema del ciclo de la urea. Tomado de Bioquímica de Voet)



5.3 ARGINASA.

La arginasa (L-arginina-urea hidrolasa; EC 3.5.3.1) es la enzima final del ciclo de la urea en mamíferos, cataliza la hidrólisis de arginina a urea y ornitina.

La arginasa es una enzima que se encuentra abundantemente en el hígado de animales urotélicos y en menores cantidades en el riñón, testículo, bazo, mamas en periodo de lactancia, etc; en los animales la arginasa se encuentra en la fracción soluble del citoplasma y en diversas estructuras celulares como las mitocondrias, lisosomas, aparato de Golgi y posiblemente en el núcleo de la célula.

Su peso molecular es de 138 Kd y es estabilizada por diversos cofactores como el magnesio, cobalto y níquel; el zinc y algunos aminoácidos básicos como la lisina, ornitina y serina la desestabilizan; su pH óptimo de acción está entre 9,8 y 10 en presencia de magnesio o cobalto, cuando se hace una mezcla de estos dos iones el pH óptimo es de 8.5 a 9.

La actividad de esta enzima depende de la presencia de un cofactor como el manganeso y sólo presenta actividad cuando el substrato presenta un grupo guanidínico con el radical amonio libre y un carboxilo asociado a un grupo amonio o hidroxilo en alfa, además de que tiene que haber cierta separación entre el primero y el segundo; los compuestos que cumplen estas condiciones son la arginina, la canavanina, la cupleina y la monobenzoilarginina.

Se ha sugerido que la arginasa está presente para asegurar la disponibilidad de la ornitina en la biosíntesis de algunos aminoácidos como la ornitina, prolina y glutamato, además de ser precursor de la síntesis de las poliaminas (putrescina, espermidina y espermina)⁽³⁵⁾

VI. FASE EXPERIMENTAL

6.1 JUSTIFICACION

Debido al uso indiscriminado que se le ha dado a este fármaco, reportándose en el año de 1977 que el consumo de BZD en los Estados Unidos de Norteamérica fue de 8,000 toneladas⁽⁹⁾ Sin que hasta la fecha se haya reportado investigación alguna sobre los efectos que pudiera tener la administración de diazepam a nivel de glándulas salivales.

6.2 OBJETIVOS

Determinar la actividad de arginasa en glándulas submaxilares de ratones de la cepa CD-1, tratados con diazepam y no tratados, además de correlacionar esta actividad con la concentración de proteínas, así como la cantidad de materia orgánica total.

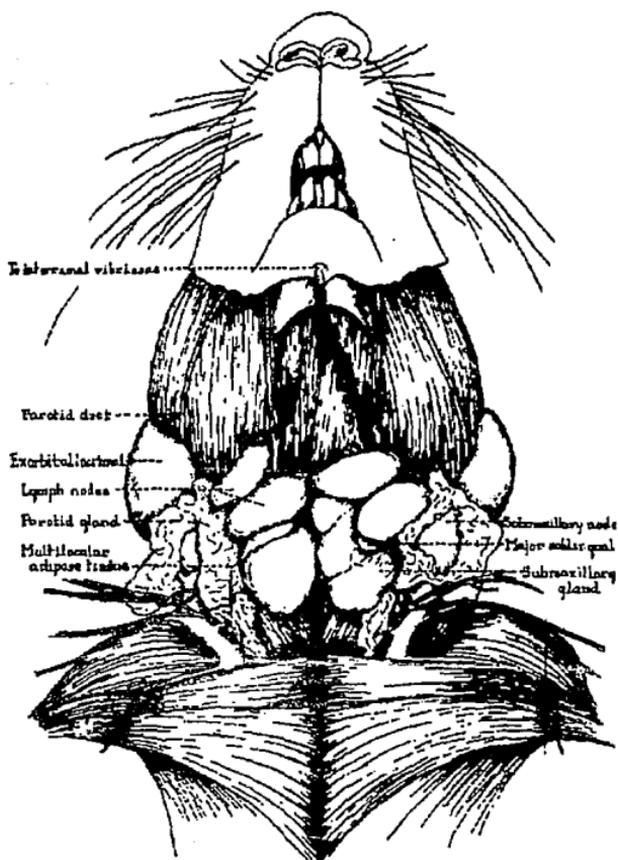


Fig 6 Disección superficial de cuello de rata.

6.3 MATERIALES Y METODOS

Para el presente estudio se utilizaron 30 ratones de la cepa CD-1 de las cuales 20 fueron hembras y 10 machos. éstos fueron gentilmente donados por el bioterio del Instituto de

Investigaciones Biomédicas de la U.N.A.M. La edad de los ratones fue de 8 semanas con un peso promedio de 25 gramos al inicio del estudio. Los animales fueron divididos en 6 grupos de 5 ratones en cajas de acrílico transparente y se marcaron para su identificación con ácido picrico. Los animales se mantuvieron en un periodo de luz de las 8 a.m. a las 8 p.m. y temperatura controlada a 24 °C, alimentación con dieta comercial dura (Roedent, Diet Lab) y agua ad libitum hasta el término de la investigación.

Cabe mencionar que el agua se les proporcionaba en botellas de vidrio que se cambiaban diario, y que las camas de aserrín dos veces por semana; todos los ratones fueron pesados antes y hasta el día de su sacrificio. El grupo experimental de 20 ratones se subdividió en 4, quedando en este un grupo de 5 machos. Se les administró una dosis de 0.5 mg de diazepam (donado por laboratorios Roche de México) por vía intraperitoneal diario a las 11:00 A.M. aproximadamente. La dosis seleccionada de DZ, si bien es diez veces más alta que la dosis usual en humano, debe de considerarse relativamente baja, considerando que la eliminación de la vida media del DZ y sus metabolitos activos es más de 30 veces más corta en los ratones que en humanos adultos⁽²¹⁾.

El periodo de administración se realizó de la siguiente manera:

Grupo 1 durante 5 días.

Grupo 2 durante 10 días.

Grupo 3 durante 15 días.

Grupo 4 durante 20 días.

A los grupos control se le administró solución isotónica como placebo durante diez días.

Se sacrificaron por medio de dislocación cervical al término de su periodo de administración, así el grupo 1 a los 5 días, el grupo dos a los 10 días, el grupo 3 a los quince días, el grupo 4 a los 20 días y el grupo control a los diez días.

Inmediatamente después del sacrificio se procedió a hacer las disecciones de las glándulas submaxilares derechas, se colocaron en solución salina y se congelaron a - 49 C; ya congeladas

se les retiraron los restos de tejido adiposo. se pesaron por separado en la balanza analítica. se anotó el peso húmedo, y se homogeneizaron en 1.5 ml de solución salina y se congelaron nuevamente hasta el momento de su estudio.

TABLA 2 . RELACION PESO CORPORAL-PESO GLANDULAR

Peso	Grupo control		Grupo experimental			
	machos	hembras	5 días	10 días*	15 días	20 días
Corporal	32.5	23.5	24.8	31.8	24.2	24.4
Glandular	120.0	69.2	80.2	123	76.2	74.8

Peso corporal expresado en gramos (Los valores representan el promedio de cada grupo).

Peso glandular expresado en miligramos.

*Grupo constituido por machos.

DETERMINACION DE PROTEINAS

FUNDAMENTO:

Método de Lowry. ⁽³⁶⁾ Desde que fue propuesto el uso del reactivo de Folin para la determinación de proteínas, se han reportado numerosas modificaciones analíticas en cuanto a su procedimiento de utilización. Se han estudiado sus peculiaridades y limitaciones de este reactivo en cuanto a efectos a diferentes pH, tiempo de reacción, concentración de reactivos y sustancias que interfieren.

Existen dos pasos que dan origen al color final con la proteína: a) la reacción con el cobre en alcali, y b) la reducción del reactivo fosfomolibdico-fosfotúngstico por la proteína tratada con el cobre.

REACTIVOS:

1. Solución 1:

Na_2CO_3 al 2%

Tartrato doble de sodio y potasio al 0.02%

Hidróxido de sodio 0.1 N

2. Solución 2:

Solución al 0.5% $\text{Cu}_2\text{SO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ en agua destilada.

3. Solución 3 :

Se mezclan 50 volúmenes de la solución 1 con un volumen de la solución 2 al momento de usarse

4. Reactivo de Folin-Ciocalteu (diluido)

5. Solución estandar de albúmina bovina 0.2 mg/ml.

APARATOS:

1. Colorímetro
2. Baño María a 37° C
3. Centrifuga
4. Vortex

PROCEDIMIENTO:

Se toman 0.05 ml de homogeneizado y se le agregan 0.5 ml de hidróxido de sodio 1 N, se incubaba a 37°C durante 30 minutos. Si es necesario se centrifuga a 3000 rpm y se toma una alícuota del sobrenadante para hacer una dilución 1:10. Se toman las alícuotas según el tipo de la glándula, en este caso se tomaron 0.03 ml y se completó a 0.5 ml con agua destilada. Hecho lo anterior se agregaron 2 ml de la solución 3 y se dejó reposar durante 10 minutos. Después se agregaron 0.2 ml del reactivo de Folin y se dejó reposar 20 minutos de forma que pasado este tiempo se leyó la absorbancia a 530 nm.

Las muestras blanco y curva estandar se hicieron por duplicado.

En ocasiones fue necesario eliminar la dilución 1:10 en ciertas glándulas con el propósito de obtener lecturas dentro del rango aceptable de la curva estandar.

CALCULOS:

La unidad en que fue reportada la cantidad de proteína en tejido fue la siguiente:

ug prot/ug peso seco

A la lectura de la muestra se le restó la lectura del blanco de reactivos de modo que la absorbancia resultante se interpoló en una curva estandar de proteínas. La concentración de proteínas se relacionó con los ug de tejido contenidos en el homogeneizado original, expresando la concentración final como ug prot/mg de tejido (peso húmedo).

PESO SECO

La cantidad de peso seco que es una medida de la cantidad de materia orgánica total se realizó con una técnica colorimétrica ⁽³⁷⁾.

FUNDAMENTO:

El método consiste en hacer reaccionar las muestras con una solución ácida de dicromato de potasio en medio ácido fuerte durante 20 minutos a 92°C y determinando la densidad óptica enseguida a 630 nm del producto formado. Las ventajas de este procedimiento son :

- 1) requiere un mínimo de tiempo para la determinación.
- 2) su mayor sensibilidad, exactitud y precisión usando equipo estandar de laboratorio.
- 3) el método es sensible a compuestos inorgánicos y por lo tanto puede ser aplicado a homogeneizados de tejidos preparados en soluciones inorgánicas. La única desventaja del método es que el dicromato reacciona específicamente con grupos que contienen carbono y por lo tanto, la participación de nitrógeno y de otros elementos en la composición del material biológico darán proporcionalmente menor absorbancia.

REACTIVOS:

1. Solución de dicromato de potasio en ácido sulfúrico.

1 g. de dicromato de potasio

50 ml de ácido sulfúrico

calentar a 70°C hasta que se disuelva completamente el dicromato de potasio.

2. Solución estandar de manosa o manitol 2 mg / ml.

APARATOS:

1. Parrilla eléctrica.
2. Colorímetro
- 3 Vortex

PROCEDIMIENTO:

Se tomaron 0.05 ml de homogeneizado y se completaron a 1 ml con agua destilada. Una vez hecho esto, se agregaron 2 ml de la solución 1 y se mezclaron bien con el vortex y posteriormente se registró la absorbancia en el colorímetro a 660 nm. Las muestras, el blanco y la curva estándar se procesaron por duplicado.

CALCULOS:

La cantidad de peso seco se reportó como:

ug peso seco / mg peso húmedo.

A la lectura de la muestra se le restó la lectura del blanco de modo que la absorbancia resultante se interpoló en una curva estandar de absorbancia contra la concentración de manosa o manitol. Teniendo los ug de peso seco se relacionaron con los ug de tejido que resultaron del procedimiento dado partiendo de la concentración original del homogeneizado.

ARGINASA

La actividad de esta enzima se determinó midiendo la concentración de urea producida por hidrólisis de arginina ⁽³⁴⁾.

FUNDAMENTO:

La actividad de arginasa se ha establecido por mediciones de:

- a) una disminución de la concentración de arginina.
- b) un incremento en la concentración de ornitina.
- c) un incremento en la concentración de urea.

Ha de hacerse notar que sólo algunos procedimientos son útiles para medir la actividad de arginasa en extractos de tejidos u homogeneizados.

Este método utiliza la tiosemicarbazida y diacetil monoxima en medio ácido. La aparición de color en este método depende del tiempo y temperatura del calentamiento. Cuando el tiempo

requerido para la aparición máxima del color es dependiente de la temperatura, la intensidad de reacción disminuye conforme se incrementa el tiempo de calentamiento a temperaturas próximas a 85°C. lo que indica que el producto puede ser afectado por la temperatura.

REACTIVOS:

1. Reactivo colorido: extracto acuoso de una solución que contiene tioceomicarbazida .4 mM y 2-3 butanediona monoxima 4.1 mM.

Diacetilmonoxima 3.5 ml

Tioceomicarbazida 0.005 g

c. b. p. H₂O 25 ml

2. Reactivo ácido: 0.1 ml de FeCl₃ 0.12 M en H PO al 56.7% más 100 ml de H₂SO₄ al 20 %.

3. Solución estándar en urea 15 ug/ml.

APARATOS:

1. Parrilla eléctrica.

2. Colorímetro.

PROCEDIMIENTO:

Se tomaron 0.05 ml de homogeneizado y se le agregaron 0.45 ml de amortiguador (MnCl₂ 0.2 mM en Tris HCl 40 mM y solución salina 0.9 % P/V de un pH de 7.2), se incubaron a 55 C durante una hora y se tomó 0.4 ml. y se agregaron 0.1 ml de una solución de arginina 40 mM de un pH de 9.4 conteniendo glicina 150 mM. Se incubó a 37°C por 15 minutos e inmediatamente se colocó en baño de agua hirviendo por 7 minutos.

Se tomaron las alícuotas 0.05 ml. y se completaron con agua destilada hasta obtener 1 ml , se agregaron a esta muestra 1 ml de reactivo colorido y 2 ml de reactivo ácido, posteriormente se mezclaron, se taparon los tubos y se calentaron a 92°C durante 25 minutos. se dejaron enfriar y después se leyó la absorbancia a 530 nm.

CALCULOS

La actividad de la enzima se expresó como:

umoles de urea. mg prot./minuto.

6.4 RESULTADOS

De acuerdo al análisis estadístico utilizando la prueba t de Student, se observaron diferencias significativas entre el grupo experimental y el control en el peso seco y en la actividad de arginasa.

Tabla 3. VALORES DE DIFERENTES PARAMETROS DETERMINADOS EN LA GLANDULA SUBMANDIBULAR EN RATONES TRATADOS Y NO TRATADOS CON DZ*.

	CONTROLES		EXPERIMENTALES			
	Hembras	Machos	5 días	10 días▲	15 días	20 días
Peso húmedo	69.2	120.2	80.2	123	76.2	74.8
(mg)	±5.5	±16.5	±6.9	±35.1	±10.3	±5.8
Peso seco	102.7	78.2	144.3	111	126.4	141.2
ug ps/mg tej	±1.29	±1.21	±11.3	±34.8	±22.9	±19.04
Proteínas	268.7	247.4	443.4	240.1	291.4	321.3
ug prot/ug ps	±1.14	±1.14	±27.23	±97.34	±52.02	±48.46
Arginasa	15.1	10.8	6.06	6.4	7.14	7.66
ug urea/ug prot/min	±1.25	±1.28	±1.38	±3.10	±1.46	±2.55

* Se administraron 0.5 mg[▲] 1 ml

(Los valores representan el promedio de cada grupo.)

▲ El grupo estuvo constituido por machos

6.5 DISCUSION

Desde que las benzodiazepinas fueron introducidas al mercado, como agentes ansiolíticos, relajantes musculares, anticonvulsivantes y en tratamientos de pre-eclampsia, se han observado buenos resultados clínicos^(8,9,13).

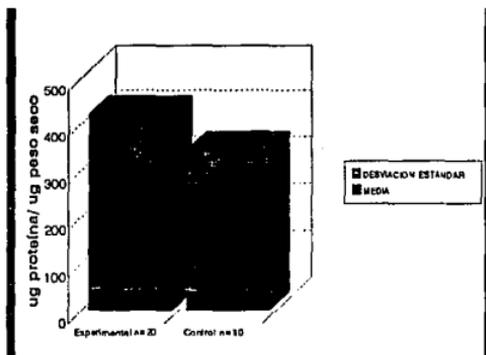
Pero a medida que se ha incrementado su uso, se han reportado los efectos adversos que pueden ocasionar. El Diazepam que es considerado el prototipo de las benzodiazepinas ha mostrado su potencial teratogénico sobre estructuras bucales, reportándose labio fisurado con o sin paladar hendido, además de úvula bifida e hipoplasia mandibular^(19, 21, 22). Ya que como registra Mandelli et al⁽¹⁵⁾ el Diazepam atraviesa la barrera placentaria después de 12 minutos de su administración intravenosa.

En adultos el Diazepam produce sedación y ataxia y en muy raras ocasiones a dosis muy elevadas la muerte, debido a parálisis respiratoria⁽⁹⁾.

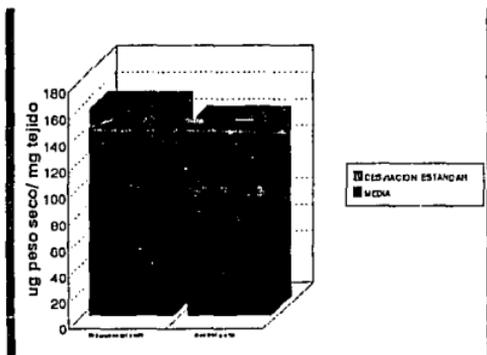
Sin embargo, en un estudio bibliográfico de los últimos 10 años no encontramos trabajo alguno que muestre desde el punto de vista bioquímico el efecto que pudiera tener el Diazepam en las glándulas salivales, aunque se sabe que tiene un ligero efecto antisialogogo⁽¹⁶⁾.

La dosis empleada en el presente estudio, si bien es más alta que la usada en el humano, en el ratón debe considerarse baja ya que éste elimina más rápidamente el Diazepam y sus metabolitos activos N-desmetildiazepam, oxazepam y glucoronido⁽²¹⁾.

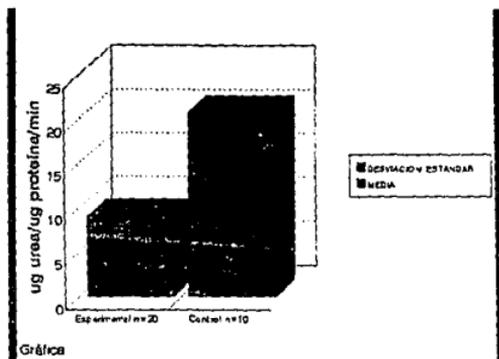
Nuestros resultados muestran que no existe diferencia significativa en la concentración de proteínas ($P < 0.085$) (gráfica 1), pero en lo referente al peso seco (gráfica 2) se observó un aumento considerable en el grupo experimental ($P < 0.049$) y por último en cuanto a la arginasa disminuyó significativamente su actividad en los ratones que recibieron este fármaco ($P < 0.033$) (gráfica 3)



Gráfica 1 Concentración de proteínas en glándulas submaxilares de ratones de la cepa CD1 tratados y no tratados con Diazepam (0.5 mg/0.1 ml X vía I.P.)



Gráfica 2 Determinación de peso seco de glándulas submaxilares de ratones de la cepa CD1 tratados y no tratados con Diazepam (0.5 mg/0.1 ml X vía I.P.)



Gráfica 3 Determinación de la actividad de arginasa en glándulas submaxilares de ratones de la cepa CD1 tratados y no tratados con Diazepam (0.5 mg/0.1 ml X vía I.P.)

6.6 CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos nos permiten concluir que la función de la glándula submandibular puede ser afectada por el Diazepam y como consecuencia la actividad de enzimas que como en el caso de la arginasa contribuye a la buena calidad de la saliva a través de la formación de la ornitina sustrato natural para la síntesis de poliaminas

Es posible que la disminución en la actividad de la arginasa que se observa en presencia del Diazepam se deba en parte a la xerostomía que se produce como un efecto colateral con la administración de este fármaco.

Se desconoce el efecto del Diazepam sobre otras glándulas por lo que estos estudios quedan pendientes de realizarse.

VII. BIBLIOGRAFIA

- 1.- Testut, L. y Latarjet, A: Tratado de Anatomía Humana. Tomo IV
9ª edición, Salvat editores S.A. Barcelona España 1977.
- 2.- Mason, D. K. and Chisholm, D. M. : Salivary Glands in Health and Disease. Printed at the Lavenham Press Ltd. Lavenham, Suffolk, England. 1975.
- 3.- Ham, A. W. y Cormack D. H: Tratado de Histología. 8ª edición. Nueva editorial Interamericana. Méx. D.F. 1984.
- 4.- Russell, W.L: Biology of the laboratory mouse. 1953, 112-115.
- 5.- Baker, Linsey and Weisbroth: The laboratory rat researchs applications. Vol.II, 1980, 64-65.
- 6.- Earl G.: Biology of the laboratory mouse. 2ª edición 1966, 275-276.
- 7.- Bradley, R.M: Fisiología Oral. Ed. panamericana Mex.1984, 126- 132.
- 8.- Goodman-Gilman: Las bases farmacológicas de la terapeutica. 7ª edición, ed. Panamericana, Mex. 1984.
- 9.- Goth, Clark y Braker: Farmacología clínica. 12ª edición, ed. Panamericana, Mex. 1990.
- 10.- Lulman, H. Mohr, K. Zielger: Atlas de farmacología. Masson-Salvat. Med. Barcelona 1992.
- 11.- Singlas E: Benzodiazepines. Facteur de variation des parametres pharmacocinetiques et interaccions medicamenteuses. L'encephale 1983; IX 67B-73B.
- 12.- Hillestad, L. Hanssen, T. Melson, H.and Drivenes A: Diazepam metabolism in a normal man. Clin, Pharmacology Ther. 1974, 16: 479-489.
- 13 - Boyer. P: Concentrations plasmatiques et activité clinique des benzodiazepines. L'encephale 1983; 59B-65B.
- 14.- Giorgi, O. Corda, M.G. Fernández, A. and Biggio, S: The abstinence syndrme in diazepam-dependents cats is precipited by Ro.15-1787 and 15-4513 but no benzodiazepines receptor antagonist ZK-93426. Neurosci lett 1988; 88 : 206-210.
- 15.- Mandelli, M Morselli, P. Nordi, S. and Pardi, G: Placental transfer and its disposition in the new born. Clin. Phar. Ther. 1975. 17: 564-571.
- 16.- Kanto, J: Benzodiazepines as oral premedicants. Br. J. Anaesth. 1981; 53; 1179.

- 17 - Kellog, C.K. Primus, R.E. and Bitran D: Sexually dimorphic influence of prenatal exposure to diazepam on behavioral responses to environmental challenge and on aminobutyric acid (GABA) stimulated chloride uptake in the brain. *J. Phar. Exper. Ther.* 1991; 256: 259-265.
- 18.- Czeizel, A: Diazepam-Pheatin and etiology of cleft lip and or cleft palate. *Lancet* 1975, 13: 489.
- 19.- Saxen, I. Saxen, L: Association between maternal intake of diazepam and oral clefts. *Lancet* 1975, 13: 489.
- 20.- Cano, J.P: Notion de demi-vie et metabolisme des benzodiazepines. *L'encephale* 1983, IX : 75B-80B.
- 21.- Livezey, G.T. and Marczynsky, T: Exposure to diazepam: Late postnatal teratogenic effect. *Neurobehavioral Tox Ter.* 1986; 8: 433-440.
- 22.- Laegreid, L. Olegard, R. and Wahlstrom, C: Teratogenic effects of benzodiazepines use during pregnancy. *J. Pediatric.* 1989, 114: 126-131.
- 23.- Safra, M.J. and Oakley, G: Association between cleft lip with or without cleft palate and prenatal exposure to diazepam. *Lancet* 1975; 13: 478-480.
- 24.- Laegreid, L. Olegard, R. Wahlstrom, J. and Conradi, N: Abnormalities in children exposed to benzodiazepines in utero. *Lancet* 1987; 10: 108-109.
- 25.- Simmons, R. Miller, R.K. and Kellog, C.K: Prenatal exposure to diazepam alters central and peripheral responses to stress in adult rat offspring. *Brain RES.* 1984. 307. 39-46.
- 26.- Olive, G. and Gey, E: Benzodiazepines et grossesse. *L'encephale* 1983 IX; 87B-96B.
- 27 - Kellog, C.K. Tervo, D. and Ison, J. Prenatal exposure to diazepam alters behavioral development in rats. *Science* 1980; 207: 205-207.
- 28.- Laegreid, L. Olegard, R. Conradi, N. and Hagberg: Congenital malformations and maternal consumption of benzodiazepines. A case control study. *Dev. Med. and Child Neur* 1990, 32: 432-441.
- 29.- Kanto, J. Altonen, L. Liukko, P. and Mäenpää: Transfer of lorazepam and its conjugate across the human placenta. *Act. Phar. Tox.* 1980; 47: 130-134.

- 30 - Erkkola, R. Kanto, J. and Sellman, R.: Diazepam in early human pregnancy. Act Obstet. Gynec. Scand. 1974; 53: 135-138.
- 31.- McCarty, G.T. O'Connell, B. and Robinson, A: Blood level of diazepam in infants of two mothers given large doses of diazepam during labour. J. Obstetrics and Gynecology of the British Commonwealth 1973; 86: 3349- 3352.
- 32.- Gillberg, C: "floppy infant syndrome" and maternal diazepam. Lancet 1977; 30: 244.
- 33.- Cree, J.E. Meyer, J. and Harley, D.M: Diazepam in labour, its metabolism and effect on the clinical condition and thermogenesis of the new born. British Med. J. 1973; 4: 251-255.
- 34.- Murray K. Robert: Bioquímica de Harper. 11ª edición, México D.F. 1988. Ed. El manual moderno.
- 35.- Mendez, J.D: Poliaminas, en Bioquímica e Inmunología. Hicks, J.J. y Diaz-Zagoya, J.C. (Eds). Facultad de Medicina UNAM, México D.F. 1989. pp 370-374.
- 36.- Lowry, O.H. and Rosebrough, N.J: Protein measurerent with the Folin-Phenol reagent. J. Biol. Chem. Vol. 193, 1951; pp 83-84.
- 37.- Mendez, J.D. Bernal, A. y Rosado A: Determinación rápida del peso seco por colorimetría. Arch. Invest. Méd. México 12: 83, 1981.
- 38.- Geyer, J.W. and Dabich, D: Rapid method for determination of arginase activity in tissue homogenates. Anal. Biochem. 39: 412- 417, 1971.