

Alteraciones enzimáticas séricas en la hipervitaminosis K₃.aguda

A.J. Villavicencio M., C.J. Somoza T., E. Tauil B., O.M. Alarcón C.

Departamento de Bioquímica. Facultad de Medicina. Universidad de Los Andes

Resumen

Se realizó una serie de experimentos en ratas machos Wistar para estudiar el efecto de la vitamina K₃ (Bisulfito de menadiona, sal sódica) sobre enzimas séricas. Se determinó la actividad de las enzimas deshidrogenasa láctica (LDH), fosfohexosaisomerasa (PHI), gammaglutamiltranspeptidasa (GGT), maltasa ácida, arginasa y colinesterasa (CHE) en el suero de ratas tratadas con dosis crecientes de vitamina K₃. Los resultados se compararon con los obtenidos en los respectivos testigos tratados con dosis equivalentes de bisulfito de sodio. La vitamina K₃, especialmente con las dosis mayores, incrementó ($p < 0.05$) la actividad de la LDH, PH', maltasa ácida y arginasa, con una disminución igualmente significativa de la CHE sérica. Estos resultados, sugieren que la hipervitaminosis K₃ produce lesiones tisulares generalizadas en especial a nivel hepático. En las ratas tratadas con las dosis más elevadas de bisulfito se observó un incremento significativo, aunque no tan acentuado como el de la vitamina K₃, en la LDH y en la PH' que pudiera deberse a diversos efectos metabólicos.

Palabras claves: Enzimas séricas, Alteraciones enzimáticas séricas, hipervitaminosis, vitamina K₃.

Abstract

Serum enzymatic alterations in the acute K₃ hypervitaminosis

We have studied the effect of vitamin K₃ (sodium salt of menadione bisulfite) on the serum enzyme profile in Wistar male rats. We measured the activity of the enzymes lactic dehydrogenase (LDH), phosphohexoseisomerase (PHI), gamma-glutamyl-transpeptidase (GGT, acid maltase, arginase and cholinesterase (CHE) in the serum of rats treated with progressively larger doses of vitamin K₃. The results were compared with the serum enzyme levels in control rats treated with sodium bisulphite. The largest doses of vitamin K₃ significantly increased ($p < 0.05$) the activity of LDH, PHI, acid maltase and arginase whereas the activity of CHE decreased significantly. These results suggest that overdose of vitamin K₃ damage several tissues, including the hepatic tissue. The largest doses of sodium bisulphite increased LDH and PH' too. This suggests that sodium bisulphite alone might have an effect on the biosynthesis of proteins in general and of enzymes in particular.

Key words: Serum enzymes, serum enzymatic alterations, hypervitaminosis, vitamin K₃.

INTRODUCCIÓN

Las vitaminas K (incluyendo la K₃ o menadiona) han sido objeto de numerosos estudios y publicaciones, especialmente en cuanto a sus manifestaciones carenciales. Sin embargo, los trabajos en relación con la administración de dosis excesivas de estas vitaminas son más escasos y muy antiguos, a tal punto que los síntomas típicos de una verdadera hipervitaminosis K no han sido demostrados (Deuel, 1957). Entre las manifestaciones tóxicas de la hipervitaminosis K₃ hay disminución del crecimiento corporal, albuminuria, poifirinuria y extravasaciones hemorrágicas en hígado y en riñón (Deuel, 1957), anemia hemolítica, hepatoesplenomegalia (Molitor y Robinson, 1940) y eventualmente la muerte, sea por insuficiencia circulatoria y/o respiratoria (Deuel, 1957). A nivel hepático la

hipervitaminosis K₃ produce una marcada alteración enzimática (Rivera, 1980), lo cual sugiere que la administración de esta vitamina en dosis levadas determina variaciones concomitantes de enzimas séricas. Este hecho, que no ha sido descrito en la literatura consultada, motivó la realización de la presente investigación en la cual se valoró la actividad de diversas enzimas en la sangre de ratas tratadas con dosis variables de vitamina K₃ (grupos experimentales) y se comparó con lo que sucede en ratas que recibieron dosis equivalentes de bisulfito de sodio (grupos controles).

MATERIALES Y MÉTODOS

Diseño Experimental

Se emplearon 200 ratas machos Wistar con pesos que oscilaron entre 160 y 180 g,

adaptadas al ambiente del laboratorio durante una semana, como paso previo al inicio de las experiencias. El alimento fue Ratarina R Protinal suplementado con vitaminas y minerales. Agua de bebida "ad libitum". Al término del período de adaptación, se distribuyeron al azar en los grupos experimentales y controles que se describen a continuación.

A los grupos experimentales (del 1 al 5) se les administró V.I.M. por día y por espacio de 7 días: 10,20,30,40 y 50 mg de vitamina K₃ (bisulfito de menadiona, sal sódica, Sigma) en solución acuosa/kg de peso corporal/día, respectivamente. A los grupos controles correspondientes (del 1 al 5) se les administró por la misma vía y durante el mismo lapso, dosis equivalentes de bisulfito de sodio, en solución acuosa. Los volúmenes administrados, tanto de vitamina K₃ como de bisulfito de sodio, siempre fueron de 1 ml. Todos los grupos, tanto experimentales como controles, estuvieron constituidos por 20 animales. Las ratas se pesaron y se examinaron diariamente en busca de manifestaciones patológicas. A las 24 horas de administrada la última dosis de vitamina K₃ o de bisulfito de sodio, según los casos, los animales se anestesiaron con éter etílico, en campana de vidrio e inmediatamente después se les extrajo sangre por punción del seno retro-orbitario, mediante tubos de micro - hematocrito. Las muestras se recolectaron en tubos de centrifuga graduados, sin anticoagulante y después de centrifugaron a 2500 rpm, durante 15 mm, a fin de asegurar la pronta obtención de los sueros que se utilizaron para las determinaciones enzimáticas, que se indican a continuación:

Deshidrogenasa láctica (LDH; E.C. 1.1.1.27) según la técnica de King (1965); fosfohexosaisomerasa (PHI; E.C.5.3. 1.9.), según la técnica de Bodansky (1954); g-glutamyl-transpeptidasa (GGT; E.C. 2.3.2.2), según el método de Szasz (1969); maltasa ácida α 1,4-glucosidasa ácida ~C.3.2. 1.20), según Hers (1963), cuantificándose la glucosa liberada durante la reacción mediante la o-toluidina

(Richterich, 1969); la arginasa (E.C.3. 5.3.1) según el procedimiento descrito por Mía y Koger (1978) y la acetilcolinesterasa (E.C.3. 1.8.7) mediante el método electro-métrico de Michel (1961). Los resultados se expresan en promedios + las desviaciones estándar. El análisis estadístico se realizó mediante ANAVA de dos vías y prueba de Tuckey para establecer las variaciones significativas entre los diferentes promedios (Domenech, 1977).

RESULTADOS

En la Tabla 1 se observa que en términos generales, la vitamina K₃ incrementó significativamente ($p < 0.05$) las actividades de la LDH, de la PHI, de la maltasa ácida y de la arginasa a nivel sérico, mientras que disminuyó concomitantemente la actividad de la acetilcolinesterasa, al comparlas con los respectivos grupos controles. En todos los casos, las modificaciones enzimáticas se corresponden significativamente con las dosis administradas de la menadiona. El bisulfito, por su parte, indujo un incremento significativo en las actividades de la LDH y de la PHI con las dosis de 40 y 50 mg al compararlos con las dosis de 10 a 30 mg/kg/día.

DISCUSIÓN

Con muy pequeñas diferencias, no significativas, las actividades enzimáticas séricas detectadas en las ratas tratadas con 10-30 mg de bisulfito/día son muy semejantes a las publicadas previamente por Cañada de Zunzunegui y cols (1984), Boyd (1962) y Spector (1956). Sin embargo, con las dosis de 40-50 mg del compuesto, las diferencias de las actividades enzimáticas, respecto a los valores considerados "normales" para la rata, son estadísticamente significativas, lo cual probablemente, involucraría al bisulfito administrado que podría alterar la conformación estructural del ADN y de diversas proteínas (Perrin-Ansart y Hanh, 1989) constituyendo tal vez un factor determinante de los cambios enzimáticos detectados.

La vitamina K₃, en especial con las dosis más

elevadas, que sobrepasan en mucho los requerimientos diarios permitidos para la rata macho (Doisy y Matschiner, 1970) incrementó significativamente la actividad de las enzimas valoradas, con excepción de la acetilcolinesterasa. El hecho de encontrar en

el suero sanguíneo cantidades elevadas de enzimas intracelulares significa que existe una alteración funcional u orgánica de la célula, que permite la salida de éstas y su pasaje al medio circulante (Bergmeyer, 1976). La lesión mínima es el incremento en la

Tabla 1: Alteraciones enzimáticas séricas en la hipervitaminosis K₃ aguda experimental.

Enzimas ¹	Dosis (mg / kg de peso / día)				
	10	20	30	40	50
1.- PHI ²					
Vitamina K	40±3	46±3	60±5	85±6	97±8
Bisulfito	32±2	36±3	37±3	39±4	42±2
2.- GGT ³					
Vitamina K	8±1	13±3	22±2	25±3	27±2
Bisulfito	20±2	24±3	26±2	28±2	30±3
3.- CHE ⁴					
Vitamina K	0.9±0.01	0.8±0.02	0.7±0.04	0.6±0.02	0.4±0.05
Bisulfito	0.8±0.02	0.9±0.03	0.9±0.03	0.8±0.04	0.8±0.05
4.-Arginasa ⁵					
Bisulfito	21±3	28±4	33±2	45±4	51±5
	8±4	10±3	12±2	12±3	11±3
5.- M.AC. ⁶					
Vitamina K	1.69±0.01	1.72±0.04	1.77±0.05	2.85±0.04	3.63±0.05
Bisulfito	1.31±0.02	1.35±0.03	1.32±0.02	1.39±0.03	1.35±0.04
6.- LDH ⁷					
Vitamina K	768±32	836±35	981±37	1163±40	1803±39
Bisulfito	642±28	620±25	650±30	671±33	690±35

1.-Actividades enzimáticas expresadas en promedios ± desviaciones estándar.

2.- Fosolohexosaisomerasa. Unidades Bodanski.

3.- Gamma-glutamiltanspeptidasa. US/ml

4.- Colinestrasa.Uph/h

S.-Arginasa. UI/1

6.- Maltasa ácida. mM glucosa liberados por ml de suero y por hora de incubación.

7.- Deshidrogenasa láctica UBB.

permeabilidad de la membrana celular (Bergmeyer, 1976). Cuanto mayor sea la injuria celular se afectará de manera progresiva: Primero, al citoplasma; luego, a los orgánoides citoplasmáticos y, por último,

al núcleo; aumentando progresivamente la cantidad de las enzimas que de las células pasarán hacia la sangre (Wasserstein, 1973). En general puede decirse que cuanto mayores son los niveles enzimáticos séricos, mayor es

la lesión celular en intensidad aunque de esto no se puede inferir exactamente la extensión del daño y si éste es o no irreversible (Waserstein, 1973; Bergmeyer, 1976).

Los hallazgos bioquímicos de la presente investigación, de acuerdo con lo anteriormente señalados, concuerdan con los resultados histopatológicos obtenidos en la presente investigación (observaciones no publicadas), donde se demuestra que la hipervitaminosis K₃ determina congestión y tumefacción turbia a nivel hepático, esplénico y suprarrenal; enfisema y congestión pulmonar concomitante con necrosis hepática, suprarrenal y testicular. La disminución de la actividad de la acetilcolinesterasa y el incremento simultáneo de la actividad de la arginasa están relacionadas habitualmente con el daño de la célula hepática (Mía y Koger, 1978; Waserstein, 1973) que se exterioriza por la valoración de las enzimas hepatocelulares liberadas hacia el torrente circulatorio (Bergmeyer, 1976; Waserstein, 1973). De acuerdo con Mía y Koger (1978) se considera a la arginasa como un indicador confiable y útil de daño (o lesión) hepática en personas y/o en animales sean o no domésticos.

Llama la atención el incremento en la actividad de la maltasa ácida o α 1,4-glucosidasa ácida, que traduce, por lo general, un aumento de la labilidad de las membranas lisosomales o en su defecto, alteraciones en estas organelas. Esta enzima lisosomal (Lejeune y cols., 1963) está a su vez comprometida en la fagocitosis y en la destrucción autolítica de los tejidos (Brandes y cols., 1967). Es interesante señalar el incremento del contenido de hierro a nivel hepático, determinado por la vitamina K₃ (Alarcón y cols., 1985) ya que, de acuerdo con Peters y Seymour (1976) este metal, al depositarse en el BODANSKY O. (1954). Serum phosphohexose isomerase in cancer.

1. Method of determination and establishment of range of normal values. Cancer. 7: 1191-1196.

BOYD JM. (1962). The comparative activity of some enzymes in sheep, cattle and rats-normal

hígado en grandes cantidades, labiliza las membranas lisosomales favoreciendo de este modo la salida de la maltasa ácida hacia la sangre.

Se debe tener presente, además, que un aumento enzimático en el suero no siempre traduce una necrosis celular, ya que en células escasamente dañadas, en las cuales puede realizarse todavía una creciente síntesis enzimática y que son susceptibles de regeneración, es posible que se eliminen enzimas (Schmidt y Schmidt, 19-68). Aunque no parece ser nuestro caso, pues la gamma-glutamyl transpeptidasa, una enzima vinculada con los mecanismos de regeneración y defensa celulares (Lawinski, 1968; Ravens y Gudbajarsason, 1969) no se incrementó significativamente en las ratas tratadas con menadiona.

CONCLUSIONES

La menadiona en altas dosis, al igual que sucede con las vitaminas D (Cañada de Zunzunegui y cols. 1984), produce marcadas alteraciones en las enzimas séricas que exteriorizan el efecto tóxico de esta vitamina a nivel de los diversos órganos corporales.

REFERENCIAS

ALARCÓN OM, RODRÍGUEZ DE CASTRO E, BURGUERA JL, BURGUERA M. (1985). Efecto de la vitamina K₃ (menadiona) sobre el contenido hepático de electrolitos, Acta Cient. Venezolana 36: 232-235.

BERGMEYER HU. (1976). Methods of Enzymatic Analysis. 2nd. English Edition. Academic Press. New York. 1:15-30.

serum and tissue levels and changes during experimental liver necrosis. Res. Vet Med. 3: 256-268

BRANDES D, ANTON E, KNOKWAI L (1967). Studies on L-1210 leukemia. II. Ultrastructural and cytochemical changes after treatment with cyclophosphamide and vitamin A. J. Natl. Cancer

inst 39:385421.

CAÑADA DE ZUNZUNEGUI M, ALARCÓN OM, BURGUERA JA, BURGUERA JL, BURGUERA M. (1984). Efecto de la vitamina D en la concentración sérica de algunas enzimas hepáticas en la rata. *Acta Cient. Venezolana* 35:107-110.

DEUEL MJ. (1957). *The Lipids, Metabolism and Nutritional Value*. Interscience. New York. 11:857-865.

DOISY EA, MATSCHINER JT. (1970). *Biochemistry of Vitamin K*. In: *Fat-soluble vitamins*. Morton, R.A. (ed.). Pergamon Press. Oxford.

DOMENECH JM. (1977). *Bioestadística. Métodos Estadísticos para Investigadores*. Ed. Herder. Barcelona. España.

HERS HG. (1963). Glycogen storage diseases. *Adv. Met Dis.* 1:10-98.

KING J. (1965). *Practical Clinical Enzymology*. Van Nostrand. London.

LAWINSKI M. (1968). The influence of halothane and diethyl ether on gammaglutamyl-transpeptidase activity in the liver of rats. *Arch. Immunol. Ther. Exp. Varsovia* 16: 942-944.

LEJEUNE N, THINES-SEMPOUX D, HERS HG. (1963). Tissue fractionation studies. 16. Intracellular distribution and properties of alfa-glucosidades in rat liver. *Biochem. J.* 86:16-21.

MIA AS, KOGER HD. (1978). Direct colorimetric determination of serum arginase in various domestic animals. *Am. J. Vet. Res.* 30:1381-1384.

MICHEL HO. (1961). Cholinesterase in human red cells and plasma. In: *Standard Methods of Clinical Chemistry Seligson. D. (ed.)*. Academic

Press. New York. 3: 93-94.

MOLITOR H, ROBINSON HJ. (1940). Oral and parenteral toxicity of vitamin K₁, phthiocol and 2-methyl 1,4-naphthoquinone, *Proc. Soc. Exp. Biol Med.* 43: 125-128.

PERRIN-ANSART MC, HAHN TH. (1989). Sur les sulfites employés comme conservateurs. *Cah. Nutr. Diét* 24: 291-298.

PETERS TJ, SEYMUR CA. (1976). Acid hydrolases activities and lysosomal integrity in liver biopsies from patients with iron overload. *Clin. Sci. Mol. Med.* 50:75-78.

RAVENS KG, GUDBMARSASON S. (1969). Changes in the activities of lysosomal enzymes in infarcted canine heart muscle. *Circulat. Res.* 24: 851-855.

RICHTERICH R. (1969). *Determination of glucose. Clinical Chemistry. Theory and Practice*. Academic Press. New York.

RIVERA GE. (1980). Hipervitaminosis K aguda en ratas. Trabajo de Ascenso a la Categoría de Profesor Titular. Departamento de Bioquímica, Universidad de Los Andes. Mérida. (no publicado).

SCHMIDT E, SCHMIDT FW. (1968). *Praktische Enzymologie*, H. Huber. Bern. Stuttgart.

SPECTOR WS. (1956). *Handbook of Biological Data* W.B. Saunders Co. Philadelphia and London.

SZASZ G. (1969). A kinetic photometric method for serum **gamma**-glutamyl transpeptidase. *Clin. Chem.* 15: 12~17.

WASERSTEIN M. (1973). *Enzimología Clínica en la Patología Hepática*. Editorial Puma. Buenos Aires.