

# DIAGNOSTICO DE LAS DEFICIENCIAS DE TIAMINA

MÁXIMO N. PALHUA SANDOVAL

## INTRODUCCION

En 1642, Jacobus Bonius, fue el primero que describe un tipo de enfermedad carencial, que los nativos de Java la llamaban "beriberi". Existen razones para creer que la enfermedad fue descrita en el Nitching (2,696 a. J. C.). Siendo de esta manera el beriberi el primer padecimiento que se llamó enfermedad carencial.

El beriberi es un estado patológico complejo provocado primariamente por un déficit de tiamina, dentro generalmente de un cuadro de desnutrición generalizada. Es endémico en todo el mundo, pero se observa predominante en las regiones del Próximo y extremo Oriente, donde el arroz descascarillado es el principal alimento. En otras regiones aparece asociado con el consumo de cereales muy elaborados y no reforzados y otros alimentos hidrocarbonados, complicado con un elevado consumo de alcohol, hipertiroidismo, embarazo y lactancia, fiebre o dificultades de absorción. Puede aparecer en cualquier raza y en todas las edades.

El beriberi es un síndrome clínico caracterizado por: neuritis múltiples, derrames serosos, lesiones cardiovasculares, edema, atrofia muscular.

Las manifestaciones neurológicas son principalmente las de polineuritis periférica ascendente y simétrica, a veces acompañada de polioencefalitis hemorrágica aguda (Enfermedad de Wernike).

Las manifestaciones cardiovasculares incluyen las siguientes: disnea, hipertrofia y distensión cardíaca que progresa a insuficiencia cardíaca congestiva.

Puede haber edema (beriberi húmedo) que probablemente depende en parte de la insuficiencia cardíaca congestiva y en parte de la desnutrición proteica (albúmina plasmática disminuida). La anorexia

---

Sumario de la tesis presentada para optar el grado de Bachiller en Medicina en Noviembre de 1965.

es manifestación temprana. Puede haber atonía gástrica con disminución de la motilidad del estómago y náuseas. En etapas avanzadas hay fiebre y vómitos.

En 1898, Eijkman, produjo un estado análogo en las gallinas alimentadas con arroz descascarillado, el cual podía curarse o prevenirse añadiendo la cascarilla de arroz que contiene tiamina, como se pudo determinar en 1926. Diez años después, se descubre su estructura química y se logró sintetizarlo.

Desde el año 1937, se han empleado diferentes métodos para la determinación de la tiamina, se han ensayado y se emplean los siguientes métodos:

Método fluorímetro, el más empleado, y se funda en que la tiamina se convierte por oxidación en tiocromo (1), pigmento amarillo que presenta fluorescencia azulada bajo la luz ultravioleta.

Método colorímetro, depende de la formación de un pigmento rojo, al reaccionar la tiamina con una amina aromática diazotada (p-aminacetofenona) en un medio alcalino.

Método de fermentación de levadura, permite descubrir tiamina en pequeñas cantidades (depende de que aumente la fermentación de algunas levaduras), se mide por la aparición de  $\text{CO}_2$ .

Método de desarrollo de microorganismo, dependen de que la tiamina estimule el crecimiento de algunas cepas de levadura en condiciones estandarizadas.

Método indirecto, por determinación de la acumulación del ácido pirúvico en sangre, que ocurre en casos de deficiencias de tiamina.

Pruebas terapéuticas, es el procedimiento de ensayo biológico, se suministra a ratas dieta sin tiamina hasta que presenten signos de polineuritis aguda. Después a un grupo se le da una dosis estandar de tiamina que basta para anular los síntomas. A continuación los animales vuelven a la dieta sin tiamina hasta presentar de nuevo polineuritis, es entonces cuando se les administra la sustancia problema. La eficiencia terapéutica de esta última se compara con la dosis estandar de tiamina.

Sin embargo, el diagnóstico temprano de la deficiencia de tiamina no es totalmente satisfactorio por los métodos anteriormente señalados.

Un método más sensible consiste en la medición del rendimiento de  $\text{C}^{14}\text{O}_2$  cuando la glucosa 2- $\text{C}^{14}$  es incubada con eritrocitos, desde que en estas células el ciclo de ácido cítrico es inoperante e incompleto (2, 12 y 13).

El metabolismo de la glucosa a través de la vía de la pentosa fosfato determina la formación de  $\text{CO}_2$ , cuya aparición puede ser puesta en evidencia cuando se utiliza glucosa marcada con  $\text{C}^{14}$ . En esta vía al C-1 es rápidamente transformado en  $\text{CO}_2$ . El C-2 puede aparecer como  $\text{CO}_2$  solamente si se opera la serie completa de las reacciones en que el C-2 de la glucosa original se ha transformado en C-1 de la glucosa-6-fosfato sintetizada (8).

Una de las reacciones de este ciclo, la reacción de la transcetolasa, es catalizada por la tiamina pirofosfato por lo que la transformación de la glucosa 2- $\text{C}^{14}$  en  $\text{C}^{14} \text{O}_2$  requiere este cofactor.

En casos de deficiencia de tiamina no ocurre la resíntesis de la hexosa fosfato en la medida que ocurre en los eritrocitos normales y ello determina una menor recuperación de  $\text{C}^{14} \text{O}_2$  a partir de la glucosa 2- $\text{C}^{14}$ .

## MATERIAL Y METODOS

### *Obtención de la muestra de sangre*

En nuestro estudio hemos utilizado sangre de dos grupos de personas: un grupo de veinte personas aparentemente normales, seleccionados de los servicios de Cirugía del Hospital Dos de Mayo, unos previamente preparados para ser intervenidos quirúrgicamente, otros operados de emergencia por procesos agudos y en algunos casos pacientes para atención traumatológica; de este grupo de veinte pacientes, ocho estaban siendo preparados para ser operados de hernias de diversos tipos, tres para ser amigdalotomizados, cinco hospitalizados para atención traumatológica y cuatro operados de apendicitis aguda.

El segundo grupo también de veinte personas ha sido seleccionado del "Dispensario Antituberculoso Orbegoso", todos ellos padecían proceso tuberculoso activo, en su mayoría procedente de barriadas.

Las edades fluctuaban entre los veinte y sesenta años.

La selección de los casos de desnutrición se hizo de acuerdo a valoraciones efectuadas en nuestro país (10, 11).

La sangre se tomó de la vena antecubital recibiendo en tubos de centrífuga heparinizados, manteniéndose en refrigeración a 4° C.

### *Preparación de los Eritrocitos.*

Para obtener los eritrocitos libres de plasma y de glóbulos rojos, la sangre heparinizada se centrifugó a 2,000 r.p.m. durante 10 minutos en centrífuga refrigerada Internacional P R - 2 a 4° C. El plasma

sobrenadante y los leucocitos, fueron eliminados por medio de una pipeta Pasteur. Los eritrocitos fueron lavados por tres veces con solución de Ringer fosfato (21). Después de cada lavado se centrifugó a 2,000 r.p.m. durante 10 minutos. Luego de la tercera centrifugación, los hematíes fueron suspendidos en cuatro volúmenes de Ringer fosfato.

#### *Procedimientos.*

El estudio del metabolismo de la glucoma  $2\text{-C}^{14}$  en los eritrocitos se realizó en frascos de Warburg con dos ramas laterales. En una de ellas se introdujo 0.3 ml. de solución de glucosa  $2\text{-C}^{14}$  (30  $\mu\text{M}$ ) conteniendo 73,620 cuentas por minuto y en la otra 0.25 ml. de ácido sulfúrico 5 N. En el compartimiento principal se puso 1 ml. de hematíes suspendidos en Ringer fosfato, 0.5 ml. de una solución de azul de metileno al 0.4 por ciento. El volumen total se completó a 2 ml. con Ringer fosfato. En la copa central, se puso 0.15 ml. de hidróxido de sodio al 20 por ciento; luego se procedió a incubar durante dos horas a  $38^\circ$  centígrados, utilizando aire como fase gaseosa. Al cabo de este período se detuvo la reacción mediante la adición de  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , el cual además desprende  $\text{CO}_2$  disuelto en el medio líquido. Se continuó la agitación durante media hora para la absorción total de  $\text{CO}_2$  desprendido.

Retirados los frascos (tapados) se agregó 0.5 ml. de  $\text{CO}_3\text{Na}_2$  al veinte por ciento libre de  $\text{CO}_2$  a la copa central, para diluir el  $\text{C}^{14}\text{O}_3\text{Na}_2$  formado; luego el contenido y los lavados respectivos fueron transferidos a un tubo de centrifuga tarado. Para transformarlo en carbonato de bario se agregó 2 ml. de una solución conteniendo  $\text{Ba}(\text{OH})_2$  y  $\text{BaCl}_2$  (14). El precipitado formado se separó por centrifugación lavándose tres veces con agua destilada libre de  $\text{CO}_2$  y dos veces con alcohol metílico, luego se secó en horno a  $110$  grados centígrados por doce horas; se separó para ser transferido a planchetas y contar la radioactividad.

#### *Métodos analíticos.*

La glucosa radioactiva fue degradada a  $\text{C}^{14}\text{O}_2$  por el método de la combustión húmeda de Van Slyke y Folch (3), para conocer las cuentas por minuto de la glucosa puesta al frasco.

La radioactividad del  $\text{C}^{14}\text{O}_3\text{Ba}$  se determinó en un detector con flujo de gas y las cuentas por minuto fueron corregidas a grosor cero mediante una curva de absorción preparada en el Instituto de Bioquímica y Nutrición. (15). Se calcularon las cuentas totales producidas y en seguida se calculó el porcentaje que esta cantidad representa con re-

lación a las cuentas por minuto de la glucosa  $2\text{-C}^{14}$  presente en el frasco de incubación y por 100 mg. de peso seco de eritrocito.

*Reactivos especiales.*

La glucosa  $2\text{-C}^{14}$  fue obtenida de la Nuclear Instruments and Chemical Corporation de Chicago.

## RESULTADOS

**Tabla Nº 1. Resultados obtenidos en adultos aparentemente normales**

Los valores que se indican expresan el porcentaje de cuentas por minuto de glucosa  $2\text{-C}^{14}$  inicialmente presente en el frasco de incubación, que se ha incorporado al  $\text{C}^{14}\text{O}_2$  por 100 mgs. de peso seco de eritrocitos.

Nº de Casos	Edad	Rendimiento de $\text{C}^{14}\text{O}_2$
1	26	2.16
2	23	1.90
3	25	2.09
4	21	2.95
5	45	1.93
6	30	2.75
7	35	2.39
8	20	3.75
9	60	1.88
10	36	1.34
11	36	1.45
12	43	1.79
13	48	1.55
14	32	2.18
15	41	1.78
16	60	1.53
17	34	2.99
18	20	2.74
19	27	2.93
20	22	3.21

### ANALISIS ESTADISTICO

Nº de Casos	Media $\pm$ Error Standard	Desv. Stand. + Error Stand. de Desv. Stand.	Coef. de Variación	Valores Extremos
20	$2.26 \pm 0.14921$	$0.667 \pm 0.1054$	29.51	1.34 — 3.75

**Tabla N° 2. Resultados obtenidos en adultos desnutridos**

Los valores que se indican expresan el porcentaje de cuentas por minuto de la glucosa 2-C<sup>14</sup> inicialmente presente en el frasco de incubación, que se ha incorporado al C<sup>14</sup>O<sub>2</sub> por 100 mgs. de peso seco de eritrocitos.

N° de Casos	Edad	Rendimiento de C <sup>14</sup> O <sub>2</sub>
1	23	1.48
2	29	1.16
3	21	1.08
4	34	1.29
5	28	0.74
6	39	1.21
7	31	0.98
8	43	0.64
9	28	0.62
10	46	0.88
11	32	1.12
12	49	0.75
13	35	1.40
14	60	0.96
15	44	1.32
16	53	1.43
17	39	1.96
18	22	1.43
19	27	1.88
20	27	1.65

## ANALISIS ESTADISTICO

N° de Casos	Media ± Error Standard	Desv. Stand. + Error Stand. de Desv. Stand.	Coef. de Variación	Valores Extremos
20	1.199 ± 0.1536	0.68675 ± 0.1086	57.29	0.62 — 1.96

Tabla Nº 3

Oxidación de la glucosa  $2-C^{14}$  en eritrocitos obtenidos de adultos en estado de desnutrición antes y después de un tratamiento con tiamina.

Experimento	I	II	III	IV	V	VI
Antes de tratamiento	0.74	0.96	1.12	1.21	1.08	0.88
Después de tratamiento	1.33	1.54	1.85	1.72	1.66	1.48

Se administra tiamina por vía oral, a los casos seleccionados en razón de 600 mg. diarios durante siete días. Las cifras indican el porcentaje de radioactividad inicialmente presente incorporada por 100 mg. de peso seco de eritrocitos.

## ANALISIS ESTADISTICO

Nº de Casos	Media $\pm$ Error Standard	Desv. Stand. + Error Stand. de Desv. Stand.	Coef. de Variación	Valores Extremos
<b>Antes del tratamiento</b>				
6	1.000 $\pm$ 0.2143	0.35259 $\pm$ 0.1519	52.59%	0.74 — 1.21
<b>Después del tratamiento</b>				
6	1.597 $\pm$ 0.385	0.84972 $\pm$ 0.216	53.20	1.33 — 1.85

Tabla Nº 4

Análisis de la significación estadística de la comparación de los resultados obtenidos en el grupo de los eritrocitos de adultos en estado de desnutrición y de adultos aparentemente normales.

Grado de libertad	Valor t	Valor P
38	6.242	< 0.001

Análisis de la significación estadística de la comparación de los eritrocitos obtenidos antes y después del tratamiento con tiamina.

Grado de libertad	Valor t	Valor P
5	20.3839	< 0.001

En las Tablas I y II se presentan los resultados individuales de la incorporación de  $C^{14}$  de la glucosa al  $C^{14}O_2$  referidas en porcentaje de las cuentas inicialmente presentes en el medio de incubación y por 100 mg. de peso seco de eritrocitos. Se puede ver que el valor medio en los adultos aparentemente normales es de 2.26 y en los adultos en estado de desnutrición de 1.199. Es decir que hay una menor incorporación de la glucosa  $2-C^{14}$ . Apreciando la tabla N° IV se puede notar que el valor de P en la comparación de los dos grupos es de < 0.001 y por lo tanto la diferencia es estadísticamente significativa.

En el grupo de adultos en estado de desnutrición que recibieron tratamiento con tiamina, expresando en la tabla III, se aprecia que los valores medios de los dos grupos, con antelación y posterioridad al tratamiento son de 1 y 1.597 respectivamente. La diferencia se halla analizada estadísticamente en la tabla IV indica un valor de P < 0.001, diferencia estadísticamente significativa.

## DISCUSION

Conocidas las alteraciones debidas a la deficiencia de tiamina, el interés del diagnóstico en su etapa pre-clínica es cada día más creciente.

Diversos métodos han sido ensayados, pero ninguno es capaz de un diagnóstico temprano.

Como ya se ha señalado anteriormente, un método más sensible consiste en la determinación del  $C^{14}O_2$  formado cuando la glucosa  $2-C^{14}$  es incubado con eritrocitos. La adición de azul de metileno (6) al sistema de incubación, incrementa notablemente el consumo de oxígeno, que es muy bajo en estas células. Este colorante incrementa el catabolismo de la glucosa, desviándolo de la vía de Embden Mayerhof hacia el ciclo de la pentosa fosfato (13), porque el azul de metileno actúa como un aceptor de electrones del TPNH, cuya reoxidación da lugar a un incremento de la vía de la pentosa fosfato (13-18).



Incubando eritrocitos de mamíferos alimentados con dieta carente de tiamina ha sido posible determinar una alteración de la reacción de la transcetolasa (4). En este caso, la pentosa puede acumularse, porque está bloqueada la resíntesis de la hexosa fosfato. La causa de la disminución de la reacción de la transcetolasa y la subsecuente disminución de la hexosa resintetizada es una deficiencia del cofactor tiamina pirofosfato (4-20).

Godhart (5), señala que los eritrocitos no nucleados poseen una capacidad limitada para fosforilar la tiamina, en comparación con los nucleados, también se señala que esta fosforilación (7-9) se altera en los pacientes con cirrosis hepática, como pudo ser demostrado (7). Recientemente se ha reportado una tardía recuperación de las funciones enzimáticas de la tiamina en pacientes con Síndrome de Wernike (15).

La capacidad de los eritrocitos humanos es limitada en cuanto a su capacidad de fosforilar la tiamina, ésto tal vez dependa directamente de la diferencia de especies. Además se ha demostrado que el azul de metileno, aunque estimula la respiración del eritrocito, no estimula la producción de tiamina pirofosfato y si puede inhibirla (13-18). Hecho que probablemente ocurre cuando no se logra una recuperación completa en eritrocitos de ratas deficientes al administrarles tiamina.

La tiamina es un factor necesario para el reciclo de la glucosa en el "shunt" de las pentosas, siendo su forma activa el pirofosfato de tiamina que se encuentra dentro de la célula (22).

En experimentos usando eritrocitos, la perturbación del metabolismo intermediario en los estados de deficiencia de tiamina ha previsto una base para la evaluación bioquímica de la deficiencia de tiamina (16). La prueba es suficientemente sensible para revelar un defecto bioquímico antes de que aparezcan signos clínicos y por lo tanto un estado marginal de insuficiencia (16), sostenida por la observación, de que en la deficiencia de tiamina la actividad de la transcetolasa del eritrocito está disminuída (20), la que produce disminución del crecimiento de las ratas jóvenes y de peso en las adultas. La alteración bioquímica aparece con antelación a los cambios somáticos evidentes.

En nuestro medio estudiando la oxidación de la glucosa  $2\text{-C}^{14}$  en eritrocitos de niños (18), se ha encontrado que el rendimiento de  $\text{C}^{14}\text{O}_2$  en eritrocitos de niños en estado de hiponutrición es menor que el observado en eritrocitos de niños aparentemente normales.

En niños en estado de hiponutrición un tratamiento con tiamina aumenta el rendimiento de  $\text{C}^{14}\text{O}_2$ .

El mismo estudio se ha hecho en gestantes (19) del primer y tercer trimestre, en comparación con las no gestantes, no presentan disminución estadísticamente significativa. En las gestantes del segundo trimestre se observó una disminución estadísticamente significativa. (Grupo de gestantes del Hospital Central del Empleado).

Otro grupo de gestantes (de la Maternidad de Lima), todas del tercer trimestre, presentan disminución en el rendimiento de radioactividad, en comparación con las no gestantes.

Como se indica en la parte pertinente, nuestro estudio ha sido realizado en dos grupos de personas, cuyos resultados aparecen en las tablas I, II y III; como se podrá apreciar, el porcentaje de radioactividad incorporada por 100 mgrs. de peso seco de eritrocito encontrado en el grupo de adultos aparentemente normales, es mayor que en el obtenido en el grupo de adultos en estado de desnutrición, siendo la diferencia encontrada estadísticamente significativa.

La mayor incorporación del  $C^{14}$  y por lo tanto el mayor rendimiento de  $C^{14}O_2$  obtenido en las incubaciones de eritrocitos de adultos aparentemente normales, explicaría un adecuado funcionamiento del ciclo de la pentosa fosfato.

El menor rendimiento de  $C^{14}O_2$  estaría en relación con la disminución de la reacción de la transcetolasa y la subsecuente disminución de la hexosa reformada, como reflejo de la deficiencia del cofactor tiamina pirofosfato.

Del grupo de sujetos en estado de desnutrición, fueron seleccionados seis para ser sometidos a tratamiento con tiamina; habiéndoseles administrado 600 mgrs. diarios, durante siete días. Al término de este período se obtuvieron nuevas muestras, para hacer las incubaciones en las mismas condiciones que en los anteriores procedimientos; los resultados muestran un mayor porcentaje de cuentas por minuto de la glucosa  $2-C^{14}$  incorporado al  $C^{14}O_2$  por 100 mgrs. de peso seco de eritrocito, en comparación con las cuentas iniciales.

## RESUMEN

Hemos investigado la oxidación de la glucosa  $2-C^{14}$  a  $C^{14}O_2$  en eritrocitos de adultos aparentemente normales y en estados de desnutrición. De los resultados obtenidos podemos llegar a las conclusiones siguientes: 1. El rendimiento de  $C^{14}O_2$  en los estados de desnutrición es menor que el obtenido en sujetos aparentemente normales. Esta deficiencia es estadísticamente significativa.

2. El tratamiento con tiamina incrementa la oxidación de la glu-  
cosa  $2\text{-C}^{14}\text{O}_2$  en los sujetos desnutridos, implicando que el menor ren-  
dimiento de  $\text{C}^{14}\text{O}_2$  en éstos se debe a la deficiencia de tiamina.

### BIBLIOGRAFIA

1. Guzmán Barron A. y Payva C. El contenido en Vitamina  $\text{B}_1$  de algu-  
nos alimentos que se consumen en el Perú. Segundo Congreso Pe-  
ruano de Química, 1943.
2. Dajaniau, Osten J. Biol. Chem. 913-231, 1958.
3. Van Slyke, D. D. y Folch, J. Biol. Chem. 136, 509, 1940.
4. Brin, M. Shohet, S. S. and Davidson, C. S. Biol. Chem. 1958, 230, 319.
5. Goodhart, R. S. and Sinclair, H. M. Biochem. J. 1939, 33, 634.
6. Guzmán Barron, E. S. and Harrop. G. A. J. J. Exp. Med. 48: 207, 1928.
7. Williams, R. D. Mason, H. L. Power M. H. and Wilder, R. M. Arch.  
intern. Med. 1943, 71, 38.
8. Horecker, B. L. and Smyrniotis, P. Z. J. Amer. Chem. 1953, 75, 1009.
9. Williams, R. H. and Bissell. G. W. Arch. intern. Med. 1944, 73, 203.
10. Hurtado A. y colab. An. Fac. Med. 19, 9, 1936.
11. Guzmán Barron, A. Actas y trabajo del Segundo Congreso peruano de  
química 11-262-1943.
12. Lamar Grevasse, W. H. Hewson, G. G. Hajomi and Ship J. Lab. and  
Clin. Med. 65 (4) 539, 1965.
13. Van Slyke, D. D. Steele, R. Pazin. J. Biol. Chem. 1951, 192: 769.
14. Villavicencio, M. Rosales, F. Olivera, A., Melgar, E. y Guerra, R. Ac-  
ta Physiol. Latinoam, 8, 219, 1958.
15. Víctor M. An Adams. Res Publ. Ass. vern. met. Dis. Vol. 32.
16. Peters, R. A. The biochemical lesion in vitamin  $\text{B}_1$  deficiency. Lan-  
cet 1936. 1, 1161.
17. Smith, G. and Florinjin, F. Biochim. Biophys. Acta. 1950, 5, 355.
18. Montesinos Belon Alfonso. Tesis Bachiller, 1965.
19. Maradiegue, E. Tesis Bachiller, 1965.
20. Wolfe., J. Brin Davidson Ch. J. Clin IV. 37, 1476-84, 1958.
21. Umbreit, W. W. Burris, R. H. y Stauffer, J. F. Manometric Techni-  
ques Burgess Publishing Co. Minneapolis, 1957 pg. 149.
22. Brin, Myron J. A. M. A. 187 (10): 762-65, 1964.