

89
24

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO



FACULTAD DE CIENCIAS

FUNCION DEL PIROFOSFATO DE TIAMINA O
COCARBOXILASA COMO REGULADOR
EN LA INCORPORACION DE LOS
CARBOHIDRATOS A LOS TEJIDOS

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

B I O L O G O

P R E S E N T A :

ELIZABETH GUZMAN TOLEDO

Asesor. Ma. Teresa Benítez Rodríguez



México, D.F.

1992

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



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

AGRADECIMIENTOS	I
DEDICATORIAS	II

Capitulos	Pdginas
1. Resumen	2
2. Introducción	4
3. Antecedentes	11
4. Características Fisicoquímicas y Bioquímicas del pirofosfato de tiamina	20
5. Hipótesis	27
6. Objetivos	28
7. Métodos	
7a Parte I	29
7b Parte II	33
8. Resultados	
Parte I	36
Parte II	49
9. Discusión	57
10. Conclusiones	66
11. Bibliografía	69

1 RESUMEN

Las terapias tradicionales utilizadas para el control de la diabetes mellitus como son: hipoglucemiantes orales, insulina y dietas, han demostrado que no son tan eficientes, ya que no siempre permiten controlar el padecimiento; además de los efectos secundarios inmediatos que pueden desencadenar estas sustancias como la hipoglucemia, anorexia, náusea, vómito, prurito, entre otros.

En este trabajo, 20 pacientes con diabetes mellitus tipo II (no insulino dependientes), fueron sometidos a un tratamiento con base en pirofosfato de tiamina (PPT) o cocarboxiasa estable en solución.

En un tiempo de 6 meses el 70% de los pacientes tratados con dicha coenzima, normalizaron sus glucemias, además de que no presentaron efectos colaterales.

Los pacientes diabéticos disminuyeron los niveles de glucosa sérica después de la aplicación del PPT y en sujetos control, se mantuvieron dentro de lo normal, por lo que se piensa en la posibilidad de que puede actuar como un regulador en la concentración de la glucosa circulante.

Los experimentos *in vitro* confirman que el PPT actúa en las células, dado que en el suero, en donde no las hay, las lecturas

de glucosa fueron constantes durante el tiempo en que duraron las pruebas, y en la sangre, donde estan presentes los eritrocitos, si ocurren cambios de concentración de glucosa.

Por los resultados obtenidos con la utilización del PPT, se sugiere que continuen los estudios a nivel molecular, para esclarecer el papel que ejerce en el metabolismo de los carbohidratos.

2 INTRODUCCION

Los sistemas biológicos, son considerados abiertos, ya que intercambian energía y materia con su medio, lo que les permite mantener sus condiciones con relativa estabilidad.

Una de las tareas más comunes de las células además de respirar, excretar, reproducirse, etc. es incorporar bajo condiciones normales los alimentos a su interior para cubrir sus necesidades vitales.

Para llevar a cabo esta actividad, la célula utiliza frecuentemente a la glucosa que proviene de fuentes exógenas, y que ha ingresado a compartimentos internos para ser procesada como es el caso del hígado (1). Específicamente en el hombre, la glucosa se encuentra en el plasma sanguíneo a una concentración de 80 mg/dl, cantidad variable en un intervalo entre 60 y 120 mg/dl, de donde ingresa a las células de todo el organismo (2). Para ello, requiere de varios factores, como los hormonales (adrenalina, somatotropina, etc), los enzimáticos (hexocinasa, glucocinasa, fructuosa 6-fosfatasa, etc), los iónicos (Mg, P, Na, K, Fe, etc), que permiten la traslocación de las moléculas de glucosa hacia el interior de la célula. Sin embargo, la glucosa es una molécula polar, característica que no favorece su incorporación a la célula, por lo que necesitará según el tipo de célula, de moléculas especiales que le permitan este fin, tales como iones (cationes divalentes), hormonas esteroideas, tiroideas, somatotropina etc. y especialmente de la insulina.

En condiciones patológicas, como es el aumento en la concentración de glucosa en la sangre, no hay un conocimiento completo de los factores que determinan la incorporación de la glucosa al interior de las células, que producen las consecuencias correspondientes; tal es el caso de la diabetes mellitus.

La diabetes es un trastorno metabólico de los glúcidos, causado por múltiples factores como la producción insuficiente o la utilización inadecuada de la insulina por el organismo (3).

Los casos de diabetes mellitus se clasifican principalmente en 2 grupos:

- a) Diabetes mellitus tipo I o Insulinodependientes (DID).
- b) Diabetes mellitus tipo II o No insulinodependientes (DNID).

a) La primera, es una forma grave que se acompaña de cetosis cuando el paciente no es tratado. Ocurre muy comunmente en jóvenes, pero en ocasiones en adultos, sobre todo en personas no obesas y en ancianos. Es un trastorno catabólico en el cual casi no hay insulina circulante, el glucagon plasmático se encuentra elevado y las células beta del páncreas no pueden responder a todos los estímulos insulinógenos, por lo tanto se requiere de insulina exógena para invertir el estado catabólico, prevenir la cetosis, reducir la hiperglucagonemia y hacer descender la concentración elevada de glucosa sanguínea (4).

b) La segunda representa a un grupo heterogéneo que comprende formas leves de diabetes que ocurren principalmente en adultos pero en ocasiones en jóvenes. La insulina endógena es suficiente para prevenir cetoacidosis pero con frecuencia es relativamente inadecuada ante las necesidades aumentadas de absorción de azúcar debido a la falta de sensibilidad en los tejidos.

Se define como: una forma no cetósica de diabetes que no está vinculada a los marcadores HLA en el sexto cromosoma; en que no se producen anticuerpos contra las células de los islotes; y no depende de tratamiento insulínico exógeno para mantener la vida del paciente, por lo que se denomina diabetes mellitus no dependiente de insulina.

En la mayoría de los pacientes con este tipo de diabetes, sea cual sea su peso corporal, se ha observado insensibilidad de los tejidos a la insulina. Entre este grupo hay una amplia gama de trastornos heterogéneos, que incluyen varios casos raros en los cuales un gen defectuoso para la insulina produce una insulina biológicamente inadecuada, sin embargo, en la mayoría de los pacientes con diabetes tipo II, la causa no se ha definido (4).

La sintomatología que presentan los pacientes afectados por este padecimiento consiste en:

Polifagia (aumento de apetito); polidipsia (sed excesiva);

poliuria (emisión de orina en cantidad superior al promedio normal diario); astenia (falta o pérdida de fuerzas), pérdida de peso (baja de peso corporal, aún cuando el apetito es normal o abundante.); cetonemia (aumento de grupos cetónicos en la sangre); cetonuria (aumento de cuerpos cetónicos en la orina); acidosis (aumento de la acidez o disminución de la alcalinidad de la sangre); visión borrosa recurrente, el prurito vulvar y la vaginitis son síntomas iniciales frecuentes en mujeres adultas con hiperglucemia o glucosuria, debidas a la deficiencia absoluta o relativa de la insulina (5).

Complicaciones crónicas:

Son diversas alteraciones que ocurren en la diabetes de larga duración, que de hecho pueden ser características inherentes de la enfermedad, tales como:

- Retinopatías: Que se manifiestan por microaneurismas, hemorragias dentro o delante de la retina, edemas de ésta y dilataciones venosas, exudados, formación de cataratas, glaucoma, y parálisis oculares. (6 y 7).
- Nefropatías: Se inician con proteinuria, Síndrome nefrótico, insuficiencia renal, infecciones pielorreñales y necrosis

papilar renal. (7 y 8).

- **Ateroesclerosis:** Insuficiencia coronaria, hipertensión ortostática, aterosclerosis cerebral, arteritis obliterante de los miembros inferiores, etc (7 y 8).

- **Neuropatías Periféricas y vegetativas:** Afectan los nervios tanto sensitivos como motores, de las extremidades inferiores, puede ocasionar microangiopatías, degeneración neuronal en cerebro y médula, infartos y hemorragias de cerebro relacionadas con la hipertensión (7 y 9).

- **Complicaciones cutáneas:** Infecciones de piel y vías urinarias; formación de xantomas, que crecen debajo de la epidermis y zonas glúteas. (7 y 10).

Debido a los problemas señalados, se considera de suma importancia el estudio de las alteraciones metabólicas, con el fin de encontrar una solución, ya que la diabetes es un problema de alta incidencia mundial con cifras que van de un 3 a un 10% y en ciertos grupos hasta del 30% de la población total (11), en México, la prevalencia de diabetes, en la población en general es del 2%, con tasas elevadas en poblaciones de edad más avanzada

(12), y que por su repercusión afecta a todos los estratos sociales y económicos de la población a nivel mundial.

La enfermedad está condicionada por múltiples factores externos (7), (Tabla 1.1).

Tabla 1.1: Factores causales de la diabetes mellitus.

- Parentesco consanguíneo.
- Obesidad.
- Edad.
- Ingestión de esteroides, diuréticos (tiazidas), anovulatorios, anticuagulantes.
- Alimentación hipercalórica e irregular.
- Lesiones traumáticas y tensión emocional

Por lo anteriormente mencionado y por los niveles de distribución que ha alcanzado esta enfermedad metabólica, se han hecho estudios acerca de las alternativas que pueden ayudar a resolver este problema.

Existe un factor coenzimático: el Fosfato de Tiamina (PPT), Descarboxilasa o Vitamina B₅, cuya presencia es indispensable en el organismo ya que su función, establece un punto importante en el metabolismo de los carbohidratos principalmente a partir de la obtención de piruvato, por lo que ayuda a que dicha molécula se integre al ciclo de Krebs y provoque como consecuencia que se genere energía; es por esto que se propone utilizar este compuesto como un método terapéutico dado que la diabetes es un problema metabólico (1).

En décadas pasadas se reportaron casos de diabetes que eran tratados con cocarboxilasa (13), pero por causas desconocidas dejó de utilizarse por mucho tiempo, probablemente porque uno de los problemas para manejar esta molécula, es que tiene una vida media muy corta en el medio externo, además de ser difícil de mantenerla estable en su forma activa en solución.

3 ANTECEDENTES

Desde principios de este siglo, se reconoce la existencia de la Tiamina, que es un precursor de la Vitamina B₁, en tejidos de animales y vegetales. En el hombre, se reconoció la importancia de su presencia cuando se observó que la deficiencia o ausencia de esta vitamina provocaba severos trastornos, por lo que se concluyó que el humano no la sintetiza, y por lo tanto, su obtención siempre es por los alimentos (14). Desde entonces hasta nuestros días, muchas investigaciones se han dirigido a resolver problemas resultantes de la carencia de este elemento que puede provocar neuropatías como el Beri-beri.

En oriente el Beri-beri era una enfermedad cuya incidencia aumentó drásticamente y millones de seres humanos sufrían sus efectos paralizantes (polineuritis), o morían a su merced.

En 1893, el médico Eijkman (15), mostró que la parálisis podía ser aliviada rápidamente con el suministro de un extracto de cascarilla de arroz, por lo que se llegó a la conclusión, de que el salvado de arroz contenía un componente nutritivo esencial que posteriormente se identificó como Tiamina, precursor de la vitamina B₁.

En 1911, dos investigadores, Neuberg y Karczarg (citado en 14), demostraron que las células de la levadura, convierten el piruvato en acetaldehído y bióxido de carbono. A partir de ahí, se empezó a sospechar de la existencia de un factor responsable

de esta reacción y se encontró que era una coenzima a la que llamaron Cocarboxilasa o PPT. Posteriormente se ha demostrado que dicha coenzima, descarboxila también a varios α -cetoácidos (16).

En 1912, el bioquímico polaco Casimir Funk (citado en 17), formuló la Teoría de la Vitamina, de acuerdo a la cual, las enfermedades como el Beri-beri, la Pelagra, el Raquitismo y el Escorbuto, eran consecuencia de la falta de cuatro elementos nutritivos indispensables en la dieta. Tales elementos son: la Vitamina B₁ o Tiamina, el ácido nicotínico o niacina, la Vitamina D o calciferol y la Vitamina C o ácido ascórbico, respectivamente. A estos componentes esenciales se les llama Vitaminas (aminas vitales), en virtud de ser compuestos aminados.

En 1915, McCollum y Davis (18), en la Universidad de Wisconsin en los Estados Unidos, habían reconocido que el crecimiento de las ratas dependía de dos factores accesorios; el primero de ellos, soluble en disolventes de grasa, fue llamado A, y al segundo que era soluble en agua lo designaron B. Además se demostró que este último curaba el Beri-beri en los pollos. Desde entonces, se tuvo conocimiento de la Vitamina B que fue llamada AntiBeri-Beri por sus efectos curativos. Posteriormente se le llamó Tiamina. Hacia 1926, Hansen y Donath (14) lograron aislar una pequeña cantidad de tiamina en forma de Clorhidrato de Tiamina (14).

En 1929, Peters (19), comenzó a estudiar el metabolismo

oxidativo del tejido cerebral en palomas deficientes de tiamina. Encontraró entonces, que una fase de oxidación del piruvato era muy bajo en los tejidos de las aves deficientes en tiamina y que se podía lograr corregir esta deficiencia en el metabolismo oxidativo del tejido cerebral a través de la adición de tiamina

Auhagen, el 1932 (20), demostró que la levadura seca pierde su actividad de Cocarboxilasa cuando es lavada con Buffer de fosfatos a un pH de 7.8, la actividad podría restaurarse con el ion Magnesio, más un cofactor termoestable desconocido presente en la levadura hervida o en extracto de tejido muscular. El nuevo cofactor llamado Cocarboxilasa fue aislado por Auhagen de la levadura en forma cristalina, posteriormente, Lohmann y Schuster (21), demostraron que el PPT o Cocarboxilasa era un éster de la tiamina.

En 1933, Williams (18), logró la preparación de una gran cantidad de la vitamina cristalizada a partir de los desperdicios de la molienda de arroz integral.

Ya para 1935 (14), se concluía que la Tiamina se convertía, en los tejidos vivos, en un derivado que pronto se identificó como un éster pirofosfatado. Se ha demostrado que la presencia de éste, es absolutamente esencial para el correcto funcionamiento de una serie de enzimas que causan la descarboxilación de los α -cetoácidos, la desintegración de las α -hidroxicetonas o las α -dicetonas.

De nuevo, en 1939, Peters y colaboradores (citado en 22), sugirieron que la tiamina se convertía en un derivado, y demostraron que la forma que realmente estimulaba la respiración mitocondrial era el difosfato de tiamina.

Fue para 1941 que Green y colaboradores (23), y Kubowitz y Luttgens (24), purificaron la carboxilasa, a partir de la levadura, por fraccionamiento de la sal. Este compuesto contenía 0.46% de difosfato de tiamina y 0.13% de magnesio. Ambos se desdoblaban fácilmente y producían de esta manera, una apoenzima inactiva. La actividad puede restaurarse por adición de la cocarboxilasa más un catión divalente metálico como Mg^{++} , Co^{++} , Cd^{++} , Ca^{++} , Zn^{++} , o Fe^{++} .

En 1943, Ugai y colaboradores (14), reportaron que la tiamina en soluciones medianamente básicas, cataliza la condensación del furfural a furoína. Más tarde, Misuhara (18) y Misuhara y colaboradores (25), demostraron bajo condiciones similares que la descarboxilación del piruvato a acetato acetofénico (reacción de diacetil mutasa), era una reacción relativamente lenta y por lo tanto más susceptible de estudio por lo que varios laboratorios se interesaron en ella.

En 1945 Salem (26), confirmó que la deficiencia de tiamina en las ratas provoca que excreten metil glioxal (CH_3COCHO) en la orina debido a que el hígado tiene muy baja actividad de glioxilasa, lo que permite la acumulación de metil glioxal. De lo anterior, se sugiere que su sintomatología puede ser consecuencia

de una intoxicación debida al metil glioxal. En este aspecto, a la fecha se desconoce el efecto que tiene la Tiamina.

Para tratar de esclarecer el papel de la tiamina Breslow (27), siguió la línea de Misuhara, y descubrió que el átomo de hidrógeno en la posición 2 del anillo tiazolio de la tiamina se intercambiaba fácilmente con el deuterio del agua; entonces propuso que el ión dipolar tiazolio, formado por esta disociación, es el intermediario clave en las reacciones de las enzimas dependientes de tiamina.

Holzer en 1956 (28), obtuvo una cocarboxilasa altamente purificada de la levadura, con una actividad 5 veces mayor que la obtenida anteriormente.

Von Muralt (29), confirmó, que la excitación de las fibras nerviosas aisladas causa la liberación de tiamina al medio circundante. Este investigador sugiere que el desdoblamiento de la tiamina en la membrana podría originar cambios de permeabilidad como los que se observan durante la conducción del impulso nervioso. La notable parálisis neural provocada por la deficiencia de tiamina, sugieren que ésta desempeña una acción especial en los nervios (30). Se ha sugerido que el difosfato de tiamina o posiblemente el trifosfato de tiamina desempeña un papel esencial en el sistema de transporte de sodio de las membranas de los nervios (31 y 32).

Existen reacciones enzimáticas dependientes de tiamina como

la que desempeña la transcetolasa, presente en el ciclo de las pentosas y en la fotosíntesis, sitios relacionados con el metabolismo, por lo que empezó a ser estudiada exhaustivamente en su función de coenzima.

Actualmente, esta coenzima ha sido amplia y profundamente estudiada en otros países, como la Unión soviética, por Yu V. Khemelevskii, A. I. Kornts Kaya, A. V. Gudzenko etc. en el Instituto de Kiev principalmente; en Polonia, por Wadya L. Swiecicki en el Instituto Médico Latniczej (33); en Estados Unidos, por varios autores (34); y en México, en el Instituto de Investigaciones Científicas Hans Selye, desde hace más de 25 años se ha logrado estabilizar en solución éste importante compuesto y prolongar su vida media por un intervalo hasta de cuatro años (35).

Se ha demostrado que la tiamina puede tener otras funciones independientes del metabolismo de los azúcares como:

- A) Favorecer la incorporación de los aminoácidos a los tejidos:

La cocarboxilasa, participa en la reacción oxidativa de los α -cetoácidos que se lleva a cabo en los riñones e hígado. Estos pueden ser reaminados para formar aminoácidos que son utilizados posteriormente por los tejidos del cuerpo como el corazón, cerebro, riñones e hígado entre otros (36).

B) En la síntesis de proteínas:

En condiciones normales y con una dieta adecuada que suministre al organismo la tiamina, los aminoácidos son incorporados al interior celular, así, las células pueden producir proteínas; en el caso de la deficiencia de tiamina, el suministro de proteínas decrece por falta de la incorporación de aminoácidos esenciales, lo que provoca que disminuya la síntesis de proteínas y por lo tanto disminuye el peso de los órganos de las ratas (37).

La falta de síntesis en cantidades normales de proteínas provoca deficiencias en el desarrollo celular, atrofia del páncreas y de la mucosa intestinal etc (36).

El PPT, como coenzima de la transcetolasa, desempeña un papel importante en la puesta a disposición de las pentosas para la biosíntesis de los ácidos nucleicos y con ello, de las proteínas. (37).

C) En la conducción del impulso nervioso:

Las manifestaciones neurológicas por falta de la coenzima pueden ser secundarias al trastorno del metabolismo de los carbohidratos o una baja producción de acetato activo, necesario para la síntesis de acetilcolina, para la transmisión del impulso nervioso a nivel de las sinapsis acetilcolinérgicas (38).

D) Otros sitios:

Se conocen 24 enzimas que contienen Pirofosfato de Tiamina como coenzima, pero en muchos casos se desconocen los mecanismos de acción (17 y 39).

Se sabe que el grupo de las carboxilasas se encuentra en abundancia en el reino vegetal (40), y generalmente se localiza en las células de los animales, unida permanentemente al complejo multienzimático de la piruvato deshidrogenasa. Todos los tejidos la contienen en diferentes cantidades, la almacenan y la eliminan en distintas formas; en algunos permanece por tiempo prolongado a pesar de no administrarse oralmente en tanto que otros tejidos la metabolizan o excretan rápidamente (14).

En ciertas condiciones, por ejemplo, cuando existe una insuficiencia enzimática o escasea el oxígeno en los tejidos, puede estar perturbado el mecanismo de la fosforilación de la vitamina B₆ a cocarboxilasa. En estos casos, a pesar de que el aporte de vitamina B₆ sea suficiente, se produce un aumento del nivel de ácido pirúvico en la sangre. Esta hiperpiruvicemia es por tanto, una consecuencia indudable del déficit de cocarboxilasa ya que falta la coenzima del catalizador para las transformaciones posteriores del ácido pirúvico. Las consecuencias de ese estado carencial se manifiestan, debido a la posición central del ácido pirúvico, en un grave trastorno del metabolismo. El aumento del nivel del ácido pirúvico en la sangre produce además un descenso evidente de la reserva alcalina (41 y 42).

Las investigaciones recientes han demostrado que toda una serie de enfermedades van acompañadas de un aumento evidente del nivel del ácido pirúvico. La hiperpiruvicemia se ha comprobado en el coma diabético y en la acidosis diabética, en la toxicosis gravídica y de los lactantes, en los vómitos acetoneémicos, y en descompensaciones graves del miocardio y del sistema circulatorio. En casos semejantes, no se logran normalizar los valores elevados del ácido pirúvico mediante la aplicación de vitamina B₁. Sólo el aporte de cocarboxilasa produce un descenso ostensible del nivel del ácido pirúvico, elevado patológicamente. Por eso puede suponerse la posibilidad de que en las enfermedades mencionadas y en algunas otras exista un trastorno en la fosforilación de la vitamina B₁ a cocarboxilasa (41).

4 CARACTERÍSTICAS FÍSICOQUÍMICAS Y BIOQUÍMICAS DEL Pirofosfato DE TIAMINA

Lehninger (1), reporta que el PPT, está constituido por una pirimidina substituida, unida a través de un puente metileno a un grupo tiazol substituido (Fig.1)

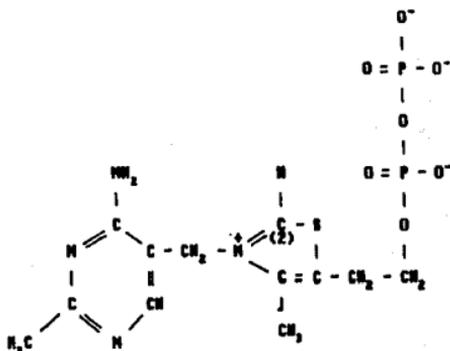


Fig. 1: Pirofosfato de tiamina (PPT) ó Cocarboxilasa (1).

Tiene un peso molecular de 460,79 Daltones; su aspecto es de un polvo blanco y cristalino; por exposición al aire absorbe rápidamente 4% de agua. Es altamente soluble en agua, e insoluble en el etanol, acetona, éter y benceno; es estable en seco y en solución a pH menor de 5.5, especialmente entre 2.7 y 3.4, el álcali la destruye; además, es un compuesto que se descompone con exposiciones prolongadas a las altas temperaturas. (43 y 44). Sus

formas comerciales son el mononitrato de tiamina y el clorhidrato de tiamina principalmente; (45). La vitamina B₁ o tiamina, pertenece al complejo B, y su forma activa es el pirofosfato de tiamina (PPT) que funciona como coenzima e ingresa al organismo por la dieta; es abundante en la carne de cerdo, víceras, germen de trigo, granos completos, cereales enriquecidos y pan. Se requiere por ser esencial en el metabolismo energético, especialmente en el de carbohidratos en relación con la producción de calorías (46).

El PPT, como grupo prostético, forma con varias proteínas específicas diversas enzimas que en el metabolismo del organismo humano y animal, catalizan transformaciones bioquímicas importantes (41).

El PPT juega un papel fundamental en el metabolismo intermediario de los carbohidratos, alcoholes y aminoácidos de cadena lateral. No se almacena en el organismo, pero dentro de él, se combina con el ATP para formar PPT o cocarboxilasa, que funciona como coenzima esencial, que interviene fundamentalmente en la descarboxilación de los alfa-ceto ácidos, importantes en la producción de energía. También actúa como coenzima en la vía de las pentosas, principal fuente del NADP reducido para la síntesis de ácidos grasos; su deficiencia provoca la acumulación de piruvato y lactato en el cuerpo, lo que causa diversos padecimientos, entre los cuales están el beri-beri, la anemia megaloblástica, la diabetes, la sordera, varias alteraciones cardiovasculares etc (47).

En la reacción para que el piruvato ingrese al ciclo de Krebs, se requiere de tres enzimas y 5 coenzimas que se organizan en un complejo multienzimático dentro de los que se incluye al PPT, como una de las coenzimas primordiales, para cumplir con este paso obligado de todos los glúcidos (Fig. 2), (18 y 48).

El PPT interviene específicamente en una primera etapa: (Fig. 2a)

- En la descarboxilación del piruvato (1), en que se convierte en el grupo α -hidroxietil del anillo tiazol.

En una segunda etapa: (Fig. 2b)

- Se deshidrogena, y el grupo acilo resultante se transfiere al átomo de azufre situado sobre el átomo 6 del ácido lipoico, para después convertir a éste en su forma reducida o ditiol (ácido dihidrolipoico), al transferirle dos átomos de hidrógeno del grupo hidroxietil del PPT al enlace disulfuro del ácido lipoico.

En una tercera etapa: (Fig. 2c)

- Se transfiere el grupo acetilo del ácido dihidrolipoico al grupo tiol de la coenzima A, que queda libre para entrar al ciclo de Krebs o de los ácidos tricarboxílicos.

En una cuarta etapa: (Fig. 2d)

- La forma ditiol del grupo lipoilo de la dihidrolipoil transacetilasa, se reoxida a su forma disulfuro a través de la lipoamida deshidrogenasa cuyo grupo prostético es el FAD.

En la quinta etapa: (Fig. 2e)

- El FAD ya reducido, posteriormente es reoxidado por el NAD⁺ dando lugar al NADH (1).

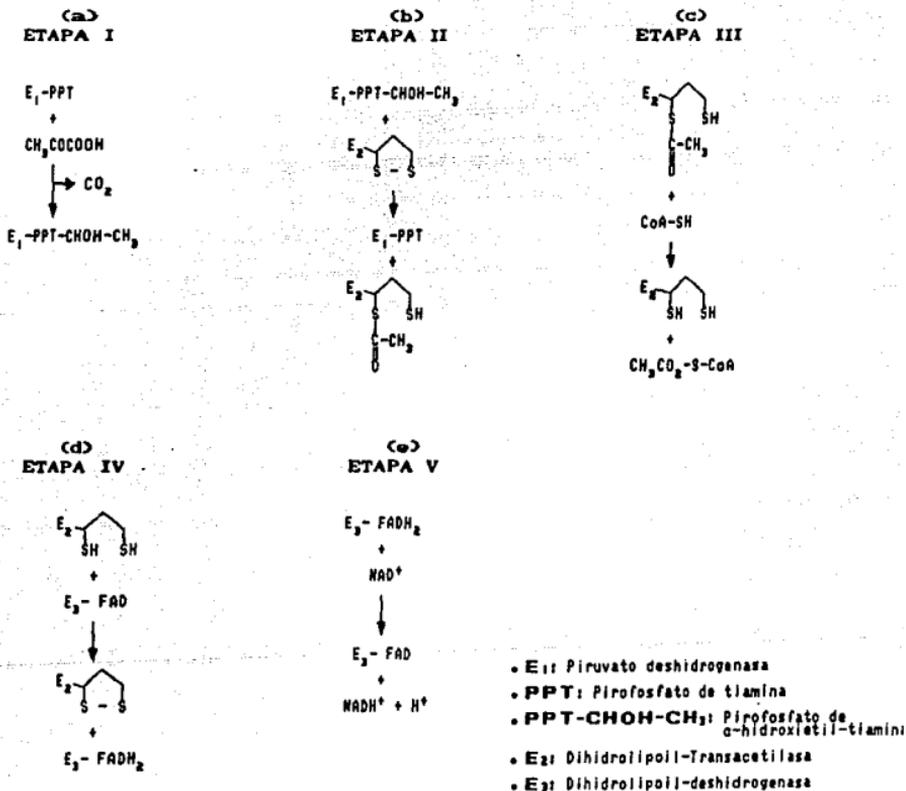


Fig. 2: Etapas de la oxidación del piruvato a acetyl CoA por el complejo de la piruvato deshidrogenasa-PPT.

Recientemente se ha demostrado que la tiamina en su forma fosforilada, interviene además en otros procesos metabólicos por ejemplo:

a) Dentro del Ciclo de la Oxidación del α -cetoglutarato a Succinil-CoA, reacción biológicamente irreversible en las células de los animales, análoga a la descrita anteriormente para la formación de la Coenzima A, donde se obtiene un producto altamente energético, la succinil-CoA (Fig. 3) (1).

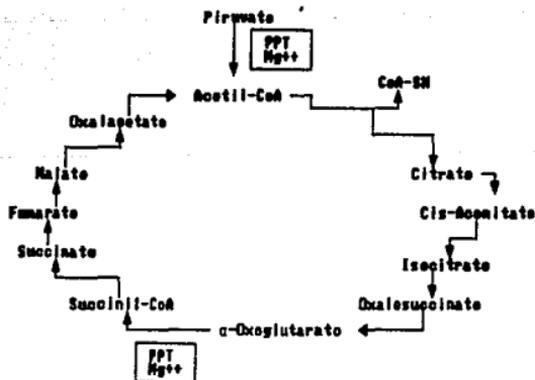


Fig. 3: Intervención del PPT dentro del ciclo de los ácidos tricarboxílicos.

b) También interviene en el ciclo de las pentosas:

La transcetolasa que contiene PPT efectúa la transferencia de un grupo gliceraldehído desde la D-Xilulosa-5-P a la D-Ribosa-5-P para obtener D-Gliceraldehído-3-P, intermediario de la glucólisis. En esta reacción, el grupo glicolaldehído es transferido en primer lugar de la D-Xilulosa al PPT y forma α -dihidroxietil, de una manera semejante a la descrita anteriormente, en la que es el transportador del aldehído que se transfiere finalmente a la D-Ribosa-5-P (Fig. 4) (1).

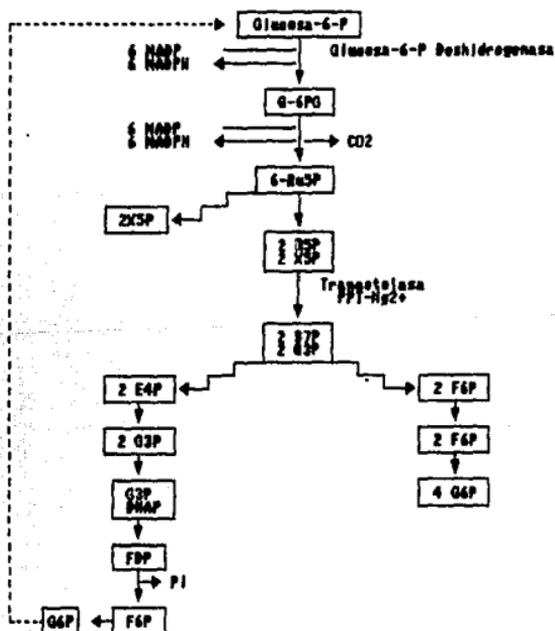


Fig. 4: Ciclo de los fosfatos de pentosas, ruta del fosfogluconato o desviación del monofosfato de hexosa.

En vista de la gran variedad de rutas ó vías metabólicas donde actua el PPT, es factible que contribuya en la utilización de la glucosa para la obtención de energía suficiente para las necesidades vitales de las células en general.

Debido al papel que el PPT desempeña en el metabolismo, en el complejo multienzimático en la descarboxilación del piruvato, es obvio que participa en el aporte energético, ya que favorece la formación de ATP, desde el momento en que permite que la glucosa ingrese al ciclo de Krebs (49).

5 HIPOTESIS

El PPT es un elemento esencial en la dieta, por lo que su incorporación por vía exógena en las dosis adecuadas, no debe provocar reacciones secundarias que afecten a los organismos en general; ya que su relación con el metabolismo es muy estrecha.

Por lo anterior, en este trabajo se utilizó el PPT estable en solución, administrado exógenamente, a individuos con deficiencias en la incorporación y/o utilización de la glucosa en las células, donde se espera, que contribuirá en la incorporación de la glucosa al interior celular, y entonces los niveles de glucosa desciendan en la sangre.

Para investigar sobre lo anterior, se plantean los siguientes objetivos.

6 OBJETIVOS

- 1- Estudiar a un grupo de pacientes diabéticos y a un grupo de sujetos normales a los que se administre PPT por vía parenteral, con el fin de observar el efecto que tiene dicha coenzima en cada grupo a nivel clínico.
- 2- Determinar en cada paciente diabético, los niveles de glucosa, colesterol, triglicéridos y hemoglobina antes, y después de someterlos al tratamiento con PPT y observar su evolución a nivel clínico y de laboratorio.
- 3- Estudiar el efecto del PPT en valores de glucosa con experimentos *in vitro* tanto en sangre como en suero.

7 METODOS

Se realizaron experimentos que se dividieron en dos partes:

- a- En el que se trabajó con personas diabéticas (hiperglucémicas) y controles (normoglucémicos).
- b- En la que se trabajó *in vitro* con sangre de caballo.

7a PARTE 1

Los criterios de inclusión de los pacientes diabéticos fueron:

- Diabetes tipo II diagnosticada clínicamente.
- Tiempo de evolución del padecimiento no mayor de 5 años. (ya que en experimentos anteriores se ha observado que el tiempo recuperación en individuos con diabetes de más de 5 años es mayor).

Los criterios de exclusión utilizados fueron:

- Infecciones sistémicas durante el último mes antes de iniciar el seguimiento.
- Embarazo.
- Menores de edad (18 años).
- Ingesta de anovulatorios.

- Ingesta de β -bloqueadores.
- Ingesta de hipoglucemiantes.
- Ingesta de esteroides y de hormonas en general.

Estos criterios de exclusión, se basaron en tratar de eliminar cualquier factor que contribuyera a un cambio de niveles de glucosa, que no fueran ocasionados por el PPT unicamente.

A cada paciente, se le informó ampliamente sobre la base del tratamiento, y se recabó su anuencia por escrito.

En esta parte se estudiaron 20 pacientes diabéticos y 29 normoglucémicos, los cuales fueron clasificados de la siguiente manera:

1. Hiperglucémicos tipo II (No insulino dependientes)
2. Normoglucémicos (Voluntarios sanos)

Los datos correspondientes a los pacientes diabéticos tipo I (insulino dependientes) no se muestran en el trabajo ya que la población era muy escasa.

A los pacientes diabéticos, se les realizó una historia clínica en donde los principales datos recabados fueron:

- 1-Edad
- 2-Sexo
- 3-Peso

- 4-Ocupación
- 5-Antecedentes diabéticos
- 6-Tiempo de padecimiento
- 7-Síntomas
- 8-Sígnos vitales y exploración clínica completa
- 9-Tipo de tratamiento al que se sometieron previamente
- 10-Tipo de dieta los últimos tres meses
- 11-Complicaciones cardiovasculares y neurológicas

Las glucemias en cada uno de ellos, fueron determinadas en condiciones de ayuno, las cuales se realizaron cada 15 días, durante un periodo total de 6 meses.

También se efectuaron análisis de laboratorio en los Laboratorios de instrumentación nuclear y aplicación de isótopos, en donde se determinó:

- *Biometría hemdtica.*
- *Química sanguínea.*
- *Curva de tolerancia (Técnica de Wilkerson) (50).*
- *Examen general de orina.*

Estas pruebas se llevaron a cabo antes, a la mitad y al finalizar el tratamiento con PPT.

Posterior al primer estudio de laboratorio, se les administró una dosis de tres mililitros (40 mg/ml) de PPT, por vía intramuscular diariamente durante dos semanas, después cada tercer día durante dos semanas, tres veces por semana durante un mes y dos veces por semana durante el siguiente mes. De acuerdo a la evolución del paciente, se hicieron ajustes a la dosis. Los

pacientes fueron sometidos a una dieta baja en carbohidratos.

Al grupo de normoglucémicos, se les determinaron las glucemias 3 veces, con un tiempo de diferencia de una semana entre cada medición, para obtener un promedio. Posteriormente se les aplicaron 3 ml de PPT, una vez por semana durante un mes. Después de una hora de cada aplicación, se les midió la glucemia.

El método utilizado, fue la lectura con el sistema *Reflolux II-Haemo-Gluco Test 20-800R*, que consiste en la determinación cuantitativa de glucosa en sangre a través de un fotómetro de reflexión digital y una tira reactiva que basa la determinación de glucosa en la reacción específica de glucosa oxidasa-peroxidasa.

Los valores de glucemias determinadas, se dan en mg/dl y el valor de referencia normal utilizado fue de 60 a 120 mg/dl.

7b PARTE II

En esta parte, se trabajó *in vitro* con sangre de equino, proporcionada por el departamento de Equinos de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM.

Se sabe que la glucemia normal en el caballo es de 90 mg/dl en promedio, valor que oscila de 70 a 130 mg/dl, muy parecida a la del humano (51).

Se utilizaron tanto la sangre completa como el suero, que fueron sometidos a condiciones iguales de trabajo.

En el trabajo experimental se utilizaron 8 tubos de ensayo, con capacidad de 10 ml, de los cuales, 4 fueron para sangre y el resto para el suero.

Para obtener el suero, se centrifugó la sangre a 3,000 rpm durante 3 minutos, 2 veces.

Todos los tubos se mantuvieron a una temperatura de 37 grados centígrados en una estufa de temperatura constante (Modelo Felisa).

A los tubos se les agregó las siguientes sustancias: (Tabla 7b.1 y 7b.2).

Tabla 7b.1: Tubos con sangre completa sometida a diferentes condiciones.

Tubo No:	1	2	3	4
SANGRE:	2ml	2ml	2ml	2ml
PPT:		.002ml		.002ml
Medio nutritivo Eagle			2ml	2ml

Tabla 7b.2: Tubos con suero sometido a diferentes condiciones

Tubo No:	5	6	7	8
Suero:	2ml	2ml	2ml	2ml
PPT:		.002ml		.002ml
Medio nutritivo Eagle			2ml	2ml

El medio nutritivo Eagle esta compuesto principalmente de una serie de aminoácidos esenciales y glucosa. Se utilizaron 2 ml (en cada tubo) de medio mínimo esencial de eagle, que entre otros componentes contiene glucosa en una concentración fisiológica de 90 mg/dl (52).

Se agregó el PPT a los tubos en una concentración proporcional al volumen que se administró a los pacientes, en la sangre y en el suero (.002 ml).

Una vez preparados los tubos, se les midió la concentración de glucosa, con el método utilizado anteriormente. Las lecturas se llevaron a cabo cada 15 minutos en un lapso de 3 horas de tiempo total.

8 RESULTADOS

PARTE I

De las muestras estudiadas, el 41% pertenecían a los diabéticos y el 51% a los voluntarios normales.

La edad promedio de los diabéticos, fue de 53 años; el 65% estuvo representado por el sexo femenino y el 35% por el sexo masculino.

En los individuos normales, la edad promedio, fue de 55 años, y el porcentaje de los sexos correspondió en un 59% a mujeres y el 41% a los hombres.

Los resultados se presentan en tablas, que muestran los datos relativos de cada sujeto, es decir Sexo, Edad, Glucemia antes de aplicar el PPT, glucemia después de 6 meses de su aplicación y la diferencia entre los valores de glucemia.

En la tabla 8.1, se observan los datos de los sujetos normales, en donde se aprecia que los valores de glucemia tienen pequeñas variaciones que oscilaron entre +9 y -13 unidades, pero se conservan estos valores dentro de intervalos normales.

TABLA 8.1: Glucemias de los sujetos normales antes y después de el suministro de PPT estable en solución.

*No. Voluntarios	Sexo	Edad	Glucemia mg/dl Antes del tratamiento	Glucemia después del tratamiento con PPT	diferencia mg/dl
1	F	46	90	77	-13
2	F	72	90	88	-2
3	F	71	90	88	-2
4	F	61	88	86	-2
5	M	46	85	86	+1
6	M	34	84	83	-1
7	F	38	80	78	-2
8	M	36	80	72	-8
9	M	85	80	78	-2
10	M	77	80	79	-1
11	M	79	77	79	+2
12	M	56	75	76	+1
13	M	40	75	73	-2
14	M	60	74	72	-2
15	F	67	73	75	+2
16	F	50	73	73	0
17	F	69	73	75	+2
18	F	43	71	80	+9
19	M	42	70	70	0
20	M	40	70	66	-4
21	F	59	70	70	0
22	F	75	70	65	-5
23	F	38	70	71	+1
24	F	56	69	76	+7
25	F	49	68	70	+2
26	F	60	68	70	+2
27	F	42	66	70	+4
28	F	62	66	66	0
29	F	53	65	68	+3

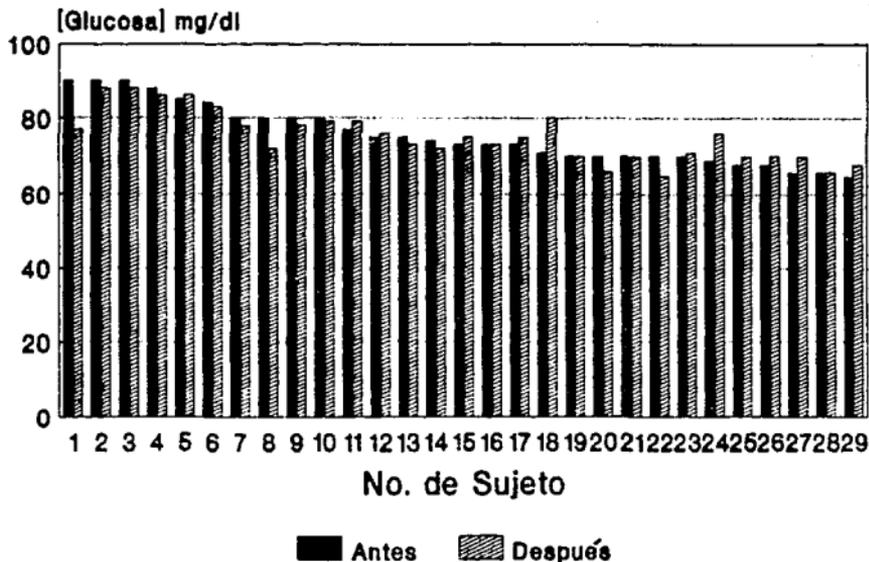
La tabla 8.2, muestra los datos de los pacientes diabéticos y se puede apreciar que los valores de glucosa presentan cambios muy notorios, es decir, de 39 unidades hasta 305 mg/dl; salvo la paciente número 46, que presenta un aumento en su nivel de glucosa.

TABLA 8.2: Datos de los pacientes diabéticos antes y después de 6 meses de tratamiento con PPT estable en solución.

*No. de Paciente	Sexo	Edad	Glucemia mg/dl	Glucemia después del PPT (mg/dl)	Diferencia mg/dl
30	F	59	375	70	-305
31	F	44	340	119	-221
32	F	32	316	124	-192
33	F	58	281	105	-176
34	M	55	281	127	-154
35	F	68	280	135	-145
36	F	52	276	201	-75
37	F	56	265	75	-190
38	M	32	260	80	-180
39	F	57	250	90	-160
40	F	64	240	110	-130
41	F	53	235	196	-39
42	M	65	225	91	-134
43	F	55	209	84	-125
44	M	45	208	81	-127
45	M	77	200	108	-92
46	F	53	183	191	+8
47	M	72	150	90	-60
48	F	48	149	74	-75
49	M	70	136	78	-58

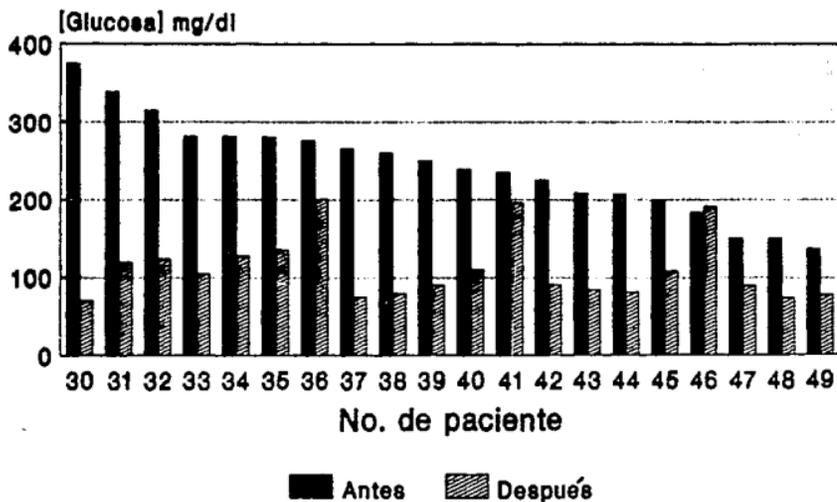
Los datos de las tablas 1 y 2, se presentan en la gráfica 8.1 y 8.2 respectivamente.

[Glucosa] en sujetos normales antes y después de suministrar PPT



Valor normal de glucosa: 80-120 mg/dl

[Glucosa] en pacientes diabeticos antes y después de 6 meses de tratarse con PPT



valor normal de glucosa: 80-120 mg/dl

Los datos obtenidos, tanto de los pacientes diabéticos como los de los sujetos normales, fueron analizados estadísticamente.

La prueba estadística que nos permitió esclarecer si existen diferencias, es la de "t" de Student (53), que dio los siguientes resultados:

En el caso de los sujetos normales:

	Antes	Después
Promedio de		
Glucemias:	75.51725	75.17242
Varianzas:	59.68719	42.93352

$p = .656763$

Se obtuvo una P mayor que .05, lo que significa, que los promedios encontrados, son muy parecidos.

En los pacientes diabéticos:

	Antes	Después
Promedio de		
Glucemias:	228.1053	121.0526
Varianzas:	3698.766	3282.054

$p = .001$

Los datos nos muestran una P menor que .05, por lo que se considera que la población estudiada, presenta diferencias notorias antes y después del tratamiento con PPT.

De estos resultados, se puede deducir que en los individuos normales, el PPT, no ejerce un efecto significativo sobre sus glucemias.

Sin embargo en el grupo de los diabéticos, si está provocando cambios considerables, ya que la mayoría de ellos, alcanzaron niveles normales de glucosa.

También se tomaron en cuenta otros parámetros de comparación, como el tiempo de establecido el padecimiento, (Tabla 8.3), el sexo del paciente, (Tabla 8.4) y la edad, (Tabla 8.5).

TABLA 8.3: Tiempo de padecimiento en los pacientes diabéticos.

No. de paciente	Tiempo de padecimiento	Glucemia después del tratamiento
30	2 años	70
31	3 años	119
32	5 años	124
33	3 años	105
34	4 años	127
35	1 año y medio	135
36	2 años y medio	201
37	3 años y medio	75
38	4 años y medio	80
39	1 año	90
40	5 años	110
41	6 meses	196
42	2 años	91
43	2 años	84
44	1 año y medio	81
45	4 años	108
46	2 años	191
47	3 años	90
48	2 años	74
49	2 años	78

Tabla 8.4: Porcentajes de respuesta en base al sexo de los pacientes diabéticos.

Sexo	Respuesta
Mujeres 65%	62% Satisfactoria 38% No satisfactoria
Hombres 35%	86% Satisfactoria 14% No satisfactoria

Tabla 8.5: Porcentaje de respuesta de acuerdo a las edades de los pacientes del sexo femenino.

Pacientes que respondieron	88% Mayores de 55 años 12% Menores de 55 años
Pacientes que no respondieron	80% Menores de 55 años 20% Mayores de 55 años

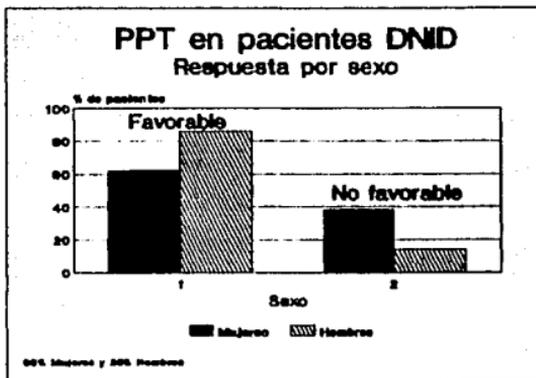
Se estudiaron además, algunos individuos normales, cuyas edades oscilaban alrededor de los 22 años en promedio, por esta razón fueron eliminados del estudio, dado que el promedio de edad de los pacientes es muy distinto al que presentó el grupo control, pero los datos aportados fueron importantes, porque permiten observar que el PPT no ejerce efecto hipoglucemiante, sino al contrario, la mayoría de estos sujetos resultaron con niveles de glucosa inferiores a lo normal, y después de la aplicación de PPT, normalizaron sus glucemias (Tabla 8.6).

Tabla 8.6: Datos generales de individuos normales, con edades de 22 años en promedio.

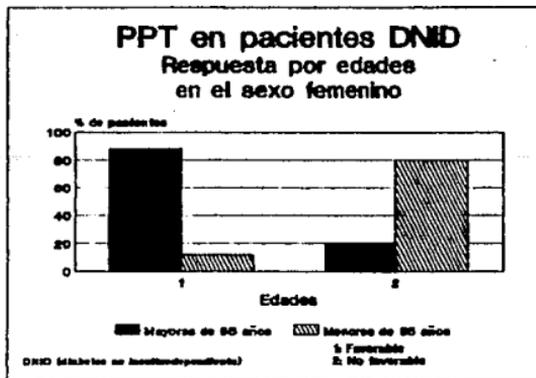
No. de Voluntario	Edad	Glucemia antes del PPT (mg/dl)	Glucemia después del PPT (mg/dl)	diferencia
1	27	79	75	-4
2	22	74	84	+10
3	19	72	70	-2
4	28	71	80	+9
5	22	70	70	0
6	18	70	72	+2
7	22	69	63	-6
8	19	65	63	-2
9	23	59	73	+14
10	21	59	73	+14
11	24	57	74	+17
12	21	55	63	+8
13	21	55	78	+23
14	22	53	72	+19
15	24	50	67	+17

Además de los datos de glucosa, se tomaron otros datos como colesterol, triglicéridos, lípidos totales, fosfolípidos y hemoglobina, ya que se relacionan muy estrechamente con la diabetes, aunque sólo se tomaron los casos con los datos más completos, ya que algunos pacientes no lograron realizar todas las pruebas (Tabla 8.7, página 47).

Los datos de las tablas 8.4 hasta la 8.7 se muestran en las gráficas correspondientes (8.4 a 8.7).



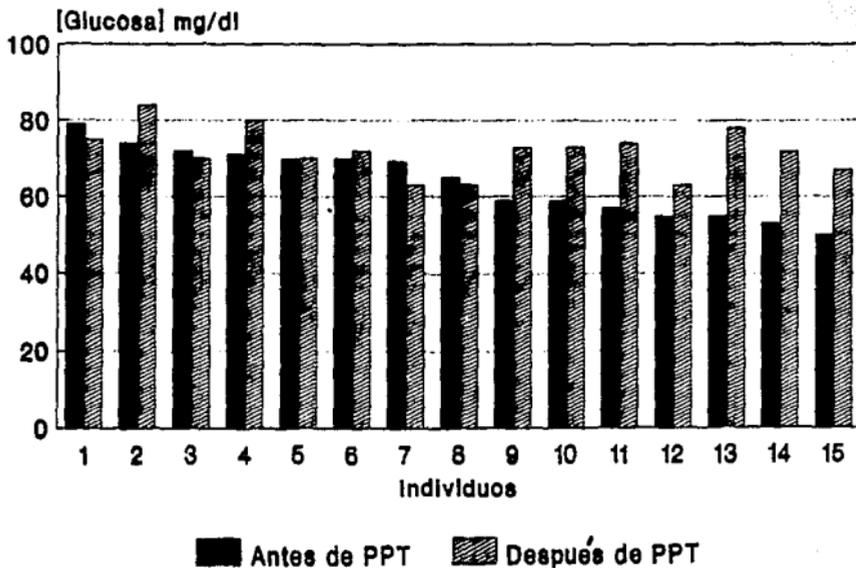
Gráfica 8.4: Diferencias de respuesta al tratamiento con respecto al sexo.



Gráfica 8.5: Diferencias de respuesta en base a la edad con respecto al sexo femenino.

[Glucosa] en individuos normales

Edad promedio 22 años



Del 9 al 15 hipoglucemia aparente

Ordica S. de diferencia antes y después de la aplicación de PPT en individuos con edades promedio de 22 años.

Tabla 8.7: Datos de laboratorio de algunos pacientes diabéticos.

No. Paciente	Colesterol mg/dl		Triglicéridos mg/dl		Fosfolípidos mg/dl		Lípidos totales mg/dl		Hemoglobina	
	A	D	A	D	A	D	A	D	A	D
30	202	173	131	132	199	250	533	559	18.3	15.3
33	230	190	192	91	254	290	600	676	15.8	13.3
34*	284	213	195	88	260	276	500	574	16.6	15.1
35*	173	186	225	170	298	211	690	760	17.3	16.1
42	264	229	211	88	301	280	740	578	17.2	14.7
43	216	270	209	84	116	266	416	745	18.1	14.3
44	120	200	173	82	441	125	407	734	19.1	18.0
45	252	188	129	93	108	166	477	489	17.1	14.3
48	303	227	318	106	500	274	1400	607	18.2	15.3
49	300	231	252	85	115	170	400	680	18.5	14.6

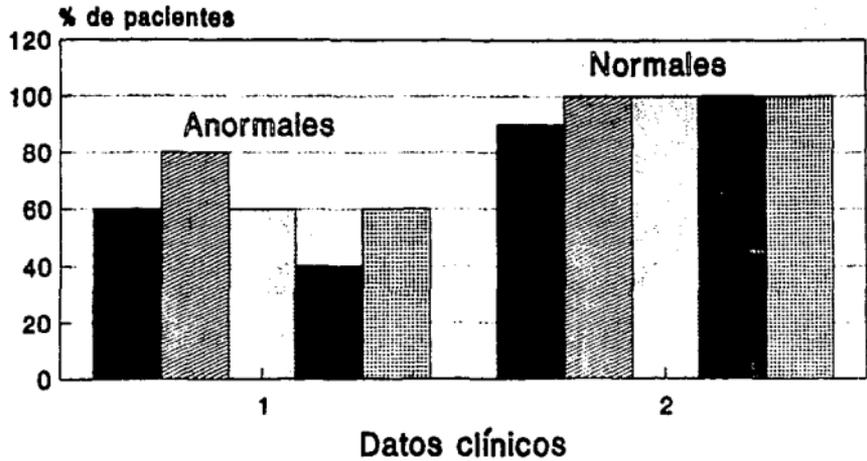
Los valores normales de otras determinaciones son las siguientes (4):

Colesterol: 150 - 250 mg/dl
 Triglicéridos: 45 - 172 mg/dl
 Fosfolípidos: 120 - 300 mg/dl
 Lípidos totales: 450 - 1000 mg/dl
 Hemoglobina: Mujeres: 11.5 - 16.4
 Hombres: 13.5 - 18

Se observó que la concentración de la hemoglobina y glucosa en la sangre, presentan un aumento, es decir, que cuando el paciente tenía niveles de glucosa altos, aumentaban los niveles de hemoglobina, y cuando la glucosa disminuye, la concentración de hemoglobina en la sangre también disminuye.

*Pacientes que no alcanzaron los valores normales de glucosa, aunque estuvieron muy cercanos.

Resultados clínicos de algunos pacientes DNID.



Datos relacionados con la diabetes

Oficina N. 7: Diferencia y después de algunos resultados con base en PPT en las pruebas. da del tratamiento diabéticos, que completaron clínicos antes

PARTE II

En esta parte, los resultados obtenidos con la sangre de caballo *in vitro* se presentan en la tabla siguiente, con sus gráficas correspondientes:

TABLA 8.8: Concentración de glucosa en sangre y suero de equino tomada en diferentes intervalos de tiempo en un lapso de 3 horas.

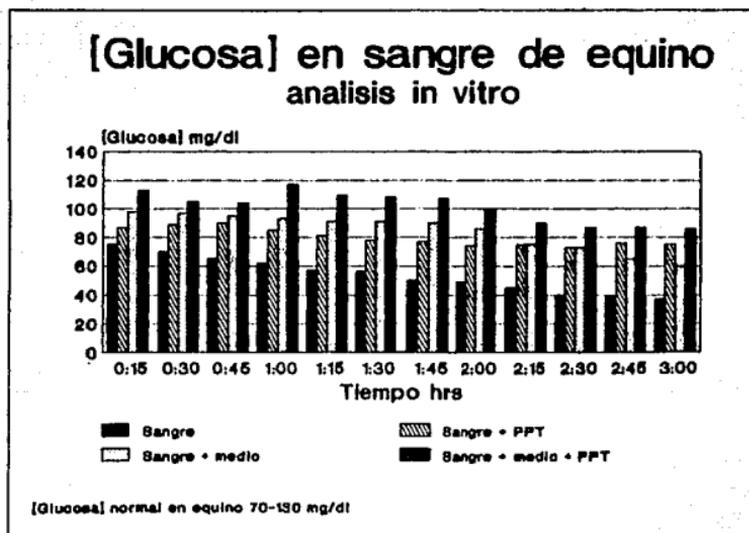
Experimentos.*								
Tiempo (min)	1	2	3	4	5	6	7	8
15	75	87	98	113	146	147	158	155
30	70	89	97	105	142	139	156	157
45	65	90	95	104	140	145	158	158
60	62	85	93	117	142	146	156	156
75	57	81	91	109	139	147	159	157
90	56	78	91	108	146	144	160	163
105	50	77	90	107	141	146	153	161
120	49	74	86	100	139	144	155	154
135	45	75	75	90	143	150	157	158
150	40	73	73	87	145	149	158	160
165	39	76	65	87	144	148	155	163
180	37	75	60	86	146	147	158	157

*Experimentos realizados 8 veces, y se muestra el promedio de ellos:

- 1) Sangre.
- 2) Sangre + Cocarboxilasa
- 3) Sangre + medio nutritivo Eagle
- 4) Sangre + medio nutritivo Eagle + Cocarboxilasa
- 5) Suero
- 6) Suero + Cocarboxilasa
- 7) Suero + medio nutritivo Eagle
- 8) Suero + medio nutritivo Eagle + Cocarboxilasa

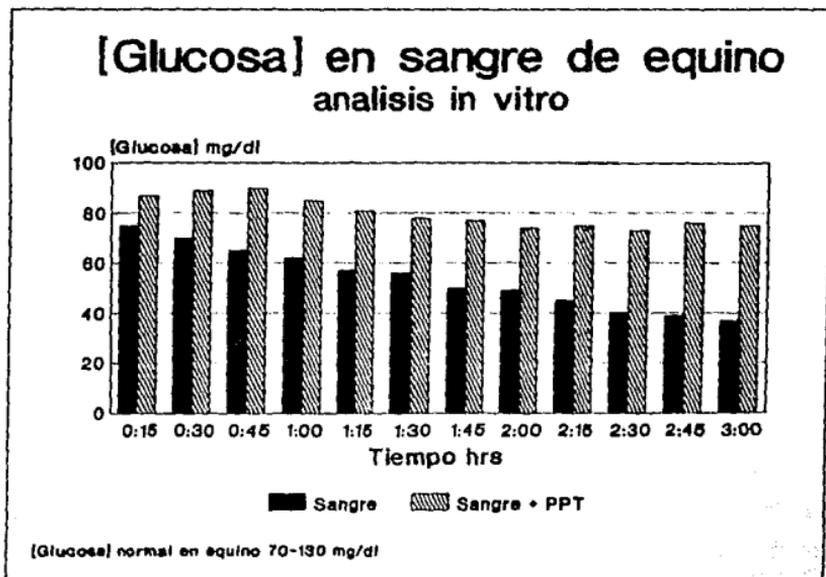
Los resultados obtenidos de los tubos 5, 6, 7 y 8 fueron ajustados por mínimos cuadrados (54).

En la gráfica 8.3, se observan los datos de las células sanguíneas *in vitro*, sometidas en diferentes condiciones de trabajo.



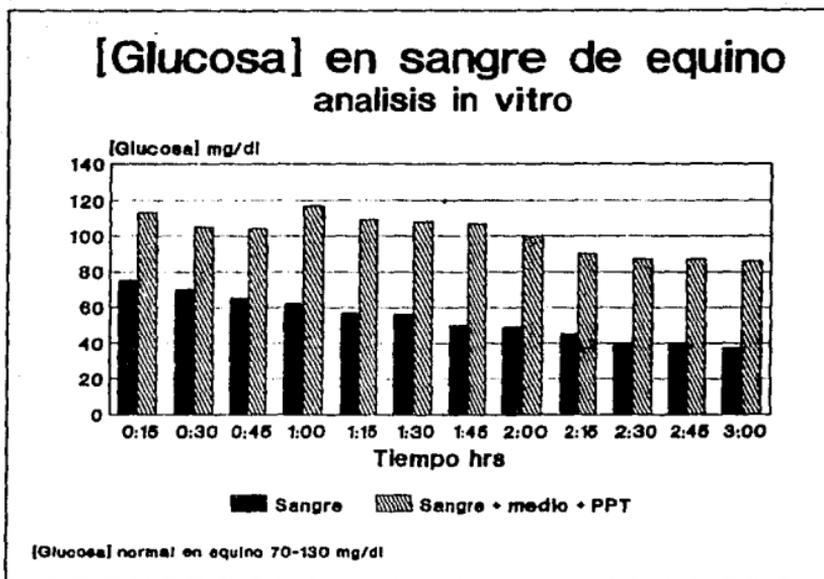
gráfica 8.3: Comparación de los experimentos *in vitro* en sangre de caballo.

En la gráfica 8.4, se aprecia la curva obtenida unicamente de la sangre y la curva de la sangre en la que se adicionó PPT. En el segundo caso ocurre un ligero aumento de la concentración de glucosa al principio, y posteriormente desciende, y se estabilizó dentro de los valores normales a partir de los 90 minutos de iniciado el experimento, en comparación con la curva de la sangre en donde los niveles de glucosa descienden por debajo de los niveles normales, después de los 60 minutos.



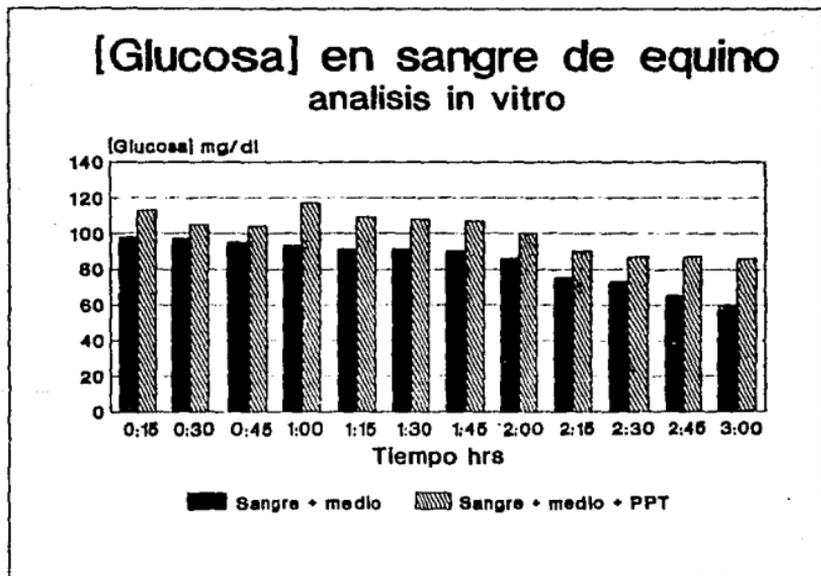
Gráfica 8.4: Diferencia entre la curva obtenida de sangre y de sangre adicionada con PPT.

En la gráfica 8.5, se observa la curva obtenida de sangre adicionada con medio nutritivo y PPT, en donde los niveles de glucosa aumentan por la glucosa que contiene el medio. Con el tiempo empiezan a descender más lento, que en la gráfica de sangre más PPT, pero al final se estabilizan dentro de valores normales de la glucosa en un tiempo de 135 minutos, con diferencia de la sangre sin adiciones.



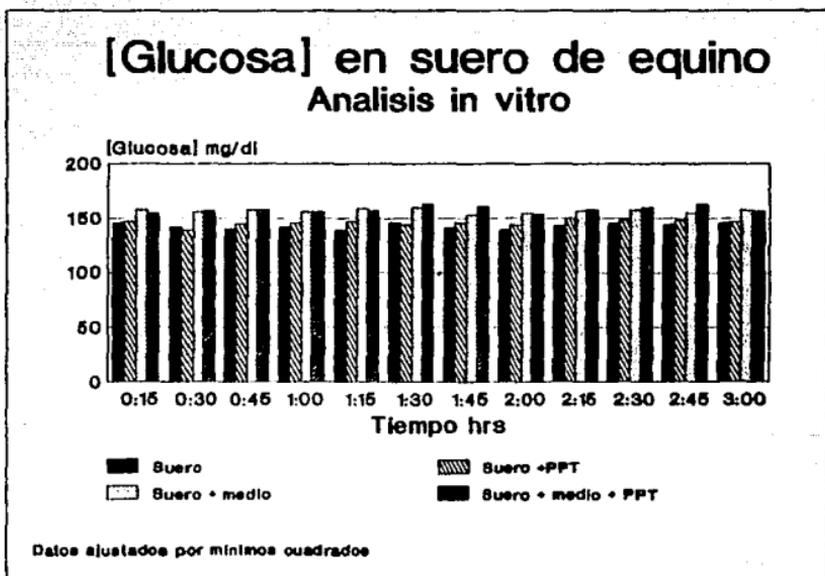
Gráfica 8.5: Diferencia entre la curva de sangre y sangre adicionada con medio nutritivo más PPT.

En la gráfica 8.6 se observa la diferencia entre la sangre adicionada con medio y la sangre con medio más PPT, donde se aprecia en el primer caso, que hay disminución de la concentración de glucosa; en el segundo caso se presenta un aumento de glucosa, y posteriormente desciende pero muy lentamente, y en valores normales, por encima del primer caso.



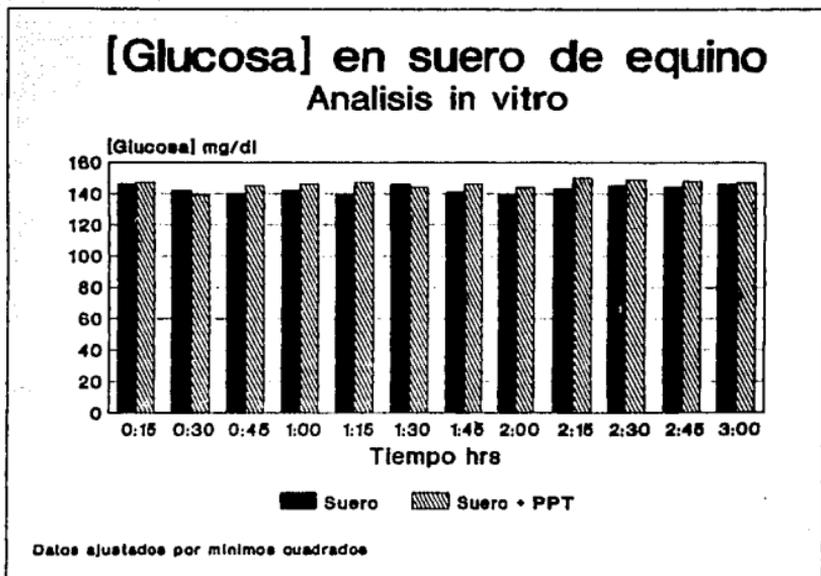
Gráfica 8.6 Comparación entre los resultados obtenidos entre la sangre adicionada con medio y la sangre con medio y PPT.

En la gráfica 8.7, se muestra la comparación de la concentración de glucosa en el suero en distintas condiciones.



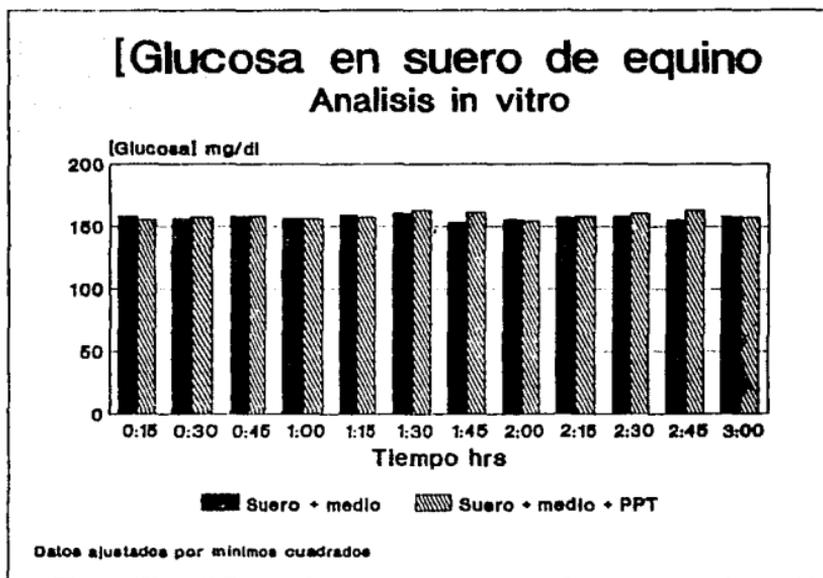
Gráfica 8.7: Comparación de los resultados en los experimentos con suero de caballo.

La gráfica 8.8, compara los datos del suero y el suero adicionado con PPT, en donde no se observan diferencias, significativas.



Gráfica 8.8: Diferencia entre la curva obtenida del suero y del suero adicionado con PPT.

En la gráfica 8.9, se muestran los valores de glucosa en suero adicionado con medio nutritivo y suero con medio nutritivo y PPT respectivamente; se obtuvieron valores semejantes al de la gráfica anterior, debido a que no hay células que consuman la glucosa presente, por lo que se observa una recta durante los 180 minutos que duró la prueba. Con estos resultados se puede pensar que el PPT, está actuando a nivel celular ya que en la sangre si se ven los cambios de concentración de glucosa.



Gráfica 8.9: Diferencia entre los valores de glucosa en el suero de caballo adicionado con medio nutritivo y el suero con medio nutritivo más PPT.

9 DISCUSION

En los mamíferos, el ciclo de Krebs, es una de las vías principales de obtención de energía, a partir de la glucosa existente en el plasma sanguíneo, y en términos generales, se conserva con mecanismos de retroalimentación que le aseguran la nutrición constante y adecuada a cada una de las células que lo integran.

Así, tenemos que en la fase inicial de la alimentación, se activan procesos que inducen la incorporación de la glucosa a los tejidos en general y en especial a los tejidos que la almacenan como el hígado, músculo, tejido adiposo etc. En este proceso de nutrición, se menciona principalmente, a la insulina cuyo papel fundamental es activar a los receptores específicos de la glucosa en la membrana para lograr su incorporación en la célula y poder ser utilizada. (55).

Aunque todos los tejidos requieren de glucosa, no todos utilizan insulina para su incorporación celular, por ejemplo: el cerebro, el duodeno, la mucosa intestinal, y los eritrocitos entre otros, ya que sus membranas facilitan el paso de la glucosa a su interior, a cambio de un ion sodio presente en el fenómeno de captura. (56).

A medida que la glucosa se incorpora a las células, los niveles plasmáticos comienzan a decrecer, por lo que se activan otros mecanismos que inducen la salida de glucosa, de los tejidos

de almacenamiento, de tal manera que siempre se conserve la misma concentración circulando aún después de un ingreso masivo a través de la alimentación o a pesar de condiciones de ayuno.

El caso patológico de la Diabetes mellitus, se considera como consecuencia de un desorden en el control de los niveles de glucosa en sangre (3), en el que los mecanismos de autoregulación no pueden llevarse a cabo, ya sea por la ausencia o por la alteración de la molécula de insulina o por algún proceso dependiente de la unión receptor-insulina por lo que la glucosa no se utiliza y por lo tanto los niveles se ven aumentados en el plasma (57).

El control del paciente diabético, es hasta el momento un problema clínico muy frecuente, tanto en el insulino dependiente como el insulino independiente.

Un alto porcentaje de glucemias, no se pueden controlar con las terapias tradicionales, además de presentar problemas secundarios a dicho tratamiento, tales como alteraciones cardíacas o resistencia a la insulina entre otras (4 y 58).

La importancia del PPT, reside en la utilización que tiene éste en el metabolismo intermediario, particularmente en el de la glucosa, en donde desempeña un papel preponderante, ya sea vía anaeróbica o aeróbica, que a su vez contribuye a la formación de moléculas de ATP que se emplean en otras actividades celulares para mantener el estado de homeostásis.

Se han hecho diversos estudios con el fin de utilizar al PPT como un factor corrector en los casos de alteraciones del metabolismo de los carbohidratos, como la diabetes mellitus, con resultados satisfactorios, a pesar de no utilizar PPT estable en solución. (59 a 68).

En esta tesis, los resultados nos demuestran que el PPT estable en solución, favorece el descenso de los niveles de la glucosa sanguínea, donde se nota que no actúa como hipoglucemiante convencional, datos que se observan en las tablas 8.1 (sujetos normales), 8.2 (pacientes diabéticos) y 8.6 (sujetos jóvenes con valores de glucosa menores del intervalo normal).

Es muy importante resaltar que el PPT estable en solución en menos de un año de utilizarse, mejoró en su gran mayoría a los pacientes diabéticos, si tomamos en cuenta los resultados obtenidos en los análisis de laboratorio (colesterol, triglicéridos, fosfolípidos, lípidos totales y hemoglobina).

En estos resultados se puede observar lo siguiente:

- El tiempo del padecimiento en cada paciente no nos proporcionó diferencias significativas de respuesta al tratamiento, ya que respondieron, tanto los individuos que tenían meses con la enfermedad, como los que tenían 5 años. (Tabla 8.3).

- Con respecto al sexo, se observaron diferencias, ya que

en el caso de los hombres, el 86% respondió favorablemente y en el caso de las mujeres se presentó un porcentaje menor de respuesta, es decir, de un 62%, lo que significa que los hombres respondieron mejor al tratamiento que las mujeres; ésto puede deberse a la presencia de diversas hormonas como la progesterona, el estradiol, etc, que intervienen en el ciclo menstrual (Tabla 8.4).

- La edad, fue otra variable que se tomó en cuenta, en donde se pudo observar, que con respecto al sexo femenino, en el grupo de las diabéticas, existieron diferencias significativas, es decir, que las mujeres con edades menores de 55 años, bajaron sus niveles de glucosa, aunqun no totalmente hasta los valores normales (80%); sin embargo, las mujeres con edades mayores a los 55 años, si normalizaron casi en su totalidad los valores de glucosa (88%), esto, sin tomar en cuenta los datos obtenidos de las mujeres diabéticas, que por razones desconocidas no terminaron el tratamiento, y sin embargo hasta donde se observó, si recuperaron sus glucemias normales; de estos resultados, se plantea, la existencia de algún factor, que probablemente influye en la regulación de la concentración de glucosa sanguínea. Quizá, podría estar relacionado con la concentración de las hormonas que participan en el ciclo menstrual, por lo que las mujeres menopáusicas, no las presentan, y de ahí que se regula más rápidamente la concentración de glucosa que en el caso de la mujeres con ciclo menstrual. (69 a 71). (Tabla 8.5).

En nuestro estudio, se trabajó en un principio, con jóvenes

de 22 años en promedio, y se observó, que originalmente, el 47% de ellos, era hipoglucémico, y al inyectarles el PPT, sus niveles de glucosa aumentaron a un intervalo normal (60/120 mg/dl), en un 100%. Estos datos, fueron eliminados del trabajo dado que este grupo de individuos eran muy jóvenes para compararlos con el grupo de pacientes diabéticos; pero los resultados obtenidos se consideran importantes ya que ésto podría ayudarnos a comprobar que el PPT estable en solución, no actúa como hipoglucemiante convencional. (Tabla 8.6).

En el grupo de personas normales, las glucemias presentaron pequeños aumentos o disminuciones que no eran significativas, dado que no se salieron del intervalo normal, (más menos dos unidades en su mayoría; con valor máximo de 9 unidades y mínimo de 13 unidades), con lo que también se demuestra que el PPT, no actúa como un hipoglucemiante. (Tabla 8.1).

En el grupo de los pacientes DNID, un buen porcentaje, (70%) alcanzaron sus glucemias normales, es decir que sus niveles de glucosa descendieron considerablemente para mantenerlos dentro de los valores normales (Tabla 8.2); y no sólo se habla de glucosa, sino de otros datos obtenidos en sus análisis de laboratorio, que se relacionan muy estrechamente con la diabetes mellitus, como niveles de colesterol, triglicéridos, fosfolípidos, lípidos totales y hemoglobina^v (11 y 72 y 73), en los que se observan los valores normales y los valores obtenidos de cada paciente. De los datos que se observan en la tabla 8.7 se obtiene lo siguiente, de colesterol el 60% antes del tratamiento, tenía valores anormales,

y después del tratamiento el 90% era normal; de triglicéridos, el 80% era anormal y después del tratamiento el 100% se normalizó; en lo que respecta a fosfolípidos, el 60% tenía valores anormales y después del tratamiento el 100% se normalizó; en los lípidos totales el 40% era anormal y al final del tratamiento el 100% se normalizó; y en lo que respecta a hemoglobina el 60% era anormal y al finalizar el tratamiento el 100% se normalizó, con estos resultados, tratamos de demostrar que el PPT estable en solución no sólo está reduciendo los niveles de glucosa a intervalos normales, sino que además está normalizando otros parámetros, que se ven afectados por el padecimiento, lo que nos hace pensar que el PPT favorece el metabolismo, y no sólo participa en la incorporación de la glucosa.

De los resultados obtenidos, se puede deducir, que si en los pacientes diabéticos, los niveles de glucosa disminuyen (Tabla 8.2), en los pacientes con hipoglucemia aparente, aumentan (Tabla 8.6) y en los sujetos normales se mantiene los niveles normales, entonces la cocarboxilasa estable en solución podría estar actuando como un regulador de la concentración de glucosa sanguínea, cuyo mecanismo se desconoce.

Es importante señalar, que desciende la concentración de la glucosa en los pacientes no insulino dependientes así como en los insulino dependientes (74), por lo que se puede pensar que la regulación no es a nivel de síntesis o liberación de insulina. Esto se puede interpretar en el caso de los insulino dependientes, con base en lo que se ha demostrado en otros experimentos en los

que se observa el papel que el PPT desempeña en la síntesis y liberación de insulina (65); sin embargo si actuara a ese nivel, sólo solucionaría el problema en los pacientes insulino dependientes, más no en los pacientes no insulino dependientes. Además es fundamental notar que la regulación de la glucosa en la sangre es a nivel celular. In vitro, se observó que se lleva a cabo el consumo de glucosa a una velocidad menor y sin rebasar el límite normal, por lo que es probable que el PPT esté actuando a nivel de membrana celular; sin embargo es difícil ubicar dónde y cómo se detecta la concentración de glucosa adecuadamente y como la conserva, ya que no se han hecho los experimentos pertinentes.

También se ha reportado que el PPT interviene en otras funciones que no están directamente relacionadas con el metabolismo de la glucosa, como son: favorecer la incorporación de los aminoácidos a los tejidos (36), en la síntesis de proteínas (37 y 41), en la conducción del impulso nervioso (38) y en otros sitios (17 y 39), lo que podría explicar la respuesta de los pacientes sometidos al tratamiento con base en PPT al regular otros mecanismos de una manera directa y/o indirecta, y que permite que disminuya o desaparezca la sintomatología de la diabetes.

Algunos pacientes, no alcanzaron sus niveles normales de glucosa, y se piensa que los motivos que influyeron fueron los siguientes:

-El abandono del tratamiento: falta de responsabilidad

por parte de algunos pacientes o por otros problemas de tipo personal, lo que pudo afectar sus niveles de glucosa.

-Discontinuidad: no llevaron adecuadamente el tratamiento.

-Dietas: No las llevaron en forma continua.

-Estado emocional del paciente: En este caso los pacientes no pueden controlar los estados de tensión en los que se pueden encontrar en un momento determinado, por lo que sus niveles de glucosa se pudieron ver afectados (75).

En los experimentos *in vitro*, se puede observar la gráfica 8.3, que nos señala el comportamiento sanguíneo, en donde la sangre en un determinado momento conserva su concentración de glucosa, pero al cabo de un tiempo considerable, los niveles descienden porque los eritrocitos la captan, y es lógico pensarlo, ya que no existe la forma de obtenerla. En el caso de la sangre con el medio nutritivo, ocurre lo mismo sólo que tarda un poco más de tiempo, debido a que el medio nutritivo contiene glucosa.

En los tubos que contenían la sangre con PPT, *in vitro* se presentó un comportamiento diferente, en cuanto a la disminución de glucosa, ya que por alguna razón las concentraciones de glucosa no descendieron de los niveles normales, por lo menos el tiempo que duraron las pruebas (Gráfica 8.4.). Estos resultados, sugieren que el PPT ejerce algún efecto en estas células

sanguíneas. Los experimentos con el suero, lo confirman ya que los niveles de glucosa se mantuvieron constantes.

Como el PPT es un compuesto que requiere de su presencia constante en el organismo, su incorporación en las concentraciones usadas por vía exógena, no ocasiona efectos secundarios, dado que es eliminada rápidamente (43 y 76).

10 CONCLUSIONES

Con los resultados obtenidos en este trabajo, se puede concluir lo siguiente:

- El PPT, parece inducir la incorporación de glucosa a las células, al normalizar los valores en la mayoría de los pacientes hiperglucémicos y en los experimentos *in vitro*, por lo que se propone como posible regulador de la glucosa sérica.
- El PPT no actúa como un hipoglucemiante clásico (4), ya que no siempre disminuye la concentración de la glucosa sérica al aplicarse en sujetos normoglucémicos y/o hipoglucémicos.
- Los síntomas asociados a la hiperglucemia como polifagia, poliuria, polidipsia, astenia, adinamia etc disminuyó durante el curso del tratamiento hasta desaparecer.
- La aplicación del PPT en las condiciones señaladas no provoca reacciones secundarias ni a corto ni a largo plazo en los pacientes diabéticos ni en los sujetos normoglucémicos, como en el caso de los hipoglucemiantes orales.

- En menos de un año, más de la mitad de los pacientes respondieron al tratamiento, por lo que el tiempo de recuperación es relativamente corto, con respecto a los tratamientos tradicionales, en los cuales se requiere de la administración de medicamentos por tiempos prolongados, e inclusive durante toda la vida.
- En los experimentos *in vitro*, en el suero, el PPT no modifica la concentración de glucosa, y en la sangre, su disminución puede ser por su incorporación en los eritrocitos, conservando los intervalos normales.

Queda por mencionar que dada la importancia del metabolismo de la glucosa y de su relación con la diabetes, el papel que parece jugar el PPT, puede ser indispensable, por lo que se propone como un posible método terapéutico, que pueda mantener en lo posible los estados homeostáticos del organismo.

Este trabajo es la primera parte del proyecto en donde se estudia la acción del PPT, ya que actualmente, se realizan otros experimentos en el Instituto de Investigaciones Científicas Hans Selye, con el fin de encontrar en donde actúa específicamente el PPT, es decir, que hace para que el organismo responda satisfactoriamente.

En otros países como Estados Unidos, se utilizan otros compuestos, aparte del PPT como el gliclazide, para tratar de instrumentar tratamientos que sean más eficaces en los pacientes con diabetes mellitus (77).

11 BIBLIOGRAFIA

- 1) Lehninger, A L; Biochemistry; The molecular basis of cell structure and function. Second edition. Ed. Omega. Barcelona. 1977: 335-348.
- 2) Balcells, G A; La clínica y el laboratorio; Interpretación de análisis y pruebas funcionales. Ed. Marín S/A; México. 1974: 68-70.
- 3) Taylor, R y Agius, L; The Biochemistry of diabetes. Biochem J 1988; 250: 625-640.
- 4) Krupp, M A y Chatton, M J; Diagnóstico clínico y tratamiento. 22a edición. Ed. El Manual Moderno. México 1984: 1-1204.
- 5) Folch, A; Diccionario enciclopédico de términos médicos. Ed. Interamericana. México. 1988: 13, 100, 205, 848, 850 y 851.
- 6) Chandler, T Y; Diabetic retinopathy diagnosis and treatment. Tex Med 1988; 84 (6): 42-46.
- 7) Hart, I R y Newton, R W; Endocrinología, sistema integrado de estudio. Ed. El Manual Moderno. México. 1987: 1-328.
- 8) Iint M A; Prevention of the complications of diabetes. Prim Care 1988; 15 (2): 277-284.
- 9) Anónimo; Report and recomendation of the San Antonio Conference of diabetic neuropathy. Consensus statement. Diabetes. 1988; 37 (7): 1000-1004.
- 10) Belon, PH; Les complications cutanées du diabete sucré. Cah Med 1979; 4: 1731-1737.

- 11) Salgado, S P; Estudio de alteraciones metabólicas en pacientes con diabetes mellitus tipo II. *Bioquímica*. México. 1991; 16. (61): 22-28.
- 12) Martínez, A F y Medrano, T G; Diabetes del anciano. *Geratría y gerontología*. México. 1989; 1. (1): 13-18.
- 13) Chavez-Montes, J; Empleo de la cocarboxilasa en ciertas complicaciones de la diabetes mellitus. *Semana Médica de México*. 1959; 20, 254: 231-236.
- 14) Metzler, D E, The enzymes. 2nd. ed. (Boyer, H. Lardy, and K. Myrback, eds.), Academic Press, New York, 1960, 2: 296-337.
- 15) Eijkman, C; Eine Beriberi-ähnliche Krankheit der Hühner. *Arch Path Anat*, 1897, 148: 523-526.
- 16) Shimomura, Y, Kuntz, M J, Suzuki, M, Ozawa, T y Harris, R A; Monovalent Cations and inorganic phosphate alter Brauched-chain alpha ketoacids dehydrogenase-kinase activity and inhibitor sensivity. *Arch Biochem Biophys* 1988, 266 (1): 210-218.
- 17) Goodman S L y Gilman A; Bases farmacológicas de la terapéutica. 5a edición. Ed. Interamericana México. 1978, 1302-1347.
- 18) Metzler, D E; *Bioquímica: Las reacciones químicas en las células vivas*. 6a edición. Ed. Omega. Barcelona. 1981: 443-529.
- 19) Peters, R A; The biochemical lesion in vitamin B deficiency. Application of modern biochemical analysis in its diagnosis. *Lancet* 1936; 1: 1161-1164.
- 20) Auhagen, E, Uber Co-Carboxilase. *Reinigung gerversuche un*

- Vorkommen in tierischen organen. *Biochem Zeitschr* 1933; 258 (1/4): 330-339.
- 21) Lohmann, K y Schuster, P; On Cocarboxylase. *Nutrition Classics* 1937, 25: 26-27.
 - 22) Jansen, B C P; en Vitamins. (W. H. Sebrell and R. S. Harris, eds). Academic Press New York. 1954; 3: 426-429.
 - 23) Green, D E, Herbert, D, y Subrahmanyam, V; Cocarboxilase. *J Biol Chem* 1941; 138 (1): 327-339.
 - 24) Kubowitz, F y Lüttgens, W; Composition, cleavage and resynthesis of cocarboxilase. *Biochem Z* 1941; 307: 170-172.
 - 25) Takeuchi, Y, Okuda, K, Hayakawa, S, y Mizuhara, S; The active center of thiamine. *J Biochem (Tokio)*. 1955; 42 (1): 93-97.
 - 26) Salem, H M; Determination of methylglyoxal in thiamine-deficient rats by paper chromatography. *Arch Biochem Biophys* 1945; 57 (1): 20-22.
 - 27) Breslow, R; On the mechanism of thiamine action. Evidence from studies on model systems. *J Am Chem Soc* 1958; 80: 3719-3726.
 - 28) Holzer, H; Kinetics and thermodynamics of enzymatic reactions in living cells and tissues. *Biochem Z* 1956; 327: 331-335.
 - 29) Von Muralt, A; The role of thiamine in nervous excitation. *Exper Cell Res* 1958; 5 (supp.): 72-76.
 - 30) Gubler, C J; Ed. Thiamine. Wiley, New York. 1976: 24-30.
 - 31) Leder, I G; Metabolism Pathways. 3rd Ed. 1975, 7: 57-85.
 - 32) Itokawa, Y y Cooper; On a relationship between ion

- transport and thiamine in nervous tissue. *Biochem Pharmacol* 1969; 18: 545-547.
- 33) Khemelevskii, Y V, y Kornts, K A; Diversas investigaciones realizadas en repúblicas socialistas sobre la acción de la cocarboxilasa degradable en procesos isquémicos (1971-1978). *Compendium de investigaciones clínicas Latinoamericanas* 1987. 7, (2) 24-25.
- 34) Bolan, B, Hitchcock, J, y Brennan, Ma K; Thiamin: Twenty years of progress. Ed. Staff. *EUA Annals of the New York Academy of sciences* 1982; 378: 1-469.
- 35) Alcázar-Leyva S; Investigación demostrativa de la acción energética de la cocarboxilasa en el bloqueo respiratorio producido por el cianuro y su proyección terapéutica. *Bioquímica* 1984, 34 (6): 1281-1282.
- 36) Gorbach, Z V, Maglysh, S S, Nefedov, L I, y Ostrovskii, M; Characteristics of intracellular Metabolism of carbohydrates and amino acids in animal with thiamine deficiency. *Biokhimiya* 1987; 52 (1): 42-52.
- 37) Henderson, G I, Hoyumpa, A M, y Scheuker, S; Effects of thiamine deficiency on cerebral and visceral protein synthesis. *Biochem Pharmacol* 1978; 27: 1677-1683.
- 38) Bettendorf, L, Thiamine triphosphate and membrane-associated thiamine phosphatases in the electric organ of *electrophorus electricus*. *J Neurochem* 1987; 49, 2: 495 - 501.
- 39) Bowmn, W C y Rand, M J; *Farmacología. 2a Ed. Interamericana. México.* 1984. 43: 10- 16.

- 40) Vennesland, B; en *The Enzymes*. (J. B. Sumner and K. Myrback eds.) 1st ed. Academic Press New York. 1951. Vol. II, Parte I: 183.
- 41) Berkow, R, Sharp y Domme; *El Manual Merck, research laboratories*. 1978: 1253-1257.
- 42) Blass, J P, Cederbaum, S D y Gibson, G E; Clinical and metabolic abnormalites accompanying deficiencies in pyruvate oxidation. In normal and pathological development of energy metabolism. (F. A. Hommes y C. J. Vanden Berg, Eds). Academic Press 1975: 193-210.
- 43) Battendorff, L, Grandfils, C, Rycker, C y Schoffeniels, E; Determination of thiamine and its phosphate esters in human blood serum at femtomole levels. *J Chromatography* 1986; 382: 297-302.
- 44) Remington; *Vitaminas y otros nutrientes en farmacología*. 17a ed., Ed. Médica Panamericana S. A. México. 1987; 2: 1400-1401.
- 45) Sanemori, H, Veki, H, y Kawasaki, T; Concentraciones de Trifosfato de tiamina (TTP) y Profosfato de tiamina (TPP) en tejidos de animales. *Annal Biochem* 1980; 107: 451.
- 46) Goodman, P y Gilman, S *The farmacological basis of therapeutic*. 6th ed., Ed. McMillan Publishing. USA. 1980: 1560-1566.
- 47) Tsallas, G, Molgat, T y Jeejeebhoy, K; *Vitamins -part two*. On continuing Practice 1987; 14, (2): 26-42.
- 48) Larrieu, A J, Yasdanfar, S, Redovan, E, Eftychiadis, A, Kao, R, Silver, J, y Ghosh, C, Benefical effects of

- cocarboxilase in treatment of experimental myocardial infarction in dogs. *Amer Surgeon* 1987; 53: 721-725.
- 49) Alcázar, M H; Historia de una investigación biológica. 1a ed Elarteh publicaciones. México. 1988: 5-22.
- 50) Zavala, S y Pérez, M C Métodos selectos para el pequeño laboratorio de Química Clínica. Ed Elarteh México. 1987: 240-250.
- 51) Robinson, N E, Current therapy in Equine Medicine. 2a ed, Ed W B Saunders Company. USA. 1983: 881-882.
- 52) Benítez, R Ma T; Reacción de linfocitos humanos ante los componentes del medio en cultivo. Tesis de Biología, Facultad de Ciencias UNAM; México. 1970: 40.
- 53) Méndez, R I, Namihira, G D, Moreno, A L y Sosa, M C; El protocolo de investigación. Lineamientos para su elaboración y análisis. 3a ed Trillas México. 1988: 139-145.
- 54) Holman, J P, Métodos experimentales. 1a ed McGraw-Hill México. 1979: 86-88.
- 55) Smith, R M y Jarrett, L; Biology of disease receptor mediated endocytosis and intra cellular processing of insulin: ultrastructural and biochemical evidence for cell-specific heterogeneity and distinction from non-hormonal ligands. *Lab. Invest.* 1988; 58, 6: 613-630.
- 56) Ganong, W F; Fisiología Médica. 11a ed, El Manual Moderno. México. 1986: 291.
- 57) Zorzano, O A; Mecanismos moleculares de acción de la insulina. *Endocrinol México.* 1988; 35 (1): 27-36.

- 58) Cahill, G F; Diabetes Mellitus. Scientific American, Medicina. 1988, 61: 23-29.
- 59) Markees, S y Meyer, F W; Die Therapie des coma diabeticum mit cocarboxilase Experimentelle Grundlagen un Klinische Ergebnisse. Schweiz Med Wochr 1949; 9: 931-934.
- 60) Boulin, R; Le traitement du coma diabetique parla cocarboxilase. Paris Med Arztl Wochr 1951; 6: 1149-1155.
- 61) Markees, S; Zur Wirkungsweise der Cocarboxylase bei der diabetischen acidose. Schweiz Med Wochr 1952; 82: 1290-1295.
- 62) Klinger, R, y Dalle, C P; Trattamento con Cocarboxilasi del acidosi diabetica e di alcune complicanze diabetische Minerva Med 1952; 43, 2: 1158-1160.
- 63) Girard, P, y Orsini, A; Augenblicklicher stand der Behandlung des coma diabeticum beim kind. Padiatrie 1954, 42: 137-138.
- 64) Markees, S; Cocarboxylase bei diabetischen acidose, in B-Vitamine klinische u physiologische-chemische Probleme, herausgegeben von H. Frhr. von Kress u K. V. Blum. Schattaver-Verlag. Stuttgart, 1966; 171-176.
- 65) Berant, M, Berkovitz, D, Mandel, H, Zinder, O y Mordohovich, D, Thiamin status of the offspring of diabetic rats. Pediatric Research 1988; 23 (6): 574-575.
- 66) Flatau, S, Fischer, G, Kleinpeter, E y Schellenberger, A; ³¹P NMR investigation on free and enzyme bound thiamine pyrophosphate. FEBS Letters 1988; 233 (2): 379-382.
- 67) Suk, K J, Orichlow, C E, Blakley, R B, y Rousseaux, C G; The effects of thiamin on the neurophysiological

- alteration induces by lead. *Vet Hum Toxicol* 1990; 32 (2): 101-104.
- 68) Shigematsu, Y, Nakai, A, Kuriyama, M, Kikawa, Y, Konishi, I, Sudo, M y Itokawa, Y; Delayed auditory brainstem response in thiamin-deficient rats. *J Nutr Sci Vitaminol* 1990; 36: 209-215.
- 69) Grodin, J M, Sileri, P K y MacDonald, P C, Source of estrogen production in postmenopausal women. *JCEM* 1973; 36, (2): 207-214.
- 70) Vermeulen, A, The hormonal activity of the postmenopausal ovary. *J Clin Endocrinol Metab* 1976; 42 (2): 247-253.
- 71) Nyholm, H, Djursing, H, Hagen, C, Agner, T, Bennett, P y Svenstrup, B; Androgens and estrogens in postmenopausal insulin-treated diabetic women. *J Clin Endocrinol Metab* 1989; 69, 5: 946-949.
- 72) Framingham., Los triglicéridos. *American Heart Journal*. 1986; 432-437.
- 73) Yoshino, G, Kasumi, T, Iwai, M, Matsuba, K, Iwatani, I, Matsushita, M, Kasama, T, y Baba, S; Recommendation of strict control of plasma triglyceride in diabetic sujetos. *Diabetes Care* II. 1988; 1: 794-795.
- 74) Alcázar, M H, Alcázar, L S, Rivera, L R M y Moreno, H J; Fosfato de tiamina estable en solución como tratamiento de la diabetes. *Investigación Médica Internacional*. 1989; 16, 2: 83-91.
- 75) Reynold, S, Thiamin homeostasis in the central Nervous System. *Annals of the New Academy of Sciences* 1982; 378: 344-354.

- 76) Casirola, D, Ferrari, G, Gastaldi, G, Patrini, C y Rindi, G; Transport of thiamine by brush-border membrane vesicles from rat small intestine. *J Physiology* 1988; 398: 329-339.
- 77) Porte, D, Kahn, S E; Oral treatment of diabetes mellitus: the contribution of gliclazide. *The American Journal of Medicine*. 1991; 90 (6A): 1-88.