

Medicentro 2001; 5(1)

INSTITUTO SUPERIOR DE CIENCIAS MÉDICAS
"DR. SERAFÍN RUIZ DE ZÁRATE RUIZ"
SANTA CLARA, VILLA CLARA

ARTÍCULO ORIGINAL

Efecto de la aspirina y diazepam sobre la fosfatasa alcalina de placenta humana

Por:

M.Sc. Jesús Alfonso Rodríguez¹ y Dra.C. María Boffill Cárdenas²

1. Master en Ciencias Bioquímicas. Profesor Auxiliar. ISCM-VC.
2. Dra. en Ciencias Médicas. Profesora Titular de Bioquímica.

RESUMEN

Se utilizaron 41 placentas de madres normales, obtenidas del Hospital Provincial Docente Ginecoobstétrico "Mariana Grajales" de Santa Clara, para conocer si la presencia de los fármacos estudiados (aspirina y diazepam) provocaban afectación de la enzima fosfatasa alcalina placentaria, así como determinar los tipos de inhibición enzimática que provocan dichos fármacos. La actividad de la fosfatasa alcalina fue ejecutada por el método de King-Deloy. Se determinó la actividad enzimática en presencia y en ausencia de los fármacos; para ellos se utilizaron dosis de 0,01, 0,05 y 0,10 mg/ml. La inhibición enzimática se determinó por el método de Lineweaver-Burk. El conocimiento del nivel de significación de la actividad enzimática se obtuvo mediante la prueba t de Student para comparación de muestras pareadas. La actividad de la enzima fue disminuida de forma significativa para ambos fármacos. La aspirina provocó una inhibición enzimática de tipo mixta lineal, y el diazepam, una inhibición de tipo acompetitiva.

Descriptor DeCS: aspirina/farmacología, diazepam/farmacología, fosfatasa alcalina/efectos de drogas, placenta/efectos de drogas

SUMMARY

Forty-one placentas of normal women obtained from the Provincial Teaching Gyneco-Obstetric Hospital "Mariana Grajales" of Santa Clara city were used to find out if the study drugs (aspirin and diazepam) affected the placental alkaline phosphatase enzyme, and to establish the types of enzyme inhibition caused by these drugs. The activity of alkaline phosphatase was determined using King-Deloy's method. The enzyme activity was determined with and without these drugs; doses of 0,01, 0,05 and 0,10 mg/ml were used. Enzyme inhibition was established using the Lineweaver-Burk's method. Significance of enzyme activity was obtained by means of the Student-t test for comparing our matched pairs. The activity of this enzyme significantly decreased with both drugs. Aspirin caused an enzymatic inhibition of the lineal mixed type, and diazepam one of the competitive type.

Subject headings: aspirin/pharmacology, diazepam/pharmacology, alkaline phosphatase/drug effects, placenta/drug effects

INTRODUCCIÓN

Uno de los logros más notables obtenidos por la Salud Pública en Cuba ha sido disminuir el índice de mortalidad infantil a nivel de los países desarrollados y, en ocasiones, los resultados han sido superiores a los que han logrado algunos de estos países, lo cual se debe a las medidas que el Ministerio de Salud Pública ha puesto en práctica en relación con el cuidado y atención que les dedica a las embarazadas, desde que las mismas son detectadas por el sistema de atención primaria.

Debido a los logros alcanzados en relación con la reducción del índice de mortalidad infantil, cada día se hace más necesario realizar investigaciones dirigidas a profundizar en otras posibles causas que puedan afectar el buen desarrollo y crecimiento del feto, y con ello poner en riesgo la calidad de la vida del neonato.

Una de las dificultades que afrontan los facultativos que se han especializado en el estudio de las embarazadas lo constituye el uso de fármacos, por los riesgos que pueden implicar en el período gestacional¹; en la actualidad se ha incrementado la terapia medicamentosa, de la cual las embarazadas no están excluidas. Es muy importante tener en cuenta que casi todos los fármacos -en mayor o menor medida- atraviesan la barrera placentaria y, por ende, penetran altas concentraciones de los mismos en la sangre fetal, lo que trae consigo efectos nocivos para el feto, al no contar con los sistemas de destoxificación hepática².

Mediante estudios epidemiológicos se conoce que el número de mujeres que ingieren fármacos durante la gestación es extraordinariamente grande^{2,5}; sin embargo, no se presta mucha atención a las posibles reacciones adversas que pueden afectar la gestación y repercutir sobre la calidad de vida del neonato, como antes expresamos.

Se sabe que el uso de aspirina, cafeína, diazepam y fenobarbital -entre otros fármacos-, durante el período gestacional, puede producir diversas alteraciones: bajo peso al nacer, parto y embarazos prolongados, abortos espontáneos, retardo del crecimiento, nacimientos prematuros y malformaciones congénitas.

Los objetivos que se persiguen en este trabajo son determinar si existe afectación en la actividad de la fosfatasa alcalina en homogeneizado total de placenta humana en presencia y en ausencia de aspirina y diazepam, así como los posibles tipos de inhibición enzimática que provoca la acción de estos fármacos.

MÉTODOS

Se utilizaron placentas de madres normales que fueron atendidas en el Hospital Provincial Docente Ginecoobstétrico "Mariana Grajales" de Santa Clara, para cuya selección se procedió a la aplicación de una encuesta o formulario donde se recogían los aspectos relacionados a continuación: nombre, edad, escolaridad, número de historia clínica, paridad, edad gestacional, peso del recién nacido y cualquier enfermedad no asociada que pudo haber presentado la madre durante el embarazo. Para ser incluido en el presente trabajo se tuvo en cuenta que el Apgar del neonato estuviera dentro de los límites normales y su peso fuera superior a los 2500 g; por su parte, la madre no podía haber presentado ninguna enfermedad durante el embarazo y su parto debió haber sido fisiológico y a término.

Las placentas fueron homogeneizadas según el método de Boffill⁶.

La actividad de la fosfatasa alcalina (EC 3.1.3.1) se determinó con la utilización de beta glicerofosfato 16 mmoles/l como sustrato, en solución amortiguadora veronal 0,02 moles/l a pH 8,6. La reacción comenzó cuando 0,4 ml del homogeneizado diluido 1 en 10, se le añadió a 0,1 ml de la mezcla de solución amortiguadora y sustrato. La mezcla de reacción se incubó a 37°C durante una hora. La reacción enzimática se detuvo por la adición de 2,5 ml de ácido tricloro

acético al 10 %; posteriormente se centrifugó a 300 rpm durante 10 minutos, y el fósforo liberado por la acción de la enzima se cuantificó para calcular su actividad.

La determinación de la actividad enzimática siempre fue realizada dentro de las 72 horas posteriores a la preparación de la muestra.

Todas las determinaciones enzimáticas se efectuaron con un blanco enzima, para corregir las interferencias que pudieran provocar otros componentes del homogeneizado.

La totalidad de las mediciones se realizaron por duplicados, se utilizaron reactivos puros para análisis y agua bidestilada.

La actividad de la fosfatasa alcalina en presencia de los fármacos se realizó con 20 placentas, y se determinó de forma simultánea para la aspirina y el diazepam.

Las concentraciones de los fármacos fueron de 0,01, 0,05 y 0,10 mg/ml para ambos.

La determinación enzimática en presencia de los fármacos se efectuó mediante la adición de los mismos en el volumen de dilución del homogeneizado, de tal manera que en la mezcla de incubación se obtuvieran las concentraciones del fármaco usado en los tratamientos con altas dosis, y las otras dos concentraciones fueron mucho más altas, para que nos permitiera analizar su correlación con las concentraciones de los fármacos empleados, en el caso de que se produjera disminución de la actividad de la enzima.

La determinación de la inhibición enzimática provocada por la aspirina y el diazepam se realizó mediante 21 placentas: 13 placentas con la aspirina y 8 con el diazepam. El estudio se realizó por el método de Lineweaver-Burk, con la utilización de concentraciones de 0,1 mg/ml para los fármacos, en un rango de 0,51 a 2,56 mmoles/ml del sustrato.

La determinación de las proteínas totales en los homogeneizados placentarios se obtuvo por el método de Lowry⁷ y fue empleada como patrón albúmina bovina 0,1 mg/ml.

El nivel de significación de la actividad enzimática de la fosfatasa alcalina en ausencia del fármaco y en presencia de las tres concentraciones diferentes se obtuvo mediante el método de distribución de la prueba t de Student para muestras pareadas, después de haber probado el ajuste a distribución normal de los datos por el método de Kolmogorov Smirnov.

RESULTADOS

La actividad de la fosfatasa alcalina frente a los diferentes fármacos empleados se muestra en la tabla. El efecto de la aspirina fue disminuir significativamente la actividad de esta enzima cuando se empleó la concentración menor, y resultó muy altamente significativa en las concentraciones intermedias y mayor.

Tabla Efecto de los fármacos estudiados sobre la actividad de la fosfatasa alcalina.

Fármaco	Concentración Mg/ml	Actividad enzimática mU/mg prot	Media de la diferencia	Tc	Significación
Aspirina	0,00	35,72±15,82	0	0	0
	0,01	32,67±15,43	3,05	3,215	< 0,05
	0,05	27,19±14,23	7,93	7,308	< 0,001
	0,10	25,63±15,72	10,93	6,238	< 0,001
Diazepam	0,00	35,72±15,82	0	0	0
	0,01	34,83±15,03	0,89	1,108	> 0,05
	0,05	32,45±14,25	3,27	2,434	< 0,05
	0,10	30,93±12,15	4,79	2,902	< 0,05

El diazepam disminuyó significativamente la actividad de esta enzima cuando se puso en el medio de reacción este fármaco en concentraciones de 0,05 mg/ml y 0,10 mg/ml, y fue no significativa en la concentración menor de 0,01 mg/ml.

En las figuras 1 y 2 se observa que la fosfatasa alcalina placentaria fue inhibida por la aspirina a través de una inhibición de tipo mixta lineal, mientras que en el caso del diazepam, la inhibición de la enzima se produjo por un mecanismo de inhibición de tipo acompetitiva.

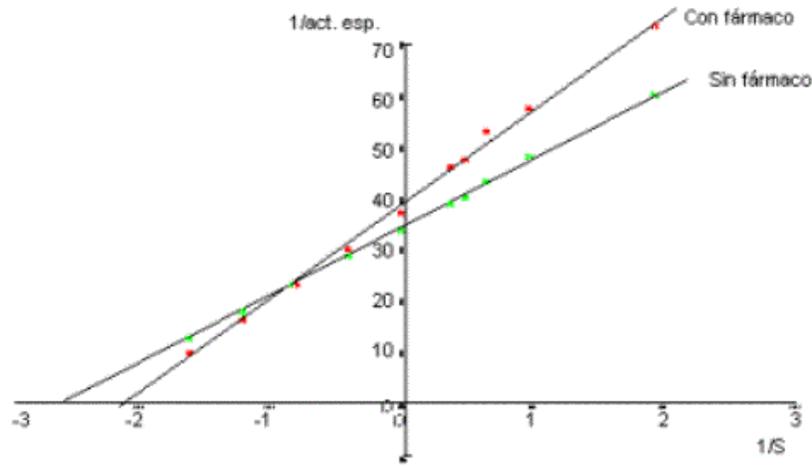


Figura 1 Inhibición enzimática de la fosfatasa alcalina con la aspirina.

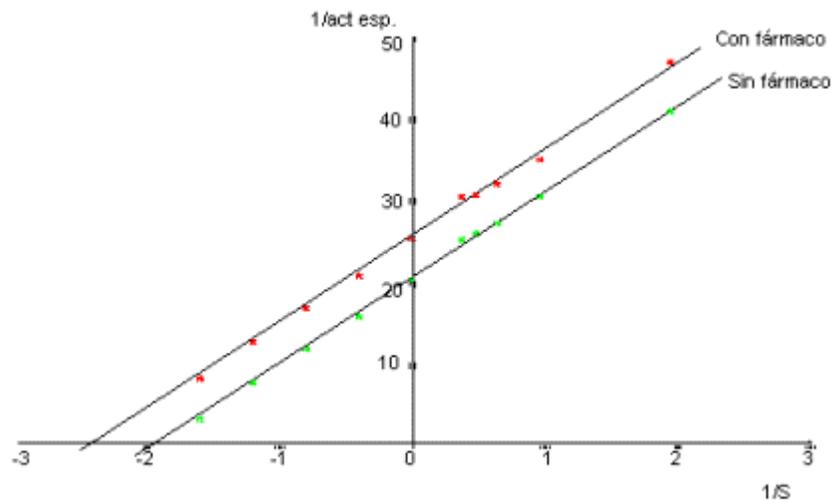


Figura 2 Inhibición enzimática de la fosfatasa alcalina con diazepam.

DISCUSIÓN

Sorrouitte y Zhao^{8,9} afirman que la fosfatasa alcalina se halla en altas concentraciones en tejidos que están asociados con el fenómeno de transporte, entre los que se encuentran las microvellosidades del sincitiotrofoblasto, y es este el lugar donde la sangre materna tiene acceso directo al feto. Griffin¹⁰ reafirma lo anterior, al plantear que una función importante de la fosfatasa alcalina en algunas membranas es su participación en el transporte activo de fosfato inorgánico, grasas, proteínas, carbohidratos, y en los mecanismos de transporte de sodio y potasio. Estos criterios nos llevan a afirmar que la fosfatasa alcalina placentaria humana podría tener una importante función en el transporte de nutrientes de madres a fetos, lo cual es vital para un

adecuado desarrollo y crecimiento fetal, y la misma puede verse afectada por la acción de la aspirina y el diazepam.

Se ha planteado que la fosfatasa alcalina, dentro del citoplasma, participa en la regulación de los procesos intracelulares, como el mantenimiento de metabolitos fosforilados a través de la síntesis o escisión de enlaces de ésteres fosfóricos¹⁰. La hidrólisis de este tipo de enlace en los sistemas biológicos por parte de la fosfatasa alcalina, se ha reconocido como un proceso importante, como una vía de transducción de señales celulares¹¹.

Tres funciones bioquímicas fundamentales se han atribuido "in vitro" a la fosfatasa alcalina, entre las que se encuentra la de poseer actividad de proteínfosfatasa¹².

La fosfatasa alcalina de mamífero desfosforila una variedad de proteínas que contienen residuos de fosfotirosina, por lo que esta enzima puede estar involucrada en la regulación celular por mecanismos de fosforilación reversible (fosforilación-desfosforilación)¹³.

Es evidente que la ingestión de aspirina y diazepam puede afectar el equilibrio dinámico que se establece entre los procesos que se regulan por este mecanismo, por el aumento o disminución de la actividad de la fosfatasa alcalina, así como los mecanismos de transducción de señales.

Según Shinozaki y Pritzer¹¹, estudios recientes han sugerido que dentro de las funciones biológicas que desempeña la fosfatasa alcalina se encuentra su participación y aporte al metabolismo energético celular, el cual puede estar asociado con la actividad pirofosfatásica que también posee esta enzima.

Esta actividad pudiera facilitar que en la placenta se ejecuten termodinámicamente procesos metabólicos tan importantes como la biosíntesis de proteínas y de colesterol, entre otros. Este aporte energético, en el cual parece participar la fosfatasa alcalina, puede verse comprometido por la acción de la aspirina y del diazepam, y con ello afectar el bienestar fetal.

Se conoce que la fosfatasa alcalina tiene una función decisiva en el proceso de mineralización ósea^{14,15}. Esta enzima, como se ha dicho, participa en el transporte de fosfato inorgánico, debido a la actividad de pirofosfatasa que se atribuye a ella, lo que permite regular el proceso de calcificación ósea^{10,11}. Esta regulación se debe a que la fosfatasa alcalina está involucrada en la degradación extracelular del pirofosfato, un potente inhibidor de la deposición del fosfato de calcio¹⁶.

La presencia del diazepam podría provocar una disminución en el metabolismo del fósforo y del calcio, lo que no permitiría una adecuada mineralización del esqueleto fetal.

Se ha demostrado que la fosfatasa alcalina cumple los requisitos necesarios que permiten la transmisión de anticuerpos funcionales para los fetos, ya que esta enzima tiene el potencial para actuar como un receptor Fc, cuya presencia es necesaria para proveer al feto de IgG materna como una adquisición de inmunización pasiva durante la gestación^{17,18}. La utilización de aspirina y diazepam pudiera entorpecer el adecuado nivel de inmunización del feto.

La disminución de la actividad de la fosfatasa alcalina debido a la inhibición de tipo mixta lineal provocada por la aspirina, se caracteriza porque se afectan tanto los valores de velocidad máxima, como los de la constante de Michaelis de una reacción enzimática. Esta inhibición puede ser considerada como una mezcla de inhibición competitiva (Ib) y de tipo no competitiva (IIa ó IIb).

La caída de la actividad de la fosfatasa alcalina, debido a la inhibición incompetitiva o incompetitiva pura provocada por el diazepam tiene como característica que el inhibidor no se une a la enzima libre, sino que se une de forma reversible al complejo ES y forma un complejo ESI no productivo. En esta inhibición se pone de manifiesto una disminución de la velocidad máxima de la reacción y de su constante de Michaelis.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Larivara P, Hartikaivien A, Rantakallo P. Use of Psychotropic drug and pregnancy out come. *J Clin Epidemiol* 1996;49:1309-1313.
2. Simone C, Derewlany LO, Karen G. Drug Transfer across the placenta. Consideration in treatment and research. *Clin Perinatal* 1994;12:468-481.
3. García I, Beyens MN, Gauchoux R, Guy C, Ollagnier M. Drug Prescription for pregnant women in the department of the Loire. *Therapie* 2000;55:605-611.

4. Perault MC, Farreliere S, Minet P, Remblrier C. Benzodiazepines and pregnancy. *Therapie* 2000;55:587-595.
5. Cayol V, Coreos M, Clervoy P, Speranza M. Pregnancy and drug abuse: current situation and therapeutic strategies. *Ann Med Interne* 2000;151(SupplB):B206.
6. Boffill M. Actividad maltásica en la placenta humana. *Medicentro* 1986;2:100.
7. Lowry OH, Rosebrought N, Farr AI, Randali RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951;183:265-275.
8. Sarroulhe D, Metaye T, Rivet G, Lalegerie J, Bawdry M. Stabilization of phosphointermediates of rat liver plasma membrane alkaline phosphatase by uncompetitive inhibition. Relation with phosphatase into hepatocytes. *Cell Mol Biol* 1993;38:469-477.
9. Zhao M, Hundal HS. Identification and biochemical localization of a Na-K-Cl co-transport in the human placental cell line Be Wo. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;274:43-48.
10. Griffith J. Alkaline Phosphatase. Newer concepts in isoenzymes and clinical applications. *Clin Lab Med* 1989;9:717-729.
11. Shinozaki T, Pritzker K. Regulation of alkaline phosphatase: implications for calcium pyrophosphatase dihydrate crystal dissolution and other alkaline phosphatase functions. *J Rheumatol* 1996;23:667-683.
12. Van Hoof VD, De Broe E. Interpretation and clinical significance of alkaline phosphatase isoenzyme patterns. *Crit Rev Clin Lab Sci* 1994;31:197-293.
13. Scott MT, Morrice N, Ball KL. Reversible phosphorylation at the C-terminal regulatory domain of p21 modulates proliferating cell nuclear antigen binding. *J Biol Chem* 2000;275:11529-11537.
14. Couttenye MM, D Haese PC, Van Hoof VD, Lemoniatou E, Goodman W, Verpooten Ga, et al. Low serum levels of alkaline phosphatase of bone origin: a good marker of adynamic bone disease in haemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant* 1996;11:1065-1072.
15. Crofton PM, Stirling HF, Shounaunt E, Keinart EI. Bone alkaline phosphatase and collagen markers as early predictors of height velocity response to growthpromoting treatments in short normal children. *Clin Endocrinol* 1996;44:385-394.
16. Risteli L, Risteli J. Biochemical markers of bone metabolism. *Ann Med* 1993;25:385-393.
17. Stefaner I, Stefanescu A, Hunziker W, Fuchs R. Expression of placental alkaline phosphatase does not correlate with IgG binding, internalization and transcytosis. *Biochem J* 1997;327:585-592.
18. Accueso G, Rojas S, Ramírez M, Bravo J. Transport and metabolism of adenosine in the perfused human placenta. *Placenta* 1995;16:611-622.