

Efecto del pirofosfato de tiamina (cocarboxilasa) estable en solución, sobre el crecimiento de las neuritas del neuroepitelio embrionario de ratas Wistar, *in vitro*

Hebert Luis Hernández-Montiel*, **
Heberto Alcázar-Montenegro†*
Susana Alcázar-Leyva*

*Instituto de Investigaciones
Científicas Hans Selye

**Laboratorio de Neurobiología
y Bioingeniería Celular
Facultad de Medicina de la
Universidad Autónoma de Querétaro

Una de las coenzimas que participan en el metabolismo del sistema nervioso central es el pirofosfato de tiamina o cocarboxilasa. La disminución de su síntesis producida por el decremento en el metabolismo energético en condiciones patológicas se relaciona con alteraciones neurológicas como hipoxia neonatal, encefalopatías, ataxia, disminución de los reflejos, convulsiones, demencia, esquizofrenia, retraso psicomotor y depresión; estas manifestaciones disminuyen o desaparecen con la administración intramuscular e intravenosa del pirofosfato de tiamina estable en solución. En el presente trabajo se estudió el efecto de la cocarboxilasa *in vitro*, sobre explantes de neuroepitelio rombencefálico rostral y del mesencéfalo de embriones de ratas Wistar, en los que se evaluó tanto la formación y el crecimiento de neuritas, como la expresión de algunos neurotransmisores como serotonina, adrenalina, ácido gama-aminobutírico y sustancia P. Para ello, se utilizaron hembras con 14.5 días de gestación. De cada embrión se obtuvieron los explantes del neuroepitelio rombencefálico rostral y del mesencéfalo. Los explantes se cultivaron en geles de colágena, se incubaron por 48 horas en presencia de cocarboxilasa y luego se fijaron. Se realizó el conteo de las neuritas, así como la detección inmunohistoquímica para identificar poblaciones neurales positivas a serotonina, adrenalina, ácido gama-aminobutírico y sustancia P. Las neuritas positivas fueron contadas empleando microscopía de luz. Los resultados obtenidos indicaron que la presencia del pirofosfato de tiamina incrementó en ambas regiones significativamente el número de neuritas positivas a serotonina, adrenalina, ácido gama-aminobutírico y sustancia P ($p < 0.05$). Con base en estos resultados se concluyó que el pirofosfato de tiamina estable en solución (X-2) modifica tanto la producción como la tasa del crecimiento de las neuritas en desarrollo.

Introducción

El pirofosfato de tiamina (PPT), también denominado cocarboxilasa, interviene en el metabolismo energético, debido a que participa como coenzima de las enzimas piruvato deshidrogenasa (PDH), α -cetoglutarato deshidrogenasa (α -CDH) y la transcetolasa (TC), según se ha comprobado en estudios realizados con ratas^{1,2} y en cerdos.³ Los resultados obtenidos en trabajos experimentales y clínicos han mostrado que su administración terapéutica sirve para el tratamiento de diferentes patologías, como diabetes mellitus, comprobado en humanos.^{4,5} Además en una preparación *in vitro* de albúmina de suero bovino, ribonucleasa A y hemoglobina de humano, se encontró que el pirofosfato es un inhibidor potente de la formación de los productos de glucosilación avanzada (AGE),⁶ hepatopatías, comprobado en ratas^{7,8} y en humanos;⁹ cardiopatías, trabajo realizado en ratas,¹⁰ en perros¹¹ y en humanos;¹² neumopatías, comprobado en perros,¹¹ en palomas¹³ y en humanos;¹⁴ neuropatía clínica^{15,16} y en la Encefalopatía de Wernicke inducida en ratas por medio de un antagonista de tiamina.¹⁷ Las mejoras observadas con el empleo del PPT se atribuyen a su participación como cofactor en las enzimas antes mencionadas (PDH, α -CDH, TC),^{1,3,18-20} En la rata la privación crónica de tiamina produce daños neuropatológicos en las estructuras pontinas, cuyos síntomas van acompañados de la disminución selectiva, del orden del 30%, en la actividad de la α -CDH, en el núcleo vestibular lateral y en el hipotálamo²⁰ y un decremento en la producción de neurotransmisores como el GABA, glutamato,²⁰ aspartato¹⁷ y la acetilcolina.^{1,21} Además provoca una disminución de la actividad piruvato deshidrogenasa en el cerebro medio de la rata, pero ésta se restablece también con la administración exógena de la coenzima.²⁰ Existen evidencias de que el PPT participa en la conducción del impulso nervioso, en la conservación e integridad de los tejidos neurales, así como en la síntesis, liberación y re-

cambio de neurotransmisores.²²⁻²⁴ como por ejemplo de la acetilcolina.²⁵ Con base en estos antecedentes, en el presente trabajos se muestra la actividad del PPT en cultivos de explantes de tejido nervioso en geles de colágena, sobre la formación de neuritas embrionarias de rata mediante el conteo de las que se produjeron, en diferentes dosis. También se llevó a cabo el análisis del efecto sobre las poblaciones neurales positivas para neurotransmisores como serotonina, adrenalina, GABA y sustancia P.

Materiales y métodos

Animales: se utilizaron hembras gestantes de la cepa Wistar, de seis meses a un año de edad, con 14.5 días de gestación (E14.5). Las ratas fueron sacrificadas mediante dislocación cervical e inmediatamente después se extrajeron todos los embriones que fueron colocados en solución de Ringer fría (NaCl 0.1232 M, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.0015 M, KCl 0.0049 M, pH 7.2). De cada embrión, a partir del rombencéfalo rostral, se obtuvieron las rombómeras 2 y 3 (r2 y r3). Los explantes del neuroepitelio fueron obtenidos del mesencéfalo de acuerdo a la metodología establecida por Varela y cols.²⁶ Ambos tejidos fueron conservados en solución de Ringer fría.

Obtención de colágena: la extracción de colágena se realizó a partir de 10 colas de rata congeladas a -20°C . Para ello, las colas fueron descongeladas a temperatura ambiente y luego fueron colocadas en etanol al 70% durante 10 minutos. Las fibras de los tendones se aislaron por acción mecánica empleando pinzas quirúrgicas y luego se colocaron en una caja de Petri estéril (con etanol al 70%) durante 15 minutos. Se decantó el etanol y se agregó ácido acético al 0.1%. Se mantuvo en agitación lenta a temperatura ambiente durante 24 horas para facilitar la disolución de las fibras de colágena. La colágena obtenida se diluyó con 300 ml de agua desionizada. Luego, se realizó una centrifugación a 12,000 rpm durante 30 minutos. El sobrenadante se recolectó y almacenó a 4°C .²⁷

Preparación de los geles de colágena: los geles de colágena se prepararon siguiendo la metodología descrita por Guthrie y Lumsden.²⁷ Brevemente, se partió de una mezcla conteniendo 300 μL del medio de cultivo DMEM, 100 μL de colágena (recién obtenida), NaCl 0.036 M y NaHCO_3 0.021 M. La mezcla se mantuvo en hielo hasta el momento de su uso. Se colocaron 30 μL de la mezcla en cajas de cultivo de cuatro pozos, formándose discos de 6 mm de diámetro. Luego se dejó solidificar la colágena a 37°C por 15 minutos. Después de esto, se realizó el cultivo de los explantes de neuroepitelio embrionario en los geles de colágena.

Incubación con el PPT: la primera etapa del estudio consistió en determinar la concentración del PPT (X-2, Laboratorio Investigaciones Filosóficas y Científicas S.A. de C.V.) a utilizarse en los cultivos *in vitro*. Para ello, se inició con una concentración de PPT de 200 $\mu\text{g/mL}$ del medio de cultivo y se probaron concentraciones menores, hasta encontrar aquella que permitiera obtener el mejor crecimiento, que fue de 0.2 $\mu\text{g/mL}$. Para los experimentos posteriores, los explantes fueron incubados en presencia de PPT (0.2 $\mu\text{g/mL}$) durante 48 horas; después se evaluó el número de neuritas y se comparó con el crecimiento de aquellas que no fueron incubadas con el PPT. Los análisis estadísticos fueron realizados empleando la prueba de *t*-student con un nivel de significancia del 0.05 ($n = 20$).

Cultivo de explantes de neuroepitelio embrionario: los explantes del neuroepitelio embrionario fueron colocados en las placas de cultivo conteniendo el gel de colágena. El excedente del líquido del explante fue eliminado del gel mediante aspiración. Los explantes fueron cubiertos con 30 μL de la mezcla de colágena mencionada, cuidando de hacer una distribución uniforme para cubrirlos en su totalidad. Las placas de cultivo se mantuvieron en la incubadora durante 15 minutos para permitir la solidificación del gel. Luego, se colocaron 700 μL del medio de cultivo

Opti-mix (Optimem al 70%, Gibco; Nutrimix F12 al 23.5%, Gibco; suero fetal bovino al 4.7%, Gibco y penicilina/estreptomicina 1:100 al 0.5%, Gibco) y las placas fueron incubadas a 37° C durante 48 horas en una atmósfera de CO₂ al 5%. Al término de la incubación, los cultivos fueron fijados y se realizaron los ensayos de inmunohistoquímica.

Los grupos experimentales fueron constituidos en la siguiente forma: neuritas del mesencéfalo tratadas (T) y no tratadas (NT) con el PPT; neuritas del rombencéfalo tratadas y no tratadas con el PPT.

Ensayos de inmunohistoquímica: éstos permitieron identificar por separado las neuritas positivas a los neurotransmisores de serotonina, adrenalina, GABA y sustancia P. La valoración de estos neurotransmisores fue realizada empleando anticuerpos anti-triptófano hidroxilasa (Dako, MO758), anti-PNMT (Chemicon International Inc, AB110), anti-GAD (SeroTec, AHP360) y anti-sustancia P (Chemicon, AB1566), respectivamente. Brevemente, los cultivos fueron fijados con *p*-formaldehído al 3.5% durante 2 horas. Luego, fueron lavados cuatro veces durante 15 minutos con solución salina amortiguadora de fosfatos (PBS) (NaCl 0.0014 M, KCl 0.0026 M, Na₂HPO₄ 0.0042 M, KH₂PO₄ 0.0014 M, pH 7.3 conteniendo Tritón X-100 al 1%. Se realizaron otros tres lavados. El primero, empleando la solución PBS/Tritón conteniendo H₂O₂ al 0.1% durante 1 hora; el segundo, empleando sólo la solución PBS/Tritón durante 24 horas y el tercero, empleando la solución PBS/Tritón adicionada de suero de cabra (Accesolab/GIBCO, 16210-072) al 10% durante 3 horas a temperatura ambiente. Se adicionaron los anticuerpos contra el neurotransmisor específico y se dejó incubar durante 72 horas a 4° C; luego se realizó un lavado con solución de PBS/Tritón durante 24 horas y, posteriormente, se adicionó el anticuerpo secundario relacionado con peroxidasa (Anti-Rabbit, Jackson Immunoresearch Labs Inc., 111-036-003), dejándolo incubar 48 horas a 4° C. El anticuerpo

primario y el secundario fueron diluidos en solución de PBS/Tritón, conteniendo suero de cabra al 10%. Para retirar el exceso de anticuerpo se volvió a lavar con solución PBS/Tritón durante 24 horas. La presencia del anticuerpo específico se puso de manifiesto incubando las neuritas en una solución que contenía diaminobencidina y revelando con H₂O₂. Después de la inmunotinción, los explantes fueron montados en laminillas junto con glicerol al 90%. Se cubrieron con cubreobjetos y se sellaron con esmalte. Las laminillas fueron observadas en microscopio óptico, se contaron las neuritas que crecieron hacia el gel y que fueron teñidas para cada neurotransmisor, comparando los resultados con los cultivos control.

Resultados

Los resultados indicaron que con la dosis inicial de 200 µg/mL, el crecimiento de las neuritas fue prácticamente nulo, sólo 6% del crecimiento control. La siguiente dosis estudiada fue de 10 µg/mL, a esta concentración comenzó a registrarse el crecimiento neurítico, sin embargo, fue menor en comparación al crecimiento registrado en los cultivos control, 15% del control. Las concentraciones de PPT de 2 y 5 µg/mL permitieron alcanzar un crecimiento similar al control, del 95%; mientras que con 0.5 µg/ml el crecimiento neurítico fue 20% superior al control. Finalmente, la concentración de 0.2 µg/ml permitió alcanzar el mayor número de neuritas en los explantes del neuroepitelio embrionario, del 65% por arriba del control en promedio. Estos resultados son interesantes pues muestran que el PPT produce un efecto dual en relación con la concentración en el medio de cultivo. Conforme la concentración se fue disminuyendo hasta 0.2 µg/mL, la respuesta pasó de ser inhibitoria a estimular el crecimiento de neuritas en todas las poblaciones estudiadas.

Por otro lado, para estudiar el efecto del PPT en el número de neuritas de diferentes poblaciones neurales de los explantes de mesencéfalo y rombencéfalo, se realizaron ensayos

de inmunohistoquímica empleando anticuerpos específicos contra estos neurotransmisores: serotonina, adrenalina, GABA y sustancia P.

La identificación de las neuritas positivas a serotonina se realizó empleando anticuerpos anti-triptófano hidroxilasa. La triptófano hidroxilasa es la enzima que participa directamente en la síntesis del neurotransmisor serotonina. Como se muestra en los resultados del panel B y F de la **figura 1**, presentan un incremento en el número de neuritas positivas al neurotransmisor serotonina en los explantes de mesencéfalo y rombencéfalo obtenidos en presencia de PPT. Las flechas indican las regiones de los explantes donde es más visible el incremento del número de neuritas positivas al neurotransmisor. En el panel A y E de la **figura 1** se muestran los explantes del mesencéfalo y rombencéfalo que no recibieron ningún tratamiento. Nótese que en el segundo caso, el número de neuritas positivas a serotonina es mucho menor. En el panel A de la **figura 2** se muestra el número de neuritas positivas a serotonina entre los grupos T y NT con la cocarboxilasa. Cabe resaltar que en los explantes del mesencéfalo y del rombencéfalo hay un incremento en el número de neuritas positivas a serotonina en presencia del PPT. En el mesencéfalo se registró un incremento del 62% con respecto al control en el número de neuritas positivas al neurotransmisor; en el rombencéfalo el incremento fue del 135% (**figura 2**, panel A). Estos últimos resultados indican que la presencia del PPT en el medio de cultivo estimula el crecimiento de la población de neuritas serotoninérgicas y especialmente a las del rombencéfalo. Esto podría atribuirse a que la población de neuronas serotoninérgicas es mayor en el rombencéfalo.

Para el neurotransmisor adrenalina se usó el anticuerpo Anti-PNMT, que reconoce a la enzima N-metiltransferasa de la feniletanolamina; esta enzima es la responsable de la síntesis del neurotransmisor adrenalina. Los resultados también mostraron un incremento significativo en

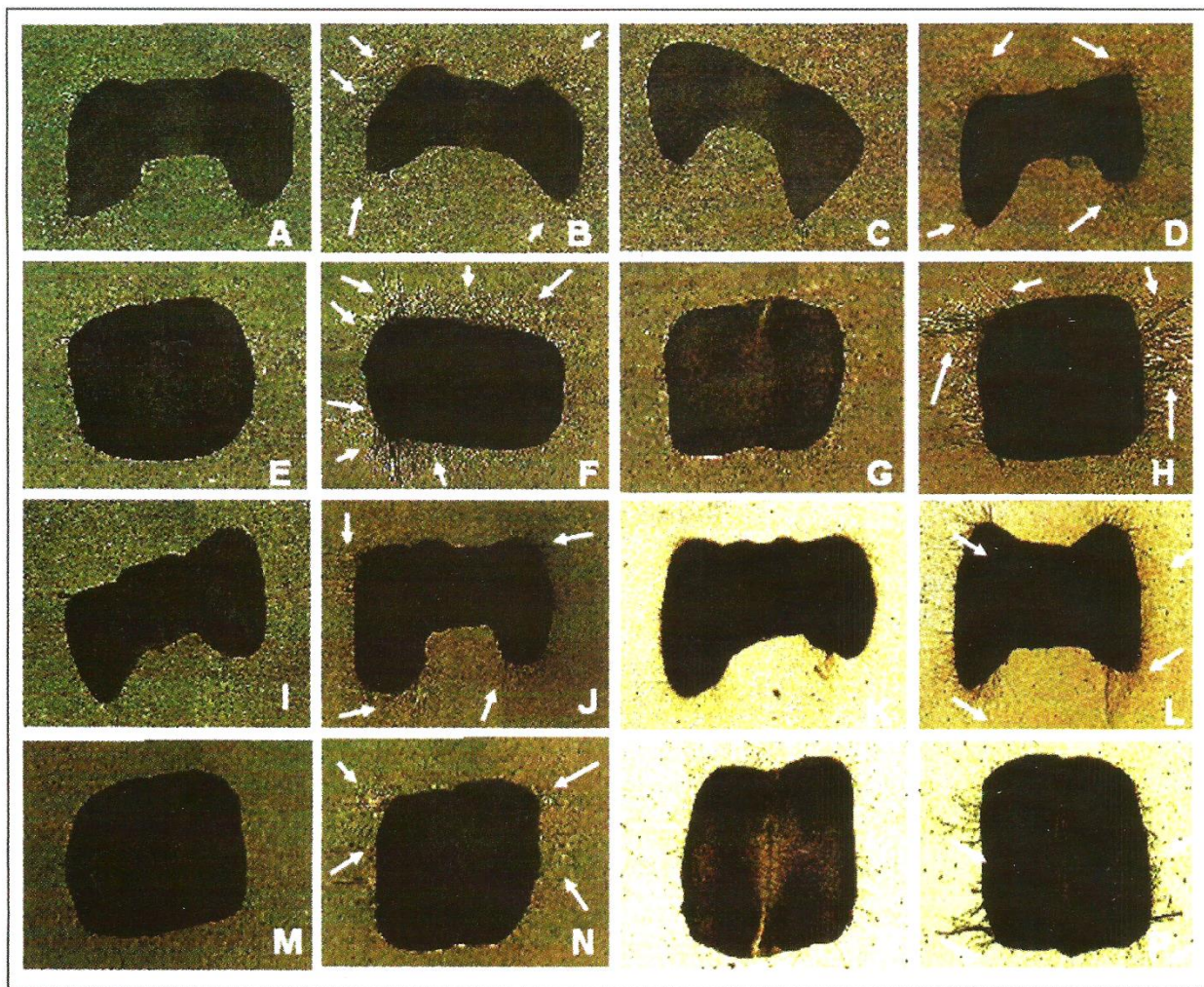


Figura 1. La cocarboxilasa incrementa significativamente el número de neuritas positivas a los neurotransmisores. Micrografías de los explantes de mesencéfalo (A, B, C, D, I, J, K, L) y rombencéfalo (E, F, G, H, M, N, O, P). Los explantes fueron inmunoteñidos con anticuerpos anti-triptófano hidroxilasa (serotonina; A, B, E y F), anti-PNMT (adrenalina; I, J, M y N), anti-GAD (GABA; C, D, G y H) y anti-sustancia P (sustancia P; K, L, O y P). Los explantes de los paneles A, C, E, I, K, M y O no recibieron ningún tratamiento; los explantes de los paneles B, D, F, H, J, L, N y P fueron tratados con la cocarboxilasa.

el número de neuritas positivas que crecían hacia el gel de colágena (figura 1, panel I, J, M y N). En este caso, se registró un incremento con respecto al control del 56% en el número de neuritas marcadas en los explantes del mesencéfalo y del 122% en el rombencéfalo (figura 2, panel B).

Para localizar el neurotransmisor GABA se empleó el anticuerpo Anti-GAD. Este anticuerpo reconoce a la

glutamato descarboxilasa, enzima responsable de la producción de GABA a partir del ácido glutámico. Los resultados se muestran en el panel C, D, G y H de la figura 1. Así las neuritas positivas a GABA mostraron un aumento del 90% en los explantes del mesencéfalo y un aumento del 65% en el rombencéfalo cuando fueron cultivadas con PPT (figura 2, panel C).

Finalmente, las neuritas positivas a la sustancia P, muestran incrementos del 47 y 65% en los explantes del mesencéfalo y rombencéfalo, respectivamente (figura 2, panel D). Las micrografías de los explantes teñidos para sustancia P, se muestran en el panel K, L, O y P de la figura 1 y en éstos los resultados son similares a los obtenidos para los demás neurotransmisores.

Número de neuritas

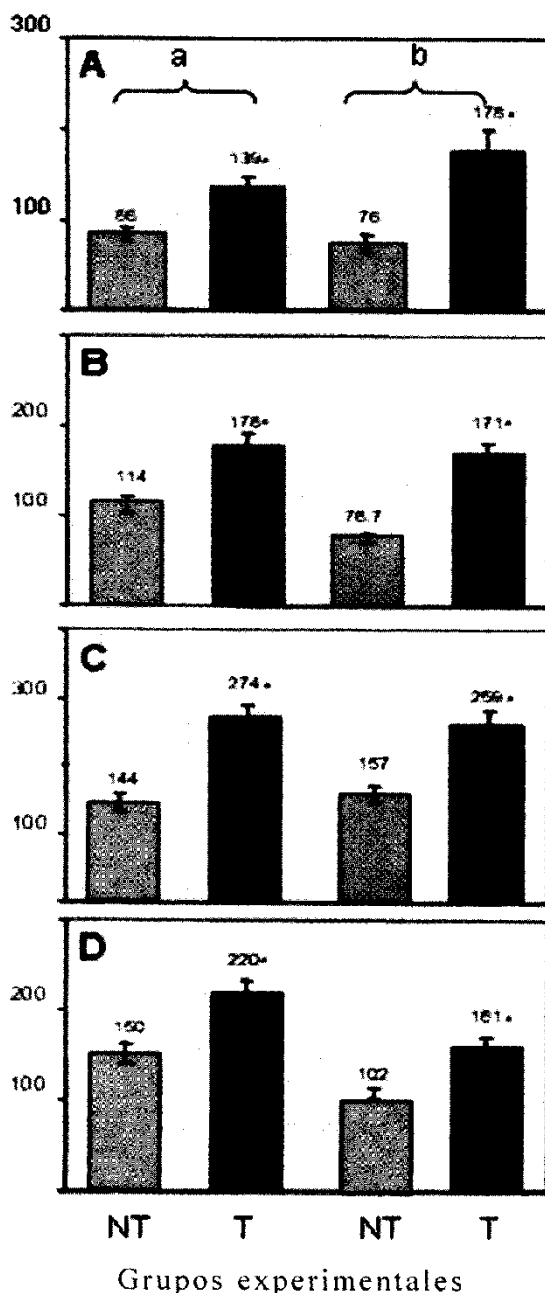


Figura 2. Proporciones de las neuritas positivas a los neurotransmisores en los explantes del mesencéfalo y del rombencéfalo. A. Neuritas positivas a la serotonina; B. Neuritas positivas a la adrenalina; C. Neuritas positivas a GABA; D. Neuritas positivas a la sustancia P. Los explantes del mesencéfalo (a) y del rombencéfalo (b) fueron teñidos con los anticuerpos correspondientes. * Significancia al 0.05.

NT - No tratadas con la cocarboxilasa.
T - Tratadas con la cocarboxilasa.

Discusión

Se ha determinado que el PPT es una coenzima que participa ampliamente en el metabolismo energético y contribuye de múltiples formas para mantener la homeostasis en el organismo. De manera específica, se ha reportado que esta coenzima está vinculada con la respiración celular y por consiguiente en la formación de ATP, así como en el metabolismo de carbohidratos^{4,5} y algunos de sus derivados intervienen en la síntesis de proteínas en bacterias.¹⁹ Los estudios realizados han proporcionado evidencias de una notable mejoría clínica en los pacientes diabéticos tratados con el PPT.^{4-6,28-30} Por otro lado, se ha demostrado que esta coenzima produce una remisión del proceso isquémico cardíaco y disminuye las secuelas del infarto al miocardio en perros y conejos.¹⁰⁻¹²

La tiamina y su forma fosforilada (PPT) participan activamente en la síntesis de neurotransmisores como por ejemplo en los derivados de la glucosa: acetilcolina, GABA y glutamato en el cerebro de ratas tratadas con el antagonista del PPT, la piritiamina.²⁰

Se ha comprobado que la deficiencia en la ingesta de tiamina genera alteraciones neurológicas, como es el caso del síndrome de Wernicke-Korsakoff en pacientes con alcoholismo crónico.^{1,20} Debido a que el PPT participa en el metabolismo neuronal,²²⁻²⁴ en el presente trabajo se estudió el efecto *in vitro* de la administración de PPT en tejidos embrionarios y específicamente, su influencia en la formación de neuritas. El diseño experimental utilizado en este estudio ha demostrado ser una herramienta muy versátil y adecuada para evaluar el efecto de ciertas sustancias sobre la formación de las neuritas. Los resultados sugirieron que la presencia del PPT en el medio de cultivo aumenta de manera notable la tasa de formación de las neuritas (figura 1 y 2), observándose paralelamente un incremento en el número de neuritas positivas para los neurotransmisores serotonina, adrenalina, GABA y sustancia P. Llama la atención que el rombencéfalo re-

gistró un mayor número de neuritis positivas a serotonina; lo anterior podría deberse a que en esta región cerebral están presentes los centros de organización que producen las señales Shh (Sonic hedgehog), FGF8 y FGF4 que promueven la diferenciación de las neuronas serotoninérgicas.³¹

El efecto en el aumento en el número de neuritis sugieren que el PPT podría permitir un funcionamiento más eficaz de las rutas metabólicas en las que participa. Se ha reportado que esta coenzima participa en la síntesis de neurotransmisores,^{1,17} por lo que es probable que en el modelo de estudio del presente trabajo también tenga un efecto similar. No se cuenta con datos al respecto, ya que en este estudio sólo se evaluó el número de neuritis en crecimiento, pero más adelante se realizarán los estudios correspondientes que permitan conocer la relación neuro-transmisor/neurita, para poder evidenciar un incremento en la cantidad de los neurotransmisores por efecto de la cocarboxilasa. También resulta interesante la respuesta producida por la concentración del PPT en el medio de cultivo.

Con base en estos resultados, se concluye que el PPT o cocarboxilasa estable en solución (X-2) aumenta el número de las neuritis en cultivo entre 47 a 122%. Si el PPT es capaz de mejorar las condiciones metabólicas en los explantes del neuroepitelio en cultivos *in vitro*, también podría mejorar las condiciones metabólicas, en aquellos estados fisiológicos alterados de manera natural (envejecimiento) y en estados patológicos. Por tanto, se propone valorar el efecto de esta coenzima en organismos seniles y enfermos, donde las condiciones fisiológicas pueden no ser las óptimas. ■

BIBLIOGRAFIA

- Calingasan NY, Sheu KF, Baker H, Jung EH, Paoletti F, Gibson GE. Immunocytochemical distribution of thiamine pyrophosphate, TTP-dependent enzymes in rat brain. *J Neurochem*. 1993;161.
- Fournier H, Butterworth RF. Effects of thiamine deficiency on thiamine-dependent enzymes in regions of the brain of pregnant rats and their offspring. *Metab Brain Dis*. 1990;5(2):77-84.
- Czerniecki J, Czygier M. Cooperation of divalent ions and thiamin diphosphate in regulation of the function of pig heart pyruvate dehydrogenase complex. *J Nutr Sci Vitaminol*. 2001;47(6):363-6.
- Markees S, Meyer FW. Die therapie des coma diabetici mit cocarboxylase. Experimentelle Grundlagen und klinische Ergebnisse Schweiz. *Med Wschr*. 1949;79:931.
- Markees S. Zur Wirkungswiese der cocarboxylase bei der diabetischen acidose Schweiz. *Med Wschr*. 1952;82, 1290.
- Booth AA, Khalil RG, Hudson BG. Thiamine pyrophosphate and pyridoxamine inhibit the formation of antigenic advanced glycation end-products: comparison with aminoguanidine. *Biochem Biophys Res Commun*. 1996;220:113-9.
- 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*. 1985;41:1041-45.
- Aguirre BEL. Efecto de la administración crónica del pirofosfato de tiamina en hepatocitos de rata normal. estudio morfológico. Tesis Profesional, Facultad de Ciencias, Departamento de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, 1986.
- Alcázar MH, Alcázar LS, Aguirre BE, Alvarado VN, Rivera LRM, Gámez MA, Benítez RMT. Disfunciones hepáticas tratadas con pirofosfato de tiamina. Resultados clínicos y de laboratorio. *Bioquímica*. 2000;25:45-48.
- Larrieu AJ, Kao RL, Yazdani R, Redovan E, Silver J, Ghosh S, Magovern J. Preliminary evaluation of cocarboxylase on myocardial protection of the rat heart. *Ann Thorac Surg*. 1987;43:168-71.
- Larrieu AJ, Yazdani R, Redovan E, Efythiadis A, Kao R, Silver J, Ghosh C. Beneficial effects of cocarboxylase in the treatment of experimental myocardial infarction in dogs. *Ann Surg*. 1987;53:721-5.
- Alcázar MH, Alcázar LS. Utilidad del pirofosfato de tiamina (cocarboxilasa) estable en solución en dos casos postinfarto del miocardio. *Inv Med Int*. 1991;17:170-180.
- Alcázar LS, Manuel S. Energy action of cocarboxylase in respiratory blockage induced by cyanide and its therapeutic projection. *Biochimia*. 1989;34:1281-82.
- Bender KY, Friedman SL, Kaprelova TS, Kolyadenko VF, Khlebnikova AY. Algunos aspectos de corrección de la hipoxia bajo condiciones experimentales clínicas. *Comp Inv Clin Lat*. 1987;7(2):25.
- Sacks W, Esser AH, Feitel B, Abbot K. Acetazolamide and thiamine: an ancillary therapy for chronic mental illness. *Psychiatry Res*. 1989;28(3):279-89.
- O'Keefe ST, Torney WP, Glasgow R, Lavan JN. Thiamine deficiency in hospitalized elderly patients. *Gerontology*. 1994;40:18-24.
- Butterworth RF, Heroux M. Effect of pyrimidine treatment and subsequent thiamine rehabilitation on regional cerebral amino acids and thiamine-dependent enzymes. *J Neurochem*. 1989;52(4):1079-84.
- Hawkins CF, Borges A, Perham RN. A common structural motif in thiamin pyrophosphate binding enzymes. *FEBS Lett*. 1989;255:77-82.
- Winkler W, Nahvi A, Breaker RR. Thiamine derivatives bind messenger RNAs directly to regulate bacterial gene expression. *Nature*. 2002;419(6910):952-6.
- Butterworth RF, Giguere JF, Besnard AM. Activities of thiamine-dependent enzymes in two experimental models of thiamine deficiency encephalopathy. *Neurochem Res*. 1986;11(4):567-77.
- Platakis A, Hwang EC, van Woert MH, Szilagyi PIA, Berl S. Effect of thiamin deficiency on brain neurotransmitter systems. *Ann NY Acad Sci*. 1982;378:367-81.
- Waldentind L. Possible role of thiamine in neuromuscular transmission. *Acta Physiol Scand*. 1979;105(1):1-10.
- Eder L y Dunant Y. Thiamine and cholinergic transmission in the electric organ of Torpedo. I. Cellular localization and functional changes of thiamine and thiamine phosphate esters. *J Neurochem*. 1980;32(6):1278-86.
- Eder L, Dunant Y y Loclin F. Thiamine and cholinergic transmission in the electric organ of Torpedo. II. Effects of exogenous thiamine and analogues on acetylcholine release. *J Neurochem*. 1980;35(6):1287-96.
- Gibson G, Barclay L y Blass. The role of cholinergic system in thiamin deficiency. *Ann NY Sci*. 1982;378:388-403.
- Varela-Echavarría A, Tucker A, Püschel A y Guthrie S. Motor axons subpopulations respond differentially to the chemorepellents netrin-1 and semaphorin-D. *Neuron*. 1997;18:1-9.
- Guthrie S y Lumsden A. Collagen gel coculture of neural tissue. *Neuroprotocols*. 1994;4:116-23.
- Alcázar MH, Alcázar LS, Rivera LRM, Moreno HJ. Pirofosfato de tiamina (cocarboxilasa) estable en solución como tratamiento de la diabetes. *Inv Med Int*. 1989;16:83-91.
- Alcázar MH, Alcázar LS. Pirofosfato de tiamina como terapia preventiva y regenerativa del proceso de envejecimiento de los diabéticos. *Inv Med Int*. 1991;17:195-199.
- Alcázar MH, Alcázar LS, Gámez MA, Benítez RMT. Actividad de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa en pacientes diabéticos tratados con pirofosfato de tiamina o cocarboxilasa. *Inv Med Int*. 1992;19:67-74.
- Hynes M, Rosenthal A. Specification of dopaminergic and serotonergic neurons in the vertebrate CNS. *Curr Opin Neurobiol*. 1999;9:26-38.

Summary

The PPT (cocarboxylase), coenzymatic thiamin form, is an important coenzyme in the SNC. A decreasing synthesis is associated with neurological alterations as neonatorum hypoxia, encephalopathies, ataxia, reflex diminishes, convulsions, dementia, schizophrenia, retardation, depression and insanity, which diminish or disappear by the administration of cocarboxylase. Because its importance in neuronal function, we studied the effect in vitro of cocarboxylase on expression of serotonin, adrenaline, GABA and substance P in embryonic neurites from fetus of Wistar rats. Materials and Methods: Pregnant Wistar rats were used with 14.5 days of gestation. The rats were sacrificed by cervical dislocation and the embryos were placed in Ringer cold solution. From each embryo the neuroepithelium explants (rostral rhombencephalon and mesencephalon) were obtained; they were placed in a collagen gel and incubated with different cocarboxylase concentrations during 48 h. Finally, the cultures were fixed and carried out immunohistochemistry for identify positive neural populations to serotonin, adrenaline, GABA and substance P. The marked neurites were counted by light microscopy. Results: The obtained values indicated that the number of positive neurites for serotonin, adrenaline, GABA and substance P ($p < 0.05$) were more high in those neurites that were incubated with cocarboxylase. Conclusion: The results indicated the importance of thiamine pyrophosphate stable in solution (X-2) which modifies the production, as well as the growth greater rate of the neurites in vitro.