

Efecto del pirofosfato de tiamina en la morfología del hepatocito normal, y en el potencial de membrana de células hepáticas, de cerebro y de cerebelo de ratas intoxicadas con CCl₄

Prof. Heberto Alcázar Montenegro¹, Biol. Elsa Aguirre Benítez², Dra. Susana Alcázar Leyva¹, M.en C. Noé Alvarado Vázquez³,
M.en C. María Teresa Benítez Rodríguez¹

Instituto de Investigaciones Científicas Hans Selye, A.C. Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México. Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias

RESUMEN

La coenzima pirofosfato de tiamina (PPT) es importante para el funcionamiento de la piruvato-deshidrogenasa y de la α -cetoglutarato deshidrogenasa que intervienen en el metabolismo celular. En especial, órganos como el corazón, el hígado o el cerebro son dependientes de la presencia del PPT para su actividad. En este estudio, se evaluó el nivel hepático el efecto de la aplicación de dosis suprafisiológicas del PPT en la morfología celular y nuclear de hepatocitos de ratas Wistar macho normales a las cuales se les aplicó la coenzima en distintos periodos. También se estudio el efecto del PPT sobre el potencial de membrana (PM) de los hepatocitos, de las células de la corteza cerebral y de las células del cerebelo en ratas intoxicadas con CCl₄.

En los hepatocitos, las dosis continuas de la coenzima provocaron un aumento mínimo (no significativo) de las áreas citoplasmáticas y nucleares. En los datos electrofisiológicos, se observó que el PPT reguló las alteraciones en el PM de las células del hígado, así como de las células del cerebro o del cerebelo provenientes de los animales tratados con el CCl₄. Por lo tanto, podemos concluir en base a los resultados obtenidos y que forman parte de una serie de investigaciones que se realizan actualmente para valorar los beneficios de utilizar al PPT, que la aplicación de esta coenzima a dosis suprafisiológica, frecuentes y a largo plazo, no ocasiona efectos secundarios y sí interviene regulando el PM de las células hepáticas así como de las células del sistema nervioso central.

Palabras clave: pirofosfato de tiamina, cocarboxilasa, cirrosis hepática, potencial de membrana, neuronas.

ABSTRACT

The coenzyme thiamin pyrophosphate (TPP) is essential for the correct functioning of the pyruvate dehydrogenase and α -ketoglutarate dehydrogenase in cell metabolism. Specifically, organs such as the heart, the liver or the brain are dependent on the presence of TPP for their respective activities. In this study, we evaluate the effect of supraphysiological doses of TPP on the cellular and nuclear morphology of the hepatocytes in healthy male Wistar rats over varying periods of time. We also studied the effect of TPP on membrane potential (MP) of hepatocytes, cells in the cerebral cortex and cerebellum of the rats intoxicated with CCl₄.

Continuous application of the coenzyme caused a minimum increase of cytoplasmic and nuclear areas. Electrophysiological data demonstrated that TPP regulated MP of the liver cells as well as cerebrum or cerebellum cells in animals treated with CCl₄. We therefore conclude that, on the basis of the results obtained from this experiment which forms part of a series of studies on the benefits of TPP, the frequent application of supraphysiological doses of TPP over long periods does not cause adverse effects and regulates MP of hepatocytes as well in central nervous system.

Key words: thiamin pyrophosphate, cocarboxylase, cirrhosis, membrane potential, neurons.

INTRODUCCION

La coenzima de pirofosfato de tiamina (PPT) o cocarboxilasa, es la forma activa de la tiamina (Vitamina B1) y es importante como cofactor en los procesos enzimáticos fundamentales para la economía celular¹. Se ha demostrado que esta coenzima forma parte integral del complejo de la piruvato deshidrogenasa, de la piruvato descaboxilasa, del complejo de la α -oxoglutarato deshidrogenasa y de la transcetolasa eritrocítica, entre otras cosas² y su síntesis es directamente dependiente de la presencia de la tiamina. A este respecto, diversos investigadores han confirmado que una deficiente concentración de tiamina tiene efectos adversos en la concentración del PPT³, lo cual afecta a órganos

¹ Instituto de Investigaciones Científicas Hans Selye, A.C. México.

² Departamento de Embriología de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México. México.

³ Departamento de Farmacología, INER. México.

Correspondencia: M.en C. Noé Alvarado Vázquez, Departamento de Investigaciones en Farmacología, Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias, Calz. de Tlalpan 4502, Col. Secc. XVI, 14080 México D.F., Fax: 56 65 46 23, E-mail: noalvarado@yahoo.com

como el corazón, hígado o el cerebro que son dependientes de la presencia de esta coenzima para su funcionamiento adecuado. En el hígado una baja concentración de tiamina provoca alteraciones en la biosíntesis de las bilirrubinas y de la albúmina⁴, favorece el desarrollo de la piruvicemia y de la acidosis láctica y altera la síntesis de diversas proteínas⁵. En la enfermedad del Jarabe de Maple, se produce una acumulación de leucina, isoleucina y valina y de los aminoácidos correspondientes a consecuencia del descoplamiento entre el complejo multienzimático y los cofactores que participan en la descarboxilación de los α -cetoácidos mencionados⁶. La administración del PPT atenúa estas alteraciones al activar al complejo de la piruvato deshidrogenasa y al de la α -cetoácido deshidrogenasa⁷.

En el caso del sistema nervioso, la deficiencia de tiamina provoca síntomas neurológicos que intervienen al administrar PPT. En particular en las neuronas encontramos dos sitios de reserva de la coenzima, uno mitocondrial con baja velocidad de recambio y el otro citoplasmático con alta velocidad de recambio⁸. La tiamina en su forma libre interviene en la síntesis y secreción de la acetilcolina en el sistema nervioso parasimpático⁹. En los núcleos neurales colinérgicos, el complejo enzimático mitocondrial de la α -cetoglutarato deshidrogenasa, fundamental para el proceso oxidativo de la glucosa depende de la presencia del PPT, esto apoya la importancia de la tiamina y de su coenzima (PPT) en el sistema nervioso.

Contando con estos antecedentes, consideramos importante valorar: 1) El efecto de la administración continua y a largo plazo del PPT sobre la morfología celular y nuclear de hepatocitos procedentes de animales normales y 2) Evaluar su efecto sobre el PM de hepatocitos, células de la corteza cerebral, así como de cerebelo obtenidas de animales intoxicados con CCl_4 .

MATERIAL Y METODOS

Se emplearon 10 lotes conformados por 9 ratas Wistar cada uno, las cuales tenían un peso inicial de 300g en promedio y que permanecieron en las condiciones habituales del bioterio durante un semana. Después del periodo de adaptación, se les aplicó por vía subdérmica 0.3mL de solución salina balanceada (SSB) a los controles y 0.3mL de pirofosfato de tiamina (12mg en cada aplicación) estable en solución a los grupos experimentales durante tiempos variables, de acuerdo al siguiente diseño: a) Lotes control, se les aplicó SSB durante el periodo experimental correspondiente: 7, 14, 21, 30 y 90 días; b) Lote 2, se les aplicó PPT durante 7 días; c) Lote 3, se les aplicó PPT durante 14 días; d) Lote 4, se les aplicó PPT durante 21 días; e) Lote 5, se les aplicó PPT durante 30 días; f) Lote 6, se les aplicó PPT por 90 días.

Al término de cada periodo, se sacrificaron los animales y se disecó el hígado, del cual se tomó el extremo inferior del lóbulo izquierdo. Este tejido se sometió a la técnica de fijación, deshidratación e inclusión en resina epóxica para hacer cortes semifinos²², en los que se realizaron los estudios histológicos con un microscopio de luz conectado, mediante una cámara de video (CCD Sony) a una computadora con un analizador de imágenes (Image Pro-plus, versión 2.0, Media Cybernetics) con el

que se hicieron los análisis morfométricos. Los resultados con promedios de 180 mediciones para cada tratamiento y para cada control, se sometieron a un análisis de varianza (ANOVA), a la prueba de Tukey, a una regresión múltiple y se aplicó un análisis factorial.

Modelo de intoxicación con CCl_4

Con 20 ratas Wistar se conformaron 4 lotes: a) Grupo control tratado con solución salina fisiológica balanceada; b) Grupo tratado durante 8 semanas con CCl_4 inyectado por vía intraperitoneal; c) Grupo tratado de igual forma que en b, al cual al término del periodo de 8 semanas se les aplicó PPT durante 8 semanas más y d) Grupo tratado simultáneamente con tetracloruro de carbono (CCl_4) y PPT durante el mismo periodo. Al término del estudio los animales fueron sacrificados y se analizó la actividad eléctrica de la corteza cerebral en la zona parietal izquierda y de células pertenecientes al extremo inferior del lóbulo izquierdo del hígado por la técnica de registros electrofisiológicos²³.

RESULTADOS

Se observó que los cambios en las áreas citoplasmáticas y nucleares de los hepatocitos fueron graduales, conforme los animales controles continuaron con su desarrollo corporal normal. Sin embargo, las áreas citoplasmáticas de las células provenientes de animales normales tratados con PPT en comparación con las del grupo testigo correspondiente, mostraron un incremento (Figura 1). A los 7 días se tuvo una diferencia de $50 \mu m^2$ en promedio en el grupo experimental con respecto al testigo; en las etapas sucesivas las diferencias fueron menores y a los 90 días de tratamiento la disparidad entre ambos grupos fue de $18 \mu m^2$. El análisis factorial determinó que la desproporción entre las pendientes fue de $35.22 \mu m^2$, mientras que el incremento por periodo fue de $0.49 \mu m^2$, lo cual no fue significativo ($p > 0.05$) (Tabla 1).

Con respecto a las áreas nucleares (Figura 1), se observó que se manifestaron diferencias entre los grupos testigos y los tratados a los 14 y a los 90 días, mientras que en los grupos restantes los valores se mantuvieron muy semejantes entre sí. Sin embargo, dichos cambios tampoco mostraron una significancia estadística ($p > 0.05$) (Tabla 2). Los grupos tratados comparados con los testigos, mostraron que los valores de las áreas citoplasmáticas y nucleares de los hepatocitos de las ratas experimentales cayeron dentro de las rangos normales, por lo que se considera que no se tuvo una estimulación de la división celular, sino únicamente cambios en las dimensiones debidas probablemente a las adaptaciones bioquímicas y fisiológicas ante la presencia de la coenzima.

Modelo de Intoxicación con CCl_4

La administración del CCl_4 provocó modificaciones en el potencial de membrana (PM) de los tipos celulares estudiados (Tabla 3). Las disminuciones observadas en el PM fueron de un 25 a un 50% al comparar con los registros obtenidos de las células procedentes de los animales controles. El efecto negativo sobre

el PM disminuye después de administrar a los animales el PPT, pero solo cuando se comenzó la aplicación de la coenzima después de 8 semanas de tratamiento con el CCl₄, cuando el PPT fue aplicado junto con el CCl₄ no se encontró ningún cambio en el PM. La despolarización que se observó en los registros obtenidos de células del cerebro de los animales tratados con el CCl₄ mostró los siguientes valores: -8 ± 20.0 mV, en las células de la corteza parietal izquierda, en el cerebelo el PM fue de $+9.5 \pm 19.5$ mV y en los hepatocitos fue de -4.5 ± 18.5 mV. El PM encontrado en las células de los animales controles, tuvo una diferencia del 80 al 96% comparada con los experimentales.

DISCUSION

La modificación de las áreas citoplasmáticas y nucleares fue gradual y obedeció al crecimiento normal de las células hepáticas, ya que a la edad a la cual se inició el estudio de los animales no han llegado a su madurez. Las dimensiones del área citoplasmática de los hepatocitos provenientes de los animales tratados con el PPT al inicio del estudio, tuvieron una diferencia de $50 \mu\text{m}^2$ con respecto al promedio encontrado en el área citoplasmática del hepatocito en las ratas testigos. Al finalizarse el estudio se observó una desigualdad de $18 \mu\text{m}^2$ en promedio en este mismo aspecto, entre las ratas testigo y las ratas tratadas aún cuando los grupos tuvieron la misma edad¹⁰. Es probable que la pequeña variación entre los grupos haya derivado de la adaptación bioquímica, fisiológica y morfológica de los organelos intracelulares y en especial de las mitocondrias, a la presencia continua y de larga duración de las cantidades "suprafisiológicas" del PPT, por ser el principal sitio en donde se llevan a cabo las reacciones bioquímicas catalizadas por el PPT. Las dimensiones de las áreas nucleares tuvieron menos discrepancias entre los grupos controles y los experimentales, probablemente debido a la etapa de diferenciación celular y por el grado de biosíntesis de las moléculas nucleares. Se ha demostrado que la deficiencia de tiamina no modifica esencialmente la biosíntesis del ADN¹¹, pero si afecta la síntesis del ARN¹², esto reafirma la mayor influencia de la tiamina y del PPT en las estructuras extranucleares más no en las intranucleares. El hígado es un órgano cuyas funciones dependen en gran medida de la presencia del PPT¹³, por lo tanto éste debe proporcionarle la capacidad de adaptación a la administración de cantidades "suprafisiológicas" continuas de esta coenzima, sin que aparentemente se genere ningún efecto secundario¹⁰. Por observaciones paralelas se observó un menor contenido de grasa en los tejidos de las ratas experimentales, las cuales se mostraron más activas; lo mencionado permite suponer que el funcionamiento del metabolismo en general fue normal¹⁰.

Las disfunciones hepáticas generan trastornos en todo el organismo, y en particular provocan encefalopatías¹⁴. Por esta razón, el cambio en las funciones hepáticas derivado de la presencia del CCl₄ produjo una modificación del PM de las neuronas¹⁵, lo mencionado se comprobó al encontrar variaciones en el PM de los hepatocitos y en las neuronas de las ratas intoxicadas con CCl₄, ésta es una de las principales alteraciones encontradas en la membrana celular. El PPT participa en la regulación y los cambios en el PM, ya que como coenzima interviene modulando las características electrofisiológicas de ésta¹⁶ mejorando la conducción del impulso nervioso. Así mismo interviene en la conservación de la integridad de los tejidos

neurales¹⁸, y en la síntesis, liberación y recambio de los neurotransmisores¹⁹. En los lotes de ratas que recibieron el PPT se observó la rehabilitación de las funciones eléctricas, así como la protección contra el efecto tóxico del CCl₄. Se encontró una tendencia a la normalización del PM solo cuando el PPT fue administrado después de la administración del CCl₄ (Tabla 3). El CCl₄ provoca modificaciones en la estructura de la membrana celular, altera la estructura del citoesqueleto, degrada a los organelos intracelulares, y disminuye la concentración de ATP de la célula, entre otros efectos. Los eventos señalados pueden relacionarse con la inducción de la necrosis derivada de la presencia del agente tóxico²⁴. Debido a estos cambios estructurales causados por el CCl₄, la administración del PPT al mismo tiempo que el agente químico no fue capaz de proporcionar una protección adecuada a la célula, lo que se reflejó en la despolarización del PM pues las células están muriendo (Tabla 3).

Las mitocondrias tienen cambios estructurales y fisiológicos durante el proceso de necrosis o de apoptosis, lo que es relevante por ser en estos organelos en donde el PPT interviene principalmente^{20,24}. La administración del PPT, tiempo después de la aplicación del CCl₄ debe proteger por las vías mencionadas a las células que aún no han muerto permitiendo su recuperación, o bien a aquellas células dañadas e incapaces de restablecer su metabolismo.

Los resultados obtenidos nos dan bases para poder explicar los beneficios obtenidos en los pacientes que presentan hepatopatías de diferente etiología y tiempo de evolución, y que muestran una mejoría clínica importante, así como en sus resultados de laboratorio durante y después de haber recibido al ppT21.

En conclusión el PPT aplicado frecuentemente, a largo plazo y en dosis "suprafisiológicas", no genera trastornos secundarios en el hepatocito y en cambio sí interviene disminuyendo y/o desapareciendo las alteraciones inducidas por el CCl₄ en el PM de las células del hígado, cerebro y cerebelo de los animales intoxicados con el agente químico

TABLA 1
Área citoplasmática de hepatocitos normales de animales tratados y no tratados con el PPT (Promedio $\pm$ D.S)

Días de tratamiento	μm^2 del área citoplasmática en los animales tratados	μm^2 del área citoplasmática en los animales testigos
7	476.84 $\pm$ 27.43	420.35 $\pm$ 19.14
14	478.7 $\pm$ 4.27	476.01 $\pm$ 12.34
21	496.4 $\pm$ 18.13	436.88 $\pm$ 23.64
30	510.26 $\pm$ 14.87	504.85 $\pm$ 28.66
90	521.18 $\pm$ 19074	503.52 $\pm$ 16.85

Para cada tiempo de tratamiento fueron realizadas un total de 180 mediciones. Los resultados están expresados en μm^2

TABLA 2
Áreas nucleares de hepatocitos normales de animales tratados y no tratados con el PPT (promedio $\pm$ desviación estándar, μm^2)

Días de tratamiento	μm^2 del área nuclear en los animales tratados	μm^2 del área nuclear en los animales testigos
7	49.44 $\pm$ 5.28	49.48 $\pm$ 7.99
14	55.08 $\pm$ 8.28	51.04 $\pm$ 4.5
21	55.65 $\pm$ 6.0	55.79 $\pm$ 7.82
30	54.12 $\pm$ 5.18	52.6 $\pm$ 6.47
90	59.24 $\pm$ 4.5	53.83 $\pm$ 8.79

El total de mediciones realizadas por grupo fue de 180. (>0.05)

TABLA 3
Registros electrofisiológicos por órgano y por grupo experimental

Grupo	Corteza	Cerebelo	Hígado
Control	-40.5 $\pm$ 0.5 mV	-36 $\pm$ 1.0 mV	-57.5 $\pm$ 2.5 mV
CCl ₄	-30 $\pm$ 2.0 mV	-20 $\pm$ 2.0 mV	-23.5 $\pm$ 0.5 mV
PPT aplicado después del CCl ₄	-42 $\pm$ 2.0 mV	-47.5 $\pm$ 7.5 mV	-70 $\pm$ 9.6 mV
CCl ₄ + PPT administrados de manera simultánea	-8 $\pm$ 20.0 mV	9.5 $\pm$ 19.5 mV	-4.5 $\pm$ 18.5 mV

Resultados obtenidos de 5 animales por grupo experimental. Las lecturas están dadas en milivoltios, se muestra el promedio $\pm$ la desviación estándar.

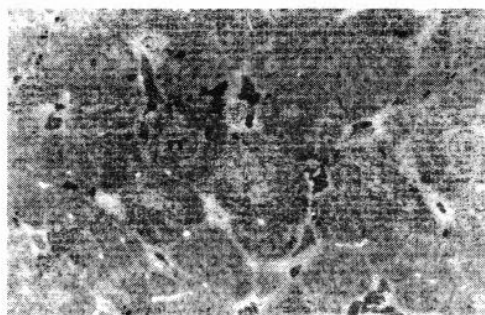


Figura 1 Se observan ejemplos de las áreas citoplasmáticas y nuclear de hepatocitos normales que fueron determinadas con microscopia de luz con ayuda del analizador de imágenes Image Pro-plus.
n=núcleo celular, c=citoplasma

BIBLIOGRAFIA

- Hawkins CF, A Borges RN, Perham. A common structural motif in thiamine pyrophosphate binding enzymes. *Febs Lett* 1989; 255(1): 77-82
- Jung EH, Takeuchi T, Nishino K, Itokawa Y. Studies on the nature of thiamine pyrophosphate binding and dependence on divalent cations. Of transketolase from human erythrocytes. *Int J Biochem* 1988; 20(11):1255-59
- Gritsenko EA, Chernikovich IP, Dimitriev AL, Pershukovich AV. Metabolism of thiamine and its di and triphosphorous esters in the blood patients with neurological symptoms of osteochondrosis. *Vopr Med Khim* 1991; 37(4): 60-63
- Benítez-Rodríguez MT. Aplicación terapéutica del pirofosfato de tiamina. México. ed. Información profesional especializada; 1996. p. 93-101
- Henderson GI, Dillon M, Schenker M. Effect of diet induced thiamine deficiency on visceral DNA synthesis and tissue composition. *Biochem Pharmacol* 1976; 25: 2275-84
- Elsas LJ, Danner DJ. The role of thiamine in maple Wup urine disease. *Ann NY Acad Sci* 1982; 378: 404-21
- Koike M, Koike K. Biochemical properties of mammalian α -oxo acid dehydrogenase multienzyme complexes and clinical relevance with chronic lactic acidosis. *Ann NY Acad Sci* 1982; 378: 225-35
- Bettendorff L, Wins PM. Lesourd. Subcellular localization and compartmentation of thiamine derivatives in rat brain. *Biochim Biophys Acta* 1994; 1222: 1-6
- Gibson GF, Barclay L, Blass J. The role of the cholinergic system in thiamine deficiency. *Ann NY Acad Sci* 1982; 378: 388-403
- Aguirre BEL. Efecto de la administración crónica del pirofosfato de tiamina en hepatocitos de rata normal: estudio morfométrico. Tesis Profesional. Facultad de Ciencias, UNAM, 1996.
- Levy CM. B-Complex vitamins in liver disease of the alcoholic. *Am J Clin Nutr* 1965; 16(4): 339-346
- Khokha AM, Fustochen LBP, Neteedw LY. Synthesis in nucleic RNA in hydroxythiamine-induced vitamin B1 deficiency. *Biokhimiya* 1984;49(7):1166-1170
- Lumeng L, Edmonson W, Schenker S, Li T. Transport and metabolism of thiamine in isolated rat hepatocytes. *J Biol Chem* 1979; 254:7265-7268
- Rotman P, Hassin D, Mosalem M, Barkai GZ. Fartel. Wernicke's encephalopathy in hyperemesis gravidarum: association with abnormal liver function. *Isr J Med Sci* 1994; 30: 225-228
- Parker WD, Hass R, Stumpf PA, Parks J, Eguen LAC, Jackson. Brain mitochondrial metabolism in experimental thiamine deficiency. *Neurology* 1984; 34 (11): 1477-1481.
- Bondia NM, Alcázar LS, Benítez RMT. Thiamine pyrophosphate in neural activities: clinical and experimental observations. En *Recent Advances in Aging Science*. Beregi E., Gergely IA, Rajczi K. Italy, ed. Monduzzi De Bologna, 1993. p. 1210-1214
- Schroth G, Wichmann W, Valavanis A. Blood-Brain barrier disruption in acute Wernicke encephalopathy: MR findings. *J Comp Ass Tomogr* 1991; 15(6):1059-61
- D'Amour ML, Bruneau J, Butterworth RF. Abnormalities of peripheral nerve conduction in relation to thiamine status in alcoholic patients. *Can J Neurol Sci* 1991; 18(2): 126-28
- Plaitakis A, Hwang EC, Van Mocrt MH, Szdogy PIA, Berl S. Effect of thiamine deficiency on brain neurotransmitter systems. *Ann NY Acad Sci* 1982; 378: 367-81.
- Dinsdale D., Zhuang J. Cohen MG. Redistribution of cytochrome c precedes the caspase-dependent formation of ultracondensed mitochondria, with a reduced inner membrane potential, in apoptotic monocytes. *Am J Pathol* 1999; 155: 607-18.
- Alcázar-Montenegro H, Alcázar-Leyva S, Aguirre-Benítez E, Alvarado- Vázquez N, Rivera-López RM, Gámez-Murrieta A, Benítez-Rodríguez MT. Disfunciones hepáticas tratadas con pirofosfato de tiamina. Resultados clínicos y de laboratorio. *Bioquímica* 2000; 25 (2): 45-48
- Weakley BSA. A beginner's handbook in biological electron microscopy. Great Britain. Ed. Churchill Livingstone; 1979. p. 270
- Bonilla NM, Alcázar MH, Alcázar LS, Benítez RMT. Monitoreo electrofisiológico de la acción clínica del pirofosfato de tiamina o coenzima estable en solución en diferentes patologías. XI Congreso Latinoamericano de Bioquímica Clínica, del 4 al 9 de junio de 1993, Acapulco Gro., México.
- Zimmerman H. Direc (roxiopathic) hepatotoxins: Haloalkanes and elemental phosphorus. En Zimmerman H. *Hepatotoxicity. The adverse effects of drugs and other chemicals on the liver*. cap. 9. New York.; Appleton-Century-Croits 1978. p. 205