

GLICOPROTEÍNAS SÉRICAS EN RATAS TRATADAS CON DOSIS ALTAS DE VITAMINA K₃ (MENADIONA).

Alarcón-Corredor OM, Guerrero Y, Belandria I.

Facultad de Medicina. Universidad de Los Andes. Mérida. Venezuela

Resumen

En el presente estudio se describe, en ratas Wistar, el efecto de la administración intramuscular diaria de dosis altas (10, 30 y 50 mg respectivamente) de vitamina K₃ (menadiona), por siete días, sobre las glicoproteínas séricas. Los resultados se comparan con los obtenidos en ratas tratadas con solución salina normal. Las glicoproteínas séricas se valoraron de acuerdo con las técnicas habituales de química clínica. La administración de dosis altas de vitamina K₃ produjo un incremento significativo ($p < 0.01$) en la concentración de las diferentes glicoproteínas en comparación con los controles no tratados. Es un hecho conocido que la vitamina K₃ a dosis elevadas determina necrosis, degeneración, hemorragias, inflamación y vacuolización en diversos tejidos y órganos de la rata. Los efectos citotóxicos de la vitamina K₃ se deben a la formación de semiquinonas, que reducen rápidamente al oxígeno con formación del radical superóxido (O₂⁻), y otros radicales libres, y producción de un estrés oxidativo, que a su vez determina la lesión tisular y las alteraciones en las glicoproteínas séricas, encontradas en la presente investigación.

Palabras claves: Hipervitaminosis K₃, menadiona, lesión tisular, glicoproteínas séricas.

Abstract

Serum glycoproteins in rats treated with high doses of vitamin K₃ (menadione)

In the present study the effect of intramuscular administration of high doses of vitamin K₃ (menadione) (10, 20 and 30 mg/day, respectively) on the serum glycoproteins in Wistar rats is described. The results were compared with those obtained in rats treated with normal saline solution. Serum glycoproteins were determined with the habitual techniques of clinical chemistry. High doses of vitamin K₃ determined a significant increase ($p < 0.01$) in the concentration of the different fractions of glycoproteins in comparison with the controls non-treated. It is well established that high doses of vitamin K₃ determine necrosis, degeneration, hemorrhage, inflammation and vacuolization in several tissues and organs of rat. The cytotoxic effects of vitamin K₃ are due to the semiquinone formation that reduces quickly the oxygen with formation of superoxide (O₂⁻), and other free radicals, and production of an oxidative stress that, in turn, determines the tissue damage and the alterations in the serum glycoproteins.

Key words: hypervitaminosis K₃, menadione, tissue damage, serum glycoproteins

INTRODUCCIÓN

Aunque las vitaminas K (K₁, K₂ y K₃) se consideran como un factor crítico en la coagulación de la sangre existen evidencias que apoyan su importancia en la salud ósea (Schaafsma et al. 2000 Shearer 2000). Recientemente se ha publicado que las vitaminas K₁ y K₂ se consideran protectores potenciales contra la osteoporosis (Tsukamoto 2004), la aterosclerosis (Adams y Pepping 2005) y el hepatocarcinoma (Nouso et al. 2005, Otsuka et al. 2004). La vitamina K₃ sintética (menadiona), por su parte, exhibe una marcada actividad antitumoral in vitro e in vivo

contra células cancerosas humanas y de roedores (Lamson y Plaza 2003, Okayasu et al. 2001, Wu et al. 1993, Juan y Wu 1993). Además, la vitamina K₃ es una vitamina de uso muy frecuente para el tratamiento de diversos trastornos hemorrágicos. A pesar de los efectos benéficos de la vitamina K₃ para la salud, su administración a dosis elevadas produce tanto en el hombre como en los animales de laboratorio diversas lesiones, tales como necrosis hepática (Smith Jr y Custer 1960), extravasaciones sanguíneas en hígado y riñón y depósito de Fe²⁺ a nivel hepático (Alarcón et al. 1985), alteraciones

hematológicas (disminución de la hemoglobina y del hematocrito, anemia hemolítica, hiperbilirrubinemia indirecta y neutrofilia, alteraciones enzimáticas séricas (Villavicencio et al. 1992) y renales (Alarcón et al. 2003) y cambios en el perfil lipídico (Alarcón et al. 1995).

Las glicoproteínas son compuestos constituidos de proteínas y restos de carbohidratos en los cuales los azúcares están firmemente ligados a la porción peptídica de la proteína; entre los glúcidos presentes en estas macromoléculas encontramos: galactosa y manosa (hexosas), N-acetil-galactosamina y N-acetil-glucosamina (hexosaminas), fucosa, arabinosa y D-xilosa (pentosas) y ácido N-acetil-neuramínico (ácido siálico) (Murray et al. 2004). La determinación de estos restos de carbohidratos se ha utilizado en clínica como un índice de los niveles séricos y de las alteraciones de estas macromoléculas. En la mayoría de los estudios se han valorado las hexosas (PBH), el ácido siálico y la fucosa unidas a las glicoproteínas y las mucoproteínas en la sangre, por consiguiente estas fracciones fueron las investigadas en el presente estudio.

Las glicoproteínas comprenden un gran número de sustancias de diversa importancia biológica que incluyen anticuerpos, enzimas, hormonas, componentes de los grupos sanguíneos, secreciones mucosas, membranas celulares y colágeno (Murray et al. 2004). Además de sus conocidas funciones biológicas, en la actualidad existe un renombrado interés sobre el tema de las glicoproteínas por haberse demostrado que sus concentraciones séricas se incrementan en múltiples situaciones patológicas, a lo cual se suma el hecho de que existen diversos tipos de glicoproteínas y que sus concentraciones sanguíneas pueden variar de manera independiente de acuerdo con el tipo de patología en estudio (Spiro 1969).

Sin embargo, a pesar de los trabajos publicados en el área de las glicoproteínas es muy poco lo que se conoce en relación a estos compuestos y a la vitamina K₃. En la presente investigación se estudió el efecto de dosis altas de vitamina K₃ (menadiona), administradas por vía intramuscular, sobre el contenido sérico de diversas fracciones glicoproteicas en ratas Wistar (grupos experimentales) y se comparó con lo que sucede en ratas sanas tratadas con solución salina normal (grupo control).

METODOLOGÍA

Reactivos y elaboración de las curvas de calibración.

Todos los reactivos utilizados (ácido sulfúrico concentrado, manosa, galactosa, ácido siálico, cisteína, ácido acético glacial, NaOH, difenilamina, ácido perclórico, etanol) fueron de grado analítico

(p.a. Merck o Sigma) y disueltos en agua bidestilada según las determinaciones a realizar. Las soluciones patrones (0,1 mg/dl) para cada una de las fracciones glicoproteicas valoradas se prepararon de los siguientes reactivos: orosomucoide (ácido siálico, Sigma; manosa y galactosa, Merck). Los patrones de trabajo se prepararon mediante las diluciones apropiadas y se utilizaron diariamente. La elaboración de las curvas de calibración para la determinación de las fracciones glicoproteicas se realizó según el método descrito por Winzler (1955).

Para inducir la hipervitaminosis K, se empleó la vitamina K₃ (Sigma: 2-metil-1,4 naftoquinona, sal de bisulfito sódico hidrosoluble) diluida en solución salina normal (NaCl 0,9% p/v).

Procedimiento Experimental.

En el estudio se emplearon 80 ratas macho Wistar, con pesos que oscilaron entre 160 y 180 g, mantenidas en jaulas metabólicas individuales, en el ambiente del laboratorio de Bioquímica (Facultad de Medicina, Universidad de Los Andes, Mérida, Venezuela) durante una semana para las adaptaciones correspondientes, previas al inicio de las experiencias. Se les suministró Ratarina Protinal suplementada con vitaminas y minerales y agua "ad libitum". Al término del periodo de adaptación, los animales se distribuyeron al azar en grupos experimentales y control de 20 animales cada uno. A los grupos experimentales (del 1 al 3) se les inyectó diariamente, por vía intramuscular, 1 ml de solución salina que contenía 10, 30 ó 50 mg de vitamina K₃ día, respectivamente, por espacio de siete días (Dosis total= 70, 210 ó 350 mg de vitamina K₃). Al grupo control se le inyectó por la misma vía 1 ml/día de solución salina normal. Durante todo el período experimental, los animales recibieron el mismo tipo de alimentación y tuvieron libre acceso al agua de bebida. Veinticuatro horas después de la última inyección de vitamina K₃ o de solución salina, los animales fueron anestesiados con éter etílico, en campana de vidrio. Las muestras de sangre (6 ml) se obtuvieron por punción del seno retro-orbitario con tubos de microhematocrito, se dejaron coagular espontáneamente a temperatura ambiente, durante 15 min., y luego se centrifugaron a 2.500 rpm, durante 10 minutos, a fin de asegurar la rápida obtención de los sueros. Por lo general, las muestras se analizaron el mismo día; en caso contrario, los sueros se congelaron a -20° C, hasta el momento de realizar las valoraciones analíticas correspondientes.

Para la determinación de las diferentes fracciones glicoproteicas (mucoproteínas, proteínas combinadas con ácido siálico, con fucosa o con hexosas o PBH) se utilizó la técnica descrita por Winzler (1955); el

procedimiento difiere según el tipo de compuesto valorado. Para el caso de las proteínas combinadas con el ácido siálico, éstas se precipitan del suero mediante etanol al 95% (v/v). El precipitado disuelto en NaOH 0.1 N se hace reaccionar con difenilamina, en medio ácido y a 100°C, con aparición de una coloración cuya intensidad se lee en Spectronic 20 B&L a 520 mμ. En el caso de las proteínas unidas con hexosas (PBH), la fracción glucídica de las proteínas conjugadas precipitadas mediante etanol al 95% (v/v) a temperatura ambiente (25°C), se determinan mediante la reacción del orcinol, con aparición de una coloración cuya intensidad se lee en Spectronic 20 B&L a 520 mμ. Las proteínas combinadas con fucosa se precipitan del suero con etanol al 5% (v/v) y el precipitado redisolto con NaOH 0.1N se trata con una solución acuosa de H₂SO₄-cisteína a 100°C; el color resultante de la reacción se lee en Spectronic B&L a 396 y 430 mμ, respectivamente. Las mucoproteínas por su parte, se precipitan del suero mediante el ácido fototúngstico y el precipitado, redisolto en medio alcalino, se hace reaccionar con el orcinol, con la aparición de un producto coloreado que se lee en Spectronic 20, B&L a 520 nm. Los resultados se expresan en mg/dl. Todas las determinaciones se realizaron por duplicado y aquellas que variaron en más de un 5% se repitieron.

Análisis estadístico

Se calcularon los promedios y las respectivas desviaciones estándar (promedios±DE). Para establecer las variaciones significativas entre los diferentes promedios, se practicó análisis de varianza (ANOVA) de una vía y 4 periodos y test de Tuckey para pruebas de múltiple rango, a un nivel α de significación del 0,05 (p<0.05). Para establecer la relación entre las variables: concentración sérica de las glicoproteínas y dosis de vitamina K₃ se practicó un análisis de regresión lineal.

RESULTADOS

Los resultados obtenidos se indican en la tabla 1. El ANOVA de una vía demostró que las concentraciones séricas de las diferentes glicoproteínas se incrementan significativamente (p<0.01) al comparar los valores de los grupos tratados con el grupo testigo correspondiente. El test de Tukey post-ANOVA demostró que existen diferencias significativas (p<0.01) al comparar entre sí las diferentes dosis de vitamina K₃ administradas. El análisis de regresión lineal demostró una correlación positiva y estadísticamente significativa (p<0.05) entre las dosis de vitamina K₃ y las concentraciones séricas de

mucoproteínas (r= 0.975; r²= 95.10%), PBH (r= 0.891; r²= 53.61%), ácido siálico (r= 0.978; r²= 95.67%) y fucosa (r= 0.999; r²= 99.79%). Los valores de los estadísticos r² indican que el modelo de regresión aplicado explica la variabilidad de las mucoproteínas, PBH, ácido siálico y fucosa, respectivamente, en relación con las dosis de menadiona inyectadas, lo cual sugiere que existen otros factores que no fueron estudiados en la presente investigación y que pueden haber influido en parte en los resultados obtenidos.

Tabla 1. Glicoproteínas séricas¹ en ratas tratadas con vitamina K₃

Fracción	Grupo control	G1 (10 mg)	G2 (30 mg)	G3 (50 mg)
Mucoproteínas	18±1.51	35±1.66 ^{ab}	43±2.33 ^a	69±3.82 ^{ac}
PBH	149±4.43	246±2.18 ^{ab}	264±4.14 ^a	280±9 ^{ac}
Ácido siálico	84±2.47	103±3.19 ^{ab}	122±3.48 ^a	135±2.88 ^{ac}
Fucosa	10±2.07	31±2.42 ^{ab}	67±4.01 ^a	101±8 ^{ac}

¹ Los resultados se expresan en mg/dl (Promedios±DE).

^a p<0.01, estadísticamente significativo al comparar con el grupo testigo.

^b p<0.01, estadísticamente significativo al comparar con los grupos tratados con 30 y 50 mg de vitamina K₃, respectivamente.

^c p<0.01, estadísticamente significativo al comparar con el grupo tratado con 30 mg de vitamina K₃, respectivamente.

PBH= proteínas combinadas con hexosas.

() Dosis de vitamina K₃ inyectada diariamente.

DISCUSIÓN

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 (p<0.05) la concentración sérica de las glicoproteínas valoradas.

Se conoce que concentraciones elevadas de glicoproteínas séricas se detectan en enfermedades caracterizadas por cambios tisulares, necróticos, inflamatorios, cancerosos, degenerativos, trombóticos y/o traumáticos (Carnevalí de Tata 1990, Macbeth y Bekesi 1962, Winzler 1955, Greenspan 1954), a tal punto que las mucoproteínas se conocen con el nombre genérico de proteínas de fase reactiva aguda. Por definición una proteína de fase reactiva aguda es aquella cuya concentración aumenta o disminuye en respuesta al estímulo inflamatorio. La mayoría realiza funciones específicas que se tornan muy importantes durante el proceso inflamatorio (Henry et al. 1974).

Por consiguiente, el aumento de las mucoproteínas, y otras glicoproteínas, ocurre en varios procesos inflamatorios sépticos o asepticos, agudos o crónicos, localizados o sistémicos, como neoplasias, enfermedades del colágeno, tuberculosis y otras enfermedades infecciosas, diabetes, etc. Sin embargo, su falta de especificidad limita su uso en términos de diagnóstico aunque las determinaciones seriadas de las mucoproteínas han sido utilizadas con relativo éxito para verificar la respuesta al tratamiento (Carnevali de Tatá 1990). Omdal y Aurebekk (1984) han postulado que el incremento en la concentración sérica de ácido siálico (proteínas unidas a ácido siálico) en diversos procesos inflamatorios puede ser una respuesta general del organismo a la inflamación y a la lesión tisular y se puede considerar como un indicador de la actividad de la enfermedad.

Es un hecho conocido que la hipervitaminosis K₃ determina, en humanos y en animales, necrosis tisular, hemorragias, trastornos inflamatorios y cambios patológicos en diversos órganos. Chiou et al. (1997) demostraron que la administración intravenosa de dosis únicas o múltiples entre 50 y 100 mg de menadiona produce lesiones en riñón, corazón, hígado y pulmón de ratas Wistar. Las lesiones renales incluyen dilatación tubular, presencia de cilindros proteicos en la luz de los túbulos, depósitos de Ca²⁺ en el parénquima, vacuolización en los túbulos proximales y distales, degeneración granular en la corteza y necrosis. Las lesiones en corazón incluyen inflamación, hemorragia, vacuolización, edema y necrosis. Las lesiones hepáticas se caracterizan por inflamación, degeneración, vacuolización y necrosis mientras que la única lesión observada en el pulmón es la hemorragia. Todas estas lesiones incrementan las concentraciones séricas de las glicoproteínas y explican los hallazgos de la presente investigación.

Se dispone de una considerable información acerca de los mecanismos que determinan los efectos tóxicos de la menadiona sobre los tejidos. La toxicidad de las quinonas ha sido atribuida al estrés oxidativo inducido por el proceso de redox cíclico de estas drogas en las células. Su metabolismo puede ocurrir por un proceso de reducción determinado por uno o por dos electrones. La reducción de la menadiona por un electrón determina la formación de un radical semiquinona, que puede ser oxidado por el oxígeno, con producción de un radical superóxido (O₂⁻) y otros radicales libres (Jewell *et al.* 1982, Thor *et al.* 1982, Tzenget al. 1994). Estos radicales dañan las membranas plasmáticas y las de las organelas, entre ellas los lisosomas y las mitocondrias. Las mitocondrias y los lisosomas alterados liberan, a su vez, diversas enzimas hidrolíticas. Por consiguiente, la hipervitaminosis K₃ determina la liberación de una

gran variedad de hidrolasas ácidas (manosidasas, catepsinas, ribonucleasa, desoxirribonucleasa, fosfatasa, α -1,4-glucosidasa o maltasa ácida, proteasa, β -glucuronidasa y sulfatasa, entre otras), que de acuerdo con De Duve et al. (1962) se encuentran en los lisosomas. Dingle (1963) comprobó que este complejo enzimático es el responsable de muchos de los cambios observados en los tejidos tratados con dosis excesivas de vitamina A u otras vitaminas liposolubles. Kokkola y Tani (1972) también han señalado que en los procesos de hipoxia, anoxia y daño tisular, ocurre la depolimerización de los mucopolisacáridos ácidos y los compuestos de proteínas unidas a diversos carbohidratos, que se originan de la destrucción tisular, llegan a la circulación y su contenido sérico se incrementa; la hipoxia, a su vez, es un hallazgo característico de la administración de menadiona a altas dosis (Alarcón et al. 1991).

CONCLUSIONES

La administración de dosis altas de vitamina K₃ eleva significativamente ($p < 0.05$) los niveles de las glicoproteínas séricas. Este incremento se debe a las lesiones tisulares determinadas por la administración de la menadiona a los animales experimentales. La vitamina K es potencialmente tóxica para la rata, y para el hombre, y por consiguiente se debe administrar con mucho cuidado en las situaciones clínicas que lo ameritan. Los resultados obtenidos pueden proporcionar información útil para futuros ensayos clínicos sobre la menadiona en el tratamiento del cáncer y de otras condiciones clínicas, además de servir como ejemplo para el estudio de los efectos del estrés oxidativo inducido por la menadiona in vivo.

REFERENCIAS

- Adams J, Pepping J. 2005. Vitamin K in the treatment and prevention of osteoporosis and arterial calcification. *Am J Health Syst Pharm* 62: 1574-1581.
- Alarcón-Corredor OM, Guerrero Y, Di Bernardo, M. et al. 2003. Distorsión del mapa enzimático renal en ratas tratadas con menadiona (vitamina K₃). *Rev Facultad de Farmacia* 45: 25-29
- Alarcón OM, Reinoza J, Silva L, Padrón F. 1995. Changes of serum lipids in vitamin K₃ (menadione) treated-rats. *Arch Latinoam Nutr* 45: 286-289
- Alarcón OM, Rodríguez de Castro E, Burguera JL et al. M.1985. Efecto de la vitamina K₃ (menadiona) sobre el contenido hepático de electrolitos. *Acta Cient Ven* 36: 232-235.
- Carnevali de Tatá E. 1990. Alteraciones de las glicoproteínas séricas en escolares portadores de diferentes patologías y recientes en la ciudad de Mérida. Trabajo de Ascenso. Facultad de Farmacia.

- Escuela de Bioanálisis. Universidad de Los Andes. Mérida. Venezuela.
- Chiou TJ, Zhang J, Ferrans VJ et al. 1997. Cardiac and renal toxicity of menadione in rat. *Toxicology* 124: 193-202.
- De Duve C, Wattiaux R, Baudhim P. 1962. Distribution of enzymes between subcellular fractions in animal tissues. *Adv Enzymol* 24: 291-358.
- Dingle JT. 1963. Action of vitamin A on the stability of lysosomes in vivo and in vitro. CIBA Foundation Symposium on Lysosomes, (De Reuck AVS, Cameron MP (Eds.). JA Churchill Ltd. London.
- Doisy EA, Matschiner JT. 1970. Biochemistry of Vitamin K. In: Fat-soluble vitamins. Pergamon Press. Oxford.
- Greenspan EM. 1954. Survey of clinical significance of serum mucoprotein level. *AMA Arch Intern Med*. 93: 863-874.
- Henry RJ, Cannon DC, Wikelman JW. 1974. Clinical Chemistry. Principles and Technics. 2a. ed. Harper & Row. New York,
- Jewell SA, Bellomo G, Thor H et al. 1982. Bleb formation in hepatocytes during drug metabolism is caused by disturbances in thiol and calcium ion homeostasis. *Science* 217: 1257-1258.
- Juan CC, Wu FY. 1993. Vitamin K₃ inhibits growth of human hepatoma HepG2 cells by decreasing activities of both p34cdc2 kinase and phosphatase. *Biochem Biophys Res Commun* 190: 907-913.
- Kokkola K, Tani P. 1972. Serum hexosamine, iron and total iron-binding capacity in untreated pulmonary tuberculosis. *Scand J Respir Dis Suppl*. 80: 129-35.
- Lamson DW, Plaza SM. 2003. The anticancer effects of vitamin K. *Altern Med Rev*. 8: 303-18.
- Macbeth RAL, Bekesi JG. 1962. Plasma glycoproteins in various disease states including carcinoma. *Cancer Res* 22: 1170-1176
- Murray RK, Mayes PA, Granner et al.. 2004. Harper Bioquímica Ilustrada. 16ª ed. El Manual Moderno. México.
- Nouso K, Uematsu S, Shiraga K et al. 2005. Regression of hepatocellular carcinoma during vitamin K administration. *World J Gastroenterol*. 11: 6722-6724.
- Okayasu H, Ishihara M, Satoh K et al. 2001. Cytotoxic activity of vitamins K₁, K₂ and K₃ against human oral tumor cell lines. *Anticancer Res* 21: 2387-2392.
- Omdal R, Aurebekk B. 1984. Sialic acid (N-acetylneuraminic acid) in the synovial fluid and serum of patients with inflammatory and non-inflammatory joint disease. *Scand J Rheumatol* 14: 87-89.
- Otsuka M, Kato N, Shao RX et al. 2004. Vitamin K₂ inhibits the growth and invasiveness of hepatocellular carcinoma cells via protein kinase A activation. *Hepatology* 40: 243-251.
- Shearer MJ. 2000. Role of vitamin K and Gla proteins in the pathophysiology of osteoporosis and vascular calcification. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 3: 433-438.
- Schaafsma A, Muskiet FA, Storm H et al. 2000. Vitamin D(3) and vitamin K(1) supplementation of Dutch postmenopausal women with normal and low bone mineral densities: effects on serum 25-hydroxyvitamin D and carboxylated osteocalcin. *Eur J Clin Nutr* 54: 626-631.
- Smith AM Jr, Custer RP (1960). Toxicity of vitamin K. Induced hypoprothrombinemia and altered liver function. *JAMA* 173: 502-504.
- Spiro RG. 1969. Glycoproteins: their biochemistry, biology and role in human disease. *N Engl J Med* 281: 991-1000, 1043-1056.
- Thor H, Smith MT, Hartzell P et al. 1982. The metabolism of menadione (2-methyl-1,4-naphthoquinone) by isolated hepatocytes. *J Biol Chem*. 257: 12419-12425.
- Tsukamoto Y. 2004. Studies on action of menaquinone-7 in regulation of bone metabolism and its preventive role of osteoporosis. *Biofactors* 22: 5-19.
- Tzeng WF, Chiou TJ, Wang CP et al. 1994. Cellular thiols as a determinant of responsiveness to menadione in cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol* 26: 889-897.
- Villavicencio M AJ, Somoza T CJ, Tauil BE, Alarcón OM. 1992. Alteraciones enzimáticas séricas en la hipervitaminosis K₃ aguda. *MedULA. Rev. Fac Med ULA* 1: 125-129
- Winzler RJ. 1955. Determination of serum glycoproteins. *Methods Biochem Anal*. 2: 279-311.
- Wu FY, Liao WC, Chang HM. 1993. Comparison of antitumor activity of vitamins K₁, K₂ and K₃ on human tumor cells by two (MTT and SRB) cell viability assays. *Life Sci* 52: 1797-1804.

Recibido: 5 nov 2006.

Aceptado: 10 dic 2006