

## Alteraciones clínicas y bioquímicas en ratas tratadas con dosis altas de vitamina A

Alarcón-Corredor OM, Alfonso R.

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

**RESUMEN.** En el presente trabajo se estudió el efecto de la administración intramuscular de 30.000, 50.000 y 100.000 UI de palmitato de vitamina A/día, durante 7 días, respectivamente, sobre la actividad enzimática hepática en 45 ratas Wistar machos, de 12 semanas de edad, con pesos entre 180 y 200 gramos. El grupo control estuvo integrado por 15 ratas Wistar sanas, con género, edad y peso similares a los animales tratados. El consumo de alimentos y de agua, y el peso de las ratas se determinó al finalizar el período experimental. Las ratas se examinaron en busca de manifestaciones clínicas de toxicidad. Al final el estudio, las ratas se sacrificaron bajo anestesia con éter y se tomaron muestras de tejido hepático para la determinación de la actividad enzimática. La administración de vitamina A en exceso incrementó de manera significativa ( $p < 0,05$ ) el contenido hepático del retinol, determinó diversos y variados signos clínicos (tales como: anorexia, pérdida de peso, alopecia, conjuntivitis, hemorragias internas y externas, alteraciones cutáneas y muerte de los animales) e incrementó ( $p < 0,05$ ) la actividad de las siguientes enzimas: alanina aminotransferasa, aspartato aminotransferasa, maltasa ácida ( $\alpha$ -1,4-glucosidasa ácida), proteasas ácidas, lactato dehidrogenasa y fosfatasa alcalina mientras que las actividades de la glucosa-6-fosfatasa, glucógeno fosforilasa,  $\alpha$ -amilasa, colinesterasa y arginasa disminuyeron ( $p < 0,05$ ) al comparar con los controles no tratados. Estos cambios son proporcionales a las dosis inyectadas de vitamina A. En conclusión, nuestros resultados proporcionan evidencias que la administración de dosis altas de vitamina A a corto plazo determina diversos y variados signos clínicos y produce una marcada alteración de la actividad enzimática hepática.

**Palabras clave:** Vitamina A, retinol, hipervitaminosis A, enzimas hepáticas, signos clínicos.

### INTRODUCCION

La vitamina A (holo-trans-retinol), una vitamina liposoluble, es un nutriente esencial para animales y humanos porque no puede ser sintetizada *de novo*. La molécula participa en todos los procesos normales de proliferación y diferenciación celular. En especial, la vitamina A, y sus derivados naturales: el retinal y el ácido retinoico, se requieren en diversos procesos como: la embriogénesis, la visión, la reproducción, el desarrollo esquelético, la morfogénesis, el mantenimiento de las membranas celulares y de los tejidos epiteliales, la hemopoyesis, la depuración de los radicales libres, la respuesta inmune y la protección contra diversos tumores (1).

**SUMMARY. Clinical and biochemical alterations in rats treated with high doses of vitamin A.** In the present work the effect of intramuscular administration of 30.000, 50.000 and 100.000 IU of vitamin A palmitate daily for seven days, respectively, on the liver enzyme activity in 45 white male Wistar rats, aged 12 weeks and weighing 180-200 g, have been studied. The group control was integrated by 15 healthy rats with similar characteristics (strain, gender, age and weight) to treated animals. Food and water consumption and body weights were recorded at the end of the experimental period. Rats were observed for clinical signs of toxicity. At the end of the study, rats were sacrificed under ether anesthesia. Liver samples were taken for the determination of enzyme activity. Administration of excess of vitamin A produced a significant ( $p < 0.05$ ) increase in the content of liver vitamin A, determined diverse and variable clinical signs (such as, anorexia, loss of body weight, alopecia, conjunctivitis, external and internal hemorrhages, skin abnormalities and death) and increased ( $p < 0.05$ ) the activity of the following enzymes: alanine aminotransferase, aspartate aminotransferase, acid maltase (acid  $\alpha$ -1,4-glucosidase), acid proteases, lactate dehydrogenase and alkaline phosphatase while glucose-6-phosphatase, glycogen phosphorylase,  $\alpha$ -amylase, cholinesterase and arginase decreased ( $p < 0.05$ ) as compared with untreated controls. These changes depend on the doses given of vitamin A. In conclusion, our results provide evidence that short-term administration of high doses of vitamin A determined diverse and variable clinical signs and produces a marked alteration of activity of liver enzymes.

**Key words:** Vitamin A, retinol, hypervitaminosis A, liver enzymes, clinical signs.

La toxicidad (hipervitaminosis) sólo ocurre cuando la cantidad de vitamina A consumida o administrada intramuscularmente excede la capacidad de combinación o unión de la proteína transportadora de retinol (RBP). La combinación de una absorción relativamente rápida con una baja depuración plasmática puede producir la toxicidad aguda (hipervitaminosis A aguda) a las pocas horas después ser consumida o inyectada una dosis del compuesto lo suficientemente alta. Al contrario, la hipervitaminosis A crónica aparece cuando dosis más pequeñas de vitamina A se administran durante un periodo más prolongado, de meses a años (1).

Los efectos tóxicos de la hipervitaminosis A aguda en los animales experimentales están muy bien documentados; entre los animales, la rata parece ser especialmente sensible a la hipervitaminosis A (2). En vista que la vitamina A se almacena principalmente en el hígado, el cual desempeña un papel de gran importancia en su metabolismo inicial y en su liberación hacia los tejidos periféricos (1), y que la hipervitaminosis A crónica determina marcados cambios a nivel hepático como: necrosis hepatocelular, degeneración grasa y cirrosis en los animales experimentales (2), a lo cual se puede agregar, de acuerdo con nuestro conocimiento, que son muy pocas las publicaciones existentes sobre los efectos de la hipervitaminosis A aguda sobre la actividad enzimática hepática en los animales experimentales, estos hechos motivaron la realización del presente trabajo en el cual se describe, en ratas, las manifestaciones clínicas y los cambios en la actividad hepática de diversas clases de enzimas (oxido-reductasas, transferasas e hidrolasas) determinados por la administración intramuscular de dosis crecientes de vitamina A (retinol), durante un periodo de 7 días (hipervitaminosis A aguda).

## MATERIALES Y METODOS

El Protocolo fue aprobado por el Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, que se encargó de velar por el buen uso y cuidado de los animales de laboratorio y avaló los procedimientos experimentales utilizados en estas ratas.

### Diseño experimental

Se emplearon 60 ratas macho Wistar, de 12 semanas de edad, con pesos 180 y 200 gramos, mantenidas en jaulas metabólicas individuales, durante una semana, para su adaptación al ambiente del laboratorio. Los animales tuvieron libre acceso al agua de bebida y a la comida durante el periodo de adaptación. Después de este periodo de adaptación, los animales se distribuyeron al azar en 4 grupos, de 15 ratas cada grupo, sin que hubiese diferencias significativas previas entre los promedios de peso de los distintos grupos. Los grupos 1 al 3 (grupos tratados) recibieron inyecciones intramusculares de 30.000, 50.000 y 100.000 UI/día de palmitato de vitamina A (Merck, vitamina A palmitato hidrosoluble; 1 mL= 100.000 UI) por siete días. Al grupo 4 que se utilizó como control, se le administró por la misma vía, y durante el mismo lapso, solución salina. Los volúmenes administrados tanto de vitamina A, como de solución salina, siempre fueron de 1 ml. Durante el periodo experimental, los animales recibieron el mismo alimento, tuvieron libre acceso al agua de bebida y se examinaron para descubrir cualquier manifestación patológica. Las ratas se pesaron en una balanza Sartorius y se registró el consumo de comida y de agua al principio y al final del periodo experimental.

A las 24 horas de administrada la última dosis de vitamina A o de solución salina, según los casos, los animales se anestesiaron con éter etílico, se decapitaron con una guillotina Harvard y se desangraron durante 1-3 minutos. Se practicó laparotomía mediana dejando al descubierto los lóbulos hepáticos, que fueron resecados y colocados en cápsulas de Petri, sobre baño de hielo. Los homogenatos hepáticos se prepararon al 10% (p/v) (1 gramo en 10 mL de agua bidestilada) utilizando un homogenizador de Potter-Elvehjem, se congelaron de inmediato y se utilizaron para las determinaciones enzimáticas, en un plazo no mayor de 48 horas.

### Actividades enzimáticas valoradas

La glucosa-6-fosfatasa (G-6-Pasa, EC 3.1.3.9.) se estimó según la técnica de Harper, utilizando como sustrato glucosa-6-fosfato (3). El fósforo inorgánico (Pi) liberado en la reacción enzimática se valoró según las recomendaciones de Fiske y Subbarow (4), expresándose los resultados en  $\mu\text{mol}$  de Pi liberados por gramo de tejido/minuto de incubación. La glucógeno fosforilasa (GF, EC 2.4.1.1) se valoró según el método de Niemeyer et al. (5) utilizando como sustrato una mezcla que contenía glucosa-1-fosfato, adenosinmonofosfato (AMP) y glucógeno (pH 6). El Pi liberado en la reacción enzimática se valoró según Fiske y Subbarow (4), expresándose los resultados en unidades de fosforilasa (UF). Una unidad de fosforilasa se define como la cantidad de enzima que libera 1  $\mu\text{mol}$  de Pi durante 5 minutos de incubación a 30°C. La actividad de la  $\alpha$ -amilasa (AMS, EC 3.2.1.1) se determinó según el método descrito por Rinaudo et al. (6), utilizando almidón hidrosoluble tamponado como sustrato. Los resultados se expresan en milimoles de glucosa liberados por gramo de tejido/hora de incubación. La maltasa ácida (MA o  $\alpha$ -1,4-glucosidasa ácida, EC 3.2.1.20) se cuantificó según la técnica de Gamkhou y Scherstén modificada (7), utilizando un sustrato tamponado de maltosa. Los resultados se expresan en mmoles de glucosa liberados por gramo de tejido y por hora de incubación. La aspartato aminotransferasa (AST) o transaminasa glutámico-oxaloacética (TGO) (EC 2.6.1.1) y la alanina aminotransferasa (ALT) o transaminasa glutámico-pirúvica (TGP) (EC 2.6.1.2) se determinaron mediante el método de Reitman y Frankel (8) utilizando aspartato y D,L-alanina como sustratos, respectivamente. Los resultados se expresan en Unidades de actividad por gramo de tejido fresco. La arginasa (EC 3.5.3.1) se determinó según el procedimiento descrito por Bhide et al. (9), empleando la arginina como sustrato. La urea producida durante la reacción enzimática se cuantificó con  $\alpha$ -isonitrosopropiofenona expresándose los resultados en  $\mu\text{moles}$  de urea producidos por gramo de tejido/hora de incubación. La colinesterasa (CHE; EC 3.2.1.7) se midió según el método electrométrico de Michel (10) con un pH-meter Orion,

empleando para la reacción un sustrato tamponado de acetilcolina. La actividad de la CHE, que representa la disminución de pH que ocurre a 25°C en un lapso de 1 hora, se expresó en UpH/hora por gramo de tejido/mg de proteína. La proteasa ácida (Pac, EC 3.4.1.14.) se determinó como actividad proteolítica ácida total empleando como sustrato hemoglobina al 4% en buffer acetato 0.1 mol/L (pH 4.5) según las indicaciones de Dingle et al, (11). Los resultados se expresaron en  $\mu$ moles de tirosina liberados por miligramo de tejido y por hora de incubación. La fosfatasa alcalina (ALP, EC 3.1.3.1) se estimó mediante el método de Walter y Schütt (12) empleando una solución tamponada de p-nitrofenilfosfato (pH 9.8). La actividad de la enzima se expresó en  $\mu$ mol de p-nitrofenol liberados en 30 minutos por gramo de tejido. La actividad de la deshidrogenasa láctica (LDH, EC 1.1.1.27) se estimó según el método de King (13) que se basa en la propiedad de la enzima para formar piruvato, a partir del D,L-lactato, en presencia de nicotín-adenín-dinucleótido oxidado (NAD<sup>+</sup>). La actividad se expresó en unidades internacionales (UI) por gramo de tejido húmedo. El contenido de vitamina A en hígado se determinó de acuerdo con la técnica de Neeld y Pearson (14), los resultados se expresan en  $\mu$ mol por gramo de peso húmedo. La nomenclatura empleada para cada enzima es la correspondiente a la Unión Internacional de Bioquímica.

### Análisis estadístico

Los resultados se expresan como promedios $\pm$ desviaciones estándar (DE). Las diferencias en la actividad de las enzimas y las otras variables (peso de los animales, contenido hepático de vitamina A, etc.) entre el grupo control y los tratados con vitamina A (1-3) se analizaron por la prueba de ANOVA de una vía y test de Tuckey post-ANOVA. Las diferencias significativas entre cada grupo tratado y el control correspondiente se analizaron mediante la t de Student. El análisis de regresión lineal se utilizó para establecer las relaciones entre las diversas variables y las dosis administradas de vitamina A. Toda  $p < 0,05$  se consideró estadísticamente significativa. Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el paquete estadístico STATGRAPHICS PLUS 5.0.

## RESULTADOS

### Hallazgos clínicos

En la mayor parte de las ratas tratadas con vitamina A se observó disminución de la ingesta alimenticia y acuosa, del peso corporal (Tabla 1) y de la actividad muscular, con caída del pelo e irritabilidad, edema palpebral unilateral y secreción mucopurulenta, hemorragias externas, sin parálisis de las extremidades posteriores. En términos generales, la intensidad de las manifestaciones clínicas es proporcional a las dosis administradas del retinol. Con la dosis de 100.000 UI/día, ocho

de los animales presentaron marcado deterioro orgánico y fallecieron, al sexto día de iniciada la administración de la vitamina A. El examen post-mortem de estos animales reveló marcadas hemorragias a nivel muscular, pulmonar y visceral. En el grupo control no se detectaron manifestaciones clínicas.

TABLA 1

Variaciones del contenido hepático de vitamina A, del peso, consumo alimentario e ingesta acuosa de los animales tratados con vitamina A y del grupo control

Variables	GRUPOS			
	Grupo control (15)	Grupo 1 (15)	Grupo 2 (15)	Grupo 3 (7)
Vitamina A $\mu$ mol/gramo	20 $\pm$ 3 <sup>a</sup>	148 $\pm$ 15 <sup>b</sup>	998 $\pm$ 43 <sup>c</sup>	2400 $\pm$ 96
Peso de los animales (gramos)	222 $\pm$ 14 <sup>a</sup>	199 $\pm$ 15 <sup>b</sup>	183 $\pm$ 18 <sup>c</sup>	117 $\pm$ 14
Consumo de alimentos (gramos)	16,8 $\pm$ 1,5 <sup>a</sup>	10,4 $\pm$ 1,6 <sup>b</sup>	8,67 $\pm$ 0,8 <sup>c</sup>	5,1 $\pm$ 0,7
Ingesta de agua (mL)	36,3 $\pm$ 1,3 <sup>a</sup>	29,7 $\pm$ 1,5 <sup>b</sup>	28,2 $\pm$ 1,1 <sup>c</sup>	21,8 $\pm$ 1,3

Los resultados se expresan como promedios $\pm$ desviaciones estándar. Grupos 1, 2 y 3 tratados con 30.000, 50.000 y 100.000 UI de vitamina A, respectivamente.

<sup>a</sup> $p < 0,05$  al comparar el grupo control con los tratados con vitamina A

<sup>b</sup> $p < 0,05$  al comparar con los grupos 2 y 3

<sup>c</sup> $p < 0,05$  al comparar con el grupo 3

( ) Número de animales por grupo

### Resultados bioquímicos

El contenido de vitamina A en el hígado de los animales tratados se muestra en la Tabla 1. El ANOVA de una vía y cuatro periodos demostró que todos los promedios de los grupos tratados difieren significativamente ( $F = 3,375$ ;  $GL = 3/48$ ;  $p < 0,05$ ) al comparar entre sí y con el grupo control. El coeficiente de correlación ( $r = 0,979$ ) obtenido al relacionar las dosis de vitamina A con su contenido hepático, mediante el método de regresión simple, demuestra que la concentración de la vitamina en hígado aumenta de manera significativa ( $p < 0,05$ ) y proporcional con las dosis administradas del retinol.

El efecto de la hipervitaminosis A sobre la actividad de las enzimas hepáticas valoradas se muestra en la Tabla 2. El ANOVA de una vía y cuatro periodos demostró que las actividades enzimáticas promedio difieren significativamente ( $F > 8,90$  en todos los casos;  $GL = 3/48$ ;  $p < 0,05$ ) al comparar entre sí los grupos tratados y el grupo control. El análisis de regresión simple demostró que la ALT ( $r = 0,894$ ;  $r^2 = 69,14\%$ ), la AST ( $r = 0,920$ ;  $r^2 = 77,06\%$ ), la ALP ( $r = 0,970$ ;  $r^2 = 91,17\%$ ), la LDH ( $r = 0,884$ ;  $r^2 = 67,83\%$ ), la proteasa ácida ( $r = 0,991$ ;  $r^2 = 97,16\%$ ) y la maltasa ácida ( $r = 0,989$ ;  $r^2 = 96,85\%$ ) incrementan su actividad significativamente ( $p < 0,05$ ) con la administración de vitamina A, alcanzando un valor máximo con las 100.000 UI.

TABLA 2

Efecto de la hipervitaminosis A aguda sobre las enzimas hepáticas en los animales tratados y en el grupo control

Enzimas <sup>1</sup>	GRUPOS			
	Grupo control (15)	Grupo 1 (15)	Grupo 2 (15)	Grupo 3 (7)
G-6-Pasa	19,5±1,28 <sup>a</sup>	5,8±0,82 <sup>b</sup>	4,9±0,77 <sup>c</sup>	3,7±0,55
GF	138±9,44 <sup>a</sup>	50±5,78 <sup>b</sup>	47±3,04 <sup>c</sup>	36±4,22
AMS	0,6±0,13 <sup>a</sup>	0,41±0,12 <sup>b</sup>	0,20±0,06 <sup>c</sup>	0,09±0,01
AST	83±18 <sup>a</sup>	192±16 <sup>b</sup>	211±21 <sup>c</sup>	256±24
ALT	108±19 <sup>a</sup>	407±35 <sup>b</sup>	441±43 <sup>c</sup>	542±90
ARG	13,8±1,02 <sup>a</sup>	10±1,3 <sup>b</sup>	4,85±0,8 <sup>c</sup>	3,59±0,3
CHE	0,33±0,02	0,27±0,01	0,18±0,02	0,10±0,01
ALP	41±5 <sup>a</sup>	118±8 <sup>b</sup>	126±9 <sup>c</sup>	344±19
LDH	162±18 <sup>a</sup>	332±27 <sup>b</sup>	393±32 <sup>c</sup>	425±37
Pac	4±0,3 <sup>a</sup>	6,1±0,38 <sup>b</sup>	7,38±0,5 <sup>c</sup>	9,41±0,55
MA	0,47±0,05 <sup>a</sup>	0,69±0,04 <sup>b</sup>	0,94±0,08 <sup>c</sup>	1,66±0,61

Los resultados se expresan como promedios±desviaciones estándar.

G-6-Pasa= glucosa-6-fosfatasa,  $\mu\text{mol}/\text{gramo de tejido}/\text{minuto}$ . GF= glucógeno fosforilasa, unidades de actividad. AMS=  $\alpha$ -amilasa, milimol/gramo de tejido/hora. AST= aspartato aminotransferasa, unidades de actividad/gramo de tejido. ALT= alanina aminotransferasa, unidades de actividad/gramo de tejido. ARG= arginasa,  $\mu\text{moles}/\text{gramo de tejido}/\text{hora}$ . CHE= colinesterasa, UpH/hora. ALP= fosfatasa alcalina,  $\mu\text{mol}/\text{gramo de tejido}/30 \text{ minutos}$ . LDH= dehidrogenasa láctica, unidades de actividad/gramo de tejido. Pac= proteasas ácidas,  $\mu\text{mol}/\text{miligramo de tejido}/\text{hora}$ . MA= maltasa ácida o  $\alpha$ -1,4-glucosidasa ácida, mmol/gramo de tejido/hora.

Grupos 1, 2 y 3 tratados con 30.000, 50.000 y 100.000 UI de vitamina A, respectivamente.

<sup>a</sup>p<0,05 al comparar el grupo control con los tratados con vitamina A

<sup>b</sup>p<0,05 al comparar con los grupos 2 y 3

<sup>c</sup>p<0,05 al comparar con el grupo 3

( ) Número de animales por grupo

Puesto que el valor P en la tabla ANOVA, del análisis de regresión simple, es menor de 0,01, existe una relación estadísticamente significativa entre estas actividades enzimáticas y la vitamina A a un nivel de confianza del 99%. Los valores de los estadísticos  $r^2$  de 69,14%, 77,06%, 91,17%, 67,33%, 97,16%, y 96,85% para ALT, AST, ALT, LDH, proteasa y maltasa ácida, respectivamente, indican que el modelo como se ajustó explica el 69%, el 77%, el 91%, el 67%, el 97% y el 97% de la variabilidad de las actividades enzimáticas determinadas por la administración de la vitamina, lo cual sugiere que otros factores que no fueron estudiados pudieran influir en nuestros resultados. El análisis de regresión lineal y las diferencias entre las pendientes en las respectivas rectas de regresión demuestran que la variación observada en las actividades enzimáticas es positiva y altamente significativa ( $p<0,05$ ) y que el incremento es directamente proporcional a la dosis administrada y al contenido hepático de vitamina A. El análisis de regresión simple también demostró que la glucosa-6-fosfatasa ( $r = -0,703$ ;  $r^2 = 55,54\%$ ), la glucógeno fosforilasa ( $r = -0,797$ ;  $r^2 = 45,26\%$ ), la  $\alpha$ -amilasa ( $r = -0,953$ ;  $r^2 = 90,80\%$ ), la arginasa ( $r = -0,889$ ;  $r^2 = 68,54\%$ ) y la

colinesterasa ( $r = -0,982$ ;  $r^2 = 94,54\%$ ) disminuyen su actividad en relación con las dosis administradas de vitamina A. Los respectivos  $r^2$  indican, al igual que en el caso anterior, que existen factores que pueden haber influido y que no fueron investigados en el presente estudio. Los resultados del análisis de regresión lineal y las diferencias entre las pendientes en las respectivas rectas de regresión demuestran que la variación observada en las actividades enzimáticas es negativa y altamente significativa ( $p<0,05$ ) y que la disminución es proporcional a la dosis administrada y al contenido hepático de vitamina A.

## DISCUSION

La vitamina A administrada en exceso determinó una hipervitaminosis A aguda que se demostró por el marcado incremento de los niveles de retinol en hígado, los signos clínicos descritos y los cambios en las actividades enzimáticas a nivel hepático.

Los signos clínicos detectados en la presente investigación se caracterizan por cambios en la piel, pérdida del apetito, pérdida del peso, caída fácil del pelo, irritabilidad, hemorragias internas y externas, infecciones conjuntivales y muerte de los animales. La hemorragia constituye una de las manifestaciones típicas de la hipervitaminosis A, en los animales experimentales (2); puede ser subcutánea o intramuscular, aunque en la mayor parte de las ratas el proceso se localiza a nivel pulmonar y visceral, determinando la muerte, cuando es muy intensa.

La marcada disminución en la ingesta de alimentos y de agua se debe a la pérdida del apetito, inducido por la hipervitaminosis A. Es interesante señalar que el ácido retinoico, un derivado natural de la vitamina A, suprime la expresión del neuropéptido Y (NPY) (15), una potente señal orexigénica. Por esta razón, es posible que los efectos directos inhibidores del retinol y/o del ácido retinoico sobre el sistema NPY, pudieran disminuir el ingreso alimentario.

Las infecciones son también frecuentes en la hipervitaminosis A, tanto aguda como crónica, debido al depósito de grandes cantidades de vitamina A en las células de Küpffer, con el deterioro de la capacidad fagocitaria de estas células y disminución de los mecanismos de defensa del organismo, lo cual predispone al animal a las infecciones secundarias. Lettinga et al., (16) han señalado, en ratas, que la administración de altas dosis de retinol, durante una semana, disminuye la capacidad de fagocitosis de las células de Küpffer.

En relación a los mecanismos que determinan los efectos tóxicos de la vitamina A sobre los tejidos, es un hecho conocido que el exceso de vitamina A libre labiliza las membranas lisosomales de hígado de rata, por su actividad detergente tensoactiva y membranólítica y determina la

liberación de una gran variedad de hidrolasas ácidas (manosidasas, catepsinas, ribonucleasa, desoxirribonucleasa, fosfatasa,  $\alpha$ -1,4-glucosidasa o maltasa ácida, proteasa,  $\beta$ -glucuronidasa y sulfatasa, entre otras), que se encuentran en los lisosomas (17). Efecto que es potenciado por la anoxia y la acidosis intracelular, determinadas por la hemorragia presente. Dingle (18) comprobó que este complejo enzimático es el responsable de muchos de los cambios observados en los tejidos tratados con dosis excesivas de vitamina A. Los resultados de la presente investigación que demuestran el incremento en la actividad de las hidrolasas ácidas lisosomales (proteasa y maltasa ácida) concuerdan con estas observaciones previas. Estas enzimas lisosomales están comprometidas en procesos inflamatorios y en la destrucción autolítica de los tejidos (19). Por otro lado, las interacciones de los retinoides (vitamina A y derivados naturales) con sus receptores nucleares pueden jugar un papel muy importante en este proceso de toxicidad, modificando la expresión de los genes (20).

Las enzimas alanina aminotransferasa (ALT) y aspartato aminotransferasa (AST) que incrementan significativamente ( $p < 0,05$ ) su actividad en el hígado de ratas tratadas con vitamina A, están relacionadas con el catabolismo proteico y sus actividades tisulares aumentan en situaciones de gluconeogénesis incrementada (21). El marcado incremento en la actividad de la ALT es especialmente significativo porque la alanina es el sustrato cuantitativamente más importante para la gluconeogénesis hepática (22). El incremento en la actividad de la LDH, debido a la hipoxia tisular determinada por la hemorragia presente (23), es un hecho importante ya que el lactato que se libera en exceso de las células que llevan a cabo la glucólisis anaerobia, por efecto de la hipervitaminosis A (24), lo recoge especialmente el hígado, donde se reoxida a piruvato, por la LDH. En este órgano, el piruvato se transamina por acción de la ALT para formar alanina, que se utiliza en los procesos de gluconeogénesis (21,22).

Nuestros resultados claramente muestran un marcado incremento en la actividad de la fosfatasa alcalina en los animales tratados que concuerda con los estudios previos de Alarcón (25) quien con diferentes técnicas histoquímicas, demostró una reacción positiva de la enzima en las estructuras interlobulillares hepáticas, en los canalículos biliares y en la adventicia de los vasos, más intensa que en los testigos, en conejos tratados con 100.000 UI/día de vitamina A. También, Lettinga et al., (16) en ratas tratadas con dosis altas de retinol, durante 7 días, demostraron mediante técnicas histoquímicas que la actividad de la ALP está incrementada en las membranas plasmáticas de los canalículos biliares con una mayor actividad en las áreas periportales. Esto se puede interpretar como un proceso activo de transporte de los ésteres de retinilo desde las células parenquimatosas hepáticas hacia la bilis. El incremento en la actividad de la fosfatasa alcalina se puede relacionar a la unión del retinol a los receptores nucleares de

los hepatocitos, que pueden aumentar la diferenciación celular y la expresión de los genes, y esto coincide con los niveles elevados de ALP (26).

La reducción en la actividad de la glucógeno fosforilasa en los animales tratados con vitamina A pudiera deberse al incremento en la concentración hepática de Zn, un inhibidor de la actividad de esta fosforilasa (27) y a la disminución del ingreso alimentario, que reduce la cantidad de la proteína enzimática (5). Aunque, Rinaudo et al., (6) en ratas blancas jóvenes a las cuales se les administró por vía subcutánea 7.000 a 14.000 UI/día de una solución oleosa de vitamina A, por un periodo de 7 días, observaron un incremento del 25% ( $p < 0,05$ ) en la actividad de la fosforilasa en comparación con el grupo control.

La glucosa-6-fosfatasa una enzima multifuncional (28), de gran importancia en el metabolismo intermediario de los glúcidos, también disminuyó su actividad en los animales tratados con vitamina A, debido al incremento en la concentración hepática de fósforo inorgánico (29) y de Zn (30) dos inhibidores de la enzima (27,31). Por el contrario, Singh et al., (32) en ratas blancas jóvenes, alimentadas con un exceso de retinol por vía oral, demostraron un incremento en la actividad de la glucosa-6-fosfatasa. Quizás estas diferencias pueden deberse al tipo de compuesto empleado, a la dosis administrada, al tiempo de administración, a la vía de administración de la vitamina o a la edad de los animales utilizados.

La  $\alpha$ -amilasa, una enzima que participa en la producción de glucosa por las células hepáticas, disminuyó significativamente ( $p < 0,05$ ) su actividad por el exceso de vitamina A; hallazgo que concuerda con los trabajos previos de Rinaudo et al., (6). La disminución de los iones cloruro y calcio (33), iones activadores de la enzima (34,35) y el incremento en la concentración del Zn, un ión inhibidor, en hígado (30), por efecto de las dosis elevadas de vitamina A, deben favorecer esta disminución.

La colinesterasa (pseudocolinesterasa) se produce en el hígado y se encuentra en todos los tejidos, especialmente en el páncreas. Existe una estrecha correlación entre la síntesis de albúmina y la producción hepática de esta hidrolasa, a tal punto que los niveles enzimáticos disminuyen en enfermedades caracterizadas por una síntesis de albúmina disminuida (23). En la presente investigación se encontró una disminución significativa ( $p < 0,05$ ) en su actividad en los animales tratados con vitamina A. Para explicar estos hallazgos debemos tener presente el trabajo de Çolakoglu y Kükner (36) quienes al estudiar, en ratas, el efecto de administrar dosis altas de ácido retinoico, un metabolito de la vitamina A, por un corto lapso de tiempo, sobre la estructura del hígado, observaron mediante estudios de microscopía óptica y electrónica: dilatación sinusoidal, infiltración celular periportal, incremento de las gotas de lípidos en las células

de Ito, que se correlacionan con el incremento en la cantidad de ácido retinoico suministrada. Estos resultados indican que las dosis altas de este compuesto alteran el tejido hepático, con alteraciones en su función. Este grado de disfunción hepática, a lo cual se suma un deficiente ingreso alimentario, la existencia de infecciones agudas, la infiltración grasa, la disminución en la síntesis de la albúmina (37) son factores que influyen en la disminución de la actividad y/o síntesis de la CHE a nivel hepático. Esta alteración del tejido hepático debe favorecer las alteraciones enzimáticas comentadas en los párrafos anteriores.

La arginasa, una enzima presente en grandes cantidades en el hígado que cataliza la transformación de la arginina en urea y ornitina (38), también disminuyó significativamente ( $p < 0,05$ ) su actividad. Esta disminución que obedece, entre otros factores, a la disminución del ingreso alimentario (39) explica la falla en la ureogénesis hepática descrita en la hipervitaminosis A (37) que altera el proceso de detoxicación del amoníaco ( $\text{NH}_3$ ), cuyo incremento excesivo en sangre conduce a un síndrome denominado encefalopatía hepática, una manifestación presente en la enfermedad hepática grave o en etapa terminal (40). Por su parte, Lettinga et al., (16) en ratas tratadas con dosis altas de retinol, durante 7 días, encontraron que los mecanismos de regulación de los niveles sanguíneos del amoníaco están muy deteriorados.

En conclusión, en todos los casos, el grado de variación de la actividad enzimática se relaciona con el contenido hepático de la vitamina A. Además nuestros resultados proporcionan evidencias que la administración de altas dosis de vitamina durante cortos periodos determinan manifestaciones clínicas muy diversas y variadas y producen una marcada alteración de la actividad de las enzimas hepáticas, lo cual debe producir, a su vez, un deterioro en los metabolismos glucídico y proteico. Aunque, los resultados obtenidos en animales tratados con dosis altas de vitamina A no pueden ser definitivamente extrapolados al hombre, estos hallazgos deben ser tomados en cuenta como indicadores de la posible ocurrencia de efectos similares en los humanos.

## REFERENCIAS

1. Perrotta S, Nobili B, Rossi F, Criscuolo M, Iolascon A, Di Pinto D, Passaro I, Cennamo L, Oliva A, Della Ragione F. Infant hypervitaminosis A causes severe anemia and thrombocytopenia: evidence of a retinol-dependent bone marrow cell growth inhibition. *Blood*. 2002; 99: 2017-22.
2. Rodahl K. Hypervitaminosis A in the rat. *J Nutr*. 1950; 41: 399-421.
3. Harper AE. Glucose-6-phosphatase. In: *Methods of Enzymatic Analysis*. Bergmeyer HU (Ed.). Academic Press. New York. 1963.
4. Fiske CH, Subbarow Y. Colorimetric determination of phosphorus. *J Biol Chem*. 1925; 66: 375-383.
5. Niemeyer H, Gonzáles C, Rozzi R. The influence of diet on liver phosphorylase. I. Effect of fasting and refeeding. *J Biol Chem*. 1961; 236: 610-3.
6. Rinaudo MT, Antoniotti ML, Montecucchi PC. Uridinediphosphoglucose-glycogen glucosyltransferase, glycogen phosphorylase and alpha-amylase in the liver of A hypervitaminosis rats. *Boll Soc Ital Biol Sper*. 1966; 42: 194-6.
7. Gamklou R, Scherstén T. Activity of  $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -1,4-glucosidase in human liver tissue. *Scand J Clin Lab Invest*. 1972; 30: 201-7.
8. Reitman S, Frankel S. A colorimetric method for the determination of serum glutamic oxalacetic and glutamic pyruvic transaminases. *Am J Clin Pathol*. 1957; 28: 56-63.
9. Bhide SV, Shah S, Desai MP. Arginase and xanthine oxidase activity in liver tissue in pathological conditions. *Biochem Med*. 1974; 9: 386-9.
10. Michel O. Cholinesterase in human red blood cells and plasma. In: *Standard Methods of Clinical Chemistry*. (Seligson D, ed.). Vol 3. Academic Press, New York and London. 1961.
11. Dingle JT, Sharman IM, Moore T. Nutrition and lysosomal activity. The influence of the vitamin A status on the proteolytic activity of extracts from the livers and kidneys of rats. *Biochem J*. 1966; 98: 476-84.
12. Walter K, Schütt C. Acid and alkaline phosphatase in serum (two point methods). In: *Methods of Enzymatic Analysis*. (Bergmeyer HU, ed.). Vol. 2. Verlag Chemie Weinheim. Academic Press. Inc. New York, 1974.
13. King J. The dehydrogenase (or) oxidoreductase-lactate dehydrogenase. In: *Practical Clinical Enzymology*. D Van Nostrand Co. Ltd., London, 1965.
14. Neeld JB Jr, Pearson WN. Macro- and micromethods for the determination of serum vitamin A using trifluoroacetic acid. *J Nutr*. 1963; 79: 454-62.
15. Magni P, Beretta E, Scaccianoce E, Motta M. Retinoic acid negatively regulates neuropeptide Y expression in human neuroblastoma cells. *Neuropharmacology*. 2000; 39: 1628-36.
16. Lettinga KD, Gutter W, Van Noorden CJ, Schellens JP, Frederiks WM. Early effects of high doses of retinol (vitamin A) on the in situ cellular metabolism in rat liver. *Liver*. 1996; 16: 1-11.
17. Wolf G. Multiple functions of vitamin A. *Physiol Rev*. 1984; 64: 873-937.
18. Dingle JT. Action of vitamin A on the stability of lysosomes in vivo and in vitro. *CIBA Foundation Symposium on Lysosomes*, (De Reuck A VS, Cameron MP, eds.). JA Churchill Ud. London. 1963.
19. Brandes D, Anton E, Lam KW. Studies of L1210 leukemia. II. Ultrastructural and cytochemical changes after treatment with cyclophosphamide and vitamin A. *J Natl Cancer Inst*. 1967; 39: 385-421.
20. Glass CK, DiRenzo J, Kurokawa R, Han ZH. 1991. Regulation of gene expression by retinoic acid receptors. *DNA Cell Biol*. 10: 623-38
21. Murray RK, Granner DK, Rodwell VW. Harper. *Bioquímica Ilustrada*. 17ª Edición. Editorial El Manual Moderno. México. 2007.
22. Smith C, Marks AD, Lieberman M. *Bioquímica Básica de Marks*. Un enfoque clínico. 2ª Edición. Editorial Mc Graw Hill-Interamericana. Madrid. España. 2006.

23. Henry JB. *El Laboratorio en el Diagnóstico Clínico*. Marbán Libros, SL. Madrid, España. 2005.
24. Singh M, Singh VN, Venkitasubramanian TA. Early effects of feeding excess vitamin A: hepatic glycogen, blood lactic acid, plasma NEFA and glucose tolerance in rats. *Life Sci*. 1968; 7: 239-47.
25. Alarcón OM. Hipervitaminosis A aguda en conejos: Aspectos bioquímicos e histoquímicos. Facultad de Medicina. Universidad de los Andes. Mérida. Venezuela. 1972.
26. Hui M, Hu M, Tenenbaum HC. Changes in cell adhesion and cell proliferation are associated with expression of tissue non-specific alkaline phosphatase. *Cell Tissue Res*. 1993; 274: 429-37.
27. Alarcón OM. Interrelaciones  $Zn^{2+}$ -vitamina A. I. Efecto de las dosis crecientes de  $Zn^{2+}$  sobre el metabolismo glucídico. Facultad de Medicina. Universidad de Los Andes. Mérida. Venezuela. 1978.
28. Foster JD, Nordlie RC. The biochemistry and molecular biology of the glucose-6-phosphatase system. *Exp Biol Med* 2002; 227: 601-608.
29. Alarcón OM, Silva T, Chacón PA, Pachano YJ, Reinoso J, Alarcón OA. Modificaciones del contenido de fósforo hepático y renal en cobayos tratados con dosis elevadas de vitamina A alcohol (retinol). *Acta Cient Ven*. 1996; 47: 127-131.
30. Alarcón OM, Burguera JL, Burguera M, Silva TM, Ferrer LF, Romero TJ. Effects of acute overdose of vitamin A on the hepatic content of K, Na, Mg, Fe, Cu and Zn, in rats. *Arch Latinoamer Nutr*. 1994; 44: 249-51.
31. Vianna AL, Nordlie RC. The inhibition by physiological orthophosphate concentrations of hydrolytic and synthetic activities of liver glucose 6-phosphatase. *J Biol Chem*. 1969; 244: 4027-32..
32. Singh M, Singh VN, Venkitasubramanian TA. Early effects of excessive retinol intake on hepatic glycogen metabolism. *Arch Biochem Biophys*. 1976; 173: 93-9.
33. Maldonado JR. Estudio del mecanismo de acción de las dosis tóxicas de vitamina A alcohol (retinol) en ratas. Comportamiento de los electrolitos séricos y tisulares. Facultad de Farmacia. Universidad de Los Andes. Mérida. Venezuela. 1974.
34. Olavarria JM, Torres HN. Mechanism of action of liver alpha-amylase. *J Biol Chem*. 1962; 237: 1746-51.
35. Rasmussen H, Tenenhouse A. Cyclic adenosine monophosphate,  $Ca^{++}$ , and membranes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1968; 59: 1364-70
36. Çolakoglu N, Kükner A. Effects of high dose of retinoic acid on adult rat liver: electron microscopic and immunohistochemical study. *Nutr Res*. 2003; 23: 509-17
37. Alarcón OM, Jonchkeer ME, Molina DS, Burguera JL, Burguera M, Burguera JA, González LD. Modificaciones del metabolismo proteico en la hipervitaminosis A aguda, en ratas. *Acta Cient Venez* 1986; 37: 162-169.
38. Bishop ML, Fody EP, Schoeff LE. *Química Clínica. Principios, Procedimientos y Correlaciones*. 5ª Edición. Editorial McGraw-Hill. México. 2007.
39. Greenberg DM. Arginase. En: *Enzymes*. (Boyer PD, Hardy H, Myrbäck K (eds.)). 2nd. Ed. Vol. 4. Academic Press. NY. 1960.
40. McPhee SJ, Lingappa VR, Ganong WF. *Fisiopatología Médica. Una Introducción a la Medicina Clínica*. 4ª Edición. Editorial El Manual Moderno. México. 2003.

Recibido:14-06-2007

Aceptado:10-09-2007