

# Distorsión del Mapa Enzimático Hepático en la Hipervitaminosis K<sub>3</sub> Aguda.

Oscar M. Alarcón<sup>1</sup>, Tania Silva<sup>1</sup>, Aleyda Padrón<sup>1</sup>, Eduar Tauil B.<sup>1</sup>, Roviro Chavarría<sup>1</sup>, Elizabeth de Tatá<sup>2</sup>.

<sup>1</sup>Departamento de Bioquímica. Facultad de Medicina. <sup>2</sup>Departamento de Análisis Clínico. Escuela de Bioanálisis. Facultad de Farmacia. Universidad de los Andes. Mérida.

## Resumen

En el presente estudio se describe el efecto de dosis elevadas de vitamina K<sub>3</sub> (VK: 10 a 50 mg/Kg/día) inyectadas intramuscularmente, durante un lapso de 7 días, sobre la actividad hepática de las siguientes enzimas: glucosa-6-fosfatasa, glucógeno fosforilasa, amilasa, maltasa ácida, proteasas ácidas y alanina y aspartato aminotransferasas en ratas blancas macho y se comparan los resultados con lo que sucede en ratas tratadas con dosis iguales de bisulfito de sodio. En los animales tratados con VK se encontró un aumento significativo en las actividades enzimáticas señaladas, con excepción de la glucógeno fosforilasa, que disminuyó su actividad, y de la amilasa, que mostró un comportamiento irregular. Se discuten los resultados obtenidos y se concluye que la VK, a dosis elevadas, es potencialmente hepatotóxica, al igual que las otras vitaminas liposolubles (A, D y E).

Palabras clave: Hipervitaminosis K<sub>3</sub>, medianona, mapa enzimático hepático, enzimas hepáticas

## Abstract

### Changes in the enzyme pattern of the liver in the acute hypervitaminosis K<sub>3</sub>.

In the present study we describe the effect of high doses of vitamin K<sub>3</sub> (VK: 10 mg/Kg/day to 50 mg/Kg/day) injected i.m., for 7 days, on the activity of the glucose-6-phosphatase, glycogen phosphorylase, amylase, acid maltase, acid proteases and alanin and aspartate aminotransferases in the liver of male albino rats. The results were compared with that obtained in rats treated with sodium bisulfite. In VK-treated animals the enzymatic activity of all the enzymes, except glycogen phosphorylase, increased significantly; glycogen phosphorylase, decreased and amylase activity behaved erratically. We concluded that high doses of VK are toxic to the liver in a similar way as other liposoluble vitamins, i.e. A, D and E

Key Words: Hypervitaminosis K<sub>3</sub>, mediadone, enzyme pattern of the liver, liver enzymes.

## INTRODUCCIÓN

Publicaciones previas señalan que el hígado es muy propenso a modificar su estructura y su metabolismo normal por efecto de la vitaminas A (Alarcón y cols., 1986 a), D (Alarcón y cols., 1986 b) y E (Sánchez de Molina, 1989) que conjuntamente con las K, integran el grupo conocido como vitaminas liposolubles. Unger y Shapiro (1948) han señalado los efectos adversos de la vitamina K sobre el hígado previamente lesionado. Smith y Custer (1960), por su parte, publicaron un caso de daño hepático inducido por la administración de la vitamina K (VK) a pacientes sin enfermedad hepática previa. En el hígado de ratas tratadas con vitamina K<sub>3</sub> (menadiona), durante dos días, se han descrito cambios en su composición electrolítica (Alarcón y cols., 1985). Estos hechos sugieren, por tanto, que el hígado es muy susceptible de intoxicarse y modificar sus actividades enzimáticas (y/o metabólicas) con la administración de la

VK a dosis elevadas, incluso durante cortos períodos de tiempo. Con el fin de comprobar esta hipótesis, en la presente investigación se valoró la actividad de las siguientes enzimas; alanina y aspartato aminotransferasas, glucosa-6-fosfatasa, glucógeno fosforilasa, amilasa, maltasa ácida y proteasas ácidas vinculadas con los diversos metabolismos intermediarios, en el hígado de ratas tratadas con dosis variables de vitamina ~ (Grupos Experimentales) y se comparó con lo que sucede en ratas que recibieron dosis equivalentes de bisulfito de sodio (Grupos Controles).

## MATERIALES Y METODOS 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. Como alimento se les suministró Ratarina Protinal R suplementada con

vitaminas y minerales. Agua de bebida «ad libitum». Al término del período de adaptación, los animales 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 K<sub>3</sub> (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 de tiempo, dosis equivalentes de bisulfito de sodio, en solución acuosa. Los volúmenes administrados, tanto de vitamina K<sub>3</sub> 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 K<sub>3</sub> o de bisulfito de sodio, según los casos, los animales se anestesiaron con éter etílico, en campana de vidrio e inmediatamente después se decapitaron mediante el empleo de una guillotina Harvard y se desangraron durante 1-3 mm. Se practicó laparotomía y los hígados fueron perfundidos «in situ», con sacarosa 0.25 M fría, siendo después resecados y colocados en cápsulas de Petri, sobre baño de hielo. Se pesaron trozos de 1 g en balanza de precisión y se procedió a la preparación de los homogenatos correspondientes. Se determinó la actividad de las siguientes enzimas: glucosa 6-fosfatasa (E.C. 3.1.3.9) según la técnica de Harper (1963); glucógeno fosforilasa (E.C. 2.4.1.1) según el procedimiento de Niemeyer y cols. (1961); amilasa (E.C. 3.2.1.1) según el método de Rinaudo y cols. (1966); maltasa ácida (E.C. 3.2.1.20) según la técnica de Hers (1963) mientras que la proteasa ácida (E.C. 3.4.1.14) se cuantificó según el procedimiento descrito por Dingle y cols. (1966). La aspartato aminotransferasa (TGO; E.C. 2.6.1.1) y la alanina aminotransferasa (TGP; E.C. 2.6.1.2) se valoraron por el procedimiento de Reitman y Frankel (1957). El fósforo inorgánico (Pi) liberado durante la reacción de la glucosa-6-fosfatasa y de la glucógeno fosforilasa se determinó según Fiske y Subbarow (1925). Los resultados se expresan en promedio + 2 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.

**Tabla 1. Efecto de la Vitamina K y Bisulfito sobre la Actividad de Diversas Enzimas Hepáticas Relacionadas con el Metabolismo Glucídico (Mérida,1994).**

Enzimas	Dosis	Bisulfito	VIT. K	"p" <sup>1</sup>
Glucosa -6- fosfatasa	10	11±1.39	8±1.30	N.S
	20	12±2.73	12±1.95	N.S
	30	10±3.00	12±1.95	N.S
	40	12±2.50	15±1.30	<0.05
	50	11±2.19	18±4.38	<0.05
Glucógeno fosforilasa	10	183±38	175±34	N.S
	20	143±30	146±30	N.S
	30	135±26	125±28	<0.05
	40	132±33	113±35	<0.05
	50	111±37	108±28	<0.05
Amilasa	10	0.40±0.22	0.49±0.49	N.S
	20	0.61±0.22	0.48±0.36	<0.05
	30	1.14±0.94	0.99±1.03	<0.05
	40	0.78±0.58	0.65±0.54	N.S
	50	1.35±1.02	0.55±1.20	<0.05

Actividades enzimáticas: Glucosa -6- fosfatasa: uM Pi/g de tejido / minuto. Glucógeno fosforilasa: U.A. Amilasa: uM glucosa/g de tejido / hora. Los resultados se expresan en las unidades de actividad enzimática señaladas (medias ±2D.E.). Dosis: mg/Kg/día <sup>1</sup>p<0.05 estadísticamente significativo al comparar con los controles correspondientes. <sup>a</sup>p<0.05 estadísticamente significativo al comparar entre sí las diferentes dosis

## RESULTADOS

Los resultados obtenidos se muestran en las tablas 1, 2y 3. En los animales tratados con menadiona (vitamina K<sub>3</sub>) las aminotransferasas (TGO y TOP), la glucosa-6-fosfatasa, la maltasa ácida y la proteasa ácida (dos enzimas lisosomales) incrementaron progresivamente sus actividades a diferencia de la glucógeno fosforilasa que la disminuyó. La amilasa, por su parte, mostró un comportamiento irregular obteniéndose una máxima actividad con la dosis de 30 mg de vitamina K<sub>3</sub>, al comparar con los respectivos grupos control. En todos los casos, con excepción de la amilasa, las modificaciones enzimáticas se corresponden significativamente con las dosis administradas de la menadiona. El bisulfito, por su parte, disminuyó significativamente la actividad de la glucógeno fosforilasa, aunque en menor proporción que la menadiona, e incrementó significativamente la

actividad amilolítica, en especial con los 50 mg.

**Tabla 2. Actividad de las Enzimas Lisosomales Hepáticas en Ratas Tratadas con Vitamina K y Bisulfito (Mérida,1994).**

Enzimas	Dosis	Bisulfito	VIT. K	"p" <sup>1</sup>
Maltasa ácida	10	2.23±0.85	1.78±0.54	N.S
	20	2.78±1.03	2.35±0.80	N.S
	30	2.31±0.72	2.60±0.58	N.S
	40	2.00±0.67	2.83±0.67	<0.05
	50	1.90±0.67	3.09±0.72	<0.05
		N.S	<0.05 <sup>a</sup>	
Proteasa ácida	10	4.75±0.88	3.66±0.36	N.S
	20	4.70±0.62	3.89±0.30	N.S
	30	4.77±0.35	4.02±0.26	N.S
	40	4.03±0.34	5.90±0.84	<0.05
	50	4.25±0.33	6.42±0.45	<0.05
		N.S	<0.05 <sup>a</sup>	

**Actividades enzimáticas: Maltasa ácida: uM glucosa/g de tejido / hora.. Proteasas ácidas: ug de tirosina/mg de tejido / hora. Los resultados se expresan en las unidades de actividad enzimática señaladas (medias ±2D.E.). Resto de la Leyenda igual a la Tabla 1.**

## DISCUSIÓN

Con muy pequeñas diferencias, no significativas, las actividades de las enzimas cuantificadas en las ratas tratadas con 10-40 mg de bisulfito / día son muy semejantes a las publicadas previamente por Alarcón y cols. (1986b) y otros (Harper, 1963; Niemeyer y cols., 1961; Rinaudo y cols.1966; Hers, 1963; Dingle y cols., 1966). Sin embargo, con la dosis de 50 mg del compuesto, las diferencias de las actividades enzimáticas hepáticas, con respecto a los valores considerados "normales" para la rata, son estadísticamente significativas, lo cual se debe al bisulfito administrado (Perrin-Ansart y Hahn, 1989).

La administración de la vitamina K<sub>3</sub>, que sobrepasa en mucho los requerimientos diarios permitidos para la rata macho (Doisy y Matschiner, 1970), durante cortos lapsos de tiempo modificó significativamente las enzimas valoradas en la presente investigación, con excepción de la amilasa (que mostró un comportamiento irregular). El grado de variación de la actividad enzimática se corresponde positiva y significativamente con el contenido hepático de la menadiona o vitamina K<sub>3</sub>. Los hallazgos presentes permiten concluir que las dosis elevadas de la vitamina K<sub>3</sub>, incluso por breves períodos (hipervitaminosis K aguda) determinan una marcada

distorsión de las actividades enzimáticas hepáticas. Esta alteración del metabolismo normal del hígado explica su fácil tendencia a intoxicarse con la sobredosis de vitamina K<sub>3</sub> y los hallazgos histopatológicos y de química sanguínea descritos por diversos investigadores (Smith y Custer, 1960; Alarcón y col., 1985; Carrillo de Quintero, 1989).

Basándonos en investigaciones realizadas en nuestro departamento (Rivera, 1980) se podría sugerir algunos posibles mecanismos de producción para estas alteraciones enzimáticas. Por ejemplo: el daño oxidativo (Thor y cols., 1982) determinado por la VK; la acidosis y la hipoxia tisular, consecutivas a la disminución en el aporte de oxígeno a los tejidos, inducidas por las alteraciones en la hemoglobina (Shimkin, 1941; Deuel, 1957), hallazgos típicos de la hipervitaminosis K. Entre otros también cabe citar las alteraciones en la distribución electrolítica tisular Alarcón y cols., 1985) y la sobreproducción de diversas enzimas en aquellas áreas hipóxicas cercanas al sitio de la lesión (Ticktin y Trujillo, 1966).

El incremento en la actividad de las hidrolasas ácidas (maltasa y proteasas) se debe al efecto, comprobado "in vitro", de la vitamina K<sub>3</sub> sobre las membranas lisosomales (de Duve y cols., 1962): Efecto que es potenciado por la anoxia y la acidosis intracelular (Rivera, 1980). Estas enzimas lisosomales están comprometidas en la fagocitosis y en la destrucción autolítica de los tejidos (Brandes y cols. 1967). Es interesante señalar el incremento en el contenido de hierro a nivel hepático (Alarcón y cols., 1985) de terminado por la vitamina K<sub>3</sub>. De acuerdo con Peters y Seymour (1976) este metal, al depositarse en el hígado en grandes cantidades, labiliza las membranas lisosomales favoreciendo de este modo la salida de sus enzimas hacia el citoplasma celular.

Los resultados obtenidos son muy parecidos a los inducidos por la dosis excesivas de las otras vitaminas liposolubles (Alarcón y cols. 1986<sup>a</sup>, b; Sánchez de Molina, 1989). Consideramos, no obstante, que a pesar de este hecho, es necesario estudiar el efecto de esta vitamina sobre otros órganos (p.e. riñón, brazo, etc.) y otras rutas metabólicas. Incluso el mapa enzimático puede ser ampliado y sustentado mediante la valoración de otras enzimas «marcadoras de lesión hepatocítica»

y/o «marcadoras de colestasis», como por ejm. la fosfatasa alcalina, la 5'nucleotidasa, la leucinaminopeptidasa y la gammaglu-tamiltranspeptidasa.

Para finalizar debemos tener presente que la vitamina K<sub>3</sub> es potencialmente tóxica, para el hígado como se desprende de los resultados obtenidos.

**Tabla 3. Actividades de las Enzimas Marcadoras de lesión en el Hígado de Ratas Tratadas con Vitamina K y Bisulfito (Mérida,1994).**

Enzimas	Dosis	Bisulfito	VIT. K	"p" <sup>1</sup>
TGO	10	2.23±0.85	1.78±0.54	N.S
	20	2.78±1.03	2.35±0.80	N.S
	30	2.31±0.72	2.60±0.58	N.S
	40	2.00±0.67	2.83±0.67	<0.05
	50	1.90±0.67	3.09±0.72	<0.05
		N.S	<0.05 <sup>a</sup>	
TGP	10	4.75±0.88	3.66±0.36	N.S
	20	4.70±0.62	3.89±0.30	N.S
	30	4.77±0.35	4.02±0.26	N.S
	40	4.03±0.34	5.90±0.84	<0.05
	50	4.25±0.33	6.42±0.45	<0.05
		N.S	<0.05 <sup>a</sup>	

**Transaminasas glutámico-oxaloacética (TGO y glutámico-pirúvica (TGP): Unidades/g de tejido / hora. Los resultados se expresan en las unidades de actividad enzimática señaladas (medias ±2D.E.). Resto de la Leyenda igual a la Tabla 1.**

## REFERENCIAS

Alarcón, O. M., Jonckheer, M. E., Molina, D. E., y cols.: Modificaciones del metabolismo proteico en la hipervitaminosis A aguda, en ratas. Acta Cient. Venezolana 37: 162-169, 1986a.

Alarcón, O. M., Burguera, J. L., Burguera, M., Burguera, J. A.: Efecto de la hipervitaminosis D sobre la actividad de algunas enzimas en hígado de ratas. Arch. Latinam. Nutr. 36: 98-107, 1986b.

Alarcón, O. M., Rodríguez de Castro, E., Burguera, J. L., Burguera, M.: Efecto de la vitamina K<sub>3</sub> (menadiona) sobre el contenido hepático de electrolitos. Acta. Cient. Venezolana 36: 232-235, 1985.

Brandes, D., Antón, E. Knokwai, L.: Studies on L-1210 leukemia. II. Ultrastructural and cytochemical changes after treatment with cyclophosphamide and vitamin A. J. Natl. Cancer Inst. 39: 385-421. 1967.

Carrillo de Quintero, G. Alteraciones de la química sanguínea en ratas tratadas con vitamina K<sub>3</sub>. Trabajo de Ascenso a Profesor Asistente. Departamento de Bioquímica. Facultad de Medicina. ULA. Mérida. 1989.

De Duve, C., Wattiaux, R., Wibo, M.: Effects of fat-soluble compounds on lysosomes in vitro. Biochem. Pharmacol. 9: 97-116, 1962.

Deuel, M. J.: The Lipids. Metabolism and Nutritional Value. Vol 11. Interscience. New York . 1957; pp. 857-865.

Dingle, J.T., Sharman, M., Moore, T.: Nutrition and lysosomal activity. The influence of vitamin A status on the proteolytic activity of extracts from the liver and kidneys of rats. Biochem. J. 98: 476-484, 1966.

Doisy, E. A., Matschiner, J. T.: Biochemistry of Vitamin K. In: Fatsoluble vitamins. Morton, R. A. (ed.). Pergamon Press. Oxford. 1070; pp. 293-331.

Fiske, C. H., Subbarow, Y.: Colorimetric determination of phosphorus. J. Biol. Chem. 66: 375-382, 1925.

Harper, A. E: Glucose-6-phosphatase. In: Methods of Enzymatic Análisis H. U. Bergmeyer (ed.). New York. Academic Press. 1963; pp. 760-769.

Hers, H. G.: Glycogen storage diseases. Adv. Met. Dis. 1: 10-98, 1963.

Niemeyer, H. G., González, C., Roíz, R.: The influence od diet on liver phosphorylase. I. Effect of fstaing and refeending. J. Biol. Chem. 236: 610-613, 1961.

Perrin-Ansart, M. C., Hahn, Th.: Sur les sulfites employes comme conservateurs. Cah. Nutr. Diet. 24: 291-298, 1989.

Peters, T. J., Seymour, C. A.: Acid hydrolases activities and lysosomal integrity in liver biopsies from patients with iron overload. Clin. Sci. Mol. Med. 50: 75-78, 1976.

Reitman, S., Frankel, S.: Colorimetric meted for the determination of serum glutamic oxalacetic and glutamic pyruvic transaminase. Am. J. Clin. Path. 28: 56-62. 1957

Rinaudo, M. T., Antoniotti, M. L., Montecucchi, P. C.: Uridindifosfoglucosa-glicogeno glucosil transferís ed a-amilasi nel fegato di ratti in hipervitaminosis A. Boll. Soc. Ital. Biol. Sper. 42: 194-197, 1966.

Rivera, G. E.: Hipervitaminosis K aguda en ratas. Trabajo de Ascenso a la Categoría de Profesor Titular. Departamento de Bioquímica. Universidad de los Andes. Mérida. 1980.

Sánchez de Molina, D.: Distorsión del mapa enzimático hepático por efecto de la hipervitaminosis E. Departamento de Bioquímica. Facultad de Medicina. Universidad de los Andes. Mérida. Venezuela. 1989.

Shikin, M. B.: Toxicity of naphthoquinone with vitamin K activity in mice. J. Pharmacol. Expt. Ther. 71: 210-214, 1941.

Smith, A. M., Jr., Custer, R. P.: Toxicity of vitamin K. Induced hypoprothrombinemia and altered liver function. JAMA 173: 502-504. 1960.

Thor, H., Smith, T.S., Hartrell, B., Bellomo, B., Jewett, S. A.: The metabolim of menadione (2-methyl-1,4-naphthoquinone) by isolated hepatocytes. J. Biol. Chem. 257: 12419-12425, 1982.

Ticktin, H. E., Trujillo, N. P.: serum encimes in diagnosis. D.M. 3: 40-51, 1966.

Unger, P. N., Shapiro, S.: Prothrombin reponse to the parenteral administration of large doses of vitamin K in subjects with normal liver diseases: Standardized test for the estimation of hepatic function. J. Clin. Invest., 27: 39-47, 1948.