



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

EFFECTO DEL PIROFOSFATO DE TIAMINA EN CORTEZA CEREBRAL ISQUEMICA DE RATAS LACTANTES.

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 :

VICTOR MARTINEZ CRUZ



FACULTAD DE CIENCIAS UNAM

DIRECTOR DE TESIS: M. en C. MARCO ANTONIO MARTINEZ AVILA

2005



FACULTAD DE CIENCIAS SECCION ESCOLAR

m 345709



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA 11
MÉXICO

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: Victor Martínez Cruz

FECHA: 22/ Junio 05

FIRMA: [Firma manuscrita]

ACT. MAURICIO AGUILAR GONZÁLEZ
Jefe de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo escrito: Efecto del Pirofosfato de Tiamina en corteza cerebral Isquémica de ratas lactantes

realizado por Víctor Martínez Cruz

con número de cuenta 09126172-0 , quien cubrió los créditos de la carrera de: Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director

Propietario M. en C. Marco Antonio Martínez Avila

[Firma manuscrita]

Propietario M. en C. María del Pilar Torres García

[Firma manuscrita]

Propietario Biol. Teresa Sosa Rodríguez

[Firma manuscrita]

Suplente M. en C. José Luis Bortolini Rosales

[Firma manuscrita]

Suplente Dra. Marcela Esperanza Aguilar Morales

[Firma manuscrita]

Consejo Departamental de Biología

[Firma manuscrita]
 M. en C. Juan Manuel Rodríguez Chávez.

FACULTAD DE CIENCIAS



UNIDAD DE ENSEÑANZA
DE BIOLOGÍA

Dedicatorias

A mis Padres
Eulalio y María

Gracias por darme la oportunidad de realizar mis sueños, por todos sus esfuerzos, sacrificios, apoyo y amor que me brindaron.

A mi Esposa
Lucía

Por su comprensión en todo momento y apoyo incondicional en las buenas y en las malas te amo.

A mis Hijos
Alan y Lucía Elizabeth

Quienes son mi razón de ser y me impulsan a seguir adelante, los quiero mucho.

A mis hermanas
María Isabel y Cristina Esperanza

Por su apoyo, confianza e impulsarme en mis metas las quiero mucho y siempre están en mi corazón.

Agradecimientos

A mi tutor M. en C. Marco Antonio Martínez Avila por ayudarme a realizar este trabajo así como también brindarme en forma desinteresada su amistad.

A mis sinodales por sus valiosas sugerencias y atinadas correcciones en la realización del presente trabajo.

A los laboratorios Manuell en particular a la Q.F.B. Magalie Manuell Retana quien me brindó su apoyo incondicional, muchas gracias.

A mi amiga del laboratorio de Biología Molecular Leticia Ramírez gracias por la amistad y el apoyo brindado.

A los compañeros del laboratorio de Neuromorfometría del INP: Armando Valenzuela, María Luisa Romero, Elvia Ramírez Mendiola, Gloria Sicilia Argumedo quienes me brindaron su amistad y me apoyaron en todo momento en la realización del presente trabajo mil gracias.

Al Dr. Miguel Ángel Jiménez Bravo-Luna quien fue parte importante en este trabajo, gracias por su apoyo.

A Jorge Dávila y Carlos Álvarez de Informática de la Torre de Investigación del INP gracias por brindarme su amistad así como también el apoyo brindado.

A mis amigos de la Facultad de Ciencias: Jorge Antonio Álvarez, Jesús Juárez, Mario Nequiz, Benjamín Gómez, Teresa Rico e Isabel quienes me apoyaron y creyeron en mi gracias.

INDICE.

1.0 .- INTRODUCCIÓN

2.0 .- ANTECEDENTES

2.1 .- Morfología de la Corteza Cerebral de Rata

2.11.- Corteza cingulada anterior

2.12.- Corteza retrosplenial.

2.13.- Corteza insular

2.14.- Corteza peririnal

2.15.- Región parietal

2.2 .- Isquemia

2.3 .- Hipoxia

3.0 .- JUSTIFICACIÓN

4.0 .- OBJETIVOS

5.0 .- HIPÓTESIS

6.0 .-MATERIAL Y METODO

7.0 .- RESULTADOS

7.1.- Análisis Histológico

7.2.- Análisis Estadístico

8.0 .- DISCUSIÓN

9.0 .- CONCLUSIONES

10 .- REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1.0 INTRODUCCIÓN.

La tiamina contiene dos sistemas anulares, uno de pirimidina y otro de tiazol unidos por un grupo metileno (Figura 1).

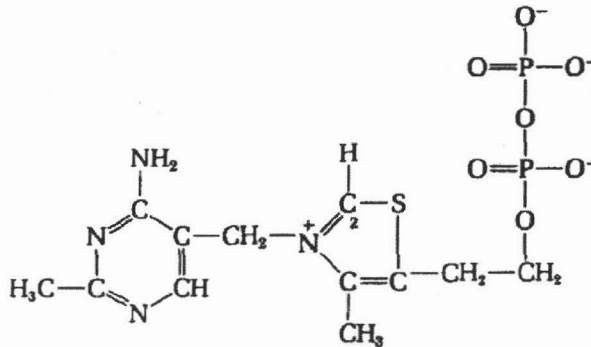


Figura1. PIROFOSFATO DE TIAMINA (PPT) Ó COCARBOXILASA. (Tomado de Lehninger, 1990).

Se ha visto que en los tejidos animales se encuentra presente en su mayor parte como pirofosfato de tiamina (PPT), el cual se encuentra forma de coenzima y funciona en diversas reacciones enzimáticas en las que los grupos aldehído se transfieren desde un dador a una molécula aceptora. Algunas de las enzimas que dependen del PPT son: Piruvato-descarboxilasa, la alfa oxoácido descarboxilasa, las piruvato oxidasas (citocromos), acetol acetato sintetasas y las transcetolasas.

Aunque se conocen que hay 24 enzimas que contienen PPT como coenzima, en muchos de los casos se desconocen los mecanismos de acción (Bowmn y Rand, 1984).

La tiamina tiene un peso molecular de 460,79 Daltones; su aspecto es de un polvo blanco y cristalino, si se le expone al aire absorbe rápidamente 4% de agua, siendo también insoluble en 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 altas temperaturas.

La tiamina libre se absorbe fácilmente por el intestino delgado, lo cual no ocurre con el pirofosfato. La tiamina es fosforilada en el intestino por la tiaminoquinasa a pirofosfato de tiamina y es secretado en la sangre portal. En esta forma de pirofosfato la mayor parte de la tiamina se almacena en una proporción de la mitad en el músculo y una décima parte en el cerebro como trifosfato de Tiamina. El contenido encefálico tiene un recambio lento, y metaboliza a monofosfato de tiamina. La mayor parte de la tiamina del plasma es libre, como el alcohol. Muchos de los metabolitos de la tiamina se excretan en la orina (Cantarow y Schepartz, 1989). Es abundante en la carne de cerdo, germen de trigo, granos completos, cereales enriquecidos y cáscara de arroz; cabe destacar que el consumo de la tiamina es importante para evitar los trastornos provocados por su deficiencia. El lugar donde se almacena en gran cantidad es en la mitocondria (Benítez, 1986).

Por otra parte la tiamina aparece en estado libre en el plasma sanguíneo y el líquido cefalorraquídeo (aproximadamente 1mg/100ml). La porción principal de la tiamina sanguínea, que fluctúa entre 6 y 12 mg/100ml se presenta en las células hemáticas como pirofosfato, en combinación proteínica. El pirofosfato de tiamina juega un papel fundamental en el metabolismo siendo intermediario de los carbohidratos, alcoholes y aminoácidos de cadena lateral por mencionar algunas de sus múltiples funciones.

La capacidad del organismo para almacenar tiamina es limitada. Se presenta en forma libre y combinada, esta última presente en corazón, hígado y riñones y en menor concentración en músculo esquelético y cerebro, mientras que en la forma de pirofosfato de tiamina se almacena en el organismo, pero dentro se combina con el trifosfato de adenosina (ATP) para formar PPT, 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 fosfato dinucleótido de nicotinamida y de adenina (NADP).

Reducido, en la síntesis de ácidos grasos; su deficiencia provoca la acumulación de piruvato y lactato en el cuerpo (Lehninger,1990).

La tiamina es un factor nutricional necesario para todas las especies vegetales y animales. La sintetizan los vegetales superiores, pero en grado limitado en la obscuridad, y la producen muchas bacterias, levaduras y mohos. La fuente más importante de esta vitamina en cuanto al hombre y otros animales es la alimentación.

Algunos vegetales y microorganismos tienen la facultad de sintetizar tiamina si se les brinda el componente pirimidico, aunque en los vegetales se halla en estado libre. En el hígado experimenta fosforilación activa convirtiéndose en cocarboxilasa.

El pirofosfato de tiamina es importante en la energía utilizada para el metabolismo celular, interactuando con enzimas como el piruvato deshidrogenasa y la alfa deshidrogenasa en el ciclo del ácido cítrico (Bettendorff, 1996).

Se ha visto que el pirofosfato de tiamina actúa a diferentes niveles, ya que es utilizado como medicamento en muchas enfermedades como el alcoholismo, diabetes, en alteraciones neurológicas, problemas durante el embarazo, alteraciones renales (Benítez, 1986).

Se ha reportado que las concentraciones del pirofosfato en el cerebro de rata son mayores con respecto a otras especies (Bettendorff, 1996). Para esto, existen diferentes metodologías que nos permiten analizar el contenido de tiamina y sus ésteres fosfatados en los diferentes líquidos corporales, así como en cada tejido, y aún en los compartimientos intracelulares. El más empleado en la actualidad, por su exactitud, es la determinación por cromatografía líquida con gradiente de alta resolución (Bettendorff, 1991).

Resultan numerosos los estudios sobre los requerimientos y el consumo de tiamina (Machlin, 1989), sin embargo, los resultados obtenidos coinciden al reportar que en el humano el mínimo requerimiento es de 1mg/día, aunque frecuentemente en los estudios se refleja gran variabilidad en el metabolismo y consumo de los

individuos, aun cuando éstos se encuentren en óptimas condiciones (Michael *et al.*, 1993).

Los órganos donde se observa una mayor velocidad de penetración son en el cerebelo, y en orden decreciente le continúan el hígado, el hipotálamo, la médula espinal, el cuerpo estriado, la médula espinal y el cerebro medio, aunque cabe destacar que el cerebro contiene el 20% de la tiamina total de reserva (Rindi *et al.*, 1987).

La vida media de la tiamina libre es de 20 minutos, el monofosfato de tiamina de 160 minutos y el pirofosfato de tiamina de 8 horas. En la corteza cerebral de humano se recambia el contenido total de tiamina y sus ésteres en 16.5 horas aproximadamente (Bettendorff y Pierre, 1994). Además se sabe que el pirofosfato de tiamina tiene funciones no coenzimáticas, tal vez como neurotransmisor en varias regiones cerebrales, como en los ganglios basales, que requieren de un mayor aporte sanguíneo y alta actividad metabólica en el recién nacido (Roskams y Connor, 1994).

En estudios de cinética de cerebro se comprobó que los compuestos de tiamina decrecen en el orden: tiamina, trifosfato de tiamina, monofosfato de tiamina y pirofosfato de tiamina. Se ha observado que después de una hora de inyectado por vía intraperitoneal, el PPT alcanzó mayores niveles en la fracción citosólica del cerebro, lo que sugiere la existencia de dos compartimientos para el PPT, la primera de cofactor unida a las mitocondrias, con un recambio bajo, y la segunda mayor en el compartimiento citosólico con alto recambio como precursor del trifosfato de tiamina (Bettendorff y Pierre, 1994).

2.0 ANTECEDENTES.

A principios del siglo pasado, se tuvo conocimiento por vez primera de la existencia de la tiamina o vitamina B1. Para el hombre es de gran importancia, ya que su ausencia provoca severos trastornos en el metabolismo, de ahí que haya surgido un gran interés por conocer a la molécula, es por eso que hasta este momento se estén realizando varias investigaciones con el afán de conocer más los problemas resultantes de la carencia de la molécula, así como también, su empleo terapéutico en la coordinación de las actividades del sistema neuroinmunoendocrino, sus posibles actividades neuroquímicas y su participación en la conducción del impulso nervioso y en la captura de radicales libres, muy recientemente, se ha visto que interviene en las vías y ciclos metabólicos más importantes y como coenzima aporta la energía necesaria al organismo proporcionando una mejoría clínica inmediata.

En el año de 1893, un médico de nombre Eijkman mostró que la parálisis podía ser aliviada rápidamente por 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 ya después se identificaría como tiamina, con el tiempo también se descubriría que esta molécula ingresa al organismo en la dieta gracias al consumo de granos y cereales (Benítez, 1986).

Con esa misma inquietud, para el año de 1911, dos investigadores de nombres Neuberg y Karczarg, demostraron que las células de la levadura, convierten el piruvato en acetaldehído y bióxido de carbono. A partir de ahí se comenzó a sospechar de la existencia

de un factor responsable de esta reacción, así se encontró que era una coenzima a la que posteriormente llamaron pirofosfato de tiamina, la cual es la forma activa de la tiamina (Benítez, 1986).

En 1929, Peters comenzó a estudiar el metabolismo oxidativo del tejido cerebral en palomas deficientes de tiamina, en donde encontró que una fase de la oxidación del piruvato era muy baja 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, lo que llevaba a vislumbrar la importancia que tenía la deficiencia de la tiamina. Peters para el año de 1939, sugirió que la tiamina se convertía en un derivado y demostró que la forma que realmente estimulaba la respiración mitocondrial era el pirofosfato de tiamina (PPT), la cual en la actualidad se sabe, es una de las coenzimas más importantes en el ciclo de Krebs y que se encuentra en grandes proporciones en la matriz mitocondrial. Para el año de 1987, Rindi observó que la tiamina y sus ésteres fosfatados penetraban a todos los tejidos pero con diferente velocidad, probablemente estas velocidades están determinadas por sus requerimientos (Peters, 1929).

En 1981, Edwin obtuvo valores de diversos alfa-cetoácidos los cuales fueron determinados en sangre total, obtenida de casos de necrosis cerebro cortical (CCN), la cual es una enfermedad ocasionada por la deficiencia de tiamina, y fueron comparados con los de animales normales. Pudo observar que el pirofosfato de tiamina (PPT) es un cofactor esencial en la carboxilación de muchos alfacetoácidos y esto fue reflejado en los valores elevados no solo de

ácido pirúvico, sino también de glicoxílico, alfacetoglutárico, fenil pirúvico e hidroxifenil pirúvico en los casos de CCN (Benítez,1986).

En 1986 Lai y Cooper, demostraron que la actividad del complejo alfa- cetogluturato deshidrogenasa es dependiente del PPT, y se presenta un gradiente a partir de corteza cerebral, cerebelo, cerebro medio, hipocampo, hipotálamo, medula espinal y bulbo olfatorio, así como también, la inhibición de este complejo por amonio, tiene efecto sobre el ciclo del ácido cítrico y puede ser de importancia fisiopatológica y patogénica en hiperamonemia, encefalopatía hepática y errores congénitos del metabolismo de la urea (Benítez,1986).

Para el año de 1988, Gibson observó que en pacientes con Alzheimer, las actividades de dos enzimas dependientes de pirofosfato de tiamina, la 2- cetogluturato deshidrogenasa y la de la transcetolasa, se reducen el 75% y 45 % respectivamente, en tejido cerebral. En el año de 1996, Bettendorff descubrió que los niveles de PPT en humano, son mínimos en hipocampo y máximos en el cuerpo mamilar. Los niveles máximos de tiamina y sus ésteres fosfato fueron detectados al nacimiento; en corteza parietal, los niveles medios de tiamina total en el grupo de edad mayor (77-103 años) fueron menores que aquellos del grupo de edad media (40-55 años), lo que sugiere que el estatus de la tiamina decrece con la edad. En 1997, se observó que el difosfato de tiamina es un cofactor importante de piruvato y alfa- cetogluturato deshidrogenasa y transcetolasas (Gibson, 1988).

La deficiencia de tiamina conduce a lesiones cerebrales reversibles e irreversibles por daño del metabolismo oxidativo, así se ve que es un cofactor para el papel que juega en el metabolismo la tiamina, además también propone que el trifosfato de tiamina puede

estar involucrado en la formación de canales iónicos. En ese mismo año, Wilkinson evaluó la respuesta de la deficiencia de tiamina, tomando al azar sujetos mayores de edad para suministrarles tiamina, éstos mostraron incrementos en las concentraciones de PPT, comparados con el grupo control, al cual no se le administró tiamina, por lo que, los primeros presentaron grandes beneficios ya que mostraban una mejor conciliación del sueño así como de energía, mientras que el grupo control mostró todo lo contrario (Benítez, 1986).

2.1 Morfología de la Corteza Cerebral de Rata

Como en todos los mamíferos, la corteza cerebral de la rata, puede ser subdividida en la isocorteza y allocorteza. Las regiones corticales muestran zonas bien definidas de seis estratos, los cuales pueden ser categorizados como isocorteza, visto que otras regiones muestran totalmente una estructura laminar heterogénea que puede ser categorizada como allocorteza.

Considerando aspectos evolutivos, el término isocorteza puede ser reemplazado por el término neocorteza; y similarmente el término allocorteza puede ser reemplazado por los términos de paleocorteza y arquicorteza, quien tiene implicaciones funcionales olfatorias y límbicas. Aunque esos términos son frecuentemente usados, la corteza olfatoria es comparable a la paleocorteza y la corteza límbica a la arquicorteza, con lo que respecta a la corteza cingulada anterior y la siguiente corteza retrosplenial caudal, forma el borde entre la allocorteza y la isocorteza, y la superficie medial y dorsal del hemisferio. En la superficie anterior, la isocorteza está rodeada por la corteza insular, la cual puede ser subdividida en las áreas agranular insular dorsal (AID), ventral (AIV) y posterior (AIP) (Paxinos y Watson, 1982).

2.11 Corteza Cingulada Anterior

El área cingulada anterior puede ser identificada en parte de la corteza prefrontal aunque en la corteza prefrontal en la rata no muestra los cuatro estratos granulares. La identificación de la corteza

prefrontal en roedores fue hecha por Leonard (1969), el cual define el campo orbitofrontal como el blanco de proyecciones de los núcleos talámicos mediodorsales (MD) (Paxinos y Watson, 1982).

2.12 Corteza Retrosplenial

Para la corteza retrosplenial (frecuentemente llamada, corteza cingulada posterior) cabe destacar que algunos términos varían y algunos otros son los mismos para las diferentes estructuras. La citoarquitectura y mieloarquitectura, tienen características que finalmente conducen a una clara separación de las áreas retrosplenial y el área cingulada anterior (Paxinos y Watson, 1982).

2.13 Corteza Insular

Tiene una posición dorsal, esta corteza se extiende profundamente en el sulco rinal y está cerca de la región de transición dorsal de la isocorteza. Esa región se puede dividir dentro de la corteza agranular insular dorsal (AID), ventral (AIV) y posterior (AIP). Estas áreas no muestran una clara estructura isocortical y debe ser comparada con las áreas perialocortical y proisocortical de la claustrócorteza (Paxinos y Watson, 1982).

2.14 Corteza Peririnal

La corteza peririnal sigue las partes posteriores del surco rinal y limita con la corteza entorrinal ventral y las áreas temporales Te2 y

Te3 dorsales. La posición y la estructura de la corteza peririnal coincide con la descripción de Deacon *et al.* 1978. La corteza peririnal recibe vías aferentes, desde el área cingulada anterior, el área media frontal, y las áreas sensorias secundarias de la neocorteza, el *presubiculum* y *parasubiculum* (Paxinos y Watson, 1982).

2.15 Región Parietal

Las áreas parietales están caracterizadas por el buen desarrollo del estrato granular. La región parietal puede, ser totalmente fácil, delineada desde las áreas periféricas de este criterio. El estrato 4 de la región parietal muestra diferencias estructurales remarcables, permitiendo subdivisiones de esta región (Paxinos y Watson, 1982). La distribución de las diversa zonas de la corteza de rata pueden ser observadas en las figuras 2 y 3.

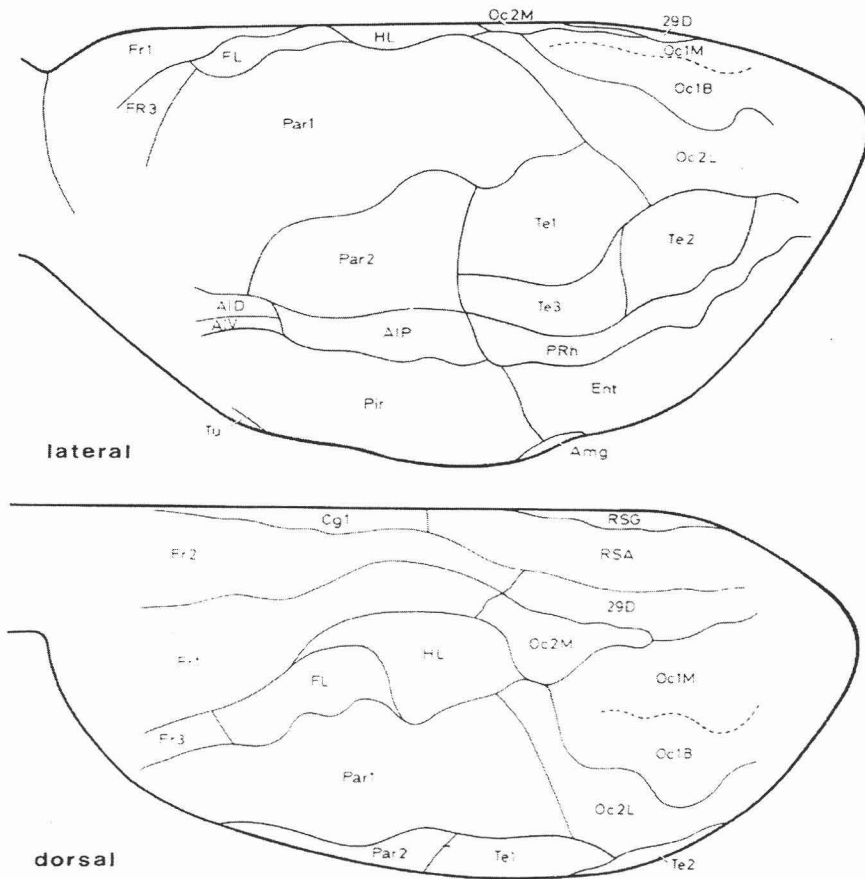


Figura 2 Estructura Laminar de rata Adulta, mapa de secciones: lateral, dorsal, medial y basal en las áreas 29D: AID, parte dorsal de corteza insular agranular; AIP parte posterior de corteza insular agranular; Cg1, área 1, corteza cingulada (corteza prefrontal media); Cg2 área 2, corteza cingulada (corteza prefrontal media); Cg3 área 3, corteza cingulada (corteza prefrontal media); Ent, área entorinal; FL, limbo anterior; Fr1, área 1 frontal; Fr2, área 2 frontal; Fr3, área 3 frontal; HL, limbo posterior; IG, indusium griseum; IL, área infralimbica de la corteza frontal media; Oc1, área, corteza occipital; Oc1B, área 1 lateral, parte binocular del occipital, Oc2L área 2 lateral occipital; Oc1M, área 1 medial parte

monocular del área occipital; Oc2M, área 2, medial occipital; Par1, área 1 parietal; Par2, área 2. Tomado de (Paxinos y Watson, 1982).

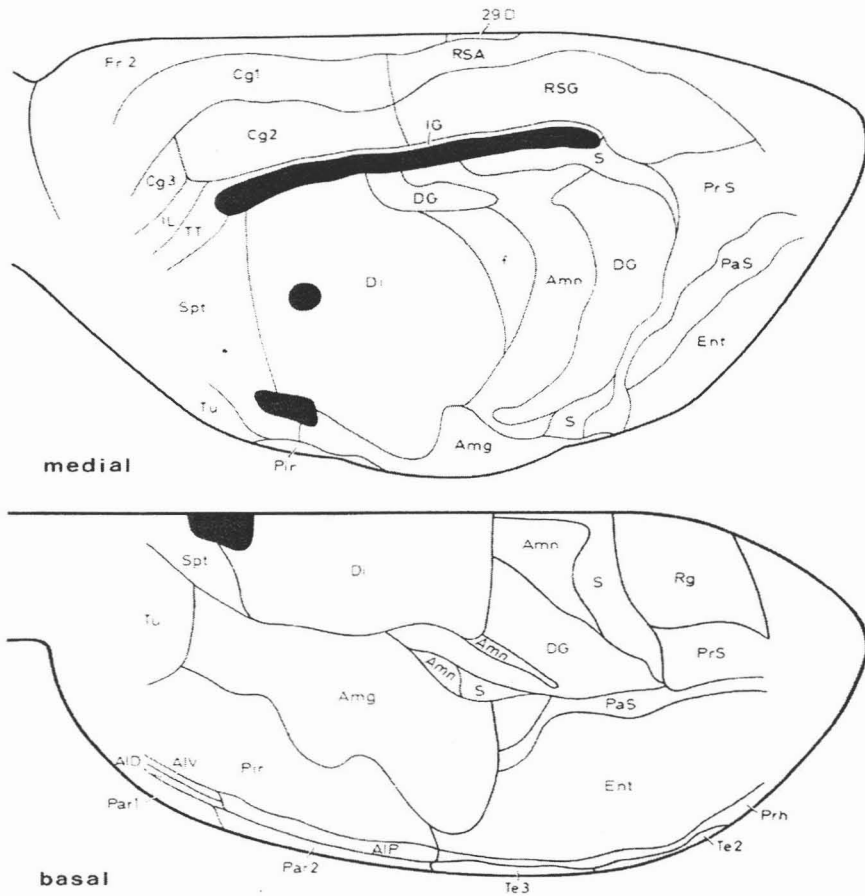


Figura 3. Estructura Laminar de rata Adulta, mapa de secciones: lateral, dorsal, medial y basal en las áreas 29D: AID, parte dorsal de corteza insular agranular; AIP parte posterior de corteza insular agranular; Amg, Amígdala; Amn, cuerno de Ammon; Cg1, área 1, corteza cingulada (corteza prefrontal media); Cg2 área 2, corteza cingulada (corteza prefrontal media); Cg3 área 3, corteza cingulada (corteza prefrontal media); DG, giro dentado; Di, diencéfalo; Ent, área

entorinal; F, fornix; FL, limbo anterior; Fr1, área 1 frontal; Fr2, área 2 frontal; Fr3, área 3 frontal; HL, limbo posterior; IG, indusium griseum; IL, área infralímbica de la corteza frontal media; Oc1, área, corteza occipital; Oc1B, área 1 lateral, parte binocular del occipital, Oc2L área 2 lateral occipital; Oc1M, área 1 medial parte monocular del área occipital; Oc2M, área 2, medial occipital; Par1, área 1 parietal; Par2, área 2, parietal; PaS, parasubiculum; Pir, corteza piriforme; PRL, corteza peririnal; PrS, presubiculum; PSA, corteza retrosplenial agranular; RSG, corteza retrosplenial granular; S, Subiculum; Spt, septum; Te1, área 1 temporal; Te2, área 2 temporal; Te3, área 3 temporal; TT, tenia tecta; Tu, Tubérculo olfatorio. Tomado de (Paxinos y Watson, 1982).

2.2 Isquemia

Normalmente, la mayor parte del control nervioso de la presión arterial se lleva a cabo por reflejos que se originan en los barorreceptores, los quimiorreceptores y los receptores de la presión baja que se localizan en la circulación periférica fuera del cerebro. Sin embargo, cuando el flujo sanguíneo al centro vasomotor situado en el tallo encefálico bajo disminuye lo bastante para causar una carencia nutricional, y en consecuencia un trastorno denominado isquemia, las neuronas del centro vasomotor en sí, responden directamente a la isquemia y se excitan intensamente. Cuando esto ocurre, el centro vasomotor aumenta su actividad y la presión arterial general se eleva muchas veces tanto que el corazón ya no puede impulsarla. Se cree que este efecto depende de la imposibilidad en que se halla el riego lento de eliminar el dióxido de carbono del centro vasomotor; la concentración local de dióxido de carbono aumenta mucho y ejerce un poderoso efecto estimulando el sistema nervioso simpático.

Es posible que otros factores, como la acumulación de ácido láctico y otras sustancias ácidas contribuyan también a fuerte estimulación del centro vasomotor y al aumento de presión. Este incremento de la presión arterial en respuesta a la isquemia cerebral recibe el nombre de respuesta isquémica del SNC (Guyton, 1994).

Si la isquemia cerebral resulta tan intensa que una elevación máxima de la presión arterial media todavía no logra aliviar la isquemia, las células neuronales empiezan a sufrir metabólicamente, y en plazo de 3 a 10 minutos se hacen totalmente inactivas, por lo tanto,

la presión arterial cae entonces hasta alrededor de 40 a 50 mm Hg, nivel al cual baja cuando desaparece toda actividad vaso motora. Por tanto, es muy afortunado que el reflejo isquémico sea tan intenso que la presión arterial generalmente suba lo suficiente para corregir la isquemia antes que cause depresión nutritiva y muerte de las células neuronales.

En otro tipo de isquemia como lo es la coronaria, el riego sanguíneo insuficiente del músculo cardiaco disminuye su metabolismo por tres motivos diferentes; falta de oxígeno, exceso de dióxido de carbono y falta de transporte de nutrientes. En consecuencia, no puede producirse polarización de las membranas en zonas donde la isquemia miocárdica es intensa, la isquemia causa dolor visceral, exactamente es la misma forma que en otros tejidos, supuestamente por la formación de productos metabólicos finales ácidos o productos de degeneración tisular, como la bradicina y enzimas proteolíticas (Murray y Alpert, 1994).

2.3 Hipoxia.

Existen diversos tipos de hipoxia, la cual se podría definir como la capacidad tisular inadecuada para el uso del oxígeno (Guyton, 1994). La causa clásica de la incapacidad de los tejidos para utilizar el oxígeno es el envenenamiento por cianuros, situación en la que la acción de la citocromooxidasa se bloquea por completo, a tal grado que los tejidos no pueden utilizar el oxígeno aunque este disponible en abundancia. Otra causa de este tipo de hipoxia es la deficiencia de enzimas oxidativas u otros elementos en el sistema oxidativo de los tejidos.

Un ejemplo de esto ocurre en el beriberi, en el cual, varios de los pasos importantes para la utilización tisular del oxígeno y la formación de dióxido de carbono se ven comprometidos debido a la deficiencia del pirofosfato. La hipoxia muy profunda puede causar muerte celular; si es de grados menores tiene como consecuencias principales:

- 1) Depresión de la actividad mental que en ocasiones culmina en el coma.
- 2) Disminución del trabajo muscular.

El tratamiento con oxígeno es de gran valor en algunos tipos de hipoxia, pero carece en otros. Los diferentes tipos de hipoxia son: hipoxia atmosférica, hipoxia por hipo ventilación, hipoxia por trastorno en la difusión, hipoxia por anemia. En los diferentes tipos de hipoxia por uso inadecuado de oxígeno, por parte de los tejidos, no hay anormalidad en la captación de oxígeno por los pulmones, ni en el transporte a los tejidos, lo que ocurre es que, el sistema metabólico de los tejidos es incapaz de utilizar el oxígeno que se le suministra. Por lo

tanto es dudoso que el tratamiento con oxígeno ofrezca algún beneficio (Guyton, 1994).

Algunas de las consecuencias de la hipoxia-isquemia son: Daños neurofisiológicos, retardo mental, parálisis cerebral, dificultad de aprendizaje y epilepsias. En modelos con hipoxia-isquemia por lo regular se trabaja con ratas de 7 días postnatales, lo que es similar histológicamente, con fetos humanos con 32 o 34 semanas de gestación. A esta edad, los estratos corticales neuronales están completos, la matriz germinal esta envuelta y la materia blanca todavía no experimenta mielinación. También se ha observado que los cerebros de rata de 12-13 días equivaldrían al tiempo terminal de un infante recién nacido humano.

En un daño provocado por el modelo de hipoxia-isquemia las ratas inmaduras sobreviven 2-3 horas. El daño está restringido al hemisferio cerebral ipsilateral; Por la oclusión de la arteria carótida. El daño puede ser observado en la corteza cerebral, subcortical y periventricular, materia blanca, ganglios basales e hipocampo (Bettendorff, 1991).

Investigaciones recientes muestran que una moderada hipotermia disminuye el daño cerebral, resultado de una hipoxia-isquemia en ratas recién nacidas, aunque no esta determinada la supresión del metabolismo oxidativo durante la hipoxia-isquemia este es un mecanismo crítico para la neuroprotección por el uso de la hipotermia (Vanucci *et al.*, 1999).

Por otro lado, existen cambios histoquímicos originados por el hierro después de la hipoxia-isquemia, es muy abundante e importante para las enzimas que regulan la energía celular del metabolismo y

juega un rol central en la formación de mielina. La concentración en el cerebro es grande durante los periodos de crecimiento rápido en el cerebro de ratas recién nacidas, mientras que en ratas adultas, el depósito excesivo del hierro en el cerebro implica una patogénesis que desencadena la enfermedad de Alzheimer (Taylor y Morgan, 1994).

En condiciones normales, el hierro del cerebro es almacenado dentro de proteínas, éstas son necesarias para salvaguardar el hierro, ya que este puede provocar la peroxidación de lípidos y catalizar el daño a diversas moléculas (Beard *et al.*, 1993).

La respuesta del cerebro de un recién nacido es diferente a la de un adulto en cuanto a la hipoxia-isquemia. Los niveles bajos del flujo de sangre en el cerebro, producen infarto en el cerebro del adulto, lo cual puede ser tolerado por los recién nacidos humanos sin un aparente efecto. Es muy importante el rol que juega la energía en el metabolismo ya que va a incrementar la tolerancia de los cerebros de recién nacidos hacia la hipoxia-isquemia (Andrews y Bringas, 1993).

Experimentos en modelos de daño cerebral de origen hipoxicoisquémico en animales, demuestran que empieza durante la hipoxia-isquemia, y empeora en el transcurso de la recuperación. Estudios recientes en animales recién nacidos señalan que el daño cerebral de origen hipoxicoisquémico, incluso infarto, puede reducirse mediante intervenciones iniciadas después del fenómeno adverso hipoxicoisquémico.

Suele llamarse lesión por reperfusión al daño causado por el regreso de la sangre oxigenada a tejido previamente isquémico. Es característico que la lesión por reperfusión incluya daño de la

microvasculatura, y está mediada en gran parte por radicales libres, factores derivados de células endoteliales y neutrófilos (Guyton, 1994).

Los procesos parenquimatosos pueden ser muy complejos y estar interrelacionados, comprenden daño neuronal por aminoácidos excitadores, acumulación intracelular de calcio, generación de radicales libres, alteraciones de la síntesis de proteína, desequilibrio de factores tróficos, microglia y apoptosis. Otros procesos parenquimatosos clave que se prestan a intervención terapéutica son las demandas metabólicas excesivas impuestas al tejido cerebral en recuperación, por crisis convulsivas, aminoácidos excitadores y depresión en diseminación. El incremento de las necesidades metabólicas debe correr parejas con un flujo aumentado. Lamentablemente, la disfunción micro vascular en la penumbra isquémica suele no permitir que se satisfagan las demandas metabólicas y la desproporción entre metabolismo y flujo sanguíneo da lugar a un infarto en evolución (Kurose *et al.*, 1994).

Muchos estudios en diversos modelos animales experimentales demuestran que cuando se restituye la perfusión del encéfalo tras un periodo de isquemia, sobreviene una hiperemia inicial, seguida de un periodo de hiper perfusión (Ames *et al.*, 1968).

La hipo perfusión post isquémica también se conoce, como fenómeno de no-reflujo, cuya gravedad se incrementa con la duración e intensidad de la isquemia cerebral (Karlson *et al.*, 1994).

Si bien muchos factores pueden contribuir al fenómeno de no-reflujo, ya sea desde dentro o fuera del microvaso, también necesita considerarse un mecanismo desencadenado por neuronas locales (Palmer y Gerard, 1989).

Ahora bien, en lo que respecta a la participación de los neutrófilos en el daño cerebral, estos se han observado en infartos cerebrales desde hace 20 años (Pozzilli *et al.*, 1985).

Recientemente se ha apreciado su contribución a la lesión cerebral en reperfusión. Los neutrófilos pueden taponar y obstruir físicamente la microvasculatura, dañar de modo directo células endoteliales, salir de los vasos, o infiltrar el parénquima cerebral y lesionar neuronas y células de la neuroglía. Los neutrófilos interactúan con células endoteliales mediante moléculas de adherencia específicas expresadas por ambas células. Se han revisado los mecanismos moleculares de la adherencia entre neutrófilos y endotelio (Lucchesi, 1994; Kurose *et al.*, 1994).

A partir de esta nueva comprensión, han surgido muchas estrategias antiinflamatorias potenciales para reducir el daño cerebral por reperfusión, que en potencia, son aplicables a estudios clínicos en recién nacidos asfixiados. Las primeras pruebas de la participación de los neutrófilos en la isquemia cerebral temprana por reperfusión proceden de un estudio en el que se informó la acumulación de granulocitos durante las primeras cuatro horas post isquemia cerebral focal en perros. Los neutrófilos se acumularon en regiones cerebrales de flujo bajo. Dicho estudio fue seguido al poco tiempo por un informe que mostró taponamiento por leucocitos en el encéfalo de gatos después de hipotensión aguda. Dicho taponamiento ocurrió en ramificaciones capilares, y se acompañó de un patrón de flujo no uniforme. Los neutrófilos contribuyen a la lesión cerebral de origen isquémico en ratas recién nacidas, tiene importancia para recién nacidos humanos. En estos últimos, los neutrófilos muestran

características funcionales diferentes; tienen cifras de activación adherencia, quimiotaxis y quimioluminiscencia menores que en adultos. Los neutrófilos son células grandes (10 - 11 micras en seres humanos), cuyo diámetro excede el de los capilares. En consecuencia, el tránsito a través de la red capilar exige deformación. En el momento de la activación, los neutrófilos presentan propiedades visco elásticas rígidas que limitan más sus movimientos, lo cual causa retraso del tránsito de eritrocitos y deterioro de flujo (Pálmer y Gerard, 1989).

Dentro de las lesiones cerebrales está el factor activador de plaquetas (PAF), el cual durante estados patológicos del sistema nervioso, como traumatismo, apoplejía y convulsiones, sobreviene producción excesiva de PAF. En muchos estudios realizados en animales con el uso de antagonistas de receptores de PAF altamente específicos ocurre reversión o prevención de consecuencias clave del daño cerebral de origen isquémico. Esos estudios señalan participación del PAF, como mediador importante de la fisiopatología de la lesión cerebral. Si bien ninguno de los estudios se efectuó en modelos de daño de encéfalo inmaduro, la disponibilidad de antagonistas del PAF puede constituir otro recurso de neuroprotección después de asfixia al nacer (Yue y Feurstein, 1994).

En el transcurso de lesión cerebral de origen isquémico, las neuronas residentes, las células gliales y endoteliales, los neutrófilos y plaquetas transportados por la sangre, producen PAF. Este último se sintetiza mediante mecanismos enzimáticos a partir de metabolitos lípidos producidos en respuesta a la activación de fosfolipasa A2 (PLA2). La isquemia cerebral activa a la PLA2 dependiente de Ca^{++2} , que hidroliza fosfolípidos de membranas celulares. La reperfusión

proporciona el oxígeno necesario para el metabolismo adicional de los ácidos grasos libres liberados, como el ácido araquidónico en prostanoïdes vasoactivos.

Los fosfolípidos de membrana proporcionan factor activador de plaquetas con actividad lítica (liso-PAF): el precursor del PAF activo. De este modo, el metabolismo de los fosfolípidos de membrana proporciona los precursores esenciales para la producción tanto de eicosanoides como de PAF durante isquemia-reperusión. (Linsberg *et al* 1991)

El PAF regula la liberación de diversos mediadores inflamatorios, entre ellos citocinas, tromboxanos, prostaglandinas y leucotrienos; asimismo ejerce efectos citotóxicos en células neuronales, inhibe la actividad de Na⁺, K⁺, ATPasa en el encéfalo de ratas y produce vaso constricción. Aumenta la permeabilidad vascular, la agregación plaquetaria y la activación de neutrófilos. Como se señaló, el PAF tiene importancia en la mediación de interacciones de adherencia entre neutrófilos circulantes, plaquetas y el endotelio micro vascular, así como entre leucocitos y plaquetas. En un estudio clínico reciente se confirmó incremento de la adherencia de plaquetas y leucocitos en pacientes con isquemia cerebral. El PAF no regula el flujo sanguíneo ni el índice metabólico de oxígeno en encéfalos normales. Ésta es una noticia agradable para los médicos y sugiere que los antagonistas de los receptores de PAF pueden tener un amplio margen de seguridad (Catalán *et al.*, 1994).

Durante el proceso de isquemia – reperusión, se da la generación de radicales libres. Un radical libre es una molécula química con uno o más electrones no apareados en su órbita más

externa. Ésto hace a la molécula inestable, dado que casi todas las moléculas biológicas tienen sus electrones dispuestos en pares. Los radicales libres donan (radical oxidante) electrones a otras biomoléculas, o los toman (radical reductor) de ellas, con el fin de formar pares con sus electrones y generar una molécula más estable. De este modo, los radicales generan nuevos radicales y destruyen la estructura química de sus moléculas blanco, incluso DNA, proteínas y casi todos los lípidos de membrana. Puesto que el encéfalo muestra un contenido particularmente alto de fosfolípidos poli insaturados, es susceptible al ataque de radicales libres. El hierro libre y el óxido nítrico son colaboradores importantes en la lesión de origen oxidativo, en vista de que transforman especies de oxígeno levemente reactivas, en radicales libres más dañinos (Reilly *et al.*, 1991).

Los radicales libres y las especies de oxígeno reactivas (superóxido y peróxido de hidrógeno), se forman en el transcurso del metabolismo normal, y causan daño sólo cuando superan a las defensas antioxidantes del encéfalo. Paradójicamente, el oxígeno es la base de casi todas las especies de radicales libres generados durante reperusión. Después de hipoxia – isquemia cerebrales se forman radicales libres excesivos, y las defensas antioxidantes están disminuidas. Durante la reperusión de un encéfalo previamente isquémico, es posible que el metabolismo de los ácidos grasos libres y de las prostaglandinas dé por resultado volúmenes en potencia dañinos de superóxido, peróxido de hidrogeno e incluso especies más reactivas como el radical hidroxilo (Yue y Feurstein, 1994).

3.0 JUSTIFICACIÓN

La encefalopatía está asociada con irritabilidad, nerviosismo, letargo, decremento en movimientos espontáneos y ataques. Aproximadamente 20 a 40% de los infantes desarrollan secuencias neurológicas, particularmente en los neonatales los signos persisten a lo largo de una semana. La hipoxia-isquemia cerebral da como resultado un daño desproporcionado en estructuras como el tálamo, corteza y materia blanca subcortical. Existen diversos metabolitos anormales en la sangre identificados durante la hipoxia-isquemia, muchos de esos metabolitos están asociados con la encefalopatía. Con el empleo del pirofosfato de tiamina se espera poder contrarrestar este daño.

4.0 OBJETIVOS

1.- Determinar el efecto neuroprotector del pirofosfato de tiamina (PPT) en la corteza cerebral isquémica de ratas recién nacidas.

2.- Establecer la ventana terapéutica del PPT en un modelo de isquemia cerebral en ratas neonatales.

5.0 HIPÓTESIS

La aplicación del PPT tendrá acción neuroprotectora mayor cuando se suministra en tiempos mas cercanos al fenómeno isquémico.

6.0 MATERIAL Y MÉTODO.

Se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar, de 15 días de nacidas, obtenidas del bioterio del Instituto Nacional de Pediatría. Fueron tratados 20 animales con una solución de PPT, la cual fue proporcionada por los Laboratorios Manuell S. A., en su presentación comercial Carzilasa, con una concentración de 0.04 gramos de cocarboxilasa por mililitro de vehículo, los que correspondieron al grupo experimental. Otros 20 animales correspondientes al grupo control fueron inoculados únicamente con el vehículo (solución fisiológica salina). Ambas soluciones tuvieron una clave para evitar que se supiera el tratamiento de cada organismo, la que se conservó hasta el final de la fase de análisis estadístico.

Cada tiempo experimentado estuvo integrado por 4 animales tratados con PPT y 4 animales con solución salina. El PPT fue administrado 5, 10, 20, 40, y 80 minutos después de iniciado el proceso isquémico en una dosis de 130 mg/Kg de peso del animal, contenida en 0.15ml de solución salina por vía intraperitoneal

Con lo que respecta al fenómeno de isquemia, ésta se indujo por oclusión de la arteria cerebral media. Los animales previamente anestesiados con Quetamina y Rumpum en una concentración de 35 mg/kg de peso en una proporción de 1:1 en solución salina, fueron operados bajo el microscopio estereoscópico. Se realizó una incisión de 5mm en la piel, entre la comisura externa del ojo derecho y el lóbulo de la oreja del mismo lado. Se separaron los músculos del cráneo y se procedió a quitar las láminas de hueso de esa zona, hasta

que se observó con facilidad la duramadre y a trasluz la arteria cerebral media. Posteriormente se ligó la arteria cerebral media con un hilo de 10 ceros. Para la piel se suturó con hilo prolene 7 ceros.

La oclusión de la arteria carótida primitiva, se hizo con una incisión de 1 cm en la piel a nivel de la línea media ventral del cuello, se separaron los músculos de la zona adyacente a la tráquea y se ligó con hilo nylon de 10 ceros la arteria carótida primitiva del lado derecho del animal. Hecho esto se suturó la piel con dos puntos utilizando un hilo prolene 7 ceros.

Se sacrificaron los animales a las dos horas posteriores al inicio del proceso isquémico por medio de decapitación. Posteriormente se obtuvo la masa encefálica y se hicieron 2 cortes coronales equidistantes en los hemisferios cerebrales y se fijaron en formalina al 10%, en buffer de fosfatos pH 7.2, 0.1 M.

Los bloques fijados de cerebro se deshidrataron con concentraciones crecientes de etanol y se aclararon con dos cambios de xileno. Se embebieron en dos cambios de parafina grado histológico a 56°C, 1 hora en cada cambio y se incluyeron en parafina permitiendo su solidificación a temperatura ambiente. Con la ayuda de un micrótopo de rotación se hicieron cortes histológicos de 5 µm los que fueron tomados cada 250 micras a partir del lóbulo frontal, a través de todo el encéfalo, manteniendo su seriación en portaobjetos. Los cortes fueron desparafinados con xileno e hidratados con cambios descendientes en etanol por 3 minutos cada uno, hasta mantenerlos en agua destilada. Posteriormente fueron teñidos con una solución acuosa al 1% de violeta de cresilo. Se deshidrataron con

concentraciones crecientes de etanol, se aclararon en xileno y montaron con resina sintética.

Con la ayuda de una cámara clara acoplada, a un microscopio y con un objetivo de 2.5X se elaboraron esquemas de las zonas isquémicas de penumbra y lesionadas. La zona de penumbra se caracterizó por presentar necrosis con mayor afinidad por el violeta de cresilo, en tanto que las zonas lesionadas tienen poca afinidad por el colorante y pérdida de la organización estructural del neuropilo. Con la ayuda de un planímetro (marca Zero Setting) se midieron las zonas afectadas, los valores fueron expresados en unidades planimétricas.

Para el análisis estadístico se utilizó la prueba de análisis de varianza y prueba de Tukey para establecer las diferencias entre los grupos estudiados.

7.0 RESULTADOS

7.1 Análisis Histológico.-

La figura 4A, muestra una panorámica de un corte de cerebro de rata (120x) la cual recibió el medicamento después de iniciada la oclusión a 10 minutos postisquémicos. Observándose una pequeña zona de lesión, esta se demuestra por presentar una menor afinidad por el colorante mientras que en el caso de la zona de penumbra se observa una mayor afinidad.

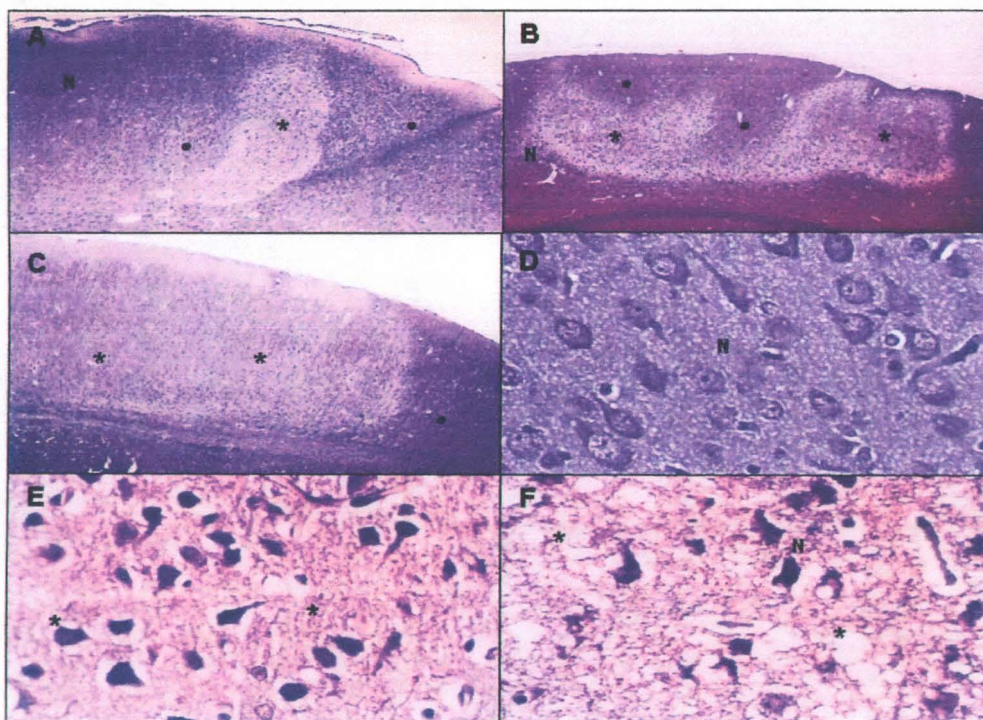
A este tiempo se puede diferenciar que el grado de lesión es menor en comparación con la figura 4B, la cual es una muestra a la que se le inoculó el pirofosfato de tiamina a los 20 minutos postisquémicos en donde también se muestra la panorámica de un corte de cerebro de rata sometida a isquemia (120X), en esta micrografía se pueden apreciar las zonas de lesión y de penumbra. La primera se caracteriza por presentar neuronas dañadas y neuropilo desorganizado; la segunda, en la cual el daño es menor se reconoce por la mayor afinidad que tienen las neuronas por el colorante. Los extremos del corte, tanto derecho como izquierdo a las zonas de penumbra y lesión. Se aprecian áreas en donde las neuronas no presentan daño alguno.

En la figura 4C, se observa una muestra a la cual se le inoculó el pirofosfato de tiamina a los 40 minutos postisquémicos observándose un grado de lesión mucho mayor respecto a las anteriores figuras presentadas, el grado de lesión es mayor respecto al área de penumbra, como se puede observar el grado de lesión se va

incrementando conforme aumenta también el tiempo de lesión postisquémica. En la figura 4D, se observa una micrografía (480X), la cual corresponde al encéfalo de los animales del grupo control. Las neuronas se distinguen con bordes bien definidos, cromatina fina, nucleolos evidentes, membrana nuclear bien definida, neurópilo homogéneo, células gliales sin alteración así como también la sustancia blanca.

Figura 4E de igual manera a los 40 minutos de inoculación postisquemicos en donde se encuentran neuronas con daño lo mismo que el parénquima el cual ya presenta alteraciones en su conformación, lo mismo sucede con los núcleos, estas alteraciones son mas que evidentes al contrastar con la figura 3D. En la figura 4F (480X) es una micrografía observada a los 80 minutos de inoculación postisquemicos en donde podemos encontrar neuronas con un daño mayor, las que se reconocen por presentar un mayor grado de afinidad por el colorante (picnosis), caracterizadas por el obscurecimiento del núcleo y citoplasma, seguido por contracción del pericarion hasta llegar a la pérdida de los límites nucleares y ruptura de la membrana citoplasmática. La luz de los vasos sanguíneos aparecen más grandes y en general grandes huecos en el parénquima nervioso respecto a la figura 4D.

FIGURA 4

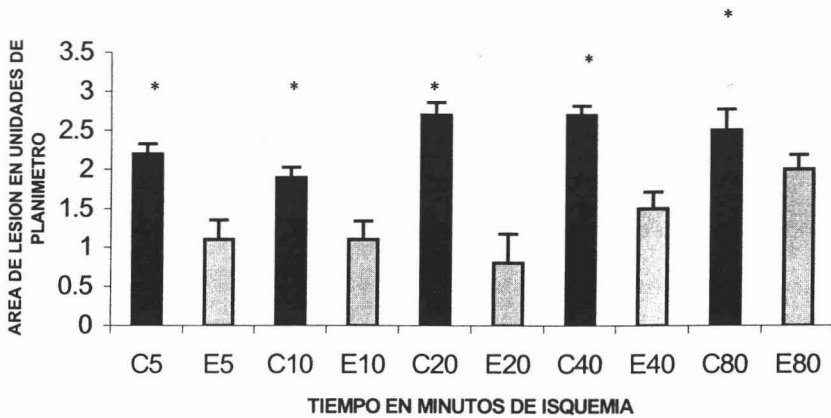


7.2 Análisis Estadístico.

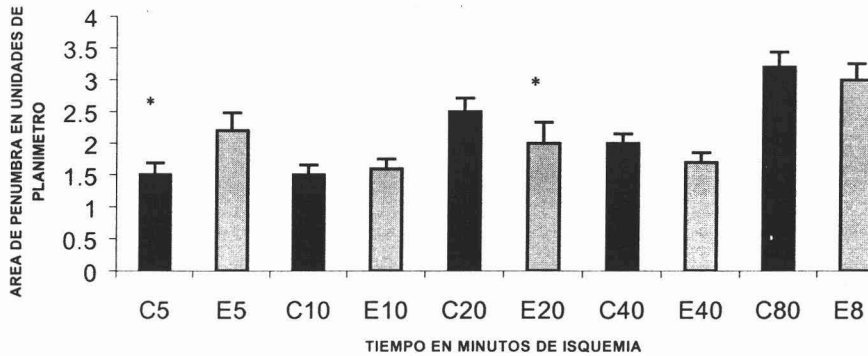
La gráfica 1, muestra los valores promedio de lesión por corte en los grupos tratados a los 5, 10, 20, 40, 80 minutos post isquemia, tanto para los animales control como para los experimentales, donde se observa que a los 5 minutos post isquemia existe una disminución de lesión del 50% en el grupo experimental comparado con el control; mientras que para los 10 minutos la disminución fue del 43%; a los 20 minutos hay una reducción de 71% en el grupo experimental comparado con el control, como se muestra en la gráfica 1.

En este tiempo se observa la mayor disminución respecto a los demás tiempos estudiados; para los 40 minutos la disminución en el grupo experimental es de 45% en relación con el control, y a los 80 minutos la disminución fue del 20% comparando el experimental con el control. Este grupo es el que menor cambio tuvo respecto a los demás tiempos estudiados.

En la gráfica 2, se muestran los valores promedio de penumbra en los grupos tratados a los 5, 10, 20, 40, 80 minutos post isquemia, tanto para los animales control como los experimentales donde se observa que a los 5 minutos hubo, un aumento en el grupo experimental comparado con el control del 46%; mientras que a los 10 minutos no hubo diferencias significativas. Para los 20 hay una disminución del 20% del grupo experimental respecto al grupo control. A partir de este tiempo se observa, tanto los grupos control y experimentales son similares, es decir no hay diferencias estadísticamente significativas.



Grafica 1. Efecto del PPT sobre áreas lesionadas a diferentes tiempos de inicio del tratamiento en cerebros con isquemia de rata lactantes. Se muestran por un lado los grupos control (C), los cuales tienen únicamente el vehículo, mientras que por el otro los grupos experimentales (E) los cuales fueron tratados con PPT. Cada barra representa el promedio de 40 a 80 cortes histológicos por grupo. Los tiempos empleados fueron 5, 10, 20, 40 y 80 minutos postisquemia. Se puede observar que hay diferencias significativas en todos los tiempos estudiados entre los grupos control y su respectivo grupo experimental. Anova, Tukey, * $p \leq 0.05$



Gráfica 2 Efecto del PPT sobre las áreas en penumbra a diferentes tiempos de inicio del tratamiento cerebros con isquemia de rata lactantes e muestran por un lado los grupos control (C) los cuales no tienen PPT, mientras que por el otro los grupos experimentales (E) los cuales fueron tratados con PPT. Los tiempos empleados fueron 5, 10, 20, 40 y 80 minutos postisquemia Para el tiempo 5 hubo un promedio mayor en el grupo experimental comparado con el control. En el tiempo 20 el grupo experimental fue significativamente menor que el control. Anova, Tukey* $p \leq 0.05$

8.0 DISCUSION

Se determinó el grado de protección que pudo conferir el PPT a partir de la disminución de la zona lesionada, avalado por el análisis de varianza y prueba de Tukey entre cada uno de los grupos. En el análisis que se hizo a las áreas lesionadas se puede observar que hubo disminución significativa en todos los tiempos estudiados entre animales experimentales comparados con los control, viéndose la mayor disminución al los 20 minutos en donde se tuvo una diferencia del 71%, mientras que en la penumbra a este mismo tiempo se observó una disminución entre el grupo experimental y control, lo cual puede decir que dicho intervalo de tiempo podría ser el adecuado para administrar el PPT.

No se tienen datos en la literatura que permitan contrastar los resultados de este trabajo en relación con el sistema nervioso central, únicamente se sabe que se produce una deficiencia de tiamina en ratas por tratamiento con piritiamina, un antagonista de tiamina.

El tratamiento con piritiamina dio como resultado signos neurológicos anormales tales como ataxia y convulsiones. Las actividades de las enzimas en los cerebros de animales pareados por alimento fueron similares a los de los grupos control. (Elnageh y Gaitonde, 1988)

Por otro lado, Rosanov y colaboradores, quienes administraron PPT, lipoato, fosfopantotenato, nicotinato y flavinas demuestran efectos antihipóxicos en un homogenado *in vitro*.

El PPT decrece en el lapso de 1 hora en tejido hepático de ratas sujetas a hipoxia. Lo que sugiere que la actividad de las enzimas que

participan en el recambio de PPT se ven alteradas durante el proceso de hipoxia por lo que podemos pensar que el suministro de PPT que se hizo en tiempos cercanos posteriores a la isquemia tienen un efecto que favorece la homeostasis de las neuronas.(Rosanov y Abu, 1990).

En el laboratorio de Neuromorfometría del INP se realizó un experimento, en el que se aplicó el PPT 24 horas y 1 hora antes de iniciar el proceso de isquemia cerebral por oclusión de la arteria cerebral media y de la carótida primitiva ipsilateral, en el que se demostró que la molécula tiene propiedades neuroprotectoras, reduciendo significativamente el área de lesión de los grupos tratados con PPT al compararse con los grupos control 2, 3 y 4 horas después de iniciado el proceso hipóxico isquémico por oclusión de la arteria cerebral media. (datos no publicados)

Queda demostrado que al observar en nuestros resultados, existe protección a la isquemia en los animales en los cuales se empleó el pirofosfato de tiamina. Los datos obtenidos en esta tesis señalan una clara concordancia con los arriba señalados y la diferencia se establece por que el experimento en el que se aplica previamente el medicamento asegura en cierta forma la presencia clara del PPT en el tejido nervioso al momento de iniciar la isquemia, en tanto que para la aplicación posterior del mecanismo después de iniciada la isquemia, limita el acceso y biodisponibilidad del medicamento, dependiendo de la circulación sanguínea y del tejido cefalorraquídeo de áreas cerebrales que no sufren isquemia y del grado de permeabilidad y difusión desde esta zona hasta las áreas de isquemia, por lo que los tiempos largos y concentraciones bajas del

fármaco se convierten en factores que modifican sustancialmente los resultados positivos en la neuroprotección del área isquémica.

En un modelo con ratas desarrollado por Bettendorff (1994), se vio que los niveles máximos de PPT se lograron 1 hora después de haber sido inoculado el medicamento donde se alcanzaron los mayores niveles en la fracción citosólica del cerebro, lo que sugiere la existencia de dos compartimentos para el PPT, la primera de cofactor unida a las mitocondrias con un recambio bajo y la segunda en el compartimiento citosólico con alto recambio como precursor del trifosfato de tiamina. De ahí también se pudo observar que desde los primeros minutos el pirofosfato de tiamina empieza a trabajar lo cual confirma la rapidez con que este actúa (Bettendorff, 1996).

En nuestros resultados se observa que no hubo ninguna dificultad de que llegara el PPT a la zona isquémica esto se puede ver en las diferencias que existen entre los grupos experimental y control a los 5 minutos en la grafica 1. A los 5 minutos de la grafica 2, correspondiente a las áreas de penumbra, se observa que hubo un aumento en el grupo experimental comparado con el control. Esto puede ser explicado por que el PPT ya existente en las células se inhiba por la ausencia de oxígeno y puesto que el PPT actúa como cofactor de diversas enzimas como son: transcetolasa, piruvato deshidrogenasa y α cetoglutarato deshidrogenasa, importantes en el metabolismo, mismas que si son inhibidas se detiene el metabolismo en el nivel que ellas actúan, y con la ayuda del PPT que se está administrando tardan en restablecerse esas vías en el metabolismo. En el caso del modelo que se empleó al ocluir las arterias media e ipsilateral y originar un área específica de lesión se sabe que la

hipoxia aparentemente inhibe simultáneamente el proceso de biosíntesis y degradación, ya que la producción de ADP y ATP se detiene, así como también diversas rutas metabólicas (Charles y Peter, 2001). El ADP y ATP y nucleótidos de pirimidina son considerados como agentes reguladores de las enzimas participantes en el recambio de PPT bajo hipoxia, sin embargo en nuestro modelo se demuestra que el PPT que se utiliza le ayuda a las células puesto que se encuentra en forma activa y esto se ve reflejado en los resultados ya que se comprueba que sí está presente en la protección de la corteza cerebral al disminuir las áreas de lesión en los animales experimentales comparados con los control.

Otro aspecto que también es importante mencionar es, que en su papel como cofactor, va a conferirle a las células muchas ventajas y una de ellas es el hecho de que inhibe la apoptosis, la cual en gran medida es gracias a que la tiamina esta muy involucrada en el mecanismo de activación de genes y biosíntesis de enzimas; mismas que están involucradas en la disminución de este fenómeno, en el caso de ausencia de PPT, la apoptosis se iría iniciando en los núcleos talámicos y conforme pasara el tiempo estaría aumentando, este daño ocurre en este tipo de circunstancias por la falta de oxígeno, ya que como se mencionó antes se inhibe el metabolismo. El PPT, puede en su calidad de cofactor inactivar los genes involucrados en la muerte celular, disminuyendo la mortandad de las neuronas, ayudando así en la protección al fenómeno de isquemia, pero no solamente puede inhibir la apoptosis si no también puede combatir los radicales libres que pueden estarse produciendo por el stress. Ya que como el PPT está involucrado en la producción de varias enzimas dependiendo de

las necesidades metabólicas mismas que pueden estar deteniendo la producción de los radicales. Mismos que van a provocar una rápida muerte celular. De ahí el rol tan importante que juega el PPT en la energía del metabolismo ya que va incrementar la tolerancia de los cerebros hacia la isquemia (Pohl *et.al.*, 2004).

9.0 CONCLUSIONES

1.-De acuerdo a los datos obtenidos no se recomienda el empleo del PPT posterior al inicio de la isquemia por aumento del promedio de penumbra.

2.-Se confiere protección neuronal dependiendo del tiempo inicio del tratamiento posterior a la instauración del proceso isquémico.

3.-Se logra proteger significativamente de la isquemia aunque los daños en tiempos de inoculación más tardíos son irreversibles.

4.-El tiempo adecuado para que haya mayor protección se observa a los 20 minutos post-isquemia.

10.0 REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.

- Altman, D. I; W. J. Powers and J. M. Perlman. 1993. Cerebral Oxygen Metabolism in Newborns. *Pediatrics*, vol.92 No.1 July. 99-104.
- Ames A; R.L. Wright, M. Kowada, J.M. Thurston and G. Majno.1968. Cerebral Ischemia. II. The no-Reflow Phenomenon. *Am J Pathol*. Feb;52(2):437-53.
- Andrews R. J and J. R. Bringas. 1993. A Review of Brain Retraction and Recommendations for Minimizing Intraoperative Brain Injury. *Neurosurgery*. Dec; 33(6):1052-63.
- Barr, M. L. 1994. *El Sistema Nervioso Humano*. Quinta edición, México. 386 pp.
- Beard, J. L; J. R. Connor and B. C. Jones. 1993. Iron in The Brain. *Nutr Rev*. 51: 157-170.
- Benítez, M.T; 1986. Aplicación Terapéutica del Pirofosfato de Tiamina o Cocarboxilasa. *Información Profesional Especializada*. México 183 pp.
- Bettendorf, L. and W. Pierre. 1994. Subcellular Localization and Compartmentation of Thiamine Derivatives in Rat Brain. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1222, 1-6.
- Bettendorff, L. 1991. Application of high Performance Liquid Chromatography to the Study of Thiamine Metabolism and in Particular Thiamine Triphosphatase. *Journal of Chromatography*. 566. 397-408.

- Bettendorff, L. 1996. Determination of Thiamine and its Phosphate Esters in Human Blood Serum at Femtomole Levels. *Journal Chromatogr.* 382: 297-302.
- Bowmn, W. C. and M. J. Rand. 1984. *Farmacologia*. 2^a Ed. Interamericana. México. 875 pp.
- Cantarow, A. y B. Schepartz. 1989. *Bioquímica* Ed. Interamericana. S.A. 4^a Edición, México. 1425 pp.
- Catalán, R. E.; A. M. Martínez, M. D. Aragonés, I. Fernández, B. G. Miguel, M. C. Calcerrada and M.J. Pérez. 1994. Platelet-Activating Factor Inhibits (Na⁺, K⁺) ATPase Activity in Rat Brain. *Neuroscience Research*. 19: 241-245.
- Charles, K. S and M. R. Peter. 2001. Molecular Mechanisms of Thiamine Utilization. *Current Molecular Medicine*. 1, 197-207.
- Elnageh, K. M. and M. K. Gaitonde. 1988. Effect of deficiency of thiamine on brain pyruvate dehydrogenase: enzyme assay by three different methods. *J Neurochem*. Nov, 51 (5): 1482-1489.
- Gibson G. E; K. F. Sheu, J. P. Blass, A. Baker, K. C. Carlson, B. Harding, P. Perrino. 1988 Reduced Activities of Thiamine-Dependent Enzymes in The Brains and Peripheral Tissues of Patients with Alzheimer's Disease. *Arch Neurol*. Aug. 45(8):836-40.
- Guyton A. C. 1994. *Tratado de Fisiología Médica*. Interamericana, México. 3289 pp.
- Hill, A. and J. J. Volpe. 1989. Perinatal Asphyxia: Clinical Aspects. *Clin Perinatol*. Vol. 16, No.2 June. 435-457.

- Karlson, B.R; B. Grogard, B. Gerdin and P. A. Steen. 1994. The Severity of Postischemic Hypoperfusion Increases with Duration of Cerebral Ischemia in rats. *Acta Anaesthesiol Scand.* 38:248.
- Kurose, I; D. C. Anderson, M. Miyasaka, T. Tamatani, J. C. Paulson, R. F. Todd, J. R. Rusche and D.N. Granger. 1994. Molecular Determinants of Reperfusion- Induced Leukocyte Adhesion and Vascular Protein Leakage. *Circ Res.* 74 (2) :336-343.
- Lehninger, L. A. 1990. *Bioquímica, Las Bases Moleculares de la Estructura y Función Celular.* Ediciones Omega España, S.A. 1117 pp.
- Linsberg, P. J; J. M. Hallenbeck and G. Feverstein. 1991: Platelet-Activating Factor in Stroke and Brain Injury (Review). *Ann Neurol.* 30(2):117-29.
- Lucchesi, B. R. 1994. Complement neutrophils and Free Radicals: Mediators of Reperfusion Injury. *Arzneimittelforschung.* 44:420-432.
- Machlin L. J. 1989. Use and Safety of Elevated Dosages of Vitamin B in Adults. *Int J Vitam Nutr Res Suppl.*30:56-68.
- Michael, J; M. D. Rukin and J. J. Volpe. 1993. Hipoxic-ischemic Brain Injury in the Newborn. *Seminars in Neurology* Volume 13, No1. 341-346.
- Murray C. J. and S. Alpert. 1994. Diagnosis of Acute Myocardial Infarction. *Curr Opin Cardiol.* Jul;9(4):465-70.
- Palmer, G. and S. Gerard. 1989. Properties and Functions of Thiamine Diphosphate. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology.* 30:1297-1318.

- Paxinos, G. and C. Watson. 1982. *The Rat Brain Stereotaxic Coordinates*. Academic Press Sydney 1458 pp
- Peters D. B. 1929. The co-enzyme Function of Thiamine. *J Nutr.* 1997 May;127(5 Suppl):1038-1039
- Pohl, M; G. A. Sprenger and M. Muller. 2004. A New Perspective on Thiamine Catalysis. *Current Opinión in Biotechnology.* 15:335-342.
- Pozzilli, C; G. L. Lenzi, C. Argentino, A. Carolei, M. Rasura, A. Signore, L. Bozzao and P. Pozzilli. 1985. Imaging of leukocytic Infiltration in Human Cerebral Infarcts. *Stroke.* 16:251-255.
- Reilly, P.M; H. J. Shiller and G. B. Bulkley. 1991. Pharmacologic Approach to Tissue Injury Mediated by Free Radicals and Other Reactive Oxygen Matabolites. *Am. J. Surg.* 161:488-503.
- Rindi, G; V. Cominicoli, C. Reggani and J. Patriani. 1987. Nervous Tissue Thiamine Metabolism in vivo. III. Influence of Ethanol Intake on the Dynamics of Thiamine and its Phosphoesters in Diferent Brain Regions and Sciatic Nerve of the Rat. *Brain Research.* Jun 9, 413 (1): 23-35.
- Roskams, J. A. and J. R; Connor. 1994. Iron Transferrin and Ferritin in The Rat Brain During Development and Aging. *Journal of Neurochem.* 63:709-716.
- Rozanov V. A. and S. Abu. 1990. Neurometabolic effects and anthypoxic activity of a vitamin-coenzyme complex, including thiamine pyrophospathe, lipoate, 4-phosphopantothenate, nicotinate and flavinadenine mononucleotide. *Vopr Med Khim,* Nov-Dec; 36(6):66-69.

- Singleton, C. K. and P. R. Martin. 2001 Molecular Mechanisms of Thiamine Utilization. *Current Molecular Medicine*. 1(2):197-207.
- Taylor, E. M. and E. H. Morgan. 1994. Developmental Changes in Transferrin and Iron Uptake By The Brain In The Rat. *Dev Brain Research*. 55:35-42.
- Vannucci, R. C; J. R. Connor and D.T. Mauger. 1999. Mini review. Rat model of Perinatal Hipoxic-Ischemic. Brain Damage. *Journal of Neuroscience Research*. 55:158-163.
- Wright, A. A; R. L. Kowada, M. Thurston and J. M. Majno. 1968. Cerebral Ischemia: II, The No-Reflow Phenomenon. *American Journal Pathology*. 52:437-453.
- Yue, T. L. and G. Z. Feuerstein. 1994. Platelet-Activating Factor: a Putative Neuromodulator and Mediator in the Pathophysiology of Brain Injury (Review). *Crit Rev Neurobiol*. 8 (1-2):11-24.