

Efecto protector del pirofosfato de tiamina en el hipocampo de ratas expuestas a estrés por inmovilización forzada

Protective effect of thiamine pyrophosphate in the hippocampus of rats exposed to stress by forced immobilization

Gloria Sicilia Argumedo* Marco Antonio Martínez Ávila* Armando Valenzuela Peraza*
María Antonia González Zavala** Leticia Granados Rojas* Marcial Gerardo Barragán Mejía†

Abstract

The ability of thiamine pyrophosphate (TPP) or activated vitamin B₁ in preventing neuronal damage to the rat hippocampus exposed to stress by forced immobilization was appraisable on this study. Twenty one days old, male rats were used and distributed on four groups of ten rats each: control (C), chronic stress (CS), chronic stress + TPP (CS + TPP), and TPP (TPP). The analyzed variables were: body weight, dendritic apical length, major and minor neuronal soma axes, as well as the average of dendritic branches and spines. The results showed significant decreases on body weight (from 20 to 40%) in all groups when comparing with C group, and a statistically significant decrease at serum corticosterone levels of 20.52% in TPP and 16.3% in CS + TPP groups when comparing with C group. A significant increase was found (6.5%) on diameter of minor neuronal soma axis in CS + TPP group compared to C group. Other statistically significant decreases were: dendritic length of 32.1% in CS group compared to C, 27.2% in CS group in relation to CS + TPP and 30.2% in CS group compared to only TPP supplied group. Finally, the number of dendritic spines showed statistically significant decrease of 59.4% in relation to CS group, 50.8% in CS group compared to CS + TPP groups, and 57.7% in group CS compared to TPP supplied group. According to these results, TPP acts preventing the increase of serum corticosterone levels in stressed rats supplied with TPP which preserves neuronal integrity on the analyzed variables, such as dendritic length and dendritic spines average.

Key words: THIAMINE PYROPHOSPHATE, STRESS, FORCED IMMOBILIZATION, HIPPOCAMPUS, CORTICOSTERONE.

Resumen

En este estudio se evaluó la capacidad del pirofosfato de tiamina (PPT) o vitamina B₁ activada, para prevenir el daño que provoca el estrés por inmovilización forzada sobre las neuronas del hipocampo de ratas. Se trabajó con ratas macho de 21 días de edad, que fueron asignadas a cuatro grupos con diez ratas cada uno: Grupo testigo (T), Grupo estrés crónico (EC), Grupo estrés crónico + PPT (EC + PPT) y Grupo de pirofosfato de tiamina (PPT). Las variables analizadas fueron: peso corporal, longitud de la dendrita apical, ejes mayor y menor del soma neuronal, así como el promedio de ramificaciones y de espinas dendríticas. Los resultados muestran disminuciones estadísticamente significativas variables de 20% a 40% en el peso corporal, en todos los grupos respecto del grupo T. Para los niveles de corticosterona sérica se observaron disminuciones estadísticamente significativas de 16.3% en el Grupo EC + PPT y de 20.5% en el Grupo PPT, ambas con respecto al grupo T. En cuanto al diámetro del eje menor, se observó un incremento significativo de 6.5% en el Grupo EC + PPT con respecto al Grupo T; otras disminuciones estadísticamente significativas encontradas fueron: la longitud dendrítica de 32.1% en el Grupo EC con respecto al Grupo T, de 27.2% en el Grupo EC en relación con el Grupo EC + PPT y de 30.2% en el Grupo EC, respecto del PPT. Finalmente, en el número de espinas se encontraron disminuciones estadísticamente significativas de 59.4% en el Grupo EC en relación con el Grupo T, de 50.8% en el Grupo EC con respecto al Grupo EC + PPT, y de 57.7% en el Grupo E, respecto del Grupo PPT. De acuerdo con los resultados, se concluye que el PPT actúa previniendo el incremento de los niveles de corticosterona sérica en ratas con estrés, a las que se les

Recibido el 20 de octubre de 2005 y aceptado el 11 de mayo de 2006.

*Laboratorio de Neuromorfometría, Instituto Nacional de Pediatría, Instituto Nacional de Pediatría, Av. Insurgentes Sur 3 700 C, México, D. F.

**Laboratorio de Bioquímica y Endocrinología, Instituto Nacional de Pediatría, Av. Insurgentes Sur 3 700 C, Col. Insurgentes Cuicuilco, México, D. F.

†Laboratorio de Neuroquímica, Instituto Nacional de Pediatría, Av. Insurgentes Sur 3 700 C, Col. Insurgentes Cuicuilco, México, D. F.

Correspondencia: Gloria Sicilia Argumedo, Instituto Nacional de Pediatría, Av. Insurgentes 3 700 C, Col. Insurgentes Cuicuilco, México, D. F., Tel.: 1084 0900, ext. 1425, Fax: 1084 3883, correo electrónico: siciliaargumedog@yahoo.es

Palabras clave: PIROFOSFATO DE TIAMINA, ESTRÉS, INMOVILIZACIÓN FORZADA, HIPOCAMPO, CORTICOSTERONA.

Introduction

Selye defines the concept of stress as the response of organisms to any physical or psychological stimulus which alters its state of equilibrium or homeostasis;¹ the response by itself causes no damage, but if the stimulus is present once for several hours (acute stress) or continues for prolonged periods (chronic stress), may induce alterations on the whole organism.^{2,3}

It has been shown that stress by immobilization in early stages of life, may damage development of the nervous system by means of catecholamines or stress hormones. The increase in levels of these hormones is related with sexual dimorphism problems and alterations on hypothalamic paraventricular nucleus in laboratory animals.^{4,5} It is also known that forced immobilization, activates hypothalamus-hypophysis-adrenocortical axis, in response to an increase in circulating corticosterone, diminishing the synaptic hippocampal activity in laboratory rats.⁶ Other studies indicate that psychosocial stress in animal models elevate the glucocorticoid levels and affect specific areas of the brain, as hippocampus, which is related with the neuroendocrine regulation and is of importance in the emotional processes which coincide with learning and memory deficit.^{7,9} Other reports indicate that chemical stress, or by immobilization, as well as multiple stress, provoke a decrease in neuronal population of CA1 and CA3 areas of the hippocampus and prefrontal cortex.

Also, it has been demonstrated that these types of stress produce atrophy of dendritic branches, decrease in synaptic efficiency, learning alterations and memory in laboratory rats.¹⁰⁻¹⁴ Morphological studies in model animals show that exposure to stress or glucocorticoid excess provokes neuronal damage, this depends on the exposure time.^{7-9,15} Other works describe that social stress or by immobilization and chronic treatment with corticosterone, are related with elevation of serotonin levels in rat hippocampus and that these factors contribute to the atrophy of apical dendrites and affect the structure and function of the brain.^{12,16,17} Also, immobilization stress, elevates glucocorticoid levels and alters calcium (Ca^{2+}) homeostasis, it affects excitability and viability of neurons in the hippocampus of rats.^{18,19} Other reports indicate that multiple severe stress (acute) and prolonged (chronic) cause neuron atrophy in CA1 and CA3 areas of rat

Introducción

Selye define el concepto de estrés como la respuesta de los organismos ante cualquier estímulo físico o psicológico que altera su estado de equilibrio u homeostasis;¹ la respuesta por sí misma no causa ningún daño, pero si el estímulo se presenta una vez durante varias horas (estrés agudo) o continúa por periodos prolongados (estrés crónico), puede provocar alteraciones en todo el organismo.^{2,3}

Se ha demostrado que el estrés por inmovilización en etapas tempranas de la vida, puede dañar el desarrollo del sistema nervioso por medio de las catecolaminas u hormonas del estrés. El incremento en los niveles de estas hormonas está relacionado con problemas en el dimorfismo sexual y alteraciones en los núcleos hipotalámicos paraventriculares en animales de laboratorio.^{4,5} También se sabe que el estrés por inmovilización, activa el eje hipotálamo-hipófisis-adrenocortical, en respuesta al incremento de corticosterona circulante, disminuyendo la actividad sináptica hipocampal en ratas de laboratorio.⁶ Otros trabajos indican que el estrés psicosocial en modelos animales eleva los niveles de glucocorticoides y afecta áreas específicas del cerebro, como el hipocampo, que está relacionado con la regulación neuroendocrina y es de importancia en los procesos emocionales que coinciden con el déficit en el aprendizaje y la memoria.⁷⁻⁹ Otros informes indican que el estrés químico, o por inmovilización, así como el estrés múltiple, provocan disminución en la población neuronal de las áreas CA1 y CA3 del hipocampo y de la corteza prefrontal.

También se ha demostrado que estos tipos de estrés producen atrofia de las ramificaciones dendríticas, disminución en la eficacia sináptica y alteraciones en el aprendizaje y en la memoria en ratas de laboratorio.¹⁰⁻¹⁴ Estudios morfológicos en modelos animales muestran que la exposición al estrés o al exceso de glucocorticoides provoca daño neuronal, ello depende del tiempo de exposición.^{7-9,15} Otros trabajos describen que el estrés social o por inmovilización y el tratamiento crónico con corticosterona, están relacionados con la elevación de los niveles de serotonina en el hipocampo de ratas y que estos factores contribuyen a la atrofia de las dendritas apicales y afectan la estructura y función del cerebro.^{12,16,17} También el estrés por inmovilización, eleva los niveles de glucocorticoides y altera la homeostasis del calcio

hippocampus, and inhibit the ability of the synapses of the hippocampus to increase its efficiency.²⁰⁻²⁴

In this context, other researches have demonstrated decrease of dendrites branches and spines in the motor and visual brain cortex in descendants of rats subjected to forced immobilization during pregnancy; this indicates that prenatal stress affects normal development of nerve cells.^{25,26} Also, it is known that deficiency of important molecules, as vitamins, is related with processes of dementia and neuropathies.²⁷ It has been demonstrated in this area, that thiamine pyrophosphate (TPP), or activated vitamin B₁, acts reestablishing damage processes, like Krebs cycle for energetic contribution, which diminishes damage caused by stress.^{28,29} The brain constitutes a structure particularly sensible to thiamine deficiency, maybe due to its ester, TPP, actuates as a coenzyme in the oxidative decarboxylation of pyruvate and alfa-ketoglutarate in Krebs cycle, and its wide distribution inside neurons; besides, TPP is an indispensable factor for oxidative metabolism and for neurotransmitters.³⁰⁻³² As a consequence of the formerly mentioned, the present work studied the capacity of TPP or activated vitamin B₁ to prevent damage to pyramidal neurons of CA1 area of rat hippocampus, provoked by stress caused by forced immobilization.

Material and methods

Forty male rats were used, of Sprague Dawley strain, 21 days of age, who were maintained in standard animal care facility conditions, with feed and water *ad libitum*, in accordance with Mexican Official Norm NOM-602-ZOO-1999, Diario Oficial de la Federación, august 22, 2001.³³ Four groups were formed, with ten animals each one: 1) Control group (C), remained in the animal care facility with no treatment during the whole study; 2) Chronic stress group (CS), rats in this group were stressed by forced immobilization, with that purpose each rat was placed in an experimental devise, designed in the laboratory, for six hours daily during 30 days. The devise consisted of a PVC (polyvinyl chloride) tube of 2 inches in diameter and 20 cm long, to which grooves were made to a metal strip slide to adjust to the animal's body; 3) Thiamine pyrophosphate group (TPP), to this group 130 mg/kg of TPP per intraperitoneal injection were administered every third day,³⁴ for the time stress exposure lasted; 4) Chronic stress group plus TPP (CS + TPP), this group was treated the same as the CS group and was injected the same dose of TPP as the TPP group. All animals were supplied with feed and water *ad libitum*.

By the end of exposure to stress for 30 days, the rats from all groups were anesthetized with sodium pentobarbital (25.2 mg/kg) and a 2 mL blood sample was

(Ca²⁺), ello afecta la excitabilidad y viabilidad de las neuronas del hipocampo de ratas.^{18,19} Otros informes indican que el estrés múltiple severo (agudo) y prolongado (crónico) causan atrofia en las neuronas de las áreas CA1 y CA3 del hipocampo de ratas, e inhiben la habilidad de las sinapsis del hipocampo para incrementar su eficacia.²⁰⁻²⁴

En este contexto, otros trabajos han demostrado disminución de ramas y espinas dendríticas en la corteza motora y visual del cerebro en descendientes de ratas sometidas a estrés por inmovilización forzada durante la gestación; esto último indica que el estrés prenatal afecta el desarrollo normal de las células nerviosas.^{25,26} Asimismo, se sabe que la deficiencia de moléculas importantes, como las vitaminas, está relacionada con procesos de demencia y neuropatías.²⁷ En este campo se ha demostrado que el pirofosfato de tiamina (PPT), o vitamina B₁ activada, actúa restableciendo procesos dañados, como el ciclo de Krebs para el aporte energético, lo cual disminuye el daño causado por el estrés.^{28,29} El cerebro constituye una estructura particularmente sensible a la deficiencia de tiamina, debido quizá a que su éster, el PPT, actúa como coenzima en la descarboxilación oxidativa del piruvato y alfaetoglutarato en el ciclo de Krebs, y a su amplia distribución dentro de las neuronas; además, el PPT es un cofactor indispensable para el metabolismo oxidativo y para la síntesis de neurotransmisores.³⁰⁻³² Como consecuencia de lo anterior, en el presente trabajo se estudió la capacidad del PPT o vitamina B₁ activada, para prevenir el daño a las neuronas piramidales del área CA1 del hipocampo de ratas, provocado por estrés debido a inmovilización forzada.

Material y métodos

Se usaron 40 ratas macho, de la cepa Sprague Dawley, de 21 días de edad, que se mantuvieron en condiciones estándar de bioterio, con alimento y agua *ad libitum*, conforme a la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, Diario Oficial de la Federación, 22 de agosto 2001.³³ Se formaron cuatro grupos, con diez animales cada uno: 1) Grupo testigo (T), permaneció en el bioterio sin tratamiento durante todo el estudio; 2) Grupo de estrés crónico (EC), a las ratas de este grupo se les provocó estrés por inmovilización forzada, con ese propósito cada rata se colocó en un dispositivo experimental, diseñado en el laboratorio, durante seis horas diarias durante 30 días. El dispositivo consistió de un tubo de PVC (cloruro de polivinilo) de dos pulgadas de diámetro por 20 cm de largo, al que se le hicieron ranuras por las que se deslizó una lámina para ajustarlo al cuerpo del animal; 3) Grupo de pirofosfato de tiamina (PPT), a este grupo se le inyectaron 130 mg/kg de PPT vía intraperito-

taken directly from the heart before being perfused, to measure serum corticosterone levels; this quantification was done at the end of the experiment in order to avoid that continuous handling would have an additional stress charge when taking blood samples. Rats were intracardiac perfused with formalin at 10% in 0.1 M, pH 7.2 phosphate buffer solution, brains were rapidly extracted and hippocampal region delimited in coronal direction from the rest of the brain, in tissue blocks of 2.5 mm thickness. Blocks were impregnated with Golgi rapid argentic technique.³⁵ Coronal cuts of 100 μ thickness were made and were fixed on slides. Later, 120 cells were selected and analyzed, in which the following variables were evaluated: *a*) apical dendritic length, *b*) mayor and minor axis of the soma, *c*) number of dendritic intersections with five concentric circles in accordance to Sholl's method.³⁶ These variables were quantified using a 40X objective, *d*) number of spines throughout the apical dendrite, which were quantified with a 100X immersion objective.

Statistic analysis

The data analysis was done with statistical package (Statistical Package for Social Sciences) version 3. For all variables a Levine test was applied, and homogeneity in variances was found; therefore, analyses of variance of one and two ways, followed by Tukey's test with a trust value of $P \leq 0.01$ was used to determine the stress effect and TPP, independently and its possible interactions.

Results

The body weight of rats from all groups during the treatment period showed a significant decrease and variable of 20% and 40% beginning with 14 days of treatment (35 days of age) with regard to group C (Figure 1, Table 1). For corticosterone serum levels, statistically significant decreases were observed in average and standard error of 16.3% in group CS + TPP and of 20.5% in group TPP, both with regard to group T (Figure 2). The graphic of the minor axis diameter of the neuronal soma of all the groups shows the average and standard error where a significant increase of 6.5% was observed in group CS + TPP, with regard to group C (Figure 3). In average and standard deviation of dendritic length, statistically significant decreases of 32.1% were observed in group CS with regard to group C, of 27.2% in group CS in relation to group CS + TPP and of 30.2% of group CS with regard to group TPP (Figure 4). In average and standard deviation there were statistically significant decreases of 59.4% in group CS with regard to group C, of 50.8% in group CS in relation to group CS +

neal cada tercer día,³⁴ durante el tiempo que duró la exposición al estrés; 4) Grupo de estrés crónico más PPT(EC + PPT), a este grupo se le trató igual que al grupo de EC y se le inyectó la misma dosis de PPT que al grupo PPT. A todos los animales se les proporcionó agua y alimento *ad libitum*.

Al finalizar la exposición al estrés durante 30 días, las ratas de todos los grupos fueron anestesiadas con pentobarbital sódico (25.2 mg/kg) y se les tomó una muestra de 2 mL de sangre directamente del corazón antes de ser perfundidas, para medir los niveles de corticosterona sérica; esta cuantificación se hizo al finalizar el experimento para evitar que el manejo continuo al tomar la muestra de sangre tuviera una carga adicional de estrés. Las ratas se perfundieron vía intracardiaca con formalina al 10% en solución amortiguadora de fosfatos 0.1 M, pH 7.2, los cerebros se extrajeron rápidamente y se delimitó la región hipocámpica en sentido coronal del resto del encéfalo, en bloques de tejido de 2.5 mm de espesor. Los bloques se impregnaron con la técnica argéntica de Golgi rápido.³⁵ Se hicieron cortes coronales de 100 μ de grosor y se montaron en laminillas. Posteriormente fueron seleccionadas y analizadas 120 células, en las que se evaluaron las siguientes variables: *a*) longitud de la dendrita apical, *b*) ejes mayor y menor del soma, *c*) número de intersecciones dendríticas con cinco círculos concéntricos de acuerdo con el método de Sholl.³⁶ Estas variables se cuantificaron utilizando un objetivo de 40X, *d*) el número de espinas a lo largo de la dendrita apical, que se cuantificaron con un objetivo de inmersión de 100X.

Análisis estadístico

El análisis de los datos se llevó a cabo con el paquete estadístico SPSS (Statistical Package for Social Sciences) versión 3. Para todas las variables se aplicó una prueba de Levine, y se encontró homogeneidad en las varianzas, por lo que se usó la prueba de análisis de varianza de una y dos vías, seguida de la prueba de Tukey con un valor de confianza de $P \leq 0.01$, para determinar el efecto del estrés y del PPT, de manera independiente y sus posibles interacciones.

Resultados

El peso corporal de las ratas de todos los grupos durante el periodo de tratamiento mostró un decremento significativo y variable de 20% a 40% a partir de los 14 días de tratamiento (35 días de edad) con respecto al grupo T (Figura 1, Cuadro 1). Para los niveles de corticosterona sérica, en el promedio y el error estándar se observaron disminuciones estadísticamente significativas de 16.3% en el Grupo EC +

Cuadro 1						
RESULTADOS ESTADÍSTICOS DE LAS VARIABLES ANALIZADAS						
STATISTICAL RESULTS OF THE ANALYZED VARIABLES						
Groups	Variable	Average (x)	Standard deviation (s.d)	Standard error (s.e)	Value of f	P
C	Levels of	417.38	48.5	17.16	7.2	0.01
CS	corticosterone	430.25	41.4	14.66		
CS + TPP		349.37	65.8	23.29		*CS + TPP vs C 16.3%
TPP	(µg/mL)	331.75	46.8	16.58		*TPP vs C 20.5%
Body weight						
C	(g)	148.3	17.3	5.4	8.3	0.01
CS		105.1	20	6.3		* From 20 to 40%
CS + TPP		109.6	14.6	4.6		From day 14
TPP		116	14.7	4.6		of treatment
Minor axis					7.992	0.05
C	(µ)	115.7	12.2	2.23		
CS		113.8	11	1.89		
CS + TPP		123.3	9.5	1.74		*CS + TPP vs C 6.5%
TPP		113	13.9	2.55		
Dendritic length					12.66	0.01
C	(µ)	2041.7	470.16	85.91		
CS		1386.18	276.59	47.44		*CS vs C 32.10%
CS + TPP		1902	526.87	96.19		*CS vs EC + TPP 27.2%
TPP		1983.2	511.03	93.3		*CS vs TPP 30.2%
Dendritic spines					8.91	0.01
C		106.9	48.82	8.91		
CS		43.5	30.6	5.26		*CS vs C 59.4%
CS + TPP		85.5	45.2	8.27		*CS vs CS + TPP 50.8%
TPP		102.2	47.5	8.68		*CS vs TPP 57.7%

Control group (C), Chronic stress group (CS); Chronic stress group plus TPP (CS + TPP); TPP group (TPP).

*Statistically significant differences.

*P ≥ 0.01, according to ANOVA statistical test of two routes.

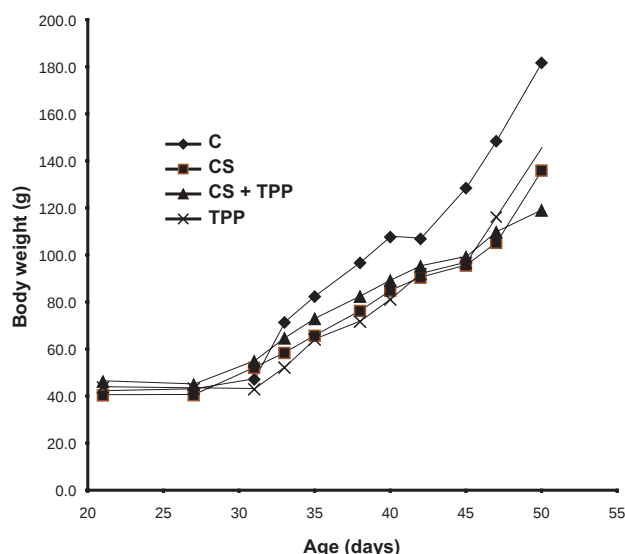


Figure 1: Comportamiento del peso corporal de los grupos durante la fase de tratamiento. Grupo Testigo (T); Grupo estrés crónico (EC) Grupo de estrés crónico + Pirofosfato de tiamina (EC + PPT) Grupo de pirofosfato de tiamina (PPT).

Figure 1: Groups' body weight behavior during treatment phase. Control group (C); Chronic stress group (CS); Chronic stress group + thiamine pyrophosphate (CS + TPP); Thiamine pyrophosphate group (TPP).

TPP, and of 57.7% of group CS with regard to group TPP (Figure 5). In figures 6 and 7, micrographies of pyramidal neurons of CA1 area from rat hippocampus, impregnated with the Golgi rapid argentic technique are observed.

Discussion

In the present study, decreases of 20% and 40% in body weight of animals of all groups with regard to group C were observed, beginning with day 14 of treatment, which coincides with what it is described by Mckittrick *et al.*¹⁶ and Watanabe *et al.*,²³ who indicated that there is significant reduction in laboratory rats' body weight subjected to social stress and immobilization. The aforementioned could be due to stress repercussions on body weight because the organism consumes more energy during these periods, since glucocorticoids act on the liver, increasing enzyme synthesis which promotes gluconeogenesis, and reduce glucose capture by peripheral tissues, such as muscle, stimulating fatty acids mobilization from fat deposits in the adipose tissue.³⁷

In the present work, a decrease in the growth curve that through time stabilized itself and later ascended, although without becoming like the one of the control group at the end of the experiment was observed (Figure 1); that behavior may be interpreted as stress adaptation. In regard to serum corticosterone levels,

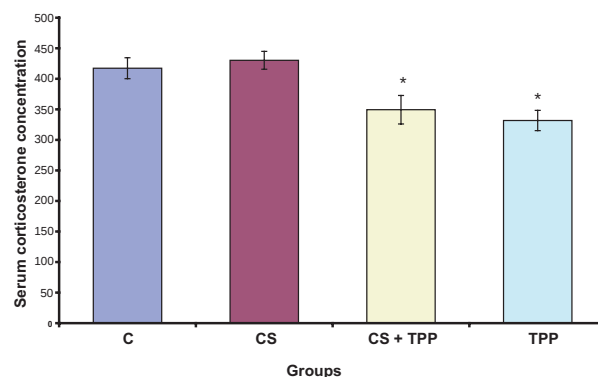


Figure 2: Niveles de corticosterona sérica para los grupos experimentales y testigo Grupo testigo (T); Grupo estrés crónico (EC); Grupo estrés crónico + pirofosfato de tiamina (EC + PPT); Grupo de pirofosfato de tiamina (PPT). *P < 0.01

Figure 2: Serum corticosterone levels for experimental and control groups. Control group (C); Chronic stress group (CS); Chronic stress group + thiamine pyrophosphate (CS + TPP); Thiamine pyrophosphate group (TPP). *P < 0.01.

PPT y de 20.5% en el Grupo PPT, ambos con respecto al Grupo T (Figura 2). La gráfica del diámetro del eje menor del soma neuronal de todos los grupos muestra el promedio y el error estándar donde se observa un aumento significativo de 6.5% en el grupo EC + PPT, con respecto al grupo T (Figura 3). En el promedio y desviación estándar de la longitud dendrítica se observan disminuciones estadísticamente significativas de 32.1% en el Grupo de EC respecto del Grupo T, de 27.2% en el Grupo EC en relación con el Grupo EC + PPT y de 30.2% del Grupo EC con respecto al Grupo PPT (Figura 4). En el promedio y desviación estándar se observan disminuciones estadísticamente significativas de 59.4% en el Grupo EC con respecto al T, de 50.8% en el Grupo EC en relación con el EC + PPT, y de 57.7% del EC respecto del Grupo PPT (Figura 5). En las figuras 6 y 7 se observan micrografías de neuronas piramidales del campo CA1 del hipocampo de rata, impregnadas con la técnica argéntica de Golgi Rápido.

Discusión

En el presente estudio se observó disminución de 20% a 40% en el peso corporal de los animales de todos los grupos con respecto al Grupo T, a partir del día 14 de tratamiento, lo cual concuerda con lo descrito por Mckittrick *et al.* y Watanabe *et al.*, quienes indicaron que existe una reducción significativa del peso corporal en ratas de laboratorio sometidas a estrés social y por inmovilización.^{16,23} Lo anterior podría deberse a que el estrés tiene repercusiones sobre el peso corporal porque el organismo consume más energía en estos periodos, debido a que los glucocorticoides actúan sobre el hígado, incrementando la síntesis de enzimas que promueven la gluconeogénesis, y redu-

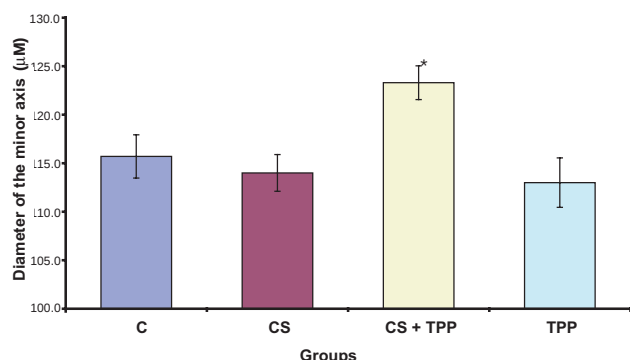


Figura 3: Diámetro del eje menor del soma de neuronas piramidales del CA1 del hipocampo. Grupo testigo (T); Grupo estrés crónico (EC); Grupo estrés crónico + Pirofosfato de tiamina (EC + PPT); Grupo de pirofosfato de tiamina (PPT). * $P \leq 0.01$ EC + PPT vs. T, EC, PPT.

Figure 3: Minor axis diameter of pyramidal neurons soma of hippocampus CA1. Control group (C); Chronic stress group (CS); Chronic stress group + thiamine pyrophosphate (CS + TPP); Thiamine pyrophosphate group (TPP). * $P \leq 0.01$ CS + TPP vs C, CS TPP.

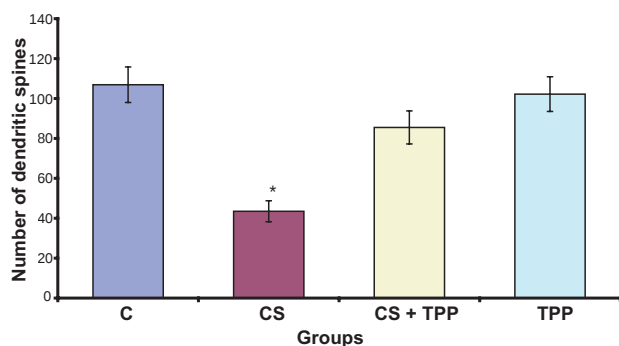


Figura 5: Promedio de espinas dendríticas de neuronas piramidales del CA1 del hipocampo. Grupo testigo (T); Grupo estrés crónico (EC); Grupo estrés crónico + Pirofosfato de tiamina (EC + PPT); Grupo de pirofosfato de tiamina (PPT). * $P \leq 0.01$. EC vs T, EC + PPT, PPT

Figure 5: Average of dendritic spines of pyramidal neurons of hippocampus CA1. Control group (C); Chronic stress group (CS); Chronic stress group + thiamine pyrophosphate (CS + TPP); Thiamine pyrophosphate group (TPP). * $P \leq 0.01$. CS vs C, CS + TPP, TPP.

the groups that received TPP showed statistically significant decrease in the levels of this glucocorticoid, compared to the CS group, such results support the study's hypothesis by confirming that TPP prevents corticosterone increment and diminishes the damage provoked by stress, which comes into agreement with the results of Benitez *et al.*,³⁴ who notified that TPP is an indispensable cofactor for metabolism, since it provides energy to the system and activates metabolic routes that confer the organism the lost energy during stress periods, maintaining in this way homeostasis.

In regard to the diameter of the minor neuronal soma axis, it was observed a significant increase in the CS + TPP group, this indicates neurons in good metabolic state, since they impregnated well with Golgi

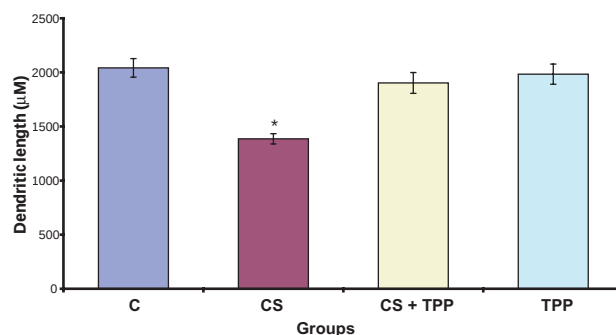


Figura 4: Promedio de la longitud de la dendrita apical, de los grupos experimentales y testigo. Grupo testigo (T); Grupo estrés crónico (EC); Grupo estrés crónico + Pirofosfato de tiamina (EC + PPT); Grupo de pirofosfato de tiamina (PPT). * $P \leq 0.01$. EC vs T, EC + PPT, PPT

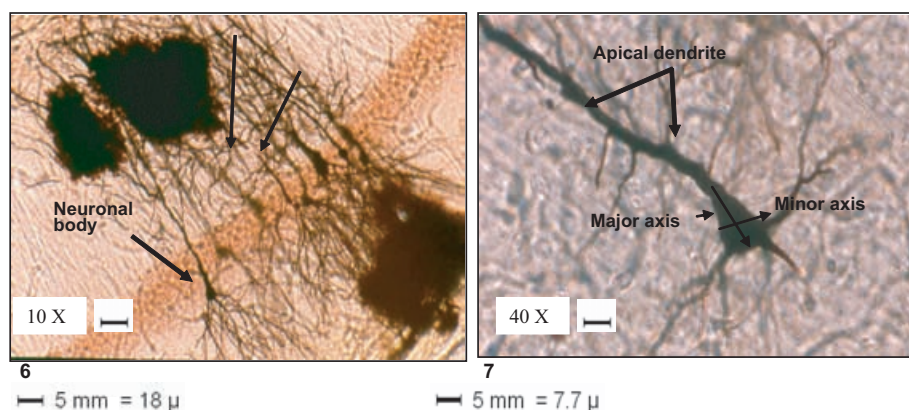
Figure 4: Average of apical dendritic length of the experimental and control groups. Control group (C); Chronic stress group (CS); Chronic stress group + thiamine pyrophosphate (CS + TPP); Thiamine pyrophosphate group (TPP). 0.01. CS vs C, CS + TPP, TPP.

cen la captación de glucosa por tejidos periféricos, como el músculo, estimulando la movilización de ácidos grasos desde los depósitos de grasa en el tejido adiposo.³⁷

En el presente trabajo se observó un descenso en la curva de crecimiento que a través del tiempo se estabilizó y posteriormente ascendió, aunque sin llegar a ser como la del Grupo testigo al finalizar el experimento (Figura 1); ese comportamiento puede interpretarse como adaptación al estrés. En cuanto a los niveles de corticosterona sérica, los grupos que recibieron PPT mostraron disminución estadísticamente significativa en los niveles de este glucocorticoide, comparados con el Grupo EC, tales resultados apoyan la hipótesis de trabajo al confirmar que el PPT previene la elevación de corticosterona y disminuye el daño provocado por el estrés, lo que concuerda con el informe de Benítez *et al.*,³⁴ quienes notificaron que el PPT es un cofactor indispensable para el metabolismo, ya que aporta energía al sistema y activa rutas metabólicas que confieren al organismo la energía perdida durante periodos de estrés, manteniendo así la homeostasis.

En cuanto al diámetro del eje menor del soma neuronal, se observó aumento significativo en el Grupo EC + PPT, ello indica neuronas en buen estado metabólico, ya que se impregnaron bien con la técnica argéntica de Golgi,³⁵ por lo que el PPT de alguna forma conserva la integridad de la estructura neuronal. En relación con la longitud dendrítica, los resultados muestran que el PPT tiene un efecto protector sobre esta estructura neuronal, ya que el grupo que se sometió a inmovilización forzada, pero que fue complementado con PPT, tiene un promedio estadístico de 1 902 μ , que es parecido al Grupo T de 2 041 μ (Cuadro 1). Algunos trabajos, como el de Gibson *et al.*²⁹ y de Singleton *et al.*,³³ notifican que pacientes con

Ramifications of the dendritic tree



Figuras 6 y 7: Neuronas piramidales del campo CA1 del hipocampo, impregnadas con la técnica argéntica Golgi rápido.

Figures 6 and 7: Pyramidal neurons of hippocampus CA1 area, impregnated with Golgi rapid argentic technique.

argentic technique,³⁵ Therefore, TPP in some way preserves the integrity of the neuronal structure. In relation with the dendritic length, the results show that TPP has a protector effect on this neuronal structure, since the group that was subjected to forced immobilization, but that was complemented with TPP, has a statistical average of 1 902 μ . Which is similar to 2 041 μ of group C (Table 1). Some works, like the one from Gibson *et al.*²⁹ and Singleton *et al.*, note that patients with neurodegenerative damage have low levels of thiamine, which is relevant, since nervous system, skeletal muscle and heart require high concentrations of thiamine for a good operation.

In regard to the number of dendritic spines, the results show statistically significant decrease in CS group; nevertheless, in the group that besides stress received TPP, the average of spines is not so low as in the CS group (Table 1), this indicates a protector effect of TPP in this variable, those results coincide with the described by Benítez *et al.*,³⁴ who showed that TPP increases the excitatory potential in glutamatergic synapsis. In accordance with the results, it is concluded that TPP prevents the serum corticosterone levels increase in rats with stress to whom it was administered, which preserves the neuronal integrity on the studied variables, like dendritic length and dendritic spines average.

Acknowledgements

Special thanks to Dr. Juana Villeda, for her advice on the application of Golgi rapid argentic technique, as well as Dr. Hermelinda Salgado, for her accurate corrections to the written work, and to Alejandro Moreno Corona, for his suggestions on the abstract translation.

Referencias

1. Selye H. Half a century of stress research a tribute to

daño neurodegenerativo tienen niveles bajos de tiamina, lo cual es relevante, ya que el sistema nervioso, el músculo esquelético y el corazón requieren de altas concentraciones de tiamina para tener buen funcionamiento.

En cuanto al número de espinas dendríticas, los resultados muestran una disminución estadística significativa en el Grupo EC; sin embargo, en el grupo que además del estrés recibió PPT el promedio de espinas no es tan bajo como el grupo de EC (Cuadro 1), ello indica un efecto protector del PPT en esta variable, esos resultados concuerdan con los descritos por Benítez *et al.*,³⁴ quienes muestran que el PPT aumenta el potencial excitatorio en sinapsis glutamatergicas. De acuerdo con los resultados, se concluye que el PPT previene el incremento de los niveles de corticosterona sérica en ratas con estrés a las que se les suministró, lo cual preserva la integridad neuronal en las variables estudiadas, como la longitud dendrítica y el promedio de espinas dendríticas.

Agradecimientos

Se agradece a la Dra. Juana Villeda, su asesoría en la aplicación de la técnica argéntica de Golgi rápido, así como a la Dra. Hermelinda Salgado, por sus acertadas correcciones al trabajo escrito, y a Alejandro Moreno Corona, por las sugerencias a la traducción del resumen.

Hans Selye by his students and associates. *Experientia* 1985, 41: 523-534.

2. Murakami S, Imbe H, Morikawa Y, Kubo C, Senba E, Chronic stress, as well as acute stress, reduces BDNF mRNA expression in the rat hippocampus but less robustly. *Neurosci Res* 2005;53:129-39.
3. Paskitti M E, McCreary BJ, Herman JP. Stress regulation of adrenocorticosteroid receptor gene transcription and mRNA expression in rat hippocampus: time-course analysis. *Mol Brain Res* 2000;80:142-152.
4. Reznikov AG, Nosenko ND. Early postnatal changes

- in sexual dimorphism of catecholamine and indoleamine content in the brain of prenatally stressed rats. *Neuroscience* 1996;70: 547-551.
5. Dayas CV, Buller KM, Day TA. Hypothalamic paraventricular nucleus neurons regulate medullary catecholamine cell responses to restraint stress. *J Comp Neurol* 2004;478:22-34.
 6. Gilad GM, Mahon BD, Finkelstein Y, Koffler B, Gilad VH. Stress-induced activation of the hippocampal cholinergic system and the pituitary- adrenocortical axis. *Brain Res* 1985;347:404-408.
 7. Fuchs E, Flügge G, Ohl F, Lucassen P, Vollmann-Honsdorf GK, Michaelis T. Psychosocial stress, glucocorticoids, and structural alterations in the tree shrew hippocampus. *Physiol Behav* 2001;73:285-291.
 8. Sandi C. The role and mechanisms of action of glucocorticoid involvement in memory storage. *Neural Plast* 1998;6:41-52.
 9. de Quervain Dominique JF, Roozendaal B, McGaugh JL. Stress and glucocorticoids impair retrieval of long-term spatial memory. *Nature* 1998;394:787-790.
 10. Yang Y, Zheng X, Wang Y, Cao J, Dong Z, Cai J *et al.* Stress enables synaptic depression in CA1 synapses by acute and chronic morphine: possible mechanisms for corticosterone on opiate addiction. *J Neurosci* 2004; 24(10):1-24.
 11. Donohue HS, Gabbott PL, Davies HA, Rodriguez JJ, Cordero MI, Sandi C *et al.* Chronic restraint stress induces changes in synapses morphology in stratus lacunosum-moleculare CA1 rat hippocampus: a stereological and tree-dimensional ultrastructural study. *Neuroscience* 2006;140:597-606.
 12. Wellman CL. Dendritic reorganization pyramidal neurons in medial prefrontal cortex after chronic corticosterone administration. *J Neurobiol* 2001; 49:245-253.
 13. Sousa N, Lukoyanov NV, Madeira MD, Almeida OFX, Paula-Barbosa MM. Reorganization of the morphology of hippocampal neurites and synapses after stress-induced damage correlates with behavioral improvement. *Neuroscience* 2000;97:253-266.
 14. Shors TJ, Gallegos RA, Breindl A. Transient and consequences of acute stress on long-term potentiation (LTP), synaptica efficacy, theta rhythms and bursts in area CA1 of the hippocampus. *Synapse* 1997;26:209-217.
 15. Yau JL, Kelly PA, Seckl JR. Increased glucocorticoid receptor gene expression in the rat hippocampus following combined serotonergic and medial septal cholinergic lesions. *Mol Brain Res* 1994; 27:174-178.
 16. Mckittrick CR, Magariños AM, Blanchard DC, Blanchard RJ, McEwen BS, Sakai RR. Chronic social stress reduces dendritic arbors in CA3 of hippocampus and decreases binding to serotonin transporter sites. *Synapse* 2000;36:85-94.
 17. Bianchi M, Heidbreder C, Crespi F. Cytoskeletal changes in the hippocampus following restraint stress: role of serotonin and microtubules. *Synapse* 2003;49:188-194.
 18. Bharagava A, Mathias SR, McCormick AJ, Dallman FM, Pearce D. Glucocorticoids prolong Ca²⁺ transients in hippocampal-derived H 19-7 neurons by Ca²⁺ - ATPase-1. *Mol Endocrinol* 2002; 16: 1629- 1637.
 19. Mameczarz J, Budziszewska B, Antkiewicz-Michaluk L, Vetulani J. The Ca²⁺ channel blockade changes the behavioral and biochemical effects of immobilization stress. *Neurophysiology* 1999;20(3):248-254.
 20. Krugers HJ, Goltein PM, van der Linden S, Joels M. Blockade of glucocorticoid receptors rapidly restores hippocampal CA1 synaptic after exposure to chronic stress. *Eur J Neurosci* 2006;23:3051-3055.
 21. Conrad CHD. What is the functional significance of chronic stress dendritic retraction within the hippocampus? *Behav Cogn Neurosci Rev* 2006; 5: 41-60.
 22. Filipovic D, Gavrilovic L, Dronjak S, Radojcic MB, Brain glucocorticoid receptor and heat shock protein 70 levels in rats exposed to acute, chronic or combined stress. *Neuropsychobiology* 2005;51:107-114.
 23. Watanabe Y, Gould E, McEwen BS. Stress induces atrophy of apical dendrites of hippocampal CA3 pyramidal neurons. *Brain Res* 1992;588:341-345.
 24. Mitra R, Jadhav S, McEwen BS, Vyas A, Chattarji S. Stress duration modulates the spatiotemporal patterns of spine formation in the basolateral amygdale. *Neuroscience* 2005;26:9371-9387.
 25. Pawlak R, Rao S, Melchor JP, Chattarji S, McEwen B, Strickland S. Tissue plasmiogen activator and plasmiogen mediate stress-induced decline of neuronal and cognitive functions in the mouse hippocampus. *Neuroscience* 2005; 102:18201-18217.
 26. Sicilia-Argumedeo G, Valenzuela-Peraza A, Granados-Rojas L, Serrano-García N, Coballase-Urrutia E, Díaz-Cintra S. Disminución del número de espinas dendríticas en las neuronas piramidales de la corteza motora de ratas bajo estrés prenatal. *Arch Neuroci* 2000;5:6-11.
 27. Granados RL, Sicilia AG, Martínez AMA, Pérez TE, Valenzuela PA, Serrano GN *et al.* Densidad de espinas dendríticas en neuronas piramidales de la corteza visual de ratas bajo estrés prenatal. *Arch Neuroci* 1998;3:128-134.
 28. Bettendorff L, Mastrogiacomo F, Wins P, Kish SJ, Grisar T, Ball MJ. Low thiamine levels in brains of patients with frontal lobe degeneration on the non Alzheimer's type. *J Neurochem* 1997;69:2005-2010.
 29. Gibson GE, Zhang H. Interaction of oxidative stress with thiamine homeostasis promote neurodegeneration. *Neurochem Int* 2002;40: 493-504.
 30. Singleton CK, Martin PR. Molecular Mecanims of thiamine utilization. *Curr Mol Med* 2001; 1:197-207.
 31. Harper C. Thiamine (vitamin B₁) deficiency and associated brain damage is still common throughout the world and prevention is simple and safe. *Eur J Neurol* 2006; 13:1078-82.
 32. Ba A, N'Douba V, D'Almeida MA, Seri BV. Effects of maternal thiamine deficiencies on the pyramidal and granule cells of the hippocampus of rat pups. *Acta Neurobiol Exp (Wars)* 2005; 65:387-398.
 33. Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999. Diario Oficial de la Federación, 22 de agosto 2001.

34. Benítez Rodríguez MT. Aplicación terapéutica del pirofosfato de tiamina o cocarboxilasa. México (D.F). Información Profesional Especializada, SA de CV, 1996.
35. Gabbott PL, Somogyi JS. The “single” section Golgi-impregnation procedure: methodological description. *J Neur Meths* 1984; 11:221-230.
36. Sholl DA. Dendritic organization in the neurons of the visual and motor cortices of the cat. *J Anat* 1953; 87:387-496.
37. Kotelevtsev Y, Holmes MC, Burchell MC, Houston S, Jamieson P. 11 β - Hidroxysteroid dehydrogenase type 1 knockout mice show attenuated glucocorticoid-inducible responses and resist hyperglycemia on obesity or stress. *Proc Natl Acad Sci* 1997; 94: 14924-14929.