



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

FALLA DE ORIGEN

EFEECTO DE LA ADMINISTRACION CRONICA DEL
PIROFOSFATO DE TIAMINA EN HEPATOCITOS DE
RATA NORMAL: ESTUDIO MORFOMETRICO.

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 :

ELSA LILIANA AGUIRRE BENITEZ

U N A M
F E S
Z A R A G O Z A



LO FORMADO EN
SU DERECHA REFLEXION

MEXICO, D. F.

1995



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.

Departamento de Embriología, Facultad de Medicina, UNAM.

Departamento del Hombre y su Ambiente, Universidad Autónoma Metropolitana,
Campus Xochimilco.

Departamento de Patología, Instituto Nacional de Cardiología.

Auspiciado por el Instituto de Investigaciones Científicas Hans Selye A. C. (IICHS).

bajo la dirección de :

M. en C. MARIA TERESA BENITEZ RODRÍGUEZ

FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM e IICHS A. C.

M. en C. CATALINA MACHUCA RODRIGUEZ

FES ZARAGOZA

DEDICATORIAS:

A mis padres por el inmenso amor con que me han cuidado, por creer en mí y por los jalones de orejas.

A mis abuelitas y abuelos por ser el origen de mi universo

En particular a mis abuelos Francisco y Rosita por haberme hecho sentir una persona muy especial.

A mis hermanos y Brandon por ser mis compañeros.

Con inmenso cariño a Jorge por el gran apoyo y comprensión que me ha brindado en todo momento, por ser mi compañía.

A mis amigos Marisol, Lidia, Bernardo, Jose Luis, Raúl, Clemencia y Santos por estar siempre conmigo, por creer en mí.

AGRADECIMIENTOS:

A mi tía Tere y mi tío Mauricio por el apoyo, la orientación y cariño que me brindaron.

A la Dra. Margarita V. Gonzalez del Pliego O. por su desinteresada amistad, comprensión y afecto.

A la Dra. Susana Alcazar Leyva por la orientación, interés y apoyo a jóvenes investigadores y la revisión de este trabajo.

A la M. en C. Rosalba Rangel C., a la M. en I.B.S.H. Leticia Morales, al Dr. Jorge F. Mendoza R. por revisar este trabajo y por la orientación brindada. En especial a la M. en C. Catalina Machuca R. y al profesor Ernesto Mendoza por su apoyo e interés en mi persona.

Al Dr. Enrique Pedernera A. por la orientación brindada y a todas las personas que colaboraron para la realización de esta tesis del Departamento de Embriología, del INC, de la UAM Xochimilco, del ICHS, de la FES Zaragoza, Cesar, Bertha y Héctor.

Un agradecimiento muy especial a los animales de experimentación utilizados por su docilidad y una disculpa muy grande por privarles de su libertad.

Este trabajo representa una parte de la investigación experimental, clínica y bibliográfica desarrollada desde hace más de 16 años en el Instituto de Investigaciones Científicas Hans Selye A. C., con el fin de demostrar que el pirofosfato de tiamina o cocarboxilasa estable en solución (X-2) es una coenzima que actúa en forma definitiva a diferentes niveles del metabolismo celular, principalmente en las mitocondrias de todas las células del organismo. Es por esto que se ha utilizado en el tratamiento de múltiples patologías, y en este caso se eligió a la célula hepática para su estudio. La forma en la que actúa, los sitios en los que se encuentra y las funciones que regula son para nosotros los investigadores un gran reto, y su estudio nos llevará al esclarecimiento más profundo de su acción.

INDICE

RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	2
HÍGADO	2
PIROFOSFATO DE TIAMINA	20
ANTECEDENTES	35
HIPÓTESIS	39
OBJETIVOS	40
MÉTODO	41
RESULTADOS	45
DISCUSIÓN	55
CONCLUSIONES	61
PERSPECTIVAS	61
BIBLIOGRAFÍA	62
APÉNDICE	66

RESUMEN

Los hepatocitos constituyen el principal componente celular (60%) del hígado, los cuales desempeñan múltiples actividades, como la síntesis de proteínas de la sangre, la formación de urea, la biosíntesis, el almacenamiento de los carbohidratos y vitaminas, y la desintoxicación del organismo mediante la destrucción de sustancias tóxicas, entre otras. En particular, el hígado depende en gran medida de la tiamina o vitamina B1 para desempeñar sus actividades, por lo cual, es ahí donde esta vitamina se almacena en una amplia proporción. La forma activa de la tiamina es el pirofosfato de tiamina (PPT) o cocarboxilasa, coenzima cuyo mecanismo de acción es específico en algunas etapas del metabolismo energético. El cual se lleva a cabo en las mitocondrias, y su presencia es indispensable para la articulación bioquímica de la glucólisis anaerobia y el ciclo del ácido cítrico o de Krebs para permitir la entrada de los carbohidratos a este ciclo. Además, desempeña otras funciones no relacionadas con el metabolismo. Existen reportes en la literatura que demuestran que bajo una dieta deficiente en tiamina se lentifican las principales vías y ciclos metabólicos, y en deficiencias más severas y prolongadas se generan hepatopatías. Por ello, se ha relacionado estrechamente la tiamina y en particular al PPT, con la actividad fisiológica de los hepatocitos.

Poco se sabe acerca del efecto que producen las vitaminas administradas continuamente y a largo plazo sobre la morfología del hepatocito. Por ello, en el presente estudio se desarrolló un modelo experimental con hígado de ratas Wistar normales para determinar si se generan efectos secundarios a nivel morfológico y celular, bajo un tratamiento continuo y a largo plazo a base de PPT estable en solución (X2), para lo cual se administró éste subdérmicamente cada 24 horas a cinco lotes de animales. La coenzima se aplicó a cada lote a los 7, 14, 21, 30 y 90 días y solución salina a sus respectivos testigos. Los resultados morfométricos de microscopía de luz analizadas con el programa Image Proplus, muestran que esta coenzima no produce alteraciones morfológicas en los hepatocitos cuando se aplica continuamente en dosis supra fisiológicas. Por otra parte sí se observa una clara tendencia al aumento en las medidas morfométricas en los grupos tratados, aun cuando las áreas celulares se mantuvieron dentro de los límites normales. Por lo anterior, se propone que con la aplicación continua de PPT, el hepatocito se adapta, mantiene o recupera su actividad bioquímica y fisiológica sin alterar su morfología.

INTRODUCCIÓN

El hígado en los mamíferos, es la glándula más grande del organismo, ya que comprende del 2 al 5 % del peso corporal total. Se encuentra localizado por debajo del diafragma, en la parte superior del abdomen. Es de consistencia blanda y de color rojo oscuro o café rojizo debido a su abundante riego sanguíneo; recibe todo el material que es absorbido del tubo digestivo con excepción de los lípidos ya que sólo algunos triglicéridos pasan a la sangre y son utilizados por los hepatocitos; los demás triglicéridos son conducidos al sistema linfático y posteriormente al tejido adiposo (Lehninger et al, 1993).

La estructura del hígado, lo hace ser un órgano complejo. Realiza numerosas y variadas funciones metabólicas, las cuales se llevan a cabo por medio de dos tipos de células: los hepatocitos y las células de Von Kupffer (Lesson, et al, 1987). El hepatocito posee un alto potencial mitótico para su renovación y reemplazo (Holtzman y Novikoff, 1986, Alberts et al, 1994).

Las funciones realizadas en forma directa en el hepatocito incluyen el metabolismo de: lípidos, proteínas, carbohidratos, así como la biosíntesis de: azúcares, proteínas plasmáticas, factores de coagulación, lípidos, urea, cuerpos cetónicos y las sales biliares; además de otras funciones como: la excreción de los pigmentos biliares, el almacenamiento de algunos lípidos, vitaminas y del glucógeno. También, tiene a su

cargo la biotransformación de tóxicos, fármacos, drogas, y hormonas (Solomon et al, 1987). La hematopoyesis o formación de células sanguíneas, es otra función del hígado durante el desarrollo embrionario cuyo potencial se conserva en la vida adulta (Lesson et al, 1987).

Las células de Von Kupffer, que son elementos del sistema retículo endotelial se encuentran revistiendo los sinusoides hepáticos que a su vez están íntimamente relacionadas con los hepatocitos y su principal función es auxiliar en la actividad fagocitaria al hígado. Los conductos de éste órgano derivan embriológicamente del endodermo, del revestimiento del tracto digestivo (Alberts et al, 1994), pero sólo una porción del hígado, el sistema extrahepático formado por los conductos biliares, se desarrolla como divertículo duodenal. Los hepatocitos provienen de las células que invaden de manera secundaria al mesénquima en el que se ha asentado el divertículo. Los conductos biliares intrahepáticos se desarrollan en forma secundaria a partir de los hepatocitos y posteriormente se fusionan con el sistema biliar extrahepático. El hígado está rodeado casi por completo por el peritoneo visceral, lo cubre una membrana serosa hasta el sistema de conductos biliares, y a las arterias y venas que salen o entran al hígado, formando así el sistema porta hepático (Lesson et al, 1987).

Hepatocitos

Los hepatocitos constituyen el parénquima del órgano y son poliédricos con seis o más caras, por lo general miden de 20-35 μm de diámetro y tienen límites distintivos

(Weiss y Greep, 1977) (figura 1). Se disponen en una serie de láminas perforadas que se ramifican y anastomosan para formar una especie de esponja o laberinto, y entre las cuales se encuentran los espacios sinusoidales. Estas láminas se extienden de la periferia del lobulillo clásico a la vena central en forma radiada (figura 2). Los núcleos de los hepatocitos son esféricos u ovoides y tienen un nucléolo prominente. El núcleo es central y está rodeado por un citoplasma acidófilo que también poseen material basófilo, además, pueden observarse células binucleadas.

Las características morfológicas de los hepatocitos dependen del estado fisiológico del organismo al tomar la muestra. En animales en ayuno, los hepatocitos se ven turbios e indistintamente delineados. Después del alimento, se agrandan y se distinguen perfectamente unos de otros. Se llenan con numerosas inclusiones glucogénicas y lipídicas dando al tejido el aspecto de panal de abejas. Las características ultraestructurales del hepatocito confirman su multiplicidad funcional. Contiene muchas mitocondrias distribuidas en la célula, cuya forma y distribución dependen de la actividad funcional de ésta, y generalmente presentan forma filamentosa. Poseen una trama extensa de retículo endoplásmico rugoso compactado y ribosomas libres, causantes de la basofilia observada al microscopio de luz. El retículo endoplásmico liso aparece como una malla de túbulos que se ramifican y anastomosan. Se observan lisosomas, peroxisomas, gotas lipídicas y glucógeno. El aparato de Golgi es grande y yuxtanclear. La membrana plasmática del hepatocito adyacente a los sinusoides, tiene numerosas microvellosidades cortas e irregulares que se proyectan en las indentaciones

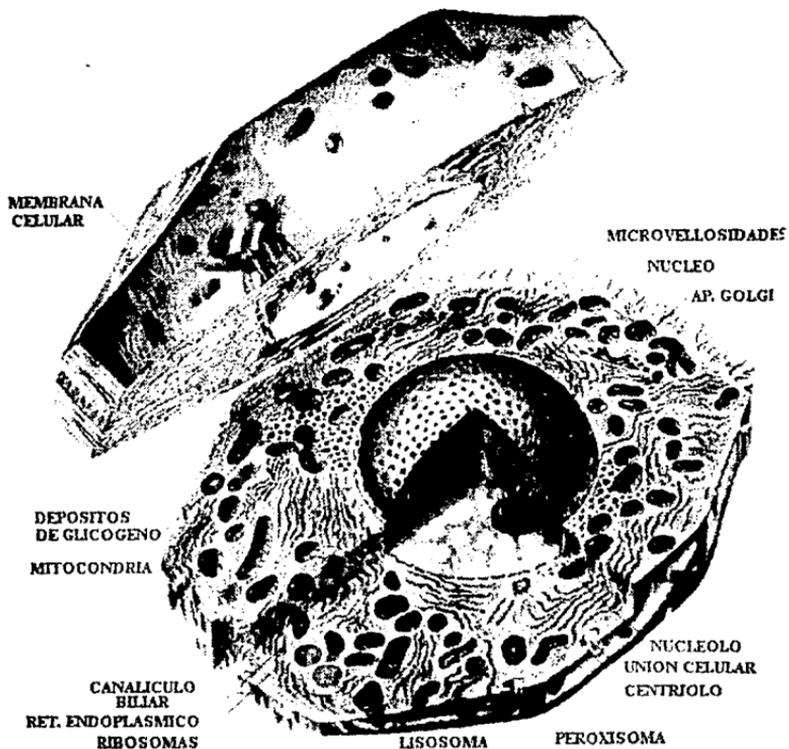


Figura 1. Sección transversal de un modelo de célula hepática, a 10,000 aumentos. Vista tridimensional (Pfeiffer, 1972).

que presentan otras membranas plasmáticas y las pequeñas se ramifican entre células adyacentes como un sistema de canaliculos biliares visibles con microscopía de luz. Las membranas celulares de los hepatocitos contiguos interaccionan mediante desmosomas y zonas de unión (Lesson et al, 1987).

Sinusoides hepáticos.

Los sinusoides hepáticos, forman la irrigación vascular intralobulillar. La sangre proveniente de los vasos interlobulillares se transporta a través de los sinusoides hacia las venas centrales. Los sinusoides son una vasta trama anastomótica que separa las placas hepáticas entre sí. Los hepatocitos tienen por lo menos una superficie yuxtapuesta al sinusoide. El amplio volumen del sinusoide está revestido por dos tipos de células. Predominan las células endoteliales típicas, y el otro tipo celular es un fagocito, la célula de Kupffer. Esta suele localizarse sobre las células endoteliales; sin embargo, los fagocitos pueden extenderse al atravesar la luz sinusoidal y aún formar parte del sinusoide.

Sistema biliar

El sistema biliar del hígado consta de canaliculos biliares y conductos intrahepáticos y extrahepáticos para transportar la bilis de los hepatocitos al duodeno (Alberts et al, 1994). El sistema de células secretoras y túbulos de conducción constituyen los componentes glandulares exócrinos del hígado. Los conductos interlobulillares se

ramifican en el tejido conjuntivo interlobulillar y se anastomosan con otros para formar los conductillos biliares. Estos se encuentran localizados entre los lobulillos adyacentes y están revestidos por un epitelio cúbico simple rodeado por tejido conjuntivo areolar. Los conductos biliares interlobulillares están revestidos por un epitelio cilíndrico simple. Estos conductos se ramifican y relacionan con la rama de la arteria y vena porta hepática formando la tríada portal (figura 2).

El tejido conjuntivo que rodea a los conductos grandes tiene músculo liso y fibras elásticas.

La organización histológica del hígado se puede considerar desde tres perspectivas: morfológica, secretoria y vascular. La unidad morfológica o anatómica es el lobulillo hepático; la secretoria o funcional es el lobulillo portal; y la vascular es el acino hepático (figura 2).

Fisiología del hígado

Además de la síntesis de las moléculas necesarias para la integridad estructural y funcional de las propias células hepáticas, los hepatocitos sintetizan muchas otras moléculas que se envían a otras partes del organismo. Como productos muy representativos del metabolismo hepático se encuentran: la albúmina, el fibrinógeno, las globulinas alfa y beta, las lipoproteínas y el colesterol. El glucógeno se sintetiza a partir de la glucosa (glucogénesis) y se almacena en los hepatocitos o se libera, de igual manera que ocurre con los lípidos. Muchas vitaminas (A,D,K, y el complejo B) se

almacenan en el hígado. Las proteínas no parecen almacenarse en éste, sino que después de sintetizadas son liberadas a la sangre (Lesson et al, 1987 y Banks, 1986). También este órgano es activo en la desintoxicación enzimática de cuerpos orgánicos extraños (Lehninger et al, 1993).

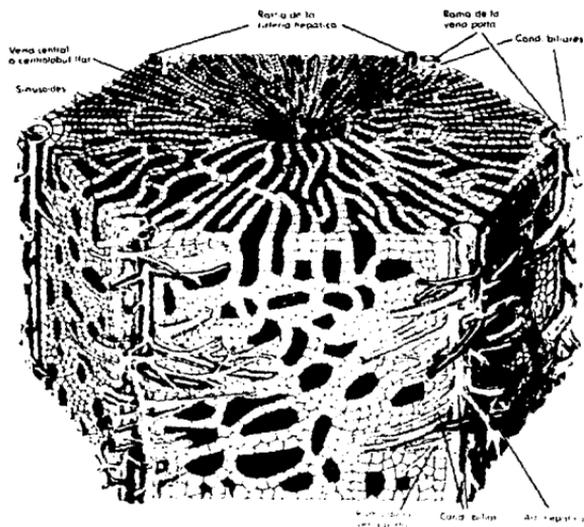


Figura 2. Esquema tridimensional de un lobulillo hepático. (Weiss, 1977).

El hígado de rata está formado anatómicamente por cuatro lóbulos: un lóbulo cístico o mediano, que comparte una profunda fisura con el ligamento hepático, un

lóbulo derecho parcialmente dividido en el lóbulo anterior y posterior, un gran lóbulo izquierdo, y un pequeño lóbulo caudal que descansa en la zona profunda rodeando al esófago (Farris y Griffin, 1949, Sheldon et al, 1979).

El hígado transforma y distribuye los elementos nutritivos

Después de ser absorbidos del tracto intestinal los elementos nutritivos, excepto una gran proporción de los triglicéridos, pasan directamente al hígado, que es el centro de distribución de los elementos nutritivos más importante en los vertebrados. Durante su paso por el hígado, los azúcares, los aminoácidos y algunos lípidos, se transforman y posteriormente son transportados a otros órganos y tejidos (Alberts et al, 1994).

Rutas metabólicas de los azúcares en el hígado.

La mayor parte de la D-glucosa que llega al hígado se fosforila por medio de la glucocinasa y rinde glucosa-6-fosfato. La D-fructosa, D-galactosa y D-manosa absorbidas desde el intestino delgado se convierten también en D-glucosa-6-fosfato, mediante rutas enzimáticas. La D-glucosa-6-fosfato se encuentra en un punto de confluencia del metabolismo de los carbohidratos en el hígado (Figura 3) (Lehninger et al, 1993).

Existen cinco rutas metabólicas principales que pueden ser recorridas por la glucosa-6-fosfato en el hígado, dependiendo del suministro y de la demanda de glucosa en forma inmediata y mediata. El flujo de glucosa es dirigido por una o más rutas

metabólicas por la acción de varias enzimas reguladas alostéricamente, y a través de la regulación hormonal.

Conversión en glucosa sanguínea:

La glucosa-6-fosfato se desfosforila, por acción de la glucosa 6-fosfatasa, y rinde D-glucosa libre que pasa al torrente sanguíneo para ser transportada a los tejidos. La glucosa en sangre debe conservarse dentro de un rango específico de concentración (4 mM), a fin de que asegure los nutrientes adecuados para todas las células del organismo (figura 3,A), por lo que la exportación es la ruta de selección cuando está limitada la cantidad de glucosa-6-fosfato (Lehninger et al, 1993).

Conversión en glucógeno:

La glucosa-6-fosfato que no se necesita de modo inmediato para quedar libre en la sangre, se convierte en el glucógeno hepático por acción de la fosfoglucomutasa (figura 3, B) y de la sintetasa del glucógeno (Lehninger, 1978).

Conversión en ácidos grasos y en colesterol:

El exceso de glucosa-6-fosfato que no se emplea en las rutas anteriores, se degrada, por la vía de la glucólisis en piruvato, y por medio del complejo de la piruvato deshidrogenasa lo convierte en acetil-CoA, la cual se emplea como el precursor para la síntesis de lípidos, en ácidos grasos (figura 3, C), los que se emplean para producir

triacilglicéridos y fosfolípidos, y colesterol. Estos son parcialmente exportados a otros tejidos, mediante la función transportadora de las lipoproteínas del plasma. En el hígado se emplea algo de acetyl-CoA para elaborar colesterol, hormonas esteroideas y cuerpos cetónicos (figura 3, C) (Lehninger, 1993).

Degradación hasta CO₂ por oxidación:

La acetyl-CoA, procedente de la glucosa-6-fosfato por la vía de la glucólisis y la descarboxilación del piruvato, puede oxidarse por la vía del ciclo del ácido cítrico o de Krebs (figura 3, D). El consiguiente transporte electrónico y la fosforilación oxidativa rinden energía en forma de ATP. Sin embargo, normalmente los ácidos grasos son el combustible a oxidar más importante en el hígado por la vía del ciclo del ácido cítrico.

Degradación por la ruta del fosfato de pentosa:

La glucosa-6-fosfato es el sustrato para la ruta del fosfato de pentosa en la que se produce por una parte, el potencial de reducción en forma de NADPH, necesario en la biosíntesis de los ácidos grasos y del colesterol, y por otra la D-ribosa-5-fosfato, que es un precursor en la síntesis de los ácidos nucleicos (figura 3, E). Por intervención de varias enzimas reguladoras, y mediante la función hormonal, el hígado dirige el flujo de restos de glucosa hacia las diferentes rutas, de acuerdo con el principio de "atender a la demanda", efectuando el suministro, que es el que determina la economía del organismo.

Biosíntesis de las proteínas del hígado.

Rutas metabólicas de los aminoácidos en el hígado:

El hígado por sus mecanismos biosintéticos renueva constantemente sus propias proteínas estructurales y funcionales, las cuales tienen una velocidad de recambio muy elevada, con una vida media de unos cuantos días solamente. El hígado también es el sitio de biosíntesis de la mayoría de las proteínas plasmáticas de la sangre.

Desaminación y degradación:

Los aminoácidos que no son necesarios para la biosíntesis de las proteínas en el hígado o en cualquier otro lugar, se desaminan y se degradan para dar acetyl-CoA e intermediarios del ciclo del ácido cítrico. Estos intermediarios pueden convertirse en glucosa y glucógeno por la ruta de la gluconeogénesis. La acetyl-CoA puede oxidarse por vía del ciclo del ácido cítrico y obtener energía en forma de ATP, o puede convertirse en lípidos de reserva. El amoníaco liberado en la degradación de los aminoácidos mediante el ciclo de la urea se convierte en el hígado, en este producto de excreción (Lehringer et al, 1993).

Participación en el ciclo de la glucosa-alanina:

El hígado participa también en el metabolismo de los aminoácidos que llegan hasta él constantemente desde los tejidos periféricos. Algunas horas después de cada comida hay un período en el que la alanina es transportada por la sangre desde los músculos al hígado; allí se desamina y el piruvato resultante se convierte en glucosa sanguínea por la vía de la gluconeogénesis. La glucosa vuelve a los músculos esqueléticos para reponer la reserva muscular del glucógeno. Un objetivo de este proceso cíclico, llamado ciclo de la alanina-glucosa, es el de amortiguar las fluctuaciones del nivel de glucosa sanguínea en los períodos entre comidas. La sangre se halla provista de glucosa de modo adecuado, exactamente después de la digestión y de la absorción de los carbohidratos de la dieta y posteriormente por la conversión de algo de glucógeno hepático en glucosa sanguínea. Pero en el período que precede a la comida siguiente se produce alguna degradación de las proteínas del músculo hasta la formación de los aminoácidos, los cuales ceden sus grupos amino al piruvato, el producto de la glucólisis, por transaminación obteniéndose alanina. El citado aminoácido transporta, por tanto, hasta el hígado el NH_3 y el piruvato. En el hígado la alanina se desamina, el piruvato se convierte en glucosa sanguínea y el NH_3 se convierte en urea, en cuya forma se excreta. El déficit de aminoácidos que se produce en los músculos se repone en la comida siguiente.

Conversión en nucleótidos y otros productos:

Los aminoácidos son los precursores en la biosíntesis de las bases de purina y pirimidina de los nucleótidos y en la síntesis de los productos especializados tales como porfirinas, hormonas y otros productos nitrogenados, éstos procesos se llevan a cabo en el hepatocito (Lehninger et al, 1993).

Rutas metabólicas de los lípidos en el hígado.

Oxidación a CO₂ con producción de ATP:

Los ácidos grasos componentes de los lípidos que ingresan al hígado por vía sanguínea, pueden activarse y oxidarse rindiendo acetil-CoA y ATP. La acetil-CoA se oxida por la vía del ácido cítrico y rinde ATP por fosforilación oxidativa. Los ácidos grasos son el combustible más importante que se oxida en el hígado.

Formación de cuerpos cetónicos:

El exceso de acetil-CoA que se libera en la oxidación de los ácidos grasos y que no se consume por el hígado se convierte en los llamados cuerpos cetónicos: acetoacetato y D-β-hidroxibutirato, que son transportados por la sangre hasta los tejidos periféricos en donde se emplean como combustibles del ácido cítrico.

Regulación de la oxidación de los ácidos grasos y la formación de los cuerpos cetónicos:

Las moléculas acil-ácido graso-CoA formadas en el citosol de las células hepáticas poseen dos posibles rutas: (1) la oxidación en la mitocondria o (2) la conversión en triacilglicéridos o en fosfolípidos por medio de las enzimas que se encuentran en el citosol. La ruta a la que se incorporan, depende de la velocidad de transferencia de las moléculas de acil ácido graso de cadena larga-CoA en el interior de la mitocondria. El proceso de transporte en la membrana, constituido por tres etapas, mediante el cual las partículas de acil-CoA citoplásmicas son introducidas en la matriz mitocondrial por vía de la carnitina. Esta es la etapa determinante de la velocidad de la oxidación del ácido graso. Una vez que los ácidos grasos han penetrado en la mitocondria se oxidan para rendir acetil-CoA. Una vez que se ha formado acetil-CoA por oxidación de los ácidos grasos en la mitocondria hepática, son posibles dos caminos: puede oxidarse hasta CO_2 por la vía del ácido cítrico, o puede convertirse en los cuerpos cetónicos que circularán hacia los tejidos periféricos. El determinante principal de la ruta seguida por la acetil-CoA en la mitocondria hepática es la disponibilidad del oxalacetato para iniciar la incorporación de la acetil-CoA al ciclo del ácido cítrico. Cuando la concentración del oxalacetato es muy baja, penetra poca acetil-CoA en el ciclo y se favorece la formación de los cuerpos cetónicos (Lehninger, 1978).

Biosíntesis de colesterol y de las sales biliares:

Cierta cantidad de acetil-CoA que deriva de los ácidos grasos y de la glucosa se utiliza como el precursor principal para la biosíntesis del colesterol, el cual es requerido para la biosíntesis de membranas, y es el precursor de hormonas esteroideas y sales biliares, las cuales, son compuestos esenciales para la digestión y absorción de los lípidos (Lehninger et al, 1993).

Biosíntesis de las lipoproteínas del plasma:

Los ácidos grasos se emplean también, como precursores para la síntesis de la porción lipídica de las lipoproteínas del plasma, que transportan lípidos al tejido adiposo en donde se acumulan en forma de triacilglicéridos.

Formación de ácidos grasos libres del plasma:

Los ácidos grasos libres se unen a la seroalbúmina y son transportados por la sangre al corazón y a los músculos esqueléticos, que los absorben y los oxidan, para así convertirse en el combustible principal de estos tejidos. La albúmina sérica es la proteína plasmática más abundante; una molécula de albúmina sérica puede transportar más de 10 moléculas de ácidos grasos libres, liberándolos conforme los tejidos que los consumen los van incorporando por difusión pasiva (Lehninger et al, 1993).

Por lo antes expuesto, es evidente que el hígado posee una extraordinaria actividad y diversidad metabólica. Se encuentra bien adaptado para desempeñar el papel de aceptor, transformador y de centro distribuidor de diversas moléculas al resto del organismo. Así, el hígado exporta a las sustancias nutritivas en proporciones correctas a los demás órganos, a fin de amortiguar las fluctuaciones que se originan en el metabolismo intermitentemente según los alimentos que se consumen, y posteriormente transforma el exceso de grupos amino en urea y otros productos que serán eliminados por los riñones (Lehninger et al, 1993).

Como podemos notar, en el hígado se metabolizan los carbohidratos, ácidos grasos y aminoácidos, que pueden seguir la ruta del ciclo del ácido cítrico, en donde se oxidan, hasta CO_2 y H_2O . En el caso de algunos elementos nutritivos como los aminoácidos y ácidos grasos, deben degradarse para dar grupos acetilo de la acetil-CoA (primera fase de la respiración), que es la forma en que el ciclo del ácido cítrico (segunda fase de la respiración) acepta la mayor parte del combustible que se le incorpora, considerando que el piruvato que se deriva de la glucosa por glucólisis, se deshidrogena rindiendo acetil-CoA y CO_2 mediante una molécula constituida por una agrupación de enzimas y coenzimas llamada complejo de la piruvato-deshidrogenasa. Esta molécula se encuentra localizada en las mitocondrias de las células eucarióticas y

en el citoplasma de las procarióticas. Cabe mencionar, la participación de la coenzima pirofosfato de tiamina como uno de los componentes del complejo multienzimático fundamental, en las reacciones más complejas de la piruvato-deshidrogenasa y de la α -cetoglutarato-deshidrogenasa que tiene lugar en la ruta principal de oxidación de los carbohidratos, lo cual quiere decir que proporciona los elementos para que se pueda llevar a cabo la obtención energética en todo el organismo, al continuar posteriormente con la tercera fase de la respiración: el transporte electrónico y la fosforilación oxidativa.

PIROFOSFATO DE TIAMINA (PPT) O COCARBOXILASA.

El pirofosfato de tiamina es una coenzima, es decir, es la forma activa de la vitamina B1 (tiamina) y de esta manera se le encuentra generalmente en las células. En las mitocondrias actúa unida permanentemente a un complejo multienzimático llamado piruvato-deshidrogenasa, el cual está formado por 3 enzimas: dihidrolipoil-transacetilasa, dihidrolipoil-deshidrogenasa y piruvato deshidrogenasa y 5 coenzimas: PPT, NAD⁺ (dinucleótido de nicotinamida y adenina oxidado), FAD (dinucleótido de flavina y adenina), lipoato y CoA (Coenzima A) (Lehninger et al, 1993). Todos los tejidos vegetales y animales la contienen en diferentes cantidades, la almacenan y la eliminan de manera diferente, ya que en algunos permanece por tiempo prolongado a pesar de no administrarse oralmente, en tanto que otros tejidos la metabolizan o excretan rápidamente, sin embargo, siempre se encuentra en muy poca cantidad (Machlin, 1990).

El PPT surge cuando el grupo fosfato del ATP es transferido al grupo tiazol de la molécula de tiamina (Metzler, 1960). El PPT está constituido por una pirimidina unida a través de un puente metileno a un grupo tiazol y contiene un nitrógeno cuaternario (figura 4). Tiene un peso molecular de 460.79 daltones. Es altamente soluble en agua, e insoluble en solventes orgánicos. En solución es estable a pH menor de 5.5; el pH óptimo es de 2.7 a 5.4 y se descompone a altas temperaturas (Berkow et al, 1978). Es susceptible a la destrucción por rayos x, rayos gamma y por la irradiación UV.

Fuentes:

Aunque la síntesis de la vitamina B1 por las bacterias intestinales ocurre principalmente en los animales, los humanos son casi completamente dependientes de su consumo a través de los alimentos. Muchas especies microbianas son autotróficas con respecto a la tiamina, mientras que otras pueden sintetizarla si se encuentra disponible la pirimidina o el anillo tiazol y algunas dependen completamente de la molécula íntegra.

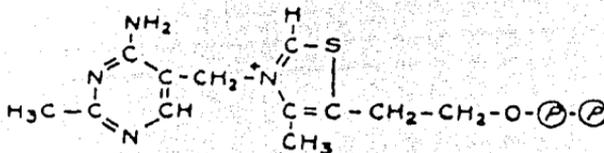


Fig. 4. FORMA ESTRUCTURAL DE LA COCARBOXILASA o PIROFOSFATO DE TIAMINA (PPT) (Lehninger et al, 1993).

Las plantas superiores pueden sintetizarla de novo (Machlin, 1990). Entre las fuentes más abundantes están: la levadura, los cereales germinados, el corazón, el riñón, la carne magra de cerdo y el hígado (Harper et al, 1980), que es el principal órgano que almacena y utiliza la tiamina así como sus ésteres fosfatados.

La concentración basal de tiamina en sangre total varía de un individuo a otro, y se encuentra entre 2 a 15 μg de tiamina/100 cm^3 ; en plasma es aproximadamente de 7 μg /100 cm^3 . Las necesidades diarias son de 1.5 mg/día y se debe ingerir de 0.54 a 0.66 mg/1000 cal. En casos de desnutrición extrema, el nivel de tiamina puede ser de 0 μg /100 cm^3 (Diccionario terminológico, Ed. Salvat, 1968). La concentración basal de la cocarboxilasa en sangre es de 0.00005 mg/ml (Tablas científicas, Ed. Ciba-Geigy, 1965).

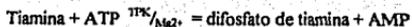
Las fracciones celulares de los hepatocitos de rata contienen aproximadamente los siguientes porcentajes de la tiamina total: núcleo 10%, mitocondrias 35 %, microsomas 5 % y el 50 % del contenido total se encuentra libre en el citoplasma (Machlin, 1990).

Según Whol (1954), el contenido de cocarboxilasa en los principales órganos es aproximadamente de:

Músculo cardíaco	200-300 μg /100g
Hígado	200 μg /100g
Cerebro y riñones	100 μg /100g
Sangre	12-13 μg /100g

Actividad

La vitamina B1 que ingresa por vía digestiva es rápida y activamente absorbida por el intestino delgado, principalmente en el duodeno y yeyuno proximal mediante un mecanismo saturable mediado por un acarreador activo. Al entrar al enterocito del yeyuno, la tiamina es fosforilada en la coenzima activa: el pirofosfato de tiamina y otros ésteres fosforilados: monofosfato y trifosfato de tiamina (Flodin, 1979 y Machlin, 1990). Cuando las concentraciones de tiamina exceden los 2 μM la tiamina se transporta por difusión pasiva y a bajas concentraciones por un proceso activo (Baumgartner, 1991) (Figura 5). Al administrar tiamina parenteralmente, la concentración excedente se deposita rápidamente en el hígado, músculo y otros órganos y ahí se convierte en el difosfato de tiamina por medio de la tiamina pirofosfocinasa (TPK) en presencia de ATP y magnesio; en menor cantidad se convierte en mono y trifosfato, dependiendo del órgano, ya que por ejemplo, en el cerebro se almacena como trifosfato de tiamina (Spector, 1982, Bettendorf et al, 1994 y Bettendorf, 1994).



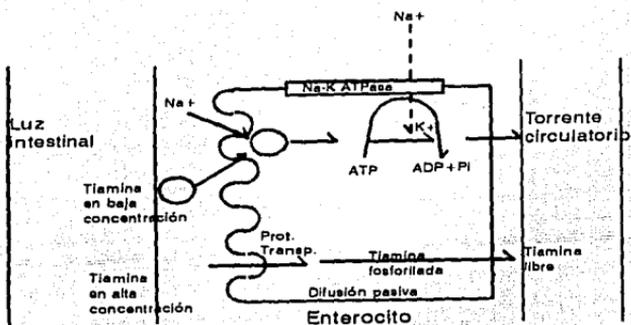


Figura 5. Esquema del mecanismo de transporte intestinal de la tiamina (Hoyumpa, 1983).

Cuando se administra un exceso de tiamina que no se convierte en PPT y no se almacena, se metaboliza en el hígado, sus principales catabolitos son: el 2-metil-4-amino-5-pirimidina ácido carboxílico, 4-metil-tiazol-5-ácido acético, 2-metil-4-amino-5-hidroximetilpirimidina, 5-(2-hidroxiel)-4-metil-tiazol, los cuales se eliminan por la orina (Machlin, 1990).

El cuerpo es incapaz de almacenar la vitamina libre, pero pequeñas cantidades de la forma fosforilada están presentes en todas las células, incluyendo a los eritrocitos (Marks, 1985). Se ha observado que la velocidad de la entrada de la tiamina total a los órganos varía, por lo que puede ser ordenada en la siguiente secuencia, empezando por el órgano al que penetra más fácilmente : cerebelo, hígado, hipotálamo, médula, cuerpo estriado, cordón espinal, cerebro medio más área talámica, nervio ciático y corteza cerebral (Rindi et al, 1980). Por el contrario, después de la primera semana, bajo una dieta deficiente de tiamina, se observa que el PPT del hígado de rata, disminuye en un 65 % y a la quinta semana en un 89 % (Molina, et al, 1994).

La cocarboxilasa es una coenzima esencial que interviene fundamentalmente en 2 tipos de reacciones del metabolismo de los glúcidos: 1) en la descarboxilación de los alfa-cetoácidos separa o transfiere grupos aldehídos, y 2) en la formación o degradación de los alfa-cetoles, siendo el anillo tiazol el que actúa como transportador transitorio de un radical aldehído "activo" unido covalentemente. Promueve la descarboxilación no enzimática del piruvato dando acetaldehído y CO_2 de la siguiente manera: el átomo de hidrógeno del carbono 2 del anillo tiazol se ioniza para dar un carbanión que reacciona con el átomo de carbono carbonílico del piruvato para dar CO_2 y un hidroximetil derivado del anillo tiazólico que se hidroliza y da lugar a un acetaldehído, o puede oxidarse para formar un grupo acilo. Esta reacción requiere de 3 enzimas y 5 coenzimas que se organizan en un complejo multienzimático como se mencionó anteriormente, y dentro de los que se incluye el PPT como una de las

coenzimas primordiales para cumplir con el paso obligado de todos los glúcidos para su ingreso al ciclo de Krebs. El PPT interviene específicamente en una primera etapa, en la descarboxilación del piruvato convirtiéndose en el grupo α -hidroxietil del anillo tiazol (Fig. 6, A). En una segunda etapa, se deshidrogena y el grupo acetilo 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 2 átomos de hidrógeno del grupo hidroxietil del PPT al enlace disulfuro del ácido lipoico (Fig.6,B). En una tercera etapa, se transfiere el grupo acetilo del ácido dihidrolipoico al grupo tiol de la CoA que queda libre para entrar al ciclo de Krebs o de los ácido tricarbóxicos (Fig. 6, C). En la cuarta etapa, 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 (dinucleótido de flavina y adenina) (Fig.6,D), éste ya reducido posteriormente es reoxidado por el NAD⁺ dando lugar al NADH (etapa cinco, Fig.6,E) (Walsh, 1979 y Harris y Thimann, 1948) (Figura 6). El PPT también interviene dentro del ciclo en la oxidación del α -cetoglutarato a succinil-CoA, reacción biológicamente irreversible en las células animales análoga a la descrita previamente para la formación de la CoA en donde se obtiene un producto altamente energético, la succinil-CoA (Figura 7).

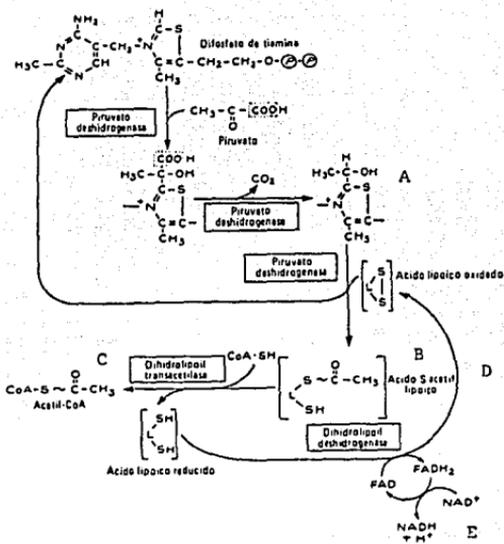


Figura 6. Descarboxilación oxidativa del piruvato (Harper, 1980).

Esta enzima, la α -cetoglutarato-deshidrogenasa cuya descarboxilación depende también del PPT, ha sido llamada la enzima clave que limita el grado o nivel de actividad del ciclo de Krebs, ya que al decrecer su actividad puede comprometer al metabolismo energético en todas las células de todos los tejidos. Por ejemplo, se ha

reportado que en el tejido cerebelar al decrecer su actividad, se modifica la síntesis de los aminoácidos excitatorios y esto puede contribuir a una disfunción neuronal (Mastrogiacomo et al, 1993, Mastrogiacomo y Kish, 1994 y Calingasan et al, 1994). También interviene en el ciclo de las pentosas: la transcetolasa que contiene al PPT unido, efectúa la transferencia de un grupo gliceraldehído desde la

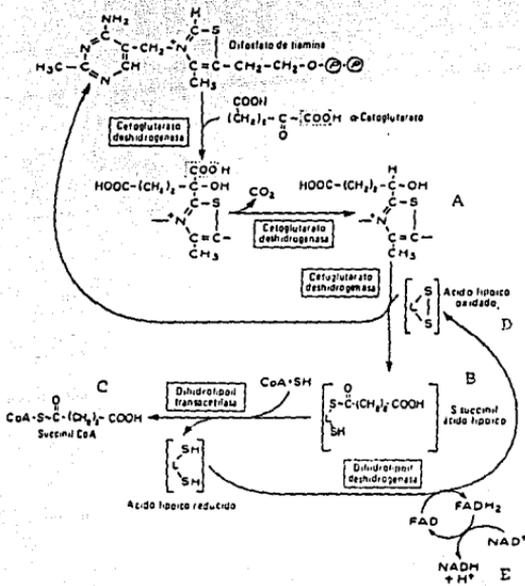


Figura 7. Descarboxilación oxidativa del α -cetoglutarato (Harper, 1980).

D-xilulosa-5-fosfato* a la D-ribosa-5-fosfato para dar la D-sedoheptulosa-7-fosfato** y D-gliceraldehido-3-fosfato, intermediario de la glucosa.

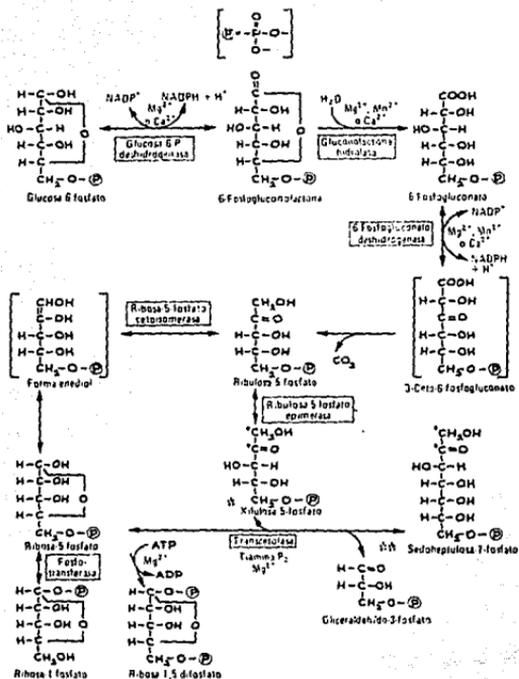


Figura 8. Derivación de la hexosamonofofato (vía de la pentosafofato)

(Harper, 1980).

En esta reacción el grupo glicaldehído es transferido en primer lugar de la D-xilulosa al PPT formando el α -D-dihidroxiétil, de una manera semejante a lo descrito previamente, siendo transportador del aldehído que se transfiere finalmente para formar a la D-ribosa-5-fosfato, pentosa que forma parte de la biosíntesis de los ácidos nucleicos.

Transporte y metabolismo de la tiamina en los hepatocitos de rata:

Al estudiar como se lleva a cabo la fosforilación de la tiamina en los hepatocitos de rata aislados, se observó que este paso metabólico es independiente de la entrada de la tiamina respecto al tiempo, fenómeno comprobado con ciertos inhibidores. Sin embargo, no existen datos totalmente concluyentes pues un reporte de Lumeng et al (1979), sugiere que en las células hepáticas aisladas, la tiamina no se fosforila después de su incorporación. Cuando una célula incorpora tiamina del medio, se observa que conforme transcurre el tiempo, se modifica la concentración de sus fosfoésteres, primero, se acumula tiamina, después de una hora, aumenta el PPT, y posteriormente, en menor cantidad se detecta monofosfato de tiamina (MFT) y trifosfato de tiamina (TFT), por lo que se concluye que el transporte de tiamina en los hepatocitos es acumulativo. Este proceso de transporte de alta afinidad es dependiente del ion Na^+ , o sea, se acompaña de un flujo de sodio. Tanto el transporte como la fosforilación de la tiamina en el hígado son dependientes de la energía biológica, lo que se ha

comprobado al desacoplar la fosforilación oxidativa con el dinitrofenol. También se ha comprobado que existe un canal específico para el transporte de la tiamina. Además, se ha demostrado por medio de un inhibidor de la tiamina, la piritiamina, la presencia de un acarreador en la membrana celular hepática que es independiente de la pirofosfocinasa de la tiamina (Lumeng et al, 1979 y Yoshitoka, 1984)).

La coenzima que utilizamos en este ensayo es el pirofosfato de tiamina o cocarboxilasa estable en solución cuyos 2 grupos fosfato se encuentran firmemente unidos a la molécula de tiamina, lo que la distingue de los liofilizados disponibles en el mercado. Se estudió la estabilidad acelerada de esta coenzima sometiéndola a la temperatura de 60°C, y se comprobó que no se degradaba.

Con base a lo antes mencionado, quedan claras las múltiples actividades que desempeña el PPT. Su importancia se comprueba por las alteraciones que se manifiestan por una deficiencia de tiamina en la ingesta, sobre todo en los mecanismos de fosforilación que la activan. Por ejemplo: La tiamina es esencial para el adecuado funcionamiento de todos los tejidos, principalmente el cerebro; en este caso, las moléculas de tiamina pasan de la sangre por difusión simple a través de los capilares cerebrales, atravesando por lo tanto, la barrera hematoencefálica (Spector, 1982).

La deficiencia de tiamina afecta primordialmente al sistema nervioso periférico, al sistema digestivo y al sistema cardiovascular (Harper, et al, 1980). Algunos

reportes sugieren que la deficiencia de tiamina contribuye al desarrollo del delirio, fallas cardíacas y neuropatías periféricas, por lo que se recomienda su administración en los ancianos (Okeeffe, et al, 1994). Algunos síntomas asociados con parámetros bioquímicos de deficiencia de tiamina son: la anemia y funciones anormales del hígado (bilirrubina y gamma-globulinas) (Baumgartner, 1991).

La vitamina B1 es resolutiva en el tratamiento del Beri-Beri. Se le ha empleado con considerable beneficio en el tratamiento de la polineuritis de varios orígenes, especialmente la asociada al alcoholismo; y en la gestación y la lactancia su requerimiento es mayor (Marks, 1985). También se ha reportado que esta deficiencia provoca desórdenes en la gluconeogénesis pues disminuye la actividad de la glucosa-6-fosfatasa, la fosfoenolpiruvato carboxiquinasa y la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa en el metabolismo del hígado de rata (Harris y Thimann, 1948 y Guzmán, 1992). Por otra parte, en las ratas se ha visto que la deficiencia de la vitamina B1 producida por administrar un antagonista de la tiamina, la oxitiamina, altera la relación de $\text{NAD}^+/\text{NADH}^+$ en el hígado (Gorbach, et al, 1983 a, Gorbach, et al, 1983 b), y en este estado, se encuentran elevados los valores sanguíneos y urinarios del ácido pirúvico (Harper, et al, 1980), y esta situación puede llevarlas al coma.

Además, en personas alcohólicas o en cualquier enfermedad del hígado se han detectado niveles anormales de esta vitamina en los tejidos y fluidos biológicos y disminución en la conversión de las vitaminas libres a coenzimas (Leevy, et al,

1965). También se ha visto que en la deficiencia tiamínica, disminuye el contenido de ARN nuclear de los hepatocitos (Khokha, et al, 1984). Por otra parte, se ha observado que en la encefalopatía de Wernicke, producida por la deficiencia de tiamina, tanto en el hígado como en el cerebro, las actividades de la piruvato-deshidrogenasa y la α -cetoglutarato-deshidrogenasa se deprimen, lo que puede llevar a la aparición de desórdenes neurológicos (Parker et al, 1984).

Las deficiencias nutricionales de la vitamina B1 se contrarrestan principalmente por la administración del PPT *in vivo*, ya que en forma de coenzima actúa directamente en las reacciones enzimáticas de los α -cetoácidos y cetoles (Flodin, 1979) además de que sus funciones se extienden a otras actividades no coenzimáticas. En enfermos con descompensación cardíaca grave, se observó que el índice de ácido pirúvico estaba aumentado y, a la vez, el de tiamina en sangre reducido, asimismo, en personas que fallecieron de insuficiencia cardíaca, se comprobó una disminución de la tiamina y la cocarboxilasa en el corazón por lo que al administrar PPT la recuperación de los valores normales de ácido pirúvico es más rápida que con la administración de tiamina (Benda, 1967).

Markees (1949, 1952, 1966), Klingler y Dalle (1952) y Tsallas y colaboradores (1987), realizaron los primeros estudios sobre el tratamiento del coma diabético, la acidosis diabética y el choque insulínico con la cocarboxilasa y el mononitrato de tiamina respectivamente. En el Instituto de Investigaciones Científicas Hans Selye, A. C. (IICHS) se ha demostrado la actividad de la cocarboxilasa o pirofosfato de

tiamina como terapia preventiva y curativa en el tratamiento de diversos padecimientos, producto de las alteraciones del metabolismo energético, entre ellos, la diabetes (Alcázar et al 1989, Alcázar et al 1991, Alcázar et al 1991, Alcázar et al 1992). En la Diabetes Mellitus la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa se encuentra inhibida o inactivada. En el IICHS también se ha comprobado que en los eritrocitos de los pacientes diabéticos, después del tratamiento con PPT la actividad de esa enzima se incrementa significativamente, por lo que se infiere que ésta coenzima regula el metabolismo de la glucosa en estos pacientes (Alcázar et al, 1992, Márquez et al, 1995). Existen reportes que establecen que la tiamina, de manera indirecta controla la síntesis y secreción de la insulina. (Henderson et al, 1977, Singh, 1982). Además, indirectamente asegura el aporte energético indispensable en la síntesis de cualquier proteína. Este es un ejemplo de las actividades no coenzimáticas del PPT, aunque se desconoce el mecanismo exacto de su funcionamiento.

ANTECEDENTES

Existen innumerables trabajos en los que se demuestra la generación de algunos cambios morfológicos a nivel celular y subcelular debidos a las alteraciones en el metabolismo inducidas por diferentes estímulos. A este respecto, es poca la literatura acerca del efecto de las vitaminas administradas continuamente o en dosis supra fisiológicas. Algunas vitaminas pueden producir hepatotoxicidad, como es el caso de la vitamina A, cuando excede a las 50,000 UI/día, ya que a esa dosis puede llegar a producir una disfunción hepática (Kowalski et al, 1994), mientras que la niacina de liberación a largo plazo puede producir daño hepatocelular y colestático (Howard, 1995). Otros estudios demuestran que los liposomas conteniendo vitamina E pueden inhibir el daño al hígado causado por la intoxicación con tetracloruro de carbono, incluso pueden proteger al hígado de cambios morfológicos (Yao et al, 1994 y Tholen et al, 1985). Se ha reportado que bajo una dieta deficiente en proteínas (14.4 %) se absorbe muy poca tiamina, por lo que se presentan alteraciones ultraestructurales en los enterocitos de aves (Bokhorov et al, 1984). Por su parte, Ostrovskii y Nikitin en 1987 observaron que en estados de deficiencia de tiamina e inflamación séptica en el músculo esquelético de ratones después de un trauma mecánico, se modificó el volumen de los lisosomas y se retardó la diferenciación de los fibroblastos. No se detectaron

cambios significativos en la ultraestructura de los granulocitos neutrófilos, eosinófilos y linfocitos. En cambio, decreció la actividad fagocitaria de los macrófagos. Por su parte, Charness (1993), realizó estudios computarizados de cerebros de pacientes alcohólicos con el síndrome de Wernicke, y encontró alteraciones en el tamaño del soma neuronal, en el número, arquitectura y complejidad sináptica. Estas lesiones fueron más severas cuando se presentaron asociadas a una deficiencia nutricional o enfermedad hepática.

En el estudio elaborado por Staubli W. y cols. en 1969, se demostró que bajo un estímulo con fenobarbital, un compuesto de conversión metabólica que aumenta la actividad enzimática de la cadena de transporte electrónico en la fosforilación oxidativa, tal como el NADH-citocromo c reductasa y el citocromo p-450, se inducía un incremento en el peso del hígado, y a nivel subcelular, se producía una proliferación de las membranas del retículo endoplásmico liso, y cambios en otros organelos. Esta hipertrofia hepática se debía a cambios adaptativos reversibles provocados por un intenso metabolismo celular. En este caso se demostró que a nivel celular pueden ocurrir modificaciones morfológicas correlacionadas con un incremento en la actividad bioquímica. Pero no sólo a este nivel se han encontrado adaptaciones de este tipo, por ejemplo, Luft y cols. (1962) demostraron que en cierto caso clínico particular de hiper-metabolismo severo que no se debía a un hipertiroidismo, se presentaron modificaciones morfológicas de las mitocondrias, como un aumento en el volumen, el número y la forma de las crestas, debido a un

desorden en el sistema enzimático. Leevy y cols. (1965), observaron que los pacientes alcohólicos y/o con daño hepático presentan una disminución en la capacidad para asimilar tiamina. Además, se observó un incremento en la longitud de las mitocondrias que no estaba asociado con algún proceso degenerativo, lo cual sólo significaba un cambio morfológico compensatorio debido al tratamiento administrado, con lo que se deduce que se producen cambios bioquímicos en estos organelos, en ciertas condiciones, sobretudo con la presencia de algunos fármacos.

En base a que existe una estrecha relación: PPT - METABOLISMO - HEPATOCITO, se diseñó un modelo experimental que permitiera analizar esta correlación y verificar si la aplicación continua del PPT no induce alteraciones negativas en los hepatocitos de rata pues existen varios antecedentes de que la aplicación de fármacos ó químicos pueden causar alteraciones morfológicas en el hígado. Por otra parte hay que considerar que todos los medicamentos tienen que pasar por este órgano para su desactivación cuando se encuentran en grandes cantidades.

Este trabajo representa una parte de un amplio proyecto de investigación ya que conjuntamente se está analizando el efecto del PPT en el tejido nervioso y en el músculo cardíaco de manera que se obtenga información de los órganos estudiados, en donde se utiliza de manera importante esta coenzima. Además, posteriormente se evaluará la actividad bioquímica en cada uno de estos órganos.

La importancia de analizar los efectos que pueda tener la aplicación continua del PPT, se deriva del hecho de que hay diversos padecimientos que responden a la administración por períodos prolongados de ésta coenzima, en personas alcohólicas o en cualquier enfermedad del hígado, por lo que surgen las siguientes interrogantes: ¿Cómo actúa a nivel molecular, celular y tisular?, ¿qué beneficios aporta clínicamente?, ¿cuáles serían las indicaciones clínicas que se podrían concluir con estos trabajos? ¿no genera efectos negativos?

HIPÓTESIS

Debido a la gran actividad metabólica que desempeña el hepatocito y la dependencia de la presencia del pirofosfato de tiamina, se propone que al aplicarse continuamente y a largo plazo ésta coenzima estable en solución a ratas Wistar normales, se activan en forma continua los procesos metabólicos hepáticos. Por otra parte, como consecuencia al incremento de la actividad bioquímica, se generan procesos fisiológicos adaptativos cuya manifestación es un cambio en la morfometría de los hepatocitos.

OBJETIVOS

Objetivo general:

Analizar el efecto a nivel citoplasmático y nuclear, del tratamiento a largo plazo con pirofosfato de tiamina estable en solución, sobre hepatocitos de ratas normales a nivel de microscopia de luz.

Objetivos particulares:

Realizar un análisis morfométrico del área citoplasmática de los hepatocitos de ratas normales, haciendo una comparación del área citoplasmática de los hepatocitos de ratas tratadas continuamente con pirofosfato de tiamina.

Realizar un análisis morfométrico comparativo de las áreas nucleares de los hepatocitos de las ratas tratadas frecuentemente con PPT y las testigo.

MÉTODO

Animales

Se dispuso de cinco lotes de ratas macho de la cepa Wistar de 300 ± 50 gr. de peso inicial y 3 meses de edad aproximadamente. Cada lote se formó con 5 ratas testigos sólo con solución salina, por 5 de cada grupo tratado con PPT y se dispuso de otros cinco lotes para la repetición del experimento. Además, se consideró un grupo independiente de 3 animales sin ningún tipo de tratamiento (tomados del bioterio y sacrificados inmediatamente) que correspondió al grupo de testigos absolutos, para observar las dimensiones morfométricas al inicio del tratamiento en ambos grupos y nos servirán para considerar que las ratas continúan creciendo con respecto al tiempo. Los animales se mantuvieron bajo las mismas condiciones ambientales. Se les permitió adaptarse a las condiciones del laboratorio por una semana y a partir de esa fecha se inició el tratamiento. Se sometieron a un fotoperíodo de luz normal del día y se alimentaron *ad libitum*.

Tratamiento

Se administró por vía subdérmica cada 24 horas 0.3 ml de solución salina fisiológica al 0.9 % a las ratas testigo y al grupo tratado 0.3 ml de pirofosfato de tiamina o cocarboxilasa (40 mg/ml), estable en solución cuyo nombre comercial es

X-2. Los tratamientos se aplicaron a cada lote durante 7, 14, 21, 30 y 90 días respectivamente.

Obtención de la muestra.

Al término del tratamiento correspondiente, se sacrificaron a los animales por decapitación. Se aisló la porción inferior del lóbulo izquierdo del hígado en un tiempo no mayor a 1 minuto para asegurar la preservación del tejido. Se eliminó el exceso de sangre con solución salina al 0.9% y se prepararon para la técnica de microscopía electrónica según Weakley, 1979. En esta parte del estudio se analizará el trabajo con cortes semifinos a microscopía de luz, una segunda fase será el análisis a microscopía electrónica de transmisión.

Fijación

Una vez disectado el fragmento del lóbulo del hígado, se bañó con el fijador glutaraldehído al 2.5%, diluido en un amortiguador de cacodilatos de sodio, 0.15 M, a pH 7.4 en donde se fragmentó el tejido cuidadosamente en porciones de 1 mm. por lado manteniéndolo siempre inmerso en la solución y colocando los fragmentos recién cortados en gotitas de fijador nuevo hasta que ya no quedaran restos de sangre libre. Posteriormente, se colocaron en viales con fijador limpio, en donde se conservaron inmersos durante 2 horas a temperatura ambiente.

Lavado

Se eliminó la solución fijadora con el amortiguador de cacodilatos, mismo que se utilizó para elaborar el fijador. Se realizaron tres cambios de 15 minutos cada uno.

Postfijación

Una vez realizado el lavado se colocaron las muestras en tetraóxido de osmio al 1%, diluido en amortiguador de cacodilatos de sodio, 0.15 M, durante dos horas. Se lavó nuevamente con tres cambios de 15 minutos cada uno con el mismo amortiguador con el que se preparó el fijador.

Deshidratación

La deshidratación se llevó a cabo con etanol a diferentes graduaciones con cambios de 15 minutos cada uno, empezando con el de 50, 60, 70, 80, 90% y 3 cambios de 15 minutos cada uno en alcohol absoluto. Por último, se realizaron 2 cambios de 15 minutos cada uno en epoxypropano (óxido de propileno).

Infiltración e Inclusión

Se colocaron los fragmentos del tejido para su preinclusión en mezclas de óxido de propileno y resina epóxica (Epon 812) 1 : 1 y 1 : 3 respectivamente, y se dejaron a temperatura ambiente de 12 a 24 horas en cada ocasión. Para la inclusión, se colocaron los fragmentos en resina epóxica pura durante 2 horas y finalmente en los moldes de inclusión.

Polimerización

Este paso se lleva a cabo en la estufa de temperatura constante (Reichert-Jung KT 100), a temperaturas de 35°, 45° y 60 ° C de 12 a 24 horas en cada temperatura.

Corte y tinción

Los bloques polimerizados se tallaron para formar la pirámide y poder obtener cortes semifinos, los cuales se realizaron en un ultramicrotomo Reichert-Jung con un grosor de 0.5 μm . aproximadamente y se montaron en portaobjetos para su contraste con el método rápido de azul de metileno-borax o azul de toluidina. Los cortes se observaron con un microscopio de luz, y se obtuvieron algunas fotografías para su estudio.

Morfometría y estadística

Las preparaciones fueron observadas en un microscopio óptico (Zeiss), conectado mediante una cámara de video (CCD Sony) a una computadora con un analizador de imágenes (Image Pro-plus, versión 2.0, Media Cibernetics), con el cual se midieron las áreas citoplasmáticas y nucleares de los hepatocitos de los animales tratados y los controles. Se analizaron para cada tiempo de tratamiento 3 preparaciones, y de cada preparación se analizaron 30 células con sus respectivas repeticiones tomadas aleatoriamente para obtener 180 mediciones en total, de cada tratamiento con sus respectivos testigos. Los resultados se sometieron al análisis de varianza (ANOVA), que posteriormente se compararon entre sí (Tukey), siendo

la p inferior a .05, y finalmente se realizó una regresión múltiple para analizar la diferencia entre las pendientes de las gráficas de los datos de los grupos tratados y los testigos.

RESULTADOS

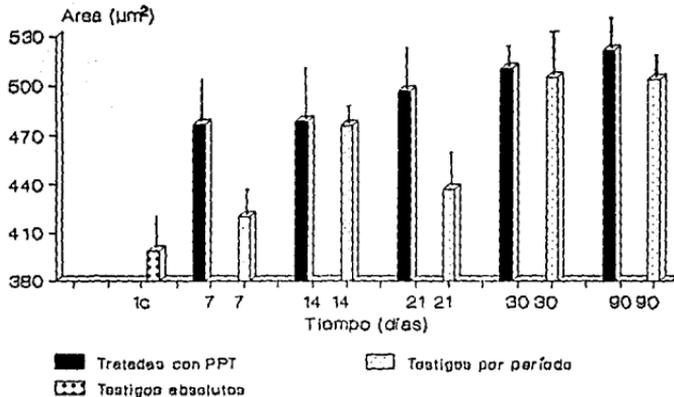
El efecto del PPT estable en solución sobre el área citoplasmática de los hepatocitos de rata después de su administración a los 7, 14, 21, 30 y 90 días se muestra en la tabla 1. En esta se observa que los valores promedio de las áreas citoplasmáticas de los animales tratados y testigos manifiestan una tendencia a incrementar su área al compararlos con el grupo de los testigos absolutos (1c), ya que éstos últimos representan las dimensiones iniciales de ambos grupos pero sin algún tratamiento, y su valor promedio es de $398.65 \mu\text{m}^2$, el más pequeño de todos. Por otro lado, se detectó que los resultados correspondientes a los animales tratados son generalmente un poco superiores a sus testigos, alcanzando un área máxima de $521.18 \mu\text{m}^2$ a los 90 días de tratamiento con una diferencia de $44 \mu\text{m}^2$ en promedio, con respecto a los valores que muestran a los 7 días de tratamiento, sin ser estadísticamente significativo. Al comparar los resultados del tratamiento a los 7 y 14 días comprobamos que no existe diferencia estadísticamente significativa entre ellos, ya que sólo un promedio de $2 \mu\text{m}^2$ los distinguen, mientras que los demás grupos difieren mucho más (Tabla 1). Al aplicar el análisis de varianza seguido por una prueba de Tukey a estos grupos se obtuvo una $p > 0.5$.

El comportamiento de estos resultados puede verse en la gráfica 1, en la cual los valores promedio muestran que el área citoplasmática se incrementa conforme transcurre el tiempo de la aplicación de la coenzima.

Para conocer las diferencias en el área citoplasmática entre los animales tratados y testigos, se aplicó un análisis factorial, el cual determinó que la diferencia entre la pendiente de los grupos es de $35.22\mu\text{m}^2$ por tiempo de tratamiento. Por su parte, el incremento del área citoplasmática en los animales tratados durante 7, 14, 21, 30 y 90 días fue de $0.49\mu\text{m}^2$ en promedio, lo cual no muestra significancia estadística ($p > .05$).

Tabla 1. Valores promedio y σ de las áreas citoplasmáticas de los hepatocitos de las ratas testigo y tratadas. (1c = testigos absolutos).

AREA CITOPLASMATICA (μm^2)		
Días de tratamiento	Tratados	Testigos
7	476.84 \pm 27.43	420.35 \pm 19.14
14	478.70 \pm 34.27	476.01 \pm 12.43
21	496.40 \pm 18.13	436.88 \pm 23.64
30	510.26 \pm 14.87	504.85 \pm 28.66
90	521.18 \pm 19.74	503.52 \pm 16.85
1c	398.65 \pm 21.49	n=6



PPT (PIROFOSFATO DE TIAMINA)
n= 6

Gráfica 1. Promedio y σ de áreas citoplasmáticas de hepatocitos de rata tratadas con PPT y de los testigos correspondientes, así como de los especímenes que se consideraron el testigo absoluto. Las ratas fueron tratadas con 0.3 ml de PPT estable en solución (40mg/ml) durante periodos de 7, 14, 21, 30 y 90 días, simultáneamente a ratas testigo (n=6) a las que se les aplicó solución salina al 0.9%. Los resultados de las ratas tratadas y testigos se comparan con el promedio del grupo de testigos absolutos (1c) $p > .05$.

Una forma de ver la diferencia numéricamente de estos resultados, es al hacer los cocientes de los promedios de las áreas citoplasmáticas de los hepatocitos de rata entre los grupos confirman nuevamente que conforme transcurre el tiempo de aplicación aumenta el área citoplasmática. La columna del lado izquierdo de la tabla 2, representa a los grupos de ratas tratadas con PPT y el renglón superior contiene tanto los grupos testigo como tratados para comparar la diferencia del cociente no sólo con los testigos sino también con cada periodo de tratamiento. Se puede observar que los cocientes del control general son menores a 1, por lo tanto, es menor a todos los demás grupos, mientras que en los grupos de 7, 14, 21, 30 y 90 días sus cocientes son mayores que sus respectivos grupos testigo, excepto en el día 14. Asimismo se detecta que al comparar el cociente de un grupo tratado con otro grupo de mayor tiempo de exposición a la coenzima, el cociente del primero es menor (Tabla 2).

La evaluación del área nuclear de los hepatocitos de rata se observa en la tabla 3, la cual nos muestra que el área nuclear también tiende a incrementarse, pero de manera mínima pues no existen diferencias estadísticamente significativas para cada tratamiento ($p > .05$), esto ocurre también con el área citoplasmática (gráfica 1). El valor máximo de $59.24 \mu\text{m}^2$, corresponde al grupo tratado de 90 días y el mínimo valor del área nuclear lo presentó el grupo de testigos absolutos con $49.28 \mu\text{m}^2$ aún cuando no fue muy diferente del valor presentado por los diferentes grupos tanto experimentales como testigos. Esta relación se confirma al obtener los

valores promedio de las áreas nucleares en la tabla 4. No obstante, en los grupos tratados de 14 y 90 días aquí si se observa una diferencia con respecto a sus testigos, sin embargo, sus desviaciones son muy grandes como se puede observar en la gráfica 2. En general, el área nuclear no muestra un cambio morfométrico notable como el observado en el área citoplasmática

Tabla 2. Comparación de los grupos con respecto al promedio del valor del área citoplasmática de los hepatocitos, grupo contra grupo. Se muestra valor del cociente de los grupos de la izquierda (tratados con PPT) sobre el valor de los grupos del renglón superior (T = testigos, Ic = testigos absolutos).

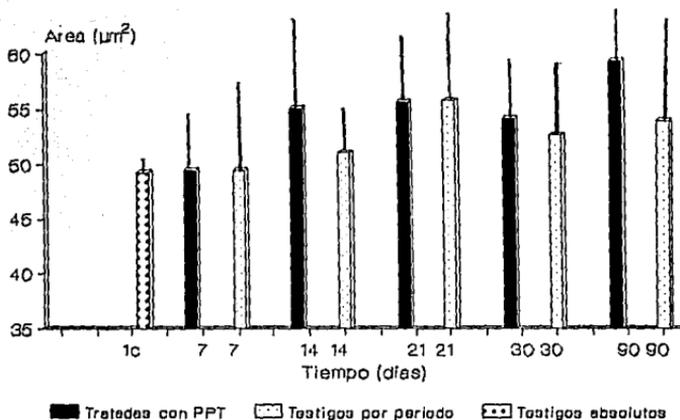
Días	7T	14	14T	21	21T	30	30T	90	90T
Ic	0.83	0.94	0.83	0.76	0.80	0.91	0.78	0.79	0.76
7		1.13	0.99		0.96		0.93		0.91
14				1.00	0.96		0.93		0.91
21						1.13	0.97		0.95
30							1.01		0.97
90									1.03

Tabla 3. Valores promedio y σ de las áreas nucleares de los hepatocitos de las ratas testigo y tratadas. (Ic = testigos absolutos).

Días de tratamiento	Tratados	Testigos
	μm^2	
7	49.44 \pm 5.28	49.48 \pm 7.99
14	55.08 \pm 8.28	51.04 \pm 4.50
21	55.65 \pm 6.00	55.79 \pm 7.82
30	54.12 \pm 5.18	52.60 \pm 6.47
90	59.24 \pm 4.50	53.83 \pm 8.79
Ic	49.28 \pm 1.40	n=6

Tabla 4. Comparación del cociente de todos los grupos con el valor del control general y grupo contra grupo del área nuclear de los hepatocitos (T= testigo, Ic = testigos absolutos).

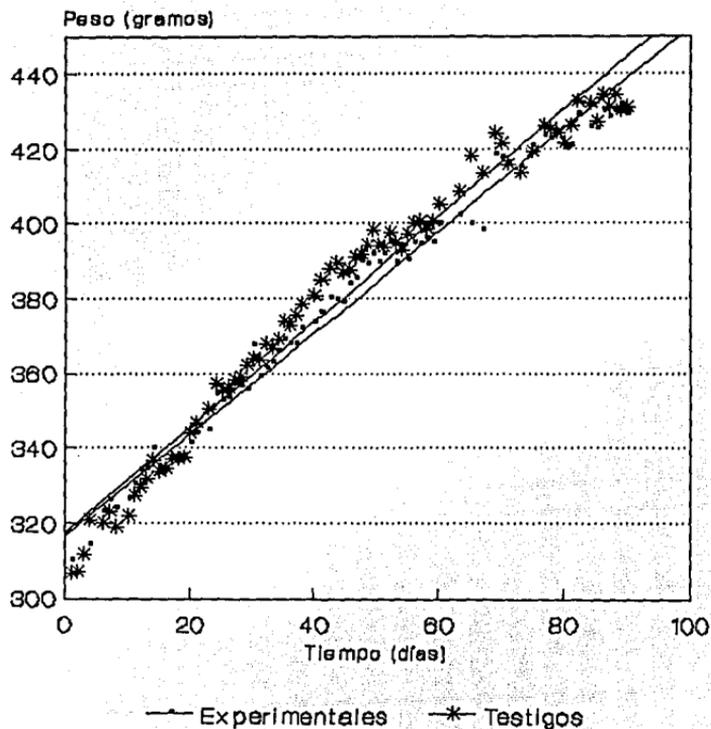
Días	7	7T	14	14T	21	21T	30	30T	90	90T
Ic	0.99	0.99	0.89	0.96	0.88	0.88	0.91	0.93	0.83	0.91
7		0.99	0.89		0.88		0.91		0.83	
14				1.07	0.98		1.01		0.92	
21						0.99	1.02		0.93	
30							1.02		0.91	
90									1.10	



PFT (PIROFOSFATO DE TIAMINA)
n= 6

Gráfica 2. Areas nucleares de hepatocitos de rata tratadas con PPT y sus respectivos controles. Las ratas fueron tratadas con 0.3 ml de PPT estable en solución (40mg/ml) durante 7, 14, 21, 30 y 90 días, simultáneamente con un grupo de ratas testigo (n=6) a quienes se les aplicó solución salina al 0.9 % en los mismos periodos. Los resultados de las ratas tratadas y testigos se comparan con un grupo testigo absoluto (1c). La comparación de datos reportó una $p > .05$.

Por otro lado, los promedios de peso corporal de las ratas testigo y tratadas con PPT estable en solución durante 90 días se observan en la gráfica 3. Es claro el incremento de peso en ambos grupos conforme transcurre el tiempo. El valor promedio del peso en los animales testigos es de 306.6 g y para los tratados de 310.1 g al inicio del estudio mientras que al término del estudio son de 430.8 g y 429.1 g respectivamente. Al realizar el análisis de regresión lineal de los datos del peso corporal se obtuvo que la pendiente para el aumento del peso de los animales testigos es de 1.415 y para los tratados es de 1.358, lo cual indica que el aumento en peso de los animales tratados fue menor que para los testigos. En este punto es importante destacar, que al realizar la disección del hígado se observó que los animales testigos presentaron mucho mayor cantidad de depósitos de grasa residual que los animales tratados con PPT.



Pendiente de experimentales 1,3589

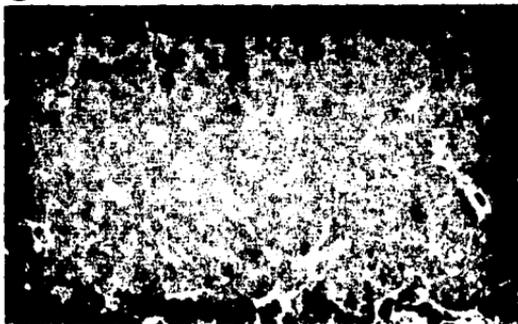
Pendiente de testigos 1,4154

Gráfica 3. Aumento de peso corporal de ratas testigo y tratadas con respecto

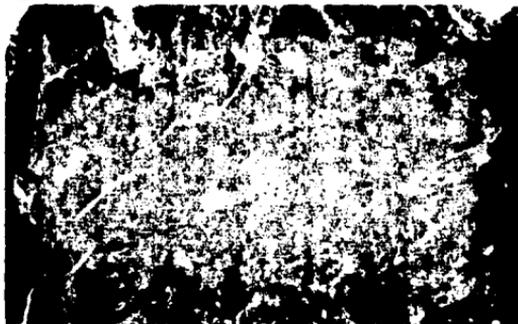
al tiempo de tratamiento.

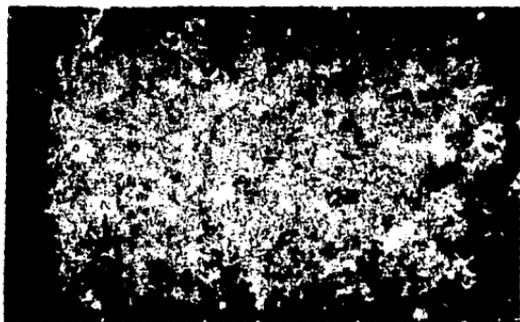
A continuación se presentan fotografías a microscopía de luz de cortes semifinos de 0.5 μm de espesor y teñidos con azul de toluidina. Se aprecia el parénquima del lóbulo izquierdo de hígado de diferentes ratas tratadas con PPT y del testigo absoluto. Podemos identificar los hepatocitos al mismo aumento y donde se observan sus características así como células de Kupffer, los sinusoides con eritrocitos dentro de ellos y algunas células binucleadas. A. Testigo absoluto. B. Animal de 7 días de tratamiento C. Animal de 14 días de tratamiento. D. Animal de 21 días de tratamiento. E. Animal de 30 días de tratamiento F. Animal de 90 días de tratamiento. En cada imagen se identifican las siguientes estructuras: N=núcleo, C=citoplasma, K=célula de Kupffer, E=eritrocitos, S=sinusoides, B=conducto biliar. X 400.

8

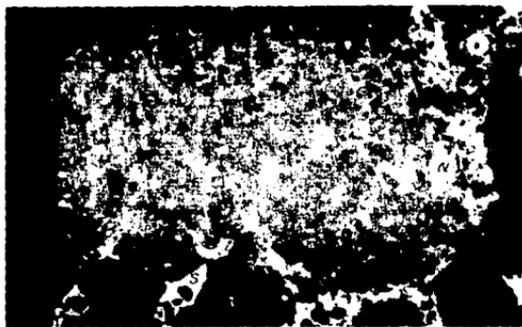


9

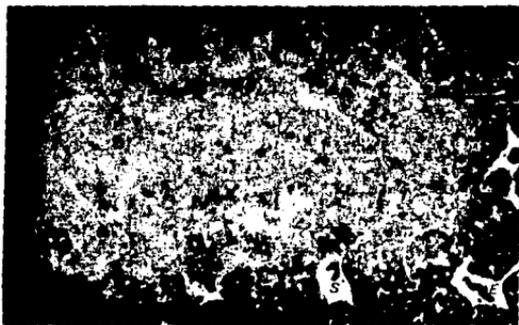




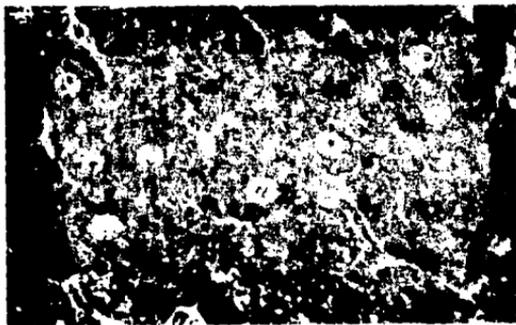
(C)



(D)



E



F

DISCUSIÓN

Se ha observado que en condiciones patológicas ó experimentales, las células responden a numerosos estímulos alterando la estructura y/o el contenido de sus organelos, lo cual parece estar correlacionado a cambios bioquímicos y fisiológicos observados en la fracción subcelular (Staubli et al, 1979, Luft et al, 1962, Weibel, 1969). Es muy escasa la literatura científica que analiza la posibilidad de que las vitaminas administradas continuamente por periodos prolongados induzcan cambios morfológicos a nivel celular en los hepatocitos. Estudios recientes han reportado evidencias de que la vitamina A y la niacina de liberación a largo plazo producen hepatotoxicidad a concentraciones elevadas modificando morfológicamente al hepatocito (Kowalski, 1994 y Howard, 1995).

De acuerdo con los resultados obtenidos en este estudio, como se observa en la gráfica 1, hubo una tendencia al incremento citoplasmático equivalente a $0.49\mu\text{m}^2$ en promedio por periodo analizado (sin ser estadísticamente significativo) en las células hepáticas sometidas al tratamiento con PPT estable en solución en comparación con las no tratadas, lo cual concuerda con el reporte de Staubli y cols. (1979), cuya modificación morfológica fue el resultado de la utilización del fenobarbital que también incrementa la actividad de las vías metabólicas que llevan a una mayor producción de

ATP momentáneamente. Observaron una hipertrofia hepática, y no sólo a este nivel, sino que los organelos también presentaron modificaciones morfológicas.

Tanto los hepatocitos de las ratas testigo como las tratadas, mostraron un incremento en las áreas citoplasmáticas y nucleares, porque al aumentar la edad también van aumentando de tamaño las células (gráficas 1 y 2), esto es normal, pero en las gráficas presentadas se observa que los hepatocitos de las ratas tratadas generalmente mostraron mayores dimensiones comparadas con sus respectivos testigos, lo que se atribuye a las adaptaciones morfológicas producto de las condiciones fisiológicas al aumentar la actividad bioquímica por la presencia continua del PPT. La interpretación de este fenómeno es que si bien con la aplicación frecuente del PPT se puede activar las rutas metabólicas, no se presentan alteraciones morfológicas. En cuanto a las áreas comparadas, es decir que las dimensiones del citoplasma se conservan dentro del rango normal $314\mu\text{m}^2 - 706.86\mu\text{m}^2$ (Holtzman, 1986) tanto en los animales controles como en los tratados con PPT, sin embargo, las desviaciones estandar son muy grandes y se superponen entre si, por lo que el análisis de varianza resulta con una $p > .05$.

El hecho, de que el valor de la pendiente en la gráfica de peso corporal de los animales testigo sea mayor con respecto a los tratados se puede atribuir, a que las ratas tratadas presentan una menor cantidad de grasa residual, lo que nos indica que probablemente el hígado la está utilizando como combustible en las vías metabólicas dependientes del PPT. Para confirmar esta

hipótesis, se requiere de la realización de algunos estudios bioquímicos posteriores. Lo observado se puede interpretar de la siguiente manera: al activar los complejos enzimáticos dependientes del PPT como son: la transcetolasa, el complejo piruvato-deshidrogenasa y la α -cetoglutarato-deshidrogenasa, se puede deducir que probablemente se están utilizando eficientemente las vías metabólicas en las que intervienen estas enzimas, lo que se manifiesta en el aumento del área citoplasmática de los hepatocitos. Esto nos indica, que la molécula de la coenzima está activando a dichas enzimas. Como se mencionó anteriormente, el hígado es un órgano muy activo metabólicamente, y requiere de la presencia de muchas enzimas y coenzimas, para que se lleve a cabo el metabolismo de la glucosa principalmente, (Rosa, 1992). De tal manera que al suministrar continuamente PPT estable en solución estamos coadyuvando a mantener la homeostasis de este órgano tan importante. Si por alguna razón, dichas enzimas y coenzimas no se encontraran, en cantidad suficiente, existirían desórdenes metabólicos considerables. En este caso, el hígado probablemente desarrolla procesos adaptativos modificando el contenido del PPT, la tiamina fosfocinasa y la tiamina pirofosfatasa, mientras que la transcetolasa tiene oscilaciones durante la deficiencia de tiamina (Tumanov et al, 1984).

En nuestros resultados no se observa una hipertrofia hepática, pero sí tenemos evidencias de una clara tendencia al incremento del área nuclear y citoplasmática, que pueden interpretarse como cambios adaptativos ante una mayor actividad metabólica. Esto nos indica que el PPT estable en solución a nivel morfológico y fisiológico, no

causa daño al hígado, tal como se ha reportado en estudios con otras moléculas (T Yao et al, 1994, Tholen, 1985 y Howard, 1995).

Si bien no hay daños morfológicos y fisiológicos por la administración del PPT podemos decir que si ejerce efectos benéficos, lo cual se manifiesta en la viabilidad celular mediada por 2 mecanismos: (1) reduciendo los niveles de lactato y por lo tanto evitando la acidosis intracelular, y (2) preservando y asegurando la descarboxilación del ácido pirúvico para su entrada al ciclo de Krebs, con su concomitante aumento en la producción de fosfatos de alta energía.

Por otro lado Staubli y cols. (1979), mostraron que el contenido nuclear del hepatocito no aumenta cuando se activa metabólicamente con fenobarbital, lo cual confirma nuestros resultados, ya que el núcleo del hepatocito no mostró un incremento importante al adicionar PPT, dado que las reacciones que éste activa se realizan en el citoplasma, principalmente en las mitocondrias. Ahora bien, los aumentos en el área nuclear a los días 14 y 90 se pueden explicar como un aumento en la síntesis del ARN nuclear como parte de los procesos adaptativos al incremento metabólico.

La relación entre el citoplasma y el núcleo es muy importante en este estudio, ya que el citoplasma mostró un crecimiento mayor bajo el efecto del PPT, lo cual podría indicarnos que debido a un mayor metabolismo los organelos se están adaptando y aumentan su fracción membranal, mientras que el núcleo puede estar produciendo activamente ARN sin afectar sus dimensiones morfológicas.

ESTA TESIS NO DEBE SALIR DE LA BIBLIOTECA

Los resultados de este trabajo experimental nos permiten fundamentar la aplicación terapéutica, de esta coenzima demostrando que la administración continua y a largo plazo del PPT no es tóxica para el organismo. Con respecto a esto último, en las patologías relacionadas con el hígado podemos mencionar lo siguiente: se ha comprobado que la función hepática se llega a alterar en algunos casos como es la encefalopatía de Wernicke y la hiperemesis gravídica (Rotman et al, 1994), los cuales responden a la aplicación de la tiamina. Sin embargo, se esperarían mejores resultados clínicos en estos casos si se administrara PPT, ya que la coenzima actúa directamente sobre su sustrato, el ácido pirúvico y el ácido α -cetoglutárico para la obtención de energía al activar el ciclo de Krebs ya que la tiamina, o sea la vitamina B1, necesitaría transformarse en coenzima para que sea activa, y esto se logra si el metabolismo energético es adecuado o sea, si hay una producción adecuada de ATP. Pero la deficiencia de éste importante donador de fosfato se encuentra en cualquier patología, por tanto, la activación de las vitaminas no se llevaría a cabo, y se produciría un círculo vicioso, con las consecuencias clínicas esperadas. Por otra parte, la presencia del PPT activa las vías metabólicas que degradan metabolitos tóxicos, los que pueden bloquear algunas reacciones bioquímicas del metabolismo celular. Asimismo, el PPT se ha utilizado en diversas alteraciones hepáticas de diferentes etiologías y su acción llega a normalizar los valores del ácido pirúvico y del ácido láctico, que se encuentran elevados por lo que el PPT puede restablecer el metabolismo energético por el mecanismo antes descrito. Una vez superadas completamente las alteraciones bioquímicas y sobre todo

energéticas de la célula hepática, las condiciones clínicas en general se mejoran poco a poco con el tiempo. Por lo tanto, con los resultados obtenidos podemos concluir que no hay efectos secundarios negativos.

CONCLUSIONES

A nivel celular; en el área citoplasmática y nuclear no se observan modificaciones morfométricas a microscopía de luz, ya que hay una tendencia al incremento del área, pero que se conserva dentro de los rangos normales, lo que nos permite proponer que el PPT no produce una hipertrofia del hepatocito, aún cuando es un tejido que depende metabólicamente y en gran medida de esta coenzima.

Con la presencia continua del PPT el hepatocito se adapta, mantiene o recupera su actividad bioquímica y fisiológica sin alterar su morfología.

PERSPECTIVAS

Como continuación a este trabajo, se desarrollará una valoración bioquímica, así como un estudio a nivel ultraestructural por medio de la microscopía electrónica de transmisión del efecto de la aplicación continua y a largo plazo del pirofosfato de tiamina estable en solución en: las células del hígado, corazón y cerebelo para complementar la información acerca del mecanismo de acción de esta coenzima, a nivel molecular, celular y tisular, y de esta manera brindar mayor información sobre su actividad biológica que sustente su aplicación terapéutica.

BIBLIOGRAFÍA

- Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K & Watson JD. Molecular biology of the cell. 3a ed. Garland Ed: New York, . 130, 660, 1148, 1994.
- Alcázar LS, Bonilla NM & Benítez RMT. Remisión de diabetes en ratas tratadas con pirofosfato de tiamina o coarboxilasa estable en solución. XXXIV Congreso Nacional de Ciencias Fisiológicas. Colima, Colima, 1991.
- Alcázar MH, Alcázar L.S, Rivera LRM & Moreno HJ. Pirofosfato de tiamina (Cocarboxilasa) estable en solución como tratamiento de la diabetes. *Inv Med Int* 16:83, 1989.
- Alcázar MH, Alcázar L.S. Utilidad del pirofosfato de tiamina (Cocarboxilasa) estable en solución en dos casos postinfarto del miocardio. *Inv Med Int* 17:170-180, 1991.
- Alcázar MH, Alcázar L.S, Gámez MA & Benítez RMT. Actividad de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa en pacientes diabéticos tratados con pirofosfato de tiamina o cocarboxilasa. *Inv Med Int* 19:64-74, 1992.
- Banks WJ. Histología veterinaria aplicada. Ed. El Manual Moderno : México, D. F. 512-522, 1986.
- Baumgartner TG. What the practicing nurse should know about thiamine. *J Intav Nurs* 14:130-135, 1991.
- Benda L. Cocarboxilasa y enfermedades del corazón. En *Vitaminas*. F. Hoffmann-La Roche & Cia. Basilea, Suiza, 29-37, 1968.
- Berkow R & Damme S. El manual Merck. Research Laboratories, 1253-1257, 1978.
- Bettendorff L, Wins P, & Lesourd M. Subcelular localization and compartmentation of thiamine derivatives in rat brain. *Biochim Biophys Act* 1222:1-6, 1994.
- Bettendorff L, Hennuy B, De Clerck A, & Wins P. Chloride permeability of of rat brain membrane vesicles correlates with thiamine triphosphate content. *Brain Res* 652:157-160, 1994.
- Bokhorov O, Lazarov I & Bozhkov S. Changes in the cAMP content in the intestinal and liver tissue and in 35 S-thiamine transport in chickens fed a low-protein diet. *Vet Med Nauki* 21:48-57, 1984.
- Calingasan NY, Baker II, Rex Sheu KF & Gibson GE. Selective enrichment of cholinergic neurons with the a-ketoglutarate dehydrogenase complex in rat brain. *Neurosci Lett*. 168:209-212, 1994.
- Charness ME. Brain lesions in alcoholics. *Alcohol Clin Exp Res* 17:2-11, 1993.
- Diccionario terminológico de ciencias médicas. 10a ed. Salvat Ed. España: 1968.
- Farris EJ & Griffin J. The rat in laboratory investigation. Ed Hafner Press : USA. 33, 88-89, 1949.
- Flodin NW. Vitamin/trace mineral/protein interactions. *Horrobin Vol. 1 USA*. 66-72, 1979.
- Gorbach ZV, Maglysh SS & Kubyshin YL. (a). Functioning of the oxidizing phase of the pentosephosphate pathway in rat liver in the development of vitamin B1 deficiency in the animal. *Vopr Med Khim* 29.5 36-41, 1983.

- Gorbach ZV, Maglysh SS & Ostrovskii IuM (b). Peculiarities of carbohydrate metabolism in the rat liver due to the limited accessibility of thiamine. *Biokhimiia* 48:11 1778-82, 1983.
- Guzmán TE. . Pirofosfato de tiamina o cocarboxilasa como regulador de la incorporación de carbohidratos a los tejidos. (Tesis Profesional) Facultad de Ciencias, UNAM 1992.
- Harper HA, Rodwell VW & Mayes PA. Manual de Química Fisiológica. Ed. El Manual Moderno: México, D.F. 178, 323, 332-333, 341, 1980.
- Harris SR & Thimann V K. Vitamins and Hormones. Ed. Academic Press. Vol. VI: USA New York 69-77, 1948.
- Henderson GI, Hoyumpa AM & Schenker IS. Effects of thiamine deficiency on cerebral and visceral protein synthesis. *Biochem Pharmacol* 27: 1677-1683, 1977.
- Holtzman E & Novikoff AB. Estructura y dinámica celular 3a ed. Ed. Nueva Editorial Interamericana : México, 5-7, 533, 1988.
- Howard PA. Hepatotoxicity with niacin. *Pharm Updt*, 1:14-15, 1995.
- Hoyumpa AM. Alcohol and thiamine metabolism. *Alcohol Clin Exp Res*, 7:11-14, 1983.
- Klinger R. & Dalle P. Coste: Trattamento con cocarbossilasi dell' acidosi diabetica e di alcune complicanze diabetiche. *Minerva Med* 43:1158, 1952.
- Kowalski TE, Falesting M, Furth E & Malet PF. Vitamin A hepatotoxicity: A cautionary note regarding 25,000 IU supplements. *Amer J Med* 97, 1994.
- Khokha AM, Fustochten L.O BP & Netedw LI. Synthesis of nucleic RNA in hydroxythiamine-induced vitamin B1 deficiency. *Biokhimiia* 49:7 1166-70, 1984.
- Lehninger AL. Bioquímica. Ed. Worth: E.U.A., California, 692-696, 1978.
- Lehninger AL, Nelson DL & Cox MM. Principles of biochemistry. 2a ed. Ed Worth: U.S.A., 736-741, 1993.
- Leevy CM, Baker H, Tenlove W, Frank O, & Chernick GR. B-Complex vitamins in liver disease of the alcoholic. *Am J Clin Nut* 16:4 339-46, 1965.
- Lesson CR, Lesson TS & Paparo AA. Histología 5a ed. Interamericana Ed: 383-394, 1987.
- Luft R, Ikkos D, Palmieri G, Ernster L & Afzelius B. A case of severe hypermetabolism of nonthyroid origin with a defect in the maintenance of mitochondrial respiratory control: A correlated clinical, biochemical, and morphological study. *Jour Clin Invest* 41:1776-1786, 1962.
- Lumeng L, Edmondson W, Schenker S & Li T. Transport and metabolism of thiamin in isolated rat hepatocytes. *Jour Biol Chem* 254:7265-7268, 1979.
- Machlin LV. Handbook of vitamins 2a ed. Ed. M. Decker Inc.: New York. 1990.
- Markees S, & Meyer FW. Die therapie des coma diabeticum mit cocarboxylase. Experimentelle grundlagen und klinische ergebnisse schweiz. *Med Wschr*. 79:931, 1949.
- Markees S. Zur wirkungsweise der cocarboxylase bei der diabetischen acidose schweiz. *Med Wschr* 82:1290, 1952.

- Markees S. Cocarboxylase bei diabetischer acidose in: B_Vitamine, klinische v. physiologisch-chemische probleme. Frlr. Van Kress U. Schattauer-Verlag Stuttgart p.171-176, 1966.
- Marks J. Vitamin B1 In: The Vitamins, Their role in medical practice. M. T. P. Press Lim ed. Lancaster, Boston. 143-148, 1985.
- Márquez LC, Del Toro EM & Amaya AFR. Valoración de pacientes diabéticos no insulino dependientes tratados con pirofosfato de tiamina. (Tesis profesional) Facultad de Ciencias Químicas, Universidad de Colima 1995.
- Mastrogiacomo I, Bergeron C & Kish SJ. Brain alpha-ketoglutarate dehydrogenase complex activity in Alzheimer's disease. *J. Neurochem* 61:2007-14, 1993.
- Mastrogiacomo I & Kish SJ. Cerebellar alpha-ketoglutarate dehydrogenase activity is reduced in spinocerebellar ataxia type 1. *Ann. Neurol* 35:624-6, 1994.
- Metzler DE. The enzymes. Academic Press ed, New York, 2.295-337, 1960.
- Molina PE, Myers N, Smith RM, Lang CH, Yousef KA, Tepper PG & Abumrad NN. Nutritional and metabolic characterization of a thiamine-deficient rat model. *J Parenter Enteral Nutr* 18:104-11 1994
- Nelson, Vaughan & Mc Kay. Tratado de pediatría, II, Salvat ed. 1198, 1975.
- Okeeffe ST, Tormey WP, Glasgow R & Lavan JN. Thiamine deficiency in hospitalized elderly patients. *Gerontology* 40:18-24, 1994.
- Ostrovskii AA & Nikitin VS. Morphological characteristics of cellular element in the focus of the posttraumatic inflammation in thiamine deficiency. *Vopr Pitat* 5:57-61, 1987.
- Parker WD, Haas R, Stumpf PA, Parks J, Eguen LA & Jackson C. Brain mitochondrial metabolism in experimental thiamine deficiency. *Neurology*. 34:11, 1477-81, 1984.
- Pfeiffer J. The cell. Time-Life PAIS. 195, 1972.
- Rindi G, Patrini C, Comincioli V & Reggiani C. Thiamine content and turnover rates of some rat nervous regions, using labeled thiamine as a tracer. *Brain Res* 181:369-380, 1980.
- Rosa JL, Bartrons R & Tavler A. Gene expression of regulatory enzymes of glycolysis/gluconeogenesis in regenerating rat liver. *Biochem J* 287:113-116, 1992.
- Rotman P, Hassin D, Mosallem M, Barkai G & Fartel Z. Wernicke's encephalopathy in hyperemesis gravidarum : Association with abnormal liver function. *Isr. J. Med. Sci.* 30:225-8, 1994.
- Sheldon BW, Crawford P M & Brewer NR. The laboratory rat. Vol. I. Academic Press ed. U.S.A. 83, 145, 1979.
- Singh M. Effect of thiamin deficiency on pancreatic acinar cell function. *Am J Clin Nutr.* 36:504-505, 1982.
- Solomon EP, Ville CA & Davis PW. *Biotlogia*. Nueva Editorial Interamericana: México, D.F., 78, 82, 217, 1987.
- Spector R. Thiamin homeostasis in the central nervous system. *Ann N Y Acad Sci.* 378:344-54, 1982.

- Staubli W, Hess R & Weibel ER. Correlated morphometric and biochemical studies on the liver cell II. Effects of phenobarbital on rat hepatocytes. *Jour Cell Biol.* 42:92-112, 1969.
- Tablas científicas, 6a ed. CIBA-GEIGY Ed. Basilea, Suiza: 1965.
- Tholen H, Zimmerli W & Rajacic Z. Effect of coenzyme-A, NAD, alpha lipoic-acid and cocarboxylase on survival of rats with galactosamine-induced severe hepatitis. *Experientia* 41:1041-1045, 1985.
- Tsallas G, Molgat T & Jeejeebhoy K. Thiamine mononitrate In: *Vitamins-part two. On Cont Pract*, 14:26, 1987.
- Tumanov VN, Trebukhina RV & Ostrovskii IuM. Adaptive processes occurring during the development of thiamine deficiency. *Vopr Pitan*, 5:38-42, 1984.
- Walsh C. Enzymatic reactions mechanisms. W. H. Freeman ed. U.S.A. 377 1979.
- Weakley B S. A beginner's handbook in biological electron microscopy. Ed. Churchill Livingstone: Great Britain, 1979.
- Weibel ER, Staubli W, Gnagi HR & Hess FA. Correlated morphometric and biochemical studies on the liver cell I. Morphometric model, stereologic methods, and normal morphometric data for rat liver. *Jour Cell Biol* 42:68-91, 1969.
- Weiss L & Greep RO. *Histology 4a ed.* Mc Graw Hill ed. USA, 1977.
- Wohl MG, Brody M, Shuman CR, Turner R & Brody J. Thiamine and cocarboxylase concentration in heart, liver and kidney of patients with heart failure. *J Clin Invest* 33, 1580, 1954.
- Yao T, Esposti SD, Huang L, Arnon R, Spangenberg A & Zern MA. Inhibition of carbon tetrachloride-induced liver injury by liposomes containing vitamin E. *Amer Jour Physiol* 267:3 Part 1 G476-G484, 1994.
- Yoshioka K. Some properties of the thiamine uptake system in isolated rat hepatocytes. *Biochim Biophys Acta* 778:1 201-9, 1984.

APENDICE I.

Asegurese antes de sacrificar los animales que todos los recipientes que se utilizaron estén disponibles y se encuentren preparados los fijadores y amortiguadores tiempo antes de que se extraigan los órganos de los animales. Si la fijación se realiza A 0 C, las soluciones deberán estar frías en un baño de hielo. Los recipientes deben estar escrupulosamente limpios, especialmente si se van a utilizar fijadores a base de Osmio, ya que trazas de materia orgánica hacen que el Osmio pierda efectividad.

Preparación de amortiguador de cacodilato 0.3 M.

1.- Prepare una solución 0.3 M de cacodilato de sodio con:

$\text{Na}(\text{CH}_3)_2\text{AsO}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 4.12 g

agregue agua destilada hasta aforar a 100 ml

Ajuste el pH del amortiguador hasta Ph 7.4 con HCl 1 N.

Una vez pesado el cacodilato disolverlo en la mitad de agua bidestilada y luego aforar a 200 ml. Disolver con agitador magnético y medir con potenciómetro. El amortiguador y el reactivo

deben estar a la misma temperatura e ir adicionando lentamente el HCl para alcanzar el pH de 7.4.. De preferencia aforar cuando llegamos a pH de 7.5 porque al adicionarse a los demás reactivos baja el pH.

Preparación del fijador glutaraldehído en cacodilato.

Mezcle buffer de cacodilato con glutaraldehído al 70 % y

Amortiguador de cacodilatos 0.2 M (ml)	3.57	2.0
--	------	-----

Glutaraldehído al 70 % (ml)	96.43	54.0
-----------------------------	-------	------

* Verter el glutaraldehído gota a gota y con agitación continua en parrilla magnética.

Preparación de tetraóxido de osmio al 1 % en amortiguador de cacodilatos.

Si la ampollita del tetraóxido de osmio es de 1/2 gramo disolverlo en 25 ml de agua bidestilada ultrapura desionizada. Se deja disolviendo durante tres días, y guardar en frasco esmerilado bien tapado y sellado. Una vez transcurrido el tiempo de disolución, adicionar el amortiguador de cacodilatos 0.3 M al tetraóxido de osmio al 2 % en proporción 1 : 1.