

La Fisiología de la Tiamina (Vitamina B₁)

por **Emilio Messner**

Director del I. de Fisiología

INTRODUCCION

La vit. B de los primeros investigadores era un conjunto de vitaminas solubles en el agua que poco a poco ha sido separado en sus componentes. Entre las vitaminas del complejo B como hoy suele decirse, figuran las siguientes como las mejor conocidas:

- vit. B₁ o aneurina o tiamina,
- vit. B₂ o lactoflavina o riboflavina,
- vit. antipellagra, el ácido nicotínico y su amida,
- vit. B₆ o adermina o piridoxina,
- el ácido pantoténico.

Nuestros conocimientos sobre la tiamina empiezan con los estudios de Eijkman 1897 sobre la beriberi en Java. Estos trabajos podrían calificarse también como el origen de la vitaminología, aunque fueron necesarios los experimentos de Bunge (1905), de Stepp (1909), de Babcock, de Holst, Hopkins, Funk (1911), para que el mundo científico de entonces aceptase el concepto de las vitaminas.

Después de esta introducción histórica en homenaje a los que cimentaron las bases de la vitaminología, permítanme una observación previa de carácter fundamental:

Las causas que conducen a la carencia de tiamina, tales como alimentación deficiente en cantidad y las más de las veces no equilibrada, la preferencia por alimentos demasiado refinados, el uso excesivo de hábitos dietarios no apropiados, generalmente acarrear escasez de algu-

nas otras vitaminas. Así la avitaminosis B₁, frecuentemente no existe sola, sino como la principal dentro de un síndrome de varias hipovitaminosis. Esto es reconocido por los clínicos y tenido en cuenta en el tratamiento. V. g. han sido descriptos casos de pelagra con síntomas de parte del sistema nervioso que bajo el tratamiento con ácido nicotínico mejoraron rápidamente en cuanto a las manifestaciones cutáneas, pero no en cuanto a las neurales. Solo con inyecciones de tiamina curaron completamente. En cambio los experimentadores, especialmente unos cuantos años atrás, consideraban a menudo como efecto de la avitaminosis tiamínica pura, un cuadro en el cual participaban, en grado indeterminado, carencias de otras vitaminas. Esta situación, es necesario decirlo con toda claridad, continúa todavía y seguirá en forma decreciente hasta la fecha, más o menos remota, en que conoceremos, de un modo definitivo, todas las vitaminas necesarias para cada especie animal ensayada. Si hoy un experimentador adopta un determinado régimen para producir una avitaminosis tiamínica pura, tácitamente presume que tal comida contiene en dosis suficiente todas las demás vitaminas, las conocidas y las aún ignoradas.

SINTOMAS Y LESIONES DE LA AVITAMINOSIS EXPERIMENTAL

I. El sistema nervioso

Ya Eijkman comprobó alteraciones de las células ganglionares del cuerno ventral y de los nervios periféricos en las gallinas. Sus observaciones fueron confirmadas por una serie de investigadores en palomas y ratas. Pero paulatinamente surgieron dudas serias si dichas lesiones pueden ser consideradas como características de la avitaminosis B₁. Por lo pronto Chamberlain y asociados (1911) notaron lesiones iguales en gallinas muertas por inanición. Davison y Stone (1937), luego Vedder (1938), llegaron al mismo resultado. Ahora, para apreciar estas observaciones en todo su volumen, hay que saber que la pérdida de apetito es uno de los síntomas precoces de esta avitaminosis y que, la administración de tiamina a las palomas en inanición no evita las degeneraciones en el sistema nervioso central. En consecuencia, algunos autores atribuyen las lesiones nerviosas, a comprobar con el microscopio, exclusivamente a la inanición. Sin embargo, cuando uno tiene presente que el cuadro de la beriberi experimental se distingue del de la simple inanición por una mayor participación de síntomas neurales, se inclina a la presunción de que las degeneraciones del S. N., por lo menos en parte, van a cuenta de la avitaminosis. Por hoy es poco provechoso plantear esta cuestión, ya que no podemos descartar la posibilidad de que en la inanición se desarrolle conjuntamente una avitaminosis. Agreguemos

que diversos agentes patógenos provocan lesiones con imágenes microscópicas parecidas y hasta idénticas.

A varios autores, entre ellos Williams y Spies, les llama la atención que las alteraciones del S. N. aparezcan tarde. Pero en vista de la poca aptitud de nuestros métodos histopatológicos para revelar las lesiones en sus comienzos, esto no debe extrañarlos. Más sorprendentes son los hechos siguientes: 1.º Perros con síntomas alarmantes (espasmos) se restablecen completamente, en pocos días, por la administración de tiamina. No obstante, las alteraciones histopatológicas persisten. 2.º Wolbach (1937) no encontró diferencias, en cuanto a las lesiones del tejido neural, entre las palomas muertas por polineuritis y las que, por el tratamiento con la tiamina, recobraron la integridad funcional. Referente a estas observaciones cabe hacer resaltar lo siguiente:

Evidentemente los métodos histopatológicos corrientes no tienen la sensibilidad ni la especificidad necesarias para estos casos. En perros clínicamente normales, mayores de un año, según nuestra experiencia, frecuentemente hallamos lesiones ligeras. Finalmente, el examen neurológico de los animales curados de la beriberi experimental, difícilmente se habrá hecho con una técnica eficaz y con la minuciosidad suficiente para descubrir la supresión funcional, no de sistemas con localización circunscrita, sino de neuronas aisladas, dispersadas en el N. S. entero. Todos sabemos que destrucciones anatómicamente importantes del sistema nervioso central de los animales producen, a veces, tan pocos síntomas que solamente una exploración muy experta es capaz de revelarlos.

II. El aparato digestivo

Ya hemos mencionado la ausencia de apetito en la hipovitaminosis tiamínica (Karr 1920, Cowgill 1921). Como lo demostró Sherman 1934 la anorexia es un verdadero síntoma de la carencia B₁, puesto que los animales después de recibir tiamina vuelven a comer el mismo alimento que antes habían rechazado. Además los perros presentan hipoclorhidria (Cowgill y Gilman 1934) y atonía gástrica (Rowlands y Browning). La hipoclorhidria va acompañada de una disminución de la co-carboxilasa sanguínea. La anaclorhidria en el hombre parece traer la hipovitaminosis tiamínica. Se establecería luego un círculo vicioso.

Lesiones anatómicas, consistentes en erosiones y úlceras del estómago, han sido vistas por diversos investigadores. La pereza de la musculatura se extiende a todo el tracto digestivo. El efecto de la acetilcolina es atenuado. Observaciones complementarias son: La tiamina aumenta la acción de la acetilcolina (Briem 1939), probablemente debido al hecho, aportado por Glick y Antopol (1939), de que la tiamina inhibe la colinesterasa de modo que la saponificación de la acetilcolina queda frenada. Luego Minz demostró que en la estimulación del vago aparece co-carboxilasa que sensibiliza el músculo para la acetilcolina.

III. El aparato circulatorio

Carter y Drury ya (1929) describieron la bradicardia en las ratas como síntoma de esta avitaminosis. En un trabajo posterior Drury le atribuyó un origen sinusal y no pneumogástrico. Me permito recordar que en la beriberi humana el corazón presenta insuficiencia, a veces hasta grave (Wenkebach 1928 y luego otros): taquicardia, corazón agrandado, presión venosa aumentada; edemas. De estas alteraciones la paloma puede tener edema y en grado variable la dilatación del corazón. Los edemas serán consecuencia, en parte, de la debilidad circulatoria, en parte de la disminución de las proteínas del plasma sanguíneo, fenómeno corriente en cualquier desnutrición pronunciada.

Lu (1939) demostró que la acumulación del piruvato en la sangre, punto que explicaremos más adelante, y la bradicardia marchan paralelamente en las ratas avitaminóticas. Luego investigó si la acumulación del mencionado ácido es la causa inmediata de la bradicardia. Con este fin inyectó ácido pirúvico en la vía circulatoria de ratas normales en dosis que producen un nivel superior al máximo comprobado en la beriberi experimental. No observó ninguna influencia sobre el pulso. En conclusión: la bradicardia no es efecto directo del ácido pirúvico sobre el gobierno del corazón.

IV. El sistema endócrino

Desde el trabajo de Mc Carrison (1919) conocemos la hipertrofia de las **cápsulas suprarrenales** en la hipovitaminosis B₁ de la rata. Entonces se pensó que la hipertrofia de las células suprarrenales observada en el ejercicio muscular intenso podría ser causada por una falta de tiamina, la cual en tales condiciones, sería requerida en mayor cantidad por el organismo.

En efecto, la hipertrofia suprarrenal del ejercicio es evitada por un aporte mayor de tiamina. Inversamente la inyección de corticosterona demora la declaración de la beriberi experimental y alivia sus síntomas. Laszt (1938) sostiene que la tiamina obra solamente en presencia de la corticosterona y viceversa.

Respecto a la **tiroides** Verzár y colaboradores notaron la detención de su función; algunos hablan hasta de la atrofia de esta glándula. Hundhausen y Schulze (1939), a base de sus exámenes histológicos, sostienen que en la hipovitaminosis B₁ es afectada primero la hipófisis por lo que inyecta menor cantidad de hormona tireotropa. La consecuencia es la inactividad de la tiroides.

Mencionamos en esta oportunidad que el estado de hipertiroidismo trae un mayor consumo de tiamina; la cocarboxilasa y la tiamina libre de los tejidos bajan. (Peters y Rossiter 1939). En las ratas tireotóxicas la administración de dosis elevadas de tiamina previene la pérdida de peso (Sure y Buchanan 1937).

La supresión de la función folicular (Evans y Bishop 1922) y los trastornos de lactación, comprobados por Evans y Burr (1928), tal vez no son manifestaciones de una pura avitaminosis B₁, ya que, en aquel tiempo, la separación dentro del complejo B estaba en sus comienzos.

V. Crecimiento y mantención del peso corporal

Para un crecimiento normal se necesita la ingestión de una serie de vitaminas, entre ellas, sin duda alguna, también la tiamina. Igualmente la tiamina es indispensable para que los adultos conserven su peso. El crecimiento detenido y la pérdida del peso corporal sin duda alguna son síntomas de la avitaminosis B₁, pero no son característicos. Los experimentos en ratas, efectuadas por Dann y Cowgill (1934), han enseñado que las ratas en desarrollo requieren tres a cinco veces más tiamina para crecer, que los animales adultos para mantener su peso. Las observaciones de la clínica humana conducen al mismo resultado (Ross y Summerfeldt 1935; Eddy y Dalldorf).

VI. El metabolismo

En cuanto a las alteraciones del metabolismo señalaré por el momento solamente los hechos fundamentales.

La avitaminosis B₁ se produce mucho más rápido con un régimen carente de tiamina en el que predominan los hidratos de carbono. En las palomas, la sola adición de azúcar a una alimentación normal, provoca la polineuritis. Lo raro es que luego la adición de tiamina no la cura. Existen observaciones análogas en el hombre. Roos y Meulengracht consideran peligroso el consumo de crecidas cantidades de hidratos de carbono sin aumentar al mismo tiempo la ingestión de tiamina. Broeder y Engel (1938) relatan el caso de una mujer que quería adelgazar. Con tal fin se alimentó durante tres meses exclusivamente con carbohidratos. El resultado de esta dieta, probablemente carente también de otras vitaminas, fué un cuadro en el cual dominaban los síntomas de la beriberi: edemas y anestesia en las piernas, imposibilidad de caminar, piel áspera y marchita con pigmentación parduzca, lesiones del miocardio.

La ausencia de hidratos de carbono en el régimen de carencia tiamínica no previene la beriberi; pero los animales resisten un tiempo mayor.

Significativo es el efecto economizante sobre la tiamina ejercido por una alimentación rica en grasa, especialmente en grasas no saturadas. Arnold y Elvehjem (1939) comprobaron que la tiamina requerida por el canino depende de la cantidad de calorías correspondientes a las materias no grasas del régimen, sin relación alguna a la grasa. Así, perros alimentados con poca grasa requerían 75 y de tiamina por 100 gr. de alimento. Un aumento de las grasas, hasta formar el 65'5 % del valor calórico total de la ración, bajó la necesidad de tiamina a 27'5

γ por 100 gr. de alimento. Cuando dicha cantidad de tiamina es calculada sobre la base de las calorías no grasa resulta ser la misma que en la dieta pobre en grasa, es decir 75 γ por 100 gr. de alimento no grasa. Como lo veremos más adelante, la tiamina es necesaria para la combustión final de la glucosa, pero no para la de las grasas. Esto nos permite comprender los hechos señalados. Si agregamos que el tejido encefálico quema únicamente hidratos de carbono, también se explica por qué la carencia en tiamina afecta especialmente el metabolismo del sistema nervioso.

En los mencionados trabajos sobre el ahorro de tiamina por la grasa se trata sólo un aspecto de una cuestión complicada. Salmón y Goodman (1937) obtuvieron la curación de la beriberi espástica en sus ratas por una alimentación con caprilato (C₈) o capronato (C₆) de glicerol.

En estudios comparativos con grasas de cadena más larga y más corta comprobaron que la acción curativa disminuye a medida que el número de átomos de carbono se aleja de ocho. Por el momento no hay explicación con base experimental. Luego Mc Henry (1937, 1940) consideró la tiamina necesaria para la síntesis de la grasa a base de glúcidos. Sus experimentos son éstos: la rata carente de tiamina pierde grasa a pesar de una ingestión abundante de hidratos de carbono. Tan pronto como se administra tiamina, vuelve a depositarse grasa con las características de la grasa formada por la rata a base de glúcidos, es decir, un 40 % de ácidos grasos de 16 C.

En esta oportunidad vamos a referirnos a la manifestación sorprendente del instinto de la rata, en cuanto a su alimentación. Estos animales sometidos a una dieta sintética sin el complejo B, puestos en la situación de poder elegir entre los alimentos ofrecidos, comen grandes cantidades de grasa, pero muy poco azúcar. Cuando pueden conseguir la tiamina, prefieren los azúcares a las grasas. También su coprofagia en la avitaminosis B₁ debe ser interpretada como aconsejada por el instinto, puesto que los excrementos contienen tiamina sintetizada por ciertas especies microbianas, habitantes del intestino. Los mismos autores dan todavía otros ejemplos del acierto instintivo de las ratas. En estado de avitaminosis tiamínica manifiestan una marcada preferencia por los alimentos que contienen esta vitamina. Rápidamente encuentran e ingieren, en cantidad importante, las soluciones de tiamina pura, ofrecidas simultáneamente con numerosos líquidos de presentación igual.

En la hipovitaminosis tiamínica hay además hiperglicemia (Rocha 1931) y descenso de la temperatura corporal, debido a la restricción del metabolismo manifestada en un consumo de O₂ disminuído en un 16 %. Es difícil decir hasta qué punto también estos síntomas, incluida la bradicardia y el aumento del ácido pirúvico sanguíneo, se deben simplemente a la inanición.

La vitaminosis B₁ aumenta la concentración de los ácidos láctico

y pirúvico del tejido nervioso central, como fué comprobado por Peters en palomas con opistótono en la base cerebral y en el Tectum opticum. Con el progreso de la avitaminosis, los ácidos láctico y pirúvico aumentan también en la sangre y son acompañados del aldehído pirúvico (metilglioxal). Según Leone (1937) se acumula también, ácido oxálico. V. Euler y Hoegberg (1940) dan, para la rata normal, 10 a 14 γ de ácido pirúvico por ml. de sangre y 40 γ para rata en avitaminosis B₁.

Simultáneamente disminuye el consumo de oxígeno por el cerebro de la paloma polineurítica. Esta respiración debilitada del encéfalo va acompañada de una merma del pirofosfato de tiamina en el mismo órgano. La administración de tiamina hace volver todos los valores mencionados a lo normal. (Ochoa y Peters 1938).

Todo lo descrito hasta ahora respecto a los síntomas y lesiones de la avitaminosis experimental se refiere a animales. En el año 1939 aparecieron tres trabajos norteamericanos (Melnick y colaboradores, Joliffe y asociados, Williams y col.), sobre la deficiencia tiamínica experimental en el hombre. Los síntomas aparecen dentro de tres a siete semanas. Pueden resumirse en: fatiga, laxitud, anorexia, dolor precordial, quemazón en las piernas, disnea al hacer un esfuerzo, calambres, palpitaciones, estreñimiento, pérdida de peso, falta o disminución del ácido clorhídrico.

CONSTITUCION QUIMICA DE LA TIAMINA

Jansen y Donath (1926) fueron los primeros en preparar tiamina cristalizada; diez años más tarde Williams aclaró definitivamente su constitución. El mismo año Andersag y Westphal llegaron a la síntesis cosa que también consiguió Williams unas cuantas semanas después.

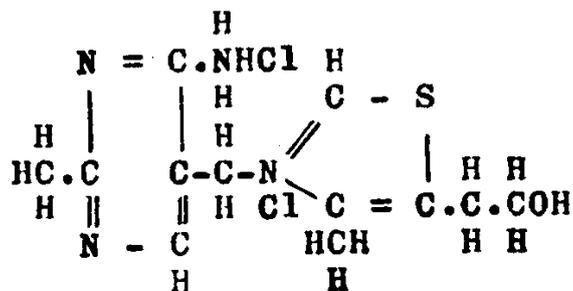
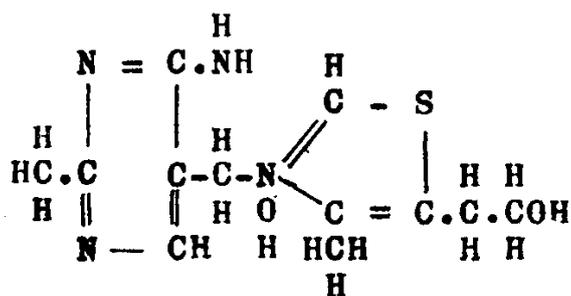
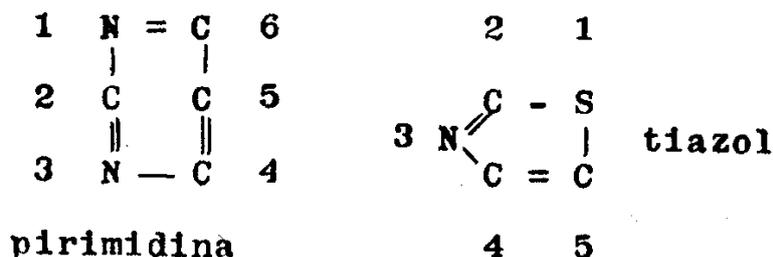
La vitamina B₁ o aneurina o tiamina es una base que no se puede preparar en estado libre. El clorhidrato del cloruro en cambio se fabrica en gran escala. Tal vez hoy, para la preparación de la tiamina pura, nadie usa ya su extracción de la levadura u otros vegetales, sino exclusivamente el procedimiento sintético. La extracción de los productos naturales sigue teniendo una extraordinaria importancia para la preparación del complejo más o menos completo de vitaminas B, es decir, mezclas naturales de tiamina, riboflavina, ácido nicotínico, piridoxina, ácido pantoténico y probablemente otras sustancias desconocidas dotadas de efecto vitamínico. Para obtener por extracción 5 gr. de tiamina se requiere una tonelada de cáscara de arroz blanco. Un kilo de levadura permite extraer desde 0.5 a 1 mg.

A la base libre le corresponde la constitución de una 2—metilo—5 (4—metil—5— β —hidroxietil—tiazol) metil—6—amino—pirimidina.

Las dos funciones básicas de la tiamina son el grupo amino del carbono 6 de la pirimidina y el hidróxido unido al N del tiazol. El clorhidrato del cloruro se formula: 2—metilo—5— (4—metilo—5— β —hidroxietil—tiazolcloruro) metil—6—aminopirimidina—clorhidrato. Se trata de

una pirimidina que por un radical metileno está combinado con una molécula de tiazol. El tiazol parece ser la única sustancia con azufre dentro de un anillo que ha sido hasta ahora encontrada en un producto natural. La pirimidina contiene todavía en posesión 2 un radical metilo y en posición 6 uno amino. El tiazol contiene en el carbono 4 un metilo y en el 5 un etanol.

numeración de los anillos:



Se sabe cuales átomos y radicales son indispensables para la función de esta vitamina. Según las experiencias realizadas hasta ahora, son necesarios:

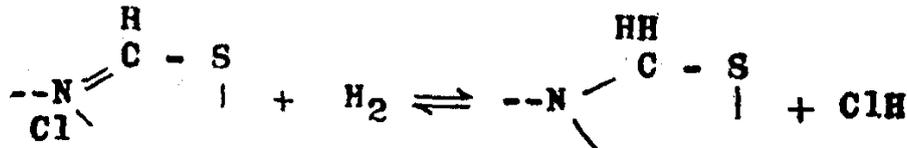
1.º El grupo amino de la pirimidina. Más adelante nos ocuparemos de esta función amina.

2.º El radical oxietilo en el tiazol. Permite la esterificación con el ácido fosfórico.

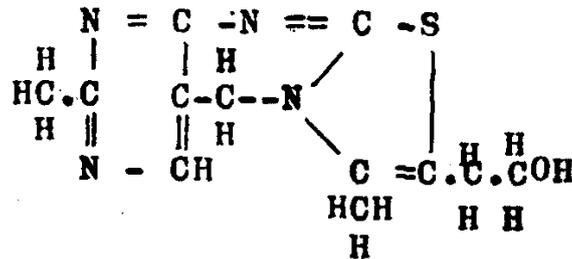
3.º El átomo de H del segundo carbono del tiazol. Su sustitución anula el efecto vitamínico.

Pasaremos a estudiar algunas reacciones de la tiamina. La reduc-

ción por medio de hidrosulfito ($\text{Na}_2\text{O}_2\text{S}_2$) o negro de platino transforma el enlace doble del nitrógeno del tiazol en simple con la entrada de 1 H. Lipman y otros piensan que el mismo tipo de reducción podría ocurrir en las células. Es una transformación reversible, depende del pH y del potencial redox del sustrato.



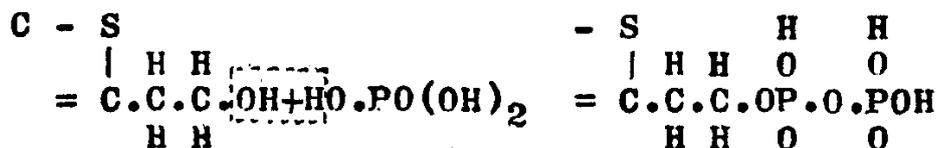
Mayor importancia revisten, actualmente, los resultados de la oxidación. Barger (1935) obtuvo por la oxidación de la tiamina, a reacción alcalina utilizando el ferricianuro potásico, una sustancia de fluorescencia azul rojiza. El mismo producto fué obtenido también por Kinnersley el mismo año. Resultó que esta sustancia fluorescente era idéntica a un cuerpo aislado de la levadura por Kuhn (1935) y denominado tiocromo.



La constitución del tiocromo ha sido determinada y confirma la asignada a la tiamina. El tiocromo, de acuerdo con lo recién expuesto respecto a los grupos que determinan la función vitamínica, carece de tal efecto. Puesto que también a reacción neutra una solución de tiamina se oxida lentamente a tiocromo, no es imposible que el llamado consumo de la tiamina en el organismo sea una destrucción por oxidación.

La tiamina puede dar cuerpos de diazonio, todos de intenso color. Se propusieron hasta ahora las siguientes sustancias para la reacción: el ácido sulfanílico por Kinnersley y Peters (1934), el p-amidoacetanilido por Prebluda y Mc Collum (1936), la dicloroanilina por Willstaedt y col. (1937) y la p-aminoacetofenona por Prebluda y Mc Collum (1939).

La tiamina por su radical alcohólico se esterifica con el ácido fosfórico. Conocemos un ester monofosfórico y un ester difosfórico. Ambas sustancias se hallan en los organismos vegetales y animales. El ester con dos moléculas de ácido fosfórico, el pirofosfato de tiamina, es la forma en que actúa la tiamina en los tejidos animales, es el coenzima de la carboxilasa llamado cocarboxilasa.



Tauber preparó cocarboxilasa pura por síntesis calentando tiamina con ácido fosfórico y pirofosfato sódico a 155°.

En el organismo la esterificación con el ácido fosfórico como la saponificación del pirofosfato de tiamina se efectúa por un mismo enzimo.

La tiamina, tal cual se encuentra en los alimentos, es bastante resistente al calor. Ya Eijkman demostró que el arroz no molido puede ser calentado durante tres horas a 100° sin perder su efecto antineurítico. La cocción casera destruye poco esta vitamina. Las legumbres por el simple hervor pierden un 22 % por destrucción y un 15 % pasa al caldo; así al despreciar el caldo la pérdida puede alcanzar unos 35 % (Aughey, Petersen 1940). La adición de soda o de bicarbonato de soda, muy en boga, aumenta la pérdida. El cocimiento del pan reduce el contenido tiamínico. La pasteurización hace perder entre un 10 y un 38 % de la tiamina total de la leche. El lomo de cerdo al ser asado pierde un 43 %.

El efecto del calor parece variar mucho con la reacción, siendo la ácida favorable a la conservación. La luz parece inofensiva.

La esterilización breve en el autoclave, por ejemplo durante 15 minutos a 110° resulta poco perjudicial. Soluciones de clorhidrato del cloruro de tiamina pueden ser autoclavadas sin pérdida y se conservan estables durante varios meses. Legumbres esterilizadas en recipientes de hojalata pierden poco de su acción de vitamina B₁.

En los alimentos desecados la vitamina parece ser bastante estable. Elvehjem (1838) comprobó en tejidos animales desecados que la pérdida en el transcurso de dos años importaba solamente un 20 %.

La hemina destruye la tiamina, también a reacción ácida. Este descubrimiento de Mahlo es tal vez de importancia para la fisiología y patología.

DETERMINACION CUANTITATIVA DE LA TIAMINA

Cuando intentamos valorar el contenido de tiamina de un alimento o de un tejido o líquido animal, debemos tener presente el alcance del método adoptado. Así verbigracia en una levadura no autorizada, el método de Jansen nos dará solamente un 25 % de lo que arrojará el ensayo de protección con palomas, puesto que tres cuartos de la tiamina total de la levadura existen en estado esterificado con el ácido fosfórico. El método al tiocromo de Jansen determina exclusivamente la

tiamina libre, en cambio el bioensayo da la suma de tiamina libre más fosfatos de tiamina.

Describiremos primero los métodos basados en el experimento con animales o con tejido animal.

I. Método de protección

Es el procedimiento más antiguo. Requiere un gran número de palomas para contrarrestar la gran dispersión de las medidas. Las aves se someten a un régimen carente de tiamina, principalmente a base de arroz pulido, con adición del producto a investigar y se determina la ración diaria del mismo, suficiente para prevenir los síntomas neuromusculares de la avitaminosis B₁. Este método es el más seguro para juzgar el valor de un alimento como fuente de tiamina y derivados activos. Su exactitud aumentó desde que, en lugar del adsorbato en tierra batán, el patrón internacional, se usa la tiamina cristalizada cuyo aprovechamiento por los animales testigos es más uniforme.

II. Método curativo de Kinnersley y Peters (1928)

Se provoca la beriberi en un lote de animales. Cuando la enfermedad es bien manifestada, unas tres a cinco semanas después de haber empezado el régimen carente, se administra por inyección una sola dosis del extrato a probar. En el caso de que el material inyectado tiene efecto de vitamina B₁, los síntomas desaparecen. El peso de la dosis dividido por el número de días transcurridos hasta la reaparición de los espasmos, da la "dosis diaria para palomas" o la unidad paloma. Coward y Morgan hicieron objeciones justificadas al procedimiento. Proponen como mejor método determinar el tanto por ciento de los animales curados. El método de protección tiene su limitación debido a la cantidad considerable de material que requiere, en cambio no exige la preparación de extractos inyectables, operación que puede producir importantes pérdidas de vitamina.

III. Método de la conservación del peso

La conservación del peso corporal de animales adultos o la producción de un crecimiento normal en animales jóvenes es el tercer tipo de evaluación. Se debe a Williams y Seidel (1916), Sherman y Spohn (1918) y Cowgill (1934); y merece menos confianza que los anteriores según se desprende de las observaciones de Jansen y Donath y luego de Waterman y Ammerman (1935). El método lucha con la dificultad de obtener un régimen que no sea carente en cuanto a otras vitaminas necesarias para un crecimiento normal.

Cuando en los bioensayos citados se sustituyen las aves por ratas

no se gana nada. Sin embargo, siempre es conveniente usar dos tipos de valoración biológica, o un procedimiento biológico y uno químico. A medida que conozcamos las vitaminas restantes del complejo B, sin duda los ensayos con aves o ratas podrán ser perfeccionados. Creemos que, a pesar de la gran dispersión y de algunos defectos posibles de las dietas usadas, el método de protección es el más seguro para orientarnos sobre el contenido global de vitamina B₁ de un alimento.

IV. El método de la bradicardia

La rata en estado de avitaminosis B₁ presenta una marcada disminución de la frecuencia del latido cardíaco, como ya dijimos al enumerar los síntomas de esta avitaminosis. Era lógico aprovechar este fenómeno para la determinación de la tiamina. Puesto que a una rata no se le puede tomar el pulso por simple palpación, dada la elevada frecuencia, 500 a 550 pulsaciones por minuto, Birch y Harris (1934) emplean el electrocardiógrafo. El animal se alimenta con una comida carente y cuando el electrocardiograma señala una baja del ritmo cardíaco a 350 se administra una sola dosis del alimento o producto a investigar, según el caso por vía bucal o parenteral. En el caso de que el producto contenga tiamina, el electrocardiograma trazado 24 horas más tarde, indicará un aumento que, según la dosis puede durar varios días hasta caer otra vez a 350, como podrá observarse en los electrocardiogramas tomadas cada 12 horas. Por valoraciones previas con dosis conocidas de tiamina se conoce la relación existente entre contenido tiamínico, elevación de la frecuencia del pulso y la duración de la mejoría. El procedimiento es aplicable a cantidades exiguas de alimento y de ejecución rápida. Su defecto fué señalado por Birch y Mapson (1936), quienes comprobaron que la frecuencia del latido cardíaco depende, no solamente de la riqueza en tiamina, sino también de la concentración de los nucleótidos, especialmente ácido adenílico, presentes en el alimento.

V. La prueba de catatorulina

Se debe a Passmore, Peters y Sinclair (1933). El nombre catatorulina significa efecto catalizador de la torulina, sinónimo de tiamina.

Se funda en que la respiración (oxidación) paralizada del tejido encefálico en la beriberi experimental, debida a la incapacidad de oxidar lactato o piruvato, se restablece rápidamente in vitro por la adición de tiamina o de pirofosfato de tiamina. El método ha sido afinado considerablemente por la misma escuela y en su forma actual permite revelar el efecto de 0'1 y de tiamina en 3 ml. de solución. (O'Brien y Peters).

Trataremos ahora los bioensayos con intervención de vegetales.

VI. La prueba del *Phycomyces*

Schopfer (1935) observó que el hongo *Phycomyces blakesleanus* no se desarrolla en un medio puramente sintético hasta que no se le agrega un poco de vit. B₁. Unos cuantos hongos más, como *Polytoma*, *Mucor*, *Phytophthora* y otros, también necesitan de esta vitamina. Luego el mismo Schopfer y otros, entre ellos Rowland y Wilkinson (1938), demostraron que, dentro de ciertos límites, el crecimiento del hongo es proporcional a la cantidad de tiamina presente. El cultivo del hongo permite la determinación de la tiamina total en alimentos y en los líquidos animales; responde a cantidades ínfimas. Tiene que efectuarse con una serie de testigos; pero aún así algunos autores, v. g. Sinclair, dudan de su especificidad.

VII. Crecimiento del *Staphylococcus aureus*

Las bases del procedimiento son las mismas del recién descrito, con la diferencia de que el producto de la cosecha no se mide con la balanza, sino con el nefelómetro. Sus autores, West y Wilson (1938), le atribuyen una sensibilidad extraordinaria y sostienen que existe una proporcionalidad satisfactoria entre la concentración de la vitamina y el desarrollo de los estafilococos.

VIII. El cultivo del *Propionibacterium*

Silverman y Werkman (1939) utilizan el *Propionibacterium pentoseaceum*. Con la adición de tiamina el metabolismo anaerobio del piruvato aumenta. Es un método poco recomendable, puesto que los referidos microbios pueden ser educados a sintetizar la tiamina.

IX. La prueba de fermentación

Schultz, Atkin y Frey (1937, 1938), comprobaron el efecto estimulante de la tiamina sobre la fermentación alcohólica. El método se basa en la medida del CO₂ producido. El procedimiento fué ampliamente confirmado por Heyns (1939) en los laboratorios de Merck. Da el valor conjunto de la tiamina y esteres de la tiamina. A su gran sensibilidad agrega la ventaja de que los líquidos animales, jugos de órganos, harinas, etc., pueden ser examinadas sin tratamiento previo.

X. Método de Ochoa y Peters

Ochoa y Peters (1938) descubrieron que la tiamina estimula, en pre-

sencia de cocarboxilasa, la decarboxilación del ácido pirúvico por la levadura lavada, fuente de la carboxilasa. Este hecho, teóricamente permite determinar tanto la tiamina como la cocarboxilasa; prácticamente, se usa para la segunda. Goodhart y Sinclair lavan una levadura desecada para quitarle la tiamina y el pirofosfato de tiamina, dejándole la carboxilasa. A una cantidad fija de esta levadura agregan tiamina y ácido pirúvico en concentración constante y por último el líquido a analizar, generalmente la sangre. El CO₂ desarrollado en media h., medido con el aparato de Warburg, está en relación con la cantidad de cocarboxilasa presente en la sangre. Para cada partida de levadura seca, en experimentos previos con cantidades conocidas de cocarboxilasa pura, se determina el factor a emplear en el cálculo.

El fenómeno de Ochoa y Peters tal vez se explica por la protección que ejerce la tiamina sobre la cocarboxilasa contra la destrucción de ésta por la fosfatasa.

Algunas de las reacciones químicas señaladas se prestan para la determinación química de la tiamina; son la oxidación a tiocromo y las reacciones de diazo.

XI. El método al tiocromo

Fué dado por Jansen (1936). La tiamina se oxida a reacción ácida por medio del ferricianuro potásico a tiocromo. Este se extrae con isobutanol; el extracto se coloca debajo la luz ultravioleta, obtenida por filtración de una lámpara de mercurio, y se compara su fluorescencia con la de un patrón. El método experimentó muchas pequeñas modificaciones. Es aplicable a los alimentos y a los tejidos y líquidos del organismo. Con la orina es difícil, debido a la presencia de una sustancia de fluorescencia azul verdosa que en proporción variable pasa también al isobutanol.

El método de Jansen valora únicamente la tiamina libre, no sus ésteres fosfóricos, dado que éstos, a pesar de dar la reacción de tiocromo, no pasan al isobutanol. Cuando previamente se hidroliza la cocarboxilasa por la fosfatasa de un extracto renal, la técnica de Jansen da la tiamina libre más la de sus ésteres fosfóricos.

XII. El método diazo

De las reacciones al diazonio, propuestas para la colorimetría de la tiamina, goza de mayor reputación la con la p-aminoacetofenona, publicada por Prebluda y Mc Collum. Según Melnick y col. (1940), que la aplicaron a la orina, determina solamente la tiamina. Para evaluar también la cocarboxilasa, saponifican ésta previamente, con fosfatasa de levadura.

FUENTES DE LA VITAMINA B¹

La primera investigación sistemática sobre la distribución de la tiamina en los diversos alimentos se debe a Cooper (1912) que trabajó con el método preventivo en palomas. Desde aquel tiempo una serie de investigadores amplió y profundizó nuestros conocimientos al respecto. Los resultados principales son los siguientes: La tiamina se encuentra en todos los alimentos naturales con una sola excepción, la miel. Es sintetizada por las plantas superiores y por algunos microorganismos. En los demás microbios parece ejercer la función de vitamina como en los animales. De los animales hasta ahora investigados al respecto, ninguno sintetiza la tiamina. Los herbívoros la ingieren con las plantas y la almacenan en escasa proporción. La flora del tracto digestivo puede tener importancia como fuente de vitamina B₁. Mc Elroy demostró un aumento considerable de las vitaminas siguientes en la panza de la oveja: tiamina, riboflavina, ácido pantoténico y piridoxina. Sin duda son elaboradas por algunas de las especies de microbios que se encuentran en cantidades enormes en dicho estómago. Bessau y Reichelt sostienen que el *B. bifidus* en el colon del niño, también sintetiza tiamina. La cuestión es si esta tiamina puede ser aprovechada todavía por el organismo humano o si se pierde con los excrementos. Para determinar la relación entre ingreso y salida de tiamina el hecho, tal vez, no es despreciable.

El organismo del herbívoro representa pues, la fuente de tiamina para el carnívoro.

Para el hombre, generalmente omnívoro, las fuentes principales son: los granos de los cereales, las semillas de unas cuantas leguminosas como lentejas, porotos, chícharos, maní, frijoles (alubia), la yema de los huevos, la carne. Se destaca la carne del cerdo por su especial riqueza en tiamina, contiene alrededor de 7 veces más que la del bovino.

Aunque la leche de vaca en estado crudo no pertenece a los alimentos ricos en tiamina, contiene unos 300 γ por 1 l. Una persona que diariamente bebe medio litro satisface, aproximadamente, un tercio de su necesidad diaria (Cowgill). La leche de mujer contiene unos 100 γ por l. (Macy y col. 1927; Neuweiler 1938).

Las legumbres las hemos incluido entre las fuentes principales. A este respecto debemos dar más detalles. Legumbres ricas en tiamina son aspáragos, alcachofas, puerros, pastinacas (chirivías). Son bastante pobres los nabos, las cebollas y las patatas, tomates y otras frutas ácidas, 300 a 600 γ por kg.

En vista de la verdadera riqueza tiamínica de los cereales por un lado y la poca pérdida causada por la cocción por el otro, uno podría concluir que el pan representa nuestra principal fuente de vit. B₁. Sería un error. El grano del trigo al llegar a la molienda contiene alrededor de 3000 γ de tiamina por kg. junto con otras vitaminas importantes, especialmente tocoferol. La harina elaborada contiene solo 400 γ por kg. La ha-

rina transformada en pan, a pesar de la adición de la levadura, no contiene más de unos 300 γ p. kg., más o menos la décima parte del valor original.

TABLA DE SCHEUNERT

100 g. de pan de trigo, aprovechamiento del grano total	210 γ tiamina
" " " " " " " " " " " 82 % del grano	140
" " " " " " " " " " " 75 " " "	50
" " " " " " " " " " " 60 " " "	30

Algo parecido ocurre con el arroz. El proceso industrial llamado el pulido priva al arroz de una película plateada, el pericarpio, y con éste de la mayor parte de su tiamina.

Los progresos en la industria molinera y la preferencia que el público da a la harina blanca, con verdadera pérdida del instinto, causa un desperdicio de vit. B₁ de importancia sanitaria y económica para un país. Por otra parte, la inclusión creciente de azúcar y de almidón puro en el régimen del hombre civilizado, causa una necesidad mayor en tiamina. En muchos hogares por la obligación de economizar tiempo o simplemente por razones de comodidad, aumenta el consumo de legumbres y frutas conservadas. Todos estos factores en su conjunto constituyen la causa de que también en las poblaciones blancas y de situación económica holgada muchos individuos están cerca o ya dentro de una ligera hipovitaminosis tiamínica.

ABSORCION Y ALMACENAMIENTO

La absorción en el tracto digestivo debe ser fácil, ya que la tiamina libre, como el fosfato y pirofosfato, es muy soluble en el agua. Aunque la solubilidad en el agua no es el único determinante de la absorción por el intestino, la observación in vivo confirma la conclusión. En los alimentos naturales influye también la naturaleza del tejido en que la vitamina se encuentra encerrada. Así la vitamina de un glóbulo rojo es más accesible que la de una célula vegetal con membrana de celulosa ya incrustada.

Según Kasahara (1938) la tiamina aplicada en forma de pomada sobre la piel cura la polineuritis de la paloma, a veces ya en 24 h., lo que demuestra su rápida absorción. Por vía subcutánea, intramuscular, etc., la tiamina se aprovecha rápidamente.

La presencia de la tiamina en la sangre lógicamente despertó un extraordinario interés por parte de los clínicos.

Daré ante todo los resultados de Goodhart y Sinclair (1940). Según los autores citados, la tiamina existe en el plasma en estado libre y, además, en los glóbulos rojos y blancos como cocarboxilasa. Los valores de la tiamina libre en el plasma son sumamente bajos: 1 γ por 100 ml o

menos, en personas normales. Cocarboxilasa no existe en el plasma. Puesto que la hemolisis más ligera inmediatamente hace pasar cocarboxilasa al plasma, Goodhart y Sinclair opinan que actualmente no existe un procedimiento exacto para la determinación de la tiamina libre en el plasma. Los mismos autores evalúan la concentración de la tiamina total con el procedimiento biológico de Meiklejohn y la de la cocarboxilasa por el propio, basado en la estimulación de la decarboxilación del ácido pirúvico por medio de la tiamina, ya mencionado al enumerar los métodos.

La tiamina libre que circula por la sangre y que difunde fácilmente, pasa al líquido intersticial de los tejidos, al líq. cefalorraquídeo, a la orina y a las células del organismo donde tiene lugar la esterificación con el ácido pirofosfórico, es decir, la transformación en cocarboxilasa. En individuos normales, la concentración de la cocarboxilasa de la sangre total va paralelamente con la de la tiamina total de la misma. En general, la concentración de la cocarboxilasa marcha también paralelamente al grado de saturación tiamínica de los tejidos y es, en consecuencia, una medida del grado de saturación del organismo. Las excepciones son representadas por casos de un aumento considerable de los glóbulos rojos o blancos, con los cuales sube también la concentración del pirofosfato de tiamina de la sangre. Se trata de policitemias verdaderas y leucemias mieloides. Goodhart y Sinclair escriben textualmente: "La inclusión de toda la cocarboxilasa dentro de las células de la sangre disminuye grandemente el valor de la determinación de la tiamina total de la sangre o la de la cocarboxilasa para investigar la presencia o ausencia de un déficit de B₁ en todo individuo con una discrasia sanguínea. Así un individuo con una leucemia mieloides, con unos 200.000 o más leucocitos por mm³, puede arrojar un valor tiamínico global de su sangre seis veces superior al normal, aunque el nivel tiamínico del plasma puede ser muy inferior a lo normal y el individuo puede padecer actualmente de una carencia tiamínica. Inversamente, una persona con anemia y leucopenia pronunciada puede tener un valor subnormal de la tiamina total de la sangre, con un nivel normal del plasma y con ausencia de síntomas relacionados a una deficiencia de vit. B₁. Huelga decir que, en personas que recientemente recibieron grandes dosis de tiamina con fines terapéuticos, la determinación de la cocarboxilasa tampoco da resultados comparables con los valores normales. Estos son 4'5 a 10 y de cocarboxilasa por 100 ml. de sangre, promedio 7 indistintamente para niños y adultos.

Presencia en el líquido cefalorraquídeo. Tenemos análisis por Säker, por De Caro y Buttuvini (1940) y por Sinclair (1939). Este último da, como promedio de 272 muestras, 0'5 γ por 100 ml. habiendo encontrado desde 0 hasta 1'3 y de la tiamina libre. Un líquido cefalorraquídeo con mayor cantidad de células contiene también más tiamina.

Almacenamiento por los diversos órganos

Ya Osborne y Mendel (1923) observaron que el hígado de ratas normales contiene cantidades importantes de vit. B₁ y que, en los animales sometidos a la carencia tiamínica, dicho depósito se agota rápidamente. Nuestros conocimientos actuales pueden resumirse en esta forma: La tiamina es almacenada, pero en cantidad relativamente pobre, aunque haya ingestión abundante. Un régimen sin tiamina agota todos los órganos más o menos en 5 semanas, con excepción del encéfalo. El segundo hecho importante es que los diversos órganos acumulan la tiamina en proporciones muy diferentes. Según Leong (1937), que analizó ratas, la concentración máxima se encuentra en el corazón, 6'75 γ/g, luego en el hígado 6'5, y músculo 1'5. Esto significaría que la rata saturada contiene en el hígado el 35 y en la musculatura el 50 % de su acervo tiamínico. Los resultados anteriores de Westenbrink (1932) y de Brodie y Mc Leod (1935) esencialmente coinciden con los de Leong. También el sistema nervioso central deposita tiamina en cantidad importante (Leong 1937, Säker 1940), tanto en forma de la tiamina libre como de la cocarboxilasa. En la avitaminosis la concentración de la cocarboxilasa en el cerebro disminuye.

EXCRECIÓN RENAL E INTESTINAL

1. La Excreción renal

Muckenfuss (1918), experimentando con palomas, obtuvo efecto de tiamina al agregar orina recién filtrada al régimen. Concluyó que con la orina se excreta tiamina. Investigaciones posteriores confirmaron ampliamente el resultado de Muckenfuss. Según Melnick y Field (1939) se elimina por la orina exclusivamente tiamina libre, de modo que los valores obtenidos con los diversos métodos aplicables deberían coincidir. No obstante, al confrontar los resultados de las publicaciones, más recientes encontramos discrepancias muy grandes. Algunos ejemplos: Robinson y col. (1940), que consideran la excreción urinaria de la tiamina como un buen indicador de la suficiencia de un régimen respecto a la vitamina B₁ anotan, en condiciones normales de dieta y salud, 90 o más γ en 24 horas para el hombre y 60 o más para la mujer. Los valores correspondientes a un ingreso deficiente son 66 y 43 respectivamente. Tres enfermos de la beriberi de los alcoholistas excretaron cantidades anormalmente bajas. Westenbrink y asociados, usando el método al tiorcromo consideran como normal 100 γ y más en 24 horas. Gaethgens con el mismo método fija como normal 100 a 200 γ y valores inferiores a 100 como sospechosos de carencia. Harris y col. (1938) dan 50 γ por día, en personas alimentadas pobremente 20 γ, en personas afectadas de beriberi 5 γ, usando el procedimiento de la bradicardia. Schultz,

Light y Frey (1937) con su método de fermentación obtienen para el adulto $497 \pm 47 \gamma$ por día, para los niños $333 \pm 60 \gamma$. Schroeder y Benacchio (1939) dan, como normal desde 100 a 400 γ . En varios enfermos anotaron valores desde 0 hasta 100 γ por día.

La cuestión no se resuelve por la indicación de promedios, como la encaran algunos autores, sino por la determinación de los valores límites con determinada técnica, en personas que han sido exploradas minuciosamente y cuyo régimen también ha sido analizado en cuanto a la riqueza global de vit. B₁.

En analogía a las investigaciones sobre el estado de saturación con el ácido ascórbico, unos cuantos clínicos hicieron experimentos de recargo. Algunos ejemplos pueden ilustrarlo. Los recién citados Schroeder y Benacchio inyectaron 5 a 10 mg. en la vena y observaron un ascenso de la excreción renal, valores desde 3 a 9 mg. en los sanos, e inferiores a 3 mg. en los enfermos. Ritsert (1937, 1938) comparó las excreciones obtenidas en cargas por vía digestiva y parenteral. De la tiamina ingerida aparece un 30 % en los excrementos, en la orina solo 4 a 6'5 %. El resto, casi el 60 % debe haber sido consumido por el organismo. Después de la introducción parenteral se halló un 25 % en la orina, la mayor parte dentro de 2 horas. La eliminación con las materias fecales no aumentó de un modo apreciable. Schultz y col. (1937) en sus pruebas de carga, observaron un ascenso de la tiamina urinaria, pero, a pesar de aumentar la dosis, hallaron que se establecen valores urinarias constantes. Los autores no pueden explicar el fenómeno. Rechazan un supuesto almacenamiento en los tejidos. En cambio admiten una mayor excreción intestinal y piden para las pruebas de recargo la determinación en la orina y en las deyecciones. v. Drigalski (1939) no reconoce valores normales para los ensayos de carga; supone una destrucción endógena de importe fluctuante.

2. La excreción intestinal

En 1914 Cooper, por bioensayos, demostró la presencia de vitamina B₁ en extractos alcohólicos de las materias fecales. La existencia de tiamina en las deyecciones fué ampliamente confirmada. ¿Cómo debe interpretarse este hecho? Existen las siguientes posibilidades:

1) La tiamina encontrada pertenece a los alimentos, habiendo escapado a la absorción.

2) La mucosa intestinal excreta tiamina como elimina v. g. Ca.

3) La tiamina del contenido del intestino grueso ha sido sintetizada por microbios intestinales. De la síntesis de la tiamina por microorganismos del tracto digestivo ya hemos hablado. Poco queda para agregar. Las ratas sometidas a un régimen sin tiamina se mantienen sin los síntomas de la hipovitaminosis, cuando se les permite la coprofaia. La síntesis es atribuida especialmente a microbios es-

porulados, habitantes del intestino grueso, sobre todo del ciego. La tiamina sintetizada por los bacilos forma parte del cuerpo microbiano y no es directamente accesible a la rata que la pierde con la salida de las materias fecales (Abdel-Salaam, Peng Chong Leong 1938). Pero cuando la construcción de la jaula no impide que los animales, guiados por su instinto, coman sus excrementos, los microbios son digeridos y la tiamina sintetizada por ellos puede ser aprovechada, con lo que la avitaminosis no se produce.

Lo más probable es que una síntesis de vitamina B₁ se efectúe también por la microflora del intestino grueso humano. Naturalmente, esta tiamina difícilmente puede ser aprovechada por el hombre. La cantidad sintetizada, probablemente, varía con el régimen y la flora y no vemos por el momento cómo separar la cantidad correspondiente a la no absorbida, de la tal vez excretada por la mucosa y de la sintetizada por los microbios. Esta situación, a mi parecer, resta mucho y tal vez todo valor a la determinación de la tiamina fecal para la investigación de un estado de deficiencia o de saturación.

LA NECESIDAD DIARIA

Ya hemos dicho que el hombre civilizado a pesar de una alimentación calóricamente no sólo suficiente sino a menudo abundante, con frecuencia no ingiere tiamina en la proporción necesaria. Tisdall (1935) a base de sus investigaciones llega a la conclusión de que más de la mitad de los alimentos en el régimen corriente de los norteamericanos no contiene cantidades apreciables de vitamina B₁. También en los países europeos, según las investigaciones de Schroeder y Wittmann, Daker, Scheunert, la ingestión de tiamina por importantes capas de la población, apenas sobrepasa la dosis mínima. Así en todas las situaciones que requieren una mayor provisión de esta vitamina, infancia, trabajo muscular intenso y cotidiano, prevalencia de los carbohidratos en la alimentación, estado morbosos, tal vez también el embarazo y la lactación se puede producir fácilmente cierta carencia.

El estudio más completo sobre la exigencia del organismo humano referente a la tiamina se debe a Cowgill. Sus resultados pueden resumirse en 2 puntos:

- 1) El mínimo diario varía para el mismo individuo según las condiciones de su metabolismo (reposo, trabajo, composición del régimen).
- 2) El mínimo diario varía de un individuo a otro. Cowgill dió la fórmula $m = p \cdot c \cdot 0'00568$, donde m es mínimo necesario; p, peso corporal; c, calorías necesarias; 0'00568, una constante.

Así, un adulto generalmente requiere entre medio mg. y 1 mg. por día, aunque dicha cantidad no sea suficiente en todos los casos. Por ejemplo Baker y Wright comprobaron beriberi en individuos que probablemente ingirieron más de 1 mg. de tiamina. Considero especialmente interesantes los estudios de los mismos en colaboración con Drummond

(1937). Llegaron al resultado de que la mayor parte de la población de Inglaterra hace un siglo, con inclusión de las personas encarceladas y enroladas en el ejército o la marina, ha tenido un ingreso tiamínico mucho más alto que la población actual. Esto sin contar las cantidades considerables de cerveza que en aquel tiempo se tomaban, y que probablemente presentaban un valor alimenticio y vitamínico más favorable que la elaborada actualmente, exenta de tiamina.

Ya hemos señalado que mucho hidrato de carbono aumenta la necesidad de tiamina, también que las grasas ejercen un efecto economizador respecto a la tiamina, hecho demostrado por Evans y Lepowsky (1929), y en nuestra opinión definitivamente comprobado y explicable por las diferencias que existen entre la oxidación de la glucosa y la de los ácidos grasos. Hay, relacionado con esto, un trabajo de Cowgill. Este investigador, con los experimentos en animales, determinó la tiamina de la axungia y la manteca, resultando los valores importantes de 1 hasta 1'5 mg. por kg. Por razones de solubilidad es bastante sorprendente que dichas grasas contengan tanta tiamina. Cowgill supone la presencia de la tiamina combinada con otra sustancia que la haga liposoluble. No admite atribuir los efectos vitamínicos como economía de tiamina causada por la grasa. El análisis químico de la manteca respecto a su contenido tiamínico tal vez permitiría dilucidar la cuestión en forma terminante.

El requerimiento durante el embarazo y la lactación. Los ensayos con ratas demuestran que las hembras preñadas necesitan de 3 a 5 veces la dosis mínima para llevar la gestación a buen término. Más o menos lo mismo sucede durante el amamantamiento. En la mujer la situación es menos clara. Los investigadores americanos opinan que hipovitaminosis B₁ es frecuente durante el embarazo y el periodo de lactación. Los vómitos de las embarazadas sin duda favorecen la carencia tiamínica. Algunos quieren ver en los vómitos de las embarazadas un síntoma de esta hipovitaminosis. En el caso de que esta opinión se confirmara, habría otro círculo vicioso. La hipovitaminosis causaría o, por lo menos, favorecería los vómitos y estos aumentarían la deficiencia en tiamina. También las neuritis a observar con cierta frecuencia en las embarazadas y que después del alumbramiento suelen desaparecer, son consideradas de origen probablemente hipovitamínico, principalmente de la tiamina. Los efectos terapéuticos obtenidos con tiamina por Schultze (1938) y otros son favorables a esta hipótesis.

Luego existe una serie de observaciones respecto a una excreción urinaria disminuída durante el embarazo y la lactación, por ejemplo Westenbrinck, Goudsmit (1938) y Stähler (1938). Neuweiler (1939) con el método de carga (inyección intramuscular de 10 mg.), considera como normal en las embarazadas una retención del 70 % en las 24 horas siguientes. Basándose en este valor notó disturbios del recambio tiamínico en un 16 % de los embarazos normales, en el 40 % de los anormales,

en el 62 % de las madres en lactación y en el 100 % de las mujeres con el llamado riñón del embarazo.

Daremos a continuación algunas observaciones que aconsejan una reserva mayor en la aceptación de una carencia de tiamina en los estados mencionados.

Werner (1939) determinó la excreción urinaria; además empleando el ensayo de carga, llegó al resultado de que las embarazadas alimentadas corrientemente no presentan ninguna hipovitaminosis B₁. Gaethgen (1939), un clínico que hace años trabaja sobre hipovitaminosis, no reconoce la necesidad de un aumento de tiamina, ni en el embarazo, ni en el alumbramiento. Guhr (1939) encuentra en sus embarazadas valores de tiamina inferiores a lo normal; pero no comprueba ningún síntoma de hipovitaminosis. Opina que a base de la excreción no se puede diagnosticar una hipovitaminosis B₁. Insiste que, en unos cuantos enfermos graves con una alimentación casi exenta de tiamina, no pudo observar síntomas de esta carencia y concluye que a menudo se exagera el peligro de una hipovitaminosis B₁.

Nuestra impresión global es que las observaciones en la mujer no contradicen los primeros resultados obtenidos en el estudio de las ratas, es decir que el organismo materno necesita más vitamina B₁ y que, en consecuencia, está más expuesto a adquirir un estado de carencia de esta vitamina. Nos ha llamado la atención que, con respecto a la demanda de vitaminas, también de A y C, en Alemania en los últimos años se manifieste una corriente de duda especialmente condensada en el rechazo de los mínimos vitamínicos indicados por los autores norteamericanos y británicos. Esto nos impresiona un poco a ciencia dirigida. Pero también reconocemos que el auge de las vitaminas es un poco cuestión de moda clínica, como lo era vg. el pH.

Hemos resumido nuestros conocimientos sobre la cantidad considerada como mínima, es decir los valores que evitan la hipovitaminosis. La cantidad óptima es una cuestión distinta, hasta ahora apenas estudiada. Knott (1936) comparó las curvas de crecimiento de niños, notó el óptimo de crecimiento cuando las criaturas reciben 1|10 mg. por kg. de peso corporal, lo que sería un múltiplo de la dosis mínima. Ya autores anteriores, Dennett (1929), Hóobler (1931), Ross y Summerfeldt (1935) y posteriormente Eddy y Dalldorf (1937) insisten sobre la influencia favorable ejercida por la tiamina en el desarrollo de los niños. Además, está generalmente reconocido que el beriberi es mucho más frecuente en la infancia que en las edades siguientes.

LA HIPERVITAMINOSIS

Debemos distinguir entre la administración peroral y la parenteral. Moll (1935) con la inyección intravenosa, intraperitoneal y subcutánea de medio cm³ de una solución al 1:1000 no observó trastorno alguno en

las ratas. Cuando dió la misma cantidad de una solución al 5:1000 por vía intravenosa, observó una ataxia transitoria. El año siguiente Molitor y Sampson, en una larga serie de experimentos con ratones, ratas, conejos y caninos, anotaron como dosis letal por vía intravenosa, 125, 250, 300 y 350 mg. por kg. de peso corporal respectivamente. En la aplicación subcutánea la dosis letal era 6 veces mayor. Cantidades inferiores a las citadas se toleraron sin síntomas, con excepción de los cobayos y de las ratas que presentan una irritación local en la cutis y subcutis.

Sure (1937), luego Perla y Sandberg (1939) observaron en las ratas tenidas con una alimentación normal, disturbios de la reproducción y de la lactación después de la administración diaria de 100 o más γ de vitamina B₁. Los efectos tóxicos de la tiamina fueron anulados por la administración diaria de 2 mg. de manganeso. A su vez, la sola administración de la mencionada dosis de Mn también provocó trastornos de lactación.

Hecht y Weese notan efectos tóxicos (hiperglicemia) cuando al ratón le dan más de 100 mg. de tiamina por kg. Los macacos con 600 a 700 mg. por kg. presentan una respiración acelerada y cianosis. Reposición en 6 a 8 h.

En resumen: la tiamina por vía parenteral prácticamente, no es tóxica en vista de la enorme distancia entre la dosis eficaz y la peligrosa.

En la administración peroral los ya citados Colitor y Sampson comprobaron una dosis letal, 40 veces mayor que la intravenosa para los animales de experimentación. Respecto al hombre existen las observaciones de Vorhaus, Williams y Waterman (1935) según las cuales dosis hasta 90 mg., no producen el menor efecto nocivo. Luego Weiss y Wilkins (1937) dieron 50 mg. por día, a veces hasta 130 mg., sin ningún síntoma de intoxicación.

Especialmente interesante era saber, cómo se efectúa la biooxia cuando se ofrecen al organismo grandes dosis de tiamina. Resultó que 25 mil veces la dosis mínima diaria no acelera la combustión.

RELACION CON OTRAS VITAMINAS

Se ha escrito bastante sobre posibles sinergismos entre las diversas vitaminas; pero los hechos comprobados parecen pocos y su interpretación es discutible. En cuanto a la tiamina parece que no existe ningún verdadero sinergismo ni antagonismo con el axeroftol (Scheunert 1938; Gerszonowicz 1938). Lo que hay es, según un descubrimiento reciente de v. Euler y Högberg, un síntoma común en ambas avitaminosis: el aumento de la concentración del ácido pirúvico en la sangre. Las ratas alimentadas 12 días sin axeroftol tienen 42 γ /ml. y con una carencia de 20 días llegan a 60, siendo lo normal 12 a 13 γ ml. Se restablece el

nivel normal por la administración de caroteno o por dosis de tiamina muy superiores al mínimo diario. La explicación la ve v. Euler no en una posible catálisis de la respiración de los tejidos, sino en la disminución de la absorción de la tiamina, debida a las lesiones epiteliales, características de la avitaminosis A.

Las siguientes observaciones establecen relaciones con el ácido ascórbico. Según Melka (1939) las ratas que perecen por inanición presentan en sus órganos un contenido normal de ácido ascórbico, mientras que las ratas afectadas de la avitaminosis del complejo B ostentan una merma del ácido ascórbico hepático que alcanza 50 hasta 70 %. Kasahara y col. anotan un aumento del crecimiento por la tiamina al administrar simultáneamente ácido ascórbico. A la inversa, la tiamina tiene un efecto protector sobre los cobayos sometidos a un régimen escorbútico. Concluyen los autores que tiamina y ácido ascórbico obran sinérgicamente. Resultados semejantes fueron publicados por Stöger (1939); cobayos escorbúticos mejoran cuando reciben tiamina adicional y especialmente cuando con la tiamina reciben una dosis submínima de ácido ascórbico. Finalmente sostiene que un régimen carente de ácido ascórbico produce síntomas parecidos a los de la beriberi. No pudimos leer el trabajo en original, por eso no nos atrevemos a comentarlo.

EL MECANISMO DE SU FUNCION

Repetidas veces hemos señalado que la abundancia de hidratos de carbono en el régimen de carencia tiamínica facilita la producción de la avitaminosis B₁. Funk, que conocía este hecho, ya en 1914 sostenía que la tiamina de algún modo debía intervenir en el metabolismo de los azúcares. Pero recién Kinnersley y Peters (1929) observaron la acumulación de ácido láctico y luego de ácido pirúvico y de metilglioxal, en el encéfalo de los animales con beriberi experimental. En la combustión de la glucosa, normalmente aparece el ácido pirúvico como surge el ácido láctico en el hendidamiento fermentativo, es decir anaerobio, de la glicolisis. El metilglioxal o aldehído pirúvico es un producto de reducción del piruvato. No vamos a tratar la serie más o menos larga de reacciones que tienen lugar desde la fosforolisis del glicógeno, a través de los trisafosfatos y del fosfoglicerato, hasta la formación del piruvato. Poco importa, para el problema de hoy, saber como se llega hasta esta sustancia. El ácido pirúvico se halla difícilmente en el cerebro normal, dado que, inmediatamente sigue el camino de la combustión total y, en consecuencia no llega a acumularse en cantidad suficiente para permitir una investigación fácil. En cambio en la avitaminosis tiamínica, justamente en esta etapa del camino, la oxidación queda interrumpida y el piruvato se concentra.

Más tarde los estudios fundamentales de Passmore, Peters y Sinclair (1933) revelaron el segundo hecho básico en la explicación del

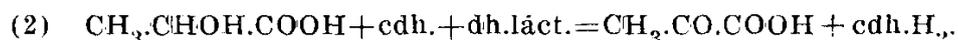
mecanismo de acción de la tiamina. Constituye la ya descrita prueba de la catatorulina: tejido encefálico de una paloma normal, suspendido en una solución de piruvato o lactato, no aumenta el consumo de oxígeno por la adición de tiamina. En cambio, el mismo tejido procedente de animales en avitaminosis B₁ sometido a iguales condiciones aumenta considerablemente su respiración, puesto que, gracias a la tiamina agregada, puede proseguir la oxidación detenida en el piruvato. Por la labor de numerosos investigadores quedó demostrado ampliamente tanto en palomas y ratas como en personas, que la acumulación de las mencionadas sustancias, sustancias fijadoras de sulfito, debe ser considerada como causa principal de la disfunción y de las lesiones en la avitaminosis B₁.

Queda ahora a preguntar: ¿por qué la oxidación del ácido pirúvico no puede hacerse? La contestación deriva del tercer hecho básico, el descubrimiento de Lohmann y Schuster (1937) de que el pirofosfato de tiamina tiene el efecto de coencimo de la carboxilasa, es decir es la cocarboxilasa. En la fermentación alcohólica la glucosa, o mejor el glicógeno, a través de á. gliceraldehidofosfórico y á. dioxiacetontofosfórico se transforma en á. fosfoglicérico, luego en fosfopirúvico y finalmente en pirúvico. Luego la carboxilasa en colaboración con su coencimo, el pirofosfato de tiamina decarboxila, es decir, descompone la molécula de piruvato en etanal y CO₂. Lógicamente se esperaba que, en la bioxia animal, la tiamina desempeñara el mismo papel de cocarboxilasa. Efectivamente Ochoa y Peters (1938) comprobaron la síntesis de cocarboxilasa a base de tiamina por el tejido cerebral de la paloma polineurítica así como la decarboxilación del piruvato. En el encéfalo normal de paloma se encuentran 4 γ de cocarboxilasa por g., y solo cantidades despreciables de la tiamina libre y del monoéster. Esto quiere decir que la tiamina del cerebro actúa en forma de cocarboxilasa. También en otros tejidos quedó demostrada la presencia de la cocarboxilasa y su capacidad de esterificar la tiamina con el á. pirofosfórico. Dicho sea de paso que nuestros conocimientos respecto a la decarboxilación encimática por los organismos tenfan, hasta hace poco, un claro muy grande: conocíamos bien el coencimo; pero nada sobre el encimo, la carboxilasa misma. Ahora Green y col., este año consiguieron extraer de la levadura la carboxilasa misma, la proteína específica o el apoencimo en la terminología de v. Euler. La carboxilasa trabaja con iones de Magnesio. Este cation puede ser sustituido por Mn, Fe, Ca, Cd, Zn y Co. Los cationes monovalentes y trivalentes son ineficaces. El sistema encimático entero, holoencimo de v. Euler, contiene 0'46 % de pirofosfato de tiamina y 0'13 % de magnesio. 1 mg. cataliza la formación de 12.100 microlitros de CO₂ por hora a 30°. Una molécula de la cocarboxilasa cataliza la decarboxilación de 840 moléc. de á. pirúv. por mín. a 30°.

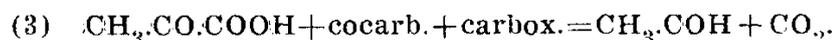
La cantidad de ácido láctico y de metilglioxal que puede acompañar al piruvato no interesa mayormente en nuestro problema. Es el a. pirú-

vico el que ocupa la posición central, un lugar casi único en el catabolismo, especialmente de los glúcidos, dándole su función quetona una afinidad notable. El problema principal es la decarboxilación del á. pirúvico, puesto que el lactato y el metilglioxal se oxidan fácilmente a á. pirúvico:

(1) $\text{COH.CO.CH}_3 + \text{H}_2\text{O} + \text{cdh} + \text{dh. ald. pir.} = \text{COOH.CO.CH}_3 + \text{cdh.H}_2$.
 metilglioxal con agua bajo la acción de la dehidrogenasa y codehidrogenasa (cdh) da á. pirúv. y codehidr. reducida. Con el á. láctico ocurre la oxidación por medio de la dehidrogenasa láctica:

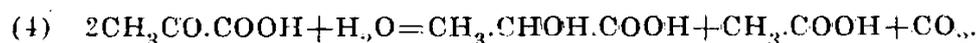


En la fermentación por la levadura el á. pir. es decarboxilado a etanal (acetaldehído) y anhídrido carbónico; es una rotura de la molécula según la ecuación:



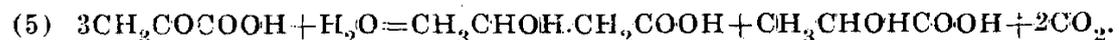
En la fermentación alcohólica el etanal se reduce a etanol. En el organismo animal este tipo de decarboxilación tiene poca importancia siendo señalada solamente para el miocardio por Simola y Kallis. En el animal el á. pir. es decarboxilado y oxidado por el O_2 o es dismutado. A pesar de que estas reacciones son mucho más complicadas que la ecuación (3), Stern admite apoyándose en experimentos, que en todas interviene el pirofosfato de tiamina como coencimo. Veremos ahora las más importantes reacciones descriptas.

La dismutación se hace en el cerebro según la ecuación de Krebs (Long):

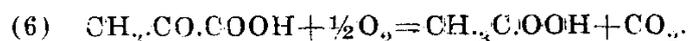


Interviene según Lipmann una batería de encimos: corarboxilasa, carboxilasa, las dehidrogenasas pirúv. y láct. y un flavencimo.

También en el testículo de la rata un 70 % del á. pirúv. total reacciona según el esquema de Krebs, dando 39'7 % de CO_2 y 35'5 % de á. acético. Para el músculo Krebs indica la dismutación siguiente: tres moléculas de á. pir. más una de agua dan á. 3-oxibutírico, á. láctico y CO_2 :



La decarboxilación acompañada de oxidación se conoce para algunos microbios, tales como *B. Deibrückii*, gonococos y estafilococos según esta ecuación global:

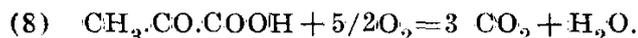


Peters la admite para el cerebro. Interviene el á. adenílico. Elvehjem da la ecuación:

(7) adenosintrifosfato + tiamina = a. adenilico + pirofosfato tiamínico.

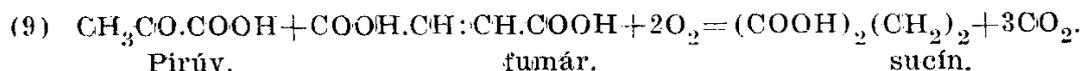
El pirofosfato de tiamina inmediatamente se regenera también por acción cimática con fosfato orgánico probablemente de exosa. Se formaría como intermediaria de una sustancia de 2 C combinada con á. fosfórico, sustancia poco estable. Parece que no es á. acético.

Una decarboxilación más complicada fué descripta por Peters y Long en el cerebro; responde a la ecuación global:

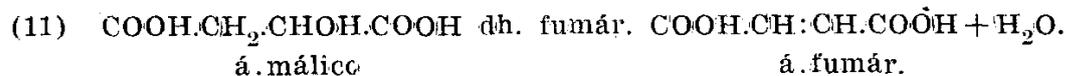
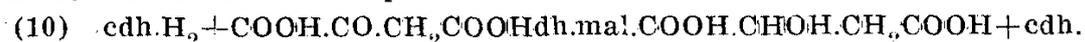


Esta reacción es especialmente interesante porque conduce a la combustión total. En realidad comprende una serie de reacciones y requiere según Ochoa fosfato inorgánico, á. adenosinfosfórico (á. adenilico) y monofosfato de hexosa.

Desde los trabajos de Szent-György sobre la intervención de los ácidos dicarboxílicos de 4 C como aceptores y donadores alternantes de H en la bioxia, los investigadores consideran como comprobada la participación de estos transportadores de H cuando la oxidación es inhibida por la adición de malonato. Tal impedimento ocurre en las decarboxilaciones oxidantes que pasamos a tratar. Krebs indica la siguiente reacción para el músculo:



El fumarato puede ser sustituido por malato o quetosuccinato (oxalacetato), lo que se explica, ya que tanto el malato como el oxalacetato se transforman fácilmente en fumarato según estas ecuaciones, donde el H de un dador es transportado al á. oxalacético:



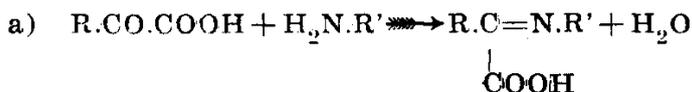
Krebs y colaboradores han demostrado la existencia de un ciclo de á. cítrico con una función análoga a la del ciclo de los á. dicarboxílicos C₄ de Szent-György. La importancia de las reacciones oxidantes con el ciclo cítrico todavía está en plena discusión. En la reacción expresada sumariamente por la ecuación (9) el citrato no puede sustituir el fumarato. Cuando en la reacción (9) junto con el fumarato se agrega un exceso de piruvato, se forma á. cítrico o 2-quetoglutárico en lugar del succínico, pero la decarboxilación oxidante no se produce.

Resumimos: Hemos conocido una serie de procesos de oxidación desintegrante del á. pir. Naturalmente, no todas estas reacciones tendrán la misma importancia para el organismo. No cabe duda de que es la tensión del oxígeno a disposición en cada momento, la que determina cuáles

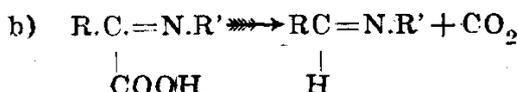
de las reacciones predominarán en un tejido. Para la decarboxilación rápida en el cerebro se necesita: pirofosfato de tiamina, fumarato, monofosfato de hexosa, fosfato inorgánico, á. adenílico, codehidrogenasa I (cozimasa) y Mg o en su lugar, otro cation bivalente. El metal probablemente se precisa para transportar el á. fosfórico. Por supuesto, se requiere también la presencia de la carboxilasa misma. Finalmente, para la regeneración de las sustancias auxiliares, como codehidrogenasa y otras, participa todavía un aparato encimático bastante complicado. Para los ensayos in vitro se emplean los siguientes preparados de encéfalo: cortes a congelación, papilla y suspensión extremadamente dispersa. La enumeración es en orden de efecto creciente.

Cuando Langenbeck (1935) demostró el efecto catalizador de las aminas primarias en la decarboxilación, v. g. del á. fenilglioxílico en benzaldehído y anhídrido carbónico, desarrolló el esquema de las reacciones intermedias y predijo que la carboxilasa o su coencimo de los tejidos animal y vegetal debería tener una función de amina primaria.

Ciclo de Langenbeck

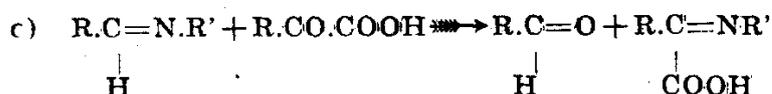


á. 2-quetocarbónico + amina \longrightarrow á.imino + agua.



á. imino=aldimina + anhídrido carbónico; ya se obtuvo la decarboxilación.

Ahora por medio de una dismutación la aldimina reacciona con una nueva molécula de la sustancia a decarboxilar, es decir con una nueva molécula de á. 2-quetocarbónico:



El resultado de la dismutación es la transformación de la aldimina en el aldehído correspondiente y la transformación de la nueva molécula de á. 2-quetocarbónico en el á. imino. El á. imino según la ecuación (b) se decarboxila, la aldimina resultante con una nueva molécula del á. 2-quetocarbónica dismuta según ecuación (c), a esta reacción sigue la (b) y así sucesivamente. El resultado final del ciclo de Langenbeck es que el á. 2-quetocarbónico da anhídrido carbónico y el aldehído correspondiente, sin que la molécula de la amina primaria sea consumida.

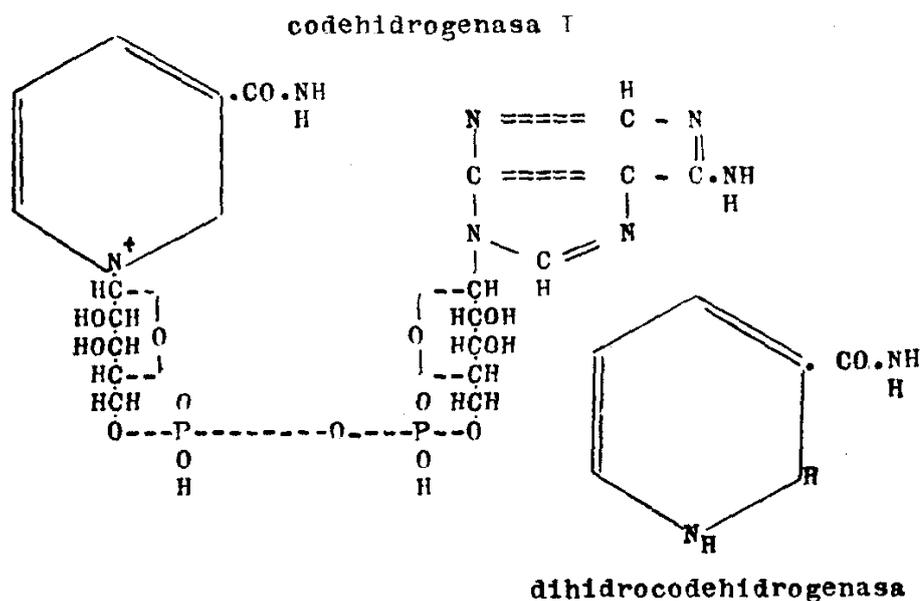
Con el descubrimiento de Lohmann parecía brillantemente confirmada la profecía de Langenbeck, y los investigadores empezaron a buscar

las reacciones intermedias análogas del pirofosfato tiamínico en la decarboxilación encimática. Pero, por lo pronto, Stern y Melnick (1939) llamaron la atención sobre el enlace doble que lleva el carbono número 6 de la pirimidina donde se sitúa la función amina, lo que significa que la función de aníma de la tiamina se distingue de las aminas primarias usadas por Langenbeck.

Lo mismo queda demostrado con el resultado de la acetilación. En los experimentos, de acuerdo con los esquemas de Langenbeck, la tiamina resultó completamente incapaz de decarboxilar. Stern y Melnic son terminantes al establecer que en la reacción del pirofosfato de tiamina en la decarboxilación encimática no tiene lugar la formación de un imino-ácido. Belitser (1940) atribuye un papel decisivo en la decarboxilación al nitrógeno cuaternario del tiazol.

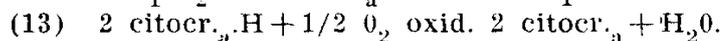
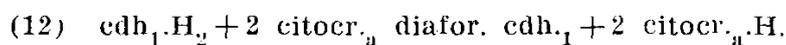
La reoxidación de las codehidrogenasas

En las reacciones descriptas intervienen las codehidrogenasas como coencimos de las diversas dehidrogenasas. Unas cuantas dehidrogenasas trabajan con el mismo coencimo, especialmente con la codehidrogenasa I

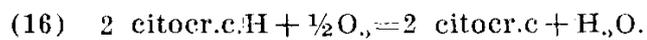
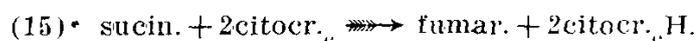
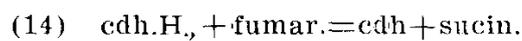


o cozimasa. La cozimasa contiene 1 molécula de amida del á. nicotínico, 1 de adenina, 2 de ribosa y 2 de á. fosfórico. La codehidrogenasa II se distingue por la posesión de una tercera molécula de á. fosfórico. En la dehidrogenación la codehidrogenasa es reducida a cdh.H₂. Para poder prestar servicio nuevamente debe ser reoxidada. Esta oxidación no puede efectuarse directamente por un citocromo, requiere primero la intervención de otro encimo, la diaforasa o el factor de la cozimasa (v. Euler; Green; Haas; Peters). La diaforasa es un flavencimo, pero dis-

tinto del viejo encima amarillo de Warburg. Transporta el H rápidamente y trabaja con los citocromos a y b como aceptores:



La oxidación de la codehidrogenasa se puede hacer por un camino más largo, interviniendo un ciclo de Szent-György. Tales vías fueron indicadas por v. Euler y por Potter. Daremos ésta última:



La codehidrogenasa es dehidrogenada por el fumarato. El á. succínico resultante es oxidado a fumarato por el citocromo_c; y éste, con el oxígeno atmosférico, es reoxidado. Así la serie de reacciones quema dos átomos de hidrógeno y regenera la coenzima, el fumarato, y el citocromo y consume media molécula de oxígeno.

Conferencia dada en el Instituto de Endocrinología
Montevideo, Octubre de 1940