

EFFECTO DE LA HIPERVITAMINOSIS D SOBRE LA ACTIVIDAD DE ALGUNAS ENZIMAS EN HIGADO DE RATAS

O. M. Alarcón,¹ J. L. Burguera,² M. Burguera³ y John A. Burguera⁴

Universidad de Los Andes
Mérida, Venezuela

RESUMEN

Se determinó el efecto de ocho dosis de 10,000, 20,000 y 30,000 UI de vitamina D₂, administradas día de por medio a tres grupos de ratas, sobre la actividad de algunas enzimas a nivel hepático.

En términos generales, el mapa enzimático de los animales tratados con dicha vitamina se caracterizó por un descenso de la actividad enzimática de la G-6-Pasa, la glucógeno fosforilasa y de la arginasa. Asimismo, se observó un aumento de la actividad enzimática de la maltasa ácido y de las transaminasas glutámico-oxaloacética y glutámico-pirúvica. Además, hubo también variaciones, dependiendo de la dosis de vitamina D administrada, en la actividad de la acetilcolinesterasa y de la amilasa.

INTRODUCCION

Los primeros trabajos experimentales sobre hipervitaminosis D se deben a Pfannestiel (1) quien, en 1928, al administrar a conejos dosis de ergosterol irradiado, observó como manifestaciones tóxicas: caquexia acentuada y muerte. Ese mismo año, Kreitmar y Moll (2) confirmaron estos hallazgos iniciales al producir la intoxicación con vitamina D en diversas especies animales. Comprobaron, además, que la respuesta a la sobredosificación difería para cada especie en particular. La revisión de la

Manuscrito modificado recibido: 3-10-85.

- 1 Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad de Los Andes, Mérida, Venezuela.
- 2 Departamento de Química, Facultad de Ciencias de la Universidad de Los Andes, Apartado 542, Mérida 5101-A, Venezuela.
- 3 Miembro del mismo Departamento, Facultad de Ciencias, Universidad de Los Andes.
- 4 Departamento de Toxicología de la Facultad de Farmacia, Universidad de Los Andes, Mérida, Venezuela.

literatura concerniente a esta hipervitaminosis indica que los cambios morfológicos más sobresalientes son: alteraciones esqueléticas (3), calcificación de los tejidos blandos (4-6) y lesiones renales (7-10). Los síntomas de sobredosificación incluyen retardo del crecimiento, pérdida de apetito y peso, polidipsia y diarrea sanguinolenta (11).

En la rata, la hipervitaminosis D incluye lesiones esqueléticas (12-15), cambios degenerativos y calcinosis generalizada de los tejidos blandos (9, 16-18), alteraciones en el funcionamiento renal (19-22), lesiones arteriales (9), cambios hematológicos (23) y modificaciones en la química sanguínea (24, 25). Se ha estudiado con mayor detalle el metabolismo del citrato y de ciertos electrolitos, en especial Ca^{2+} y el P inorgánico (26, 27), así como la actividad de la fosfatasa alcalina (28).

La inyección de dosis elevadas de ^{14}C -calciferol induce al hígado a acumular la mayor cantidad posible de este compuesto (29), entre 60 y 80% de la dosis administrada a los 60 minutos (30, 31). En cambio, en animales hepatectomizados, y sin sufrir prácticamente ninguna modificación, la vitamina D permanece durante largos períodos de tiempo en el espacio intravascular (32). Es un hecho igualmente conocido que esta vitamina sufre el primer paso obligatorio de activación a nivel hepático (33). Por otro lado, existen publicaciones previas (34-36) que señalan diversos tipos de alteraciones histológicas hepáticas, confirmadas mediante estudios biopsicos, a consecuencia de la administración de dosis excesivas de vitamina D_2 o D_3 , al igual que variaciones en la concentración de algunas enzimas hepáticas en ratas (37). Estos antecedentes indican que el hígado podría ser más propenso que otros órganos a intoxicarse (o a modificar su función y actividades enzimáticas) por sobredosis de vitamina D.

Por consiguiente, el propósito de este trabajo fue el de ampliar los estudios previos realizados por Cañada de Zunzunegui *et al.* (37), y sugerir un mapa enzimático hepático, característico de una hipervitaminosis D_2 . En este sentido, se evaluó la actividad de las siguientes enzimas hepáticas: la glucosa-6-fosfatasa, α -amilasa, maltasa ácida, glucógeno fosforilasa, arginasa, acetilcolinesterasa y las transaminasas glutámico pirúvica y glutámico-oxaloacética. Asimismo, se evaluó la actividad proteolítica hepática total.

MATERIALES Y METODOS

Se utilizaron ratas macho de la raza Sprague-Dawley, cuyo peso oscilaba entre 180 y 200 g, las que se adaptaron al ambiente del laboratorio durante un período de 10 días previo al sacrificio. Como alimentación se les suministró Ratarina Protinal[®], suplementada con vitamina y minerales y el consumo de agua fue *ad libitum*. Al finalizar el período de adaptación, los animales se distribuyeron al azar en los grupos experimentales que se detallan más adelante.

Para inducir la hipervitaminosis D_2 se administró la vitamina D_2 Merk hidrosoluble (Artículo 5000686) que contiene 100,000 UI/ml disuelta en agua a las concentraciones de 10,000, 20,000 y 30,000 UI/ml.

Los grupos experimentales, constituidos por 20 animales cada uno, fueron los siguientes:

Grupo I. A las ratas de este grupo, considerado como *testigo* o normal, se les administró 1 ml de agua destilada mezclada en la proporción de 1:1 con propilenglicol y etanol al 50/o, cada dos días, hasta completar ocho dosis.

Grupo II Experimental. A los integrantes de este grupo se les administró un total de 80,000 UI de vitamina D₂ (10,000 UI de vitamina D₂/kg de peso corporal V. I. M., cada dos días, hasta completar también ocho dosis).

Grupo III Experimental. Los animales que integraron este grupo recibieron una dosis total de 160,000 UI de vitamina D₂ (20,000 UI/kg de peso V. I. M. cada dos días, hasta completar las mismas ocho dosis).

Grupo IV Experimental. A las ratas que formaron este grupo se les administró un total de 240,000 UI de vitamina D₂ (30,000 UI/kg de peso V. I. M. cada dos días, también hasta completar ocho dosis).

Durante el período de ensayo los animales consumieron la misma alimentación. Las dosis de vitamina D₂ suministradas en el presente trabajo fueron similares a las utilizadas por Thomas y Morgan (15), quienes indujeron hipervitaminosis D, en ratas, mediante la administración de 20,000 ó 30,000 UI de vitamina D₂/kg de peso/día durante siete a 14 días (dosis total: 140,000 a 420,000 UI de vitamina D₂, según los casos). Cabe destacar, por otro lado, que nuestras dosis son sustancialmente inferiores a las que administraron Clark y Bassett (38) (quienes administraron 600,000 UI de vitamina D₂/kg de peso/día durante tres semanas, es decir, 12,600,000 UI de vitamina D₂ en total) y por Hass *et al.* (39) (investigadores que administraron de 100,000 a 400,000 UI de vitamina D₃/kg de peso/día durante 10 días, esto es, 1,000,000 a 4,000,000 UI de vitamina D en total). Las dosis utilizadas por nosotros representan, por consiguiente, un promedio de las suministradas por los diferentes investigadores consultados.

Recolección de las Muestras

A las 24 horas de administrada la última dosis de vitamina D₂ (o de agua destilada, respectivamente) las ratas fueron sacrificadas por decapitación, mediante el empleo de una guillotina Harvard, y se desangraron durante un período de dos a cuatro minutos. El sacrificio se llevó a cabo siempre a la misma hora a fin de evitar en lo posible la influencia de variaciones circadianas en las actividades enzimáticas.

A continuación se practicó laparatomía mediana, dejando al descubierto los hígados. Estos fueron perfundidos *in situ* en solución de sacarosa 0.25M fría; y posteriormente resecados, secados sobre papel de filtro y colocados en cápsulas de Petri sobre baño de hielo. Se pesaron trozos de hígado de 1 g para preparar los homogenatos correspondientes. Todas estas operaciones y las siguientes se realizaron en cámara fría o cuarto frío a una temperatura de 0 a 4°C.

Los homogenatos de hígado se prepararon al 100/o (10 g en 100 ml) en agua bidestilada, según las recomendaciones de Boyd (40) y de Clampitt y Hart (41) y se congelaron de inmediato, con hielo seco. Se

mantuvieron congelados a la temperatura de -10 a -20°C , y se utilizaron para las determinaciones enzimáticas que se señalan a continuación, en un plazo no mayor de 48 horas.

Las enzimas cuantificadas fueron: glucosa-6-fosfatasa (G-6-Pasa; E. C., 3.1.3.9.) según la técnica de Harper (42). El P (inorgánico) liberado en la reacción enzimática se valoró según Fiske y Subbarow (43), expresándose los resultados en μM de P (inorgánico) liberados por mg de tejido/min. La α -amilasa (E. C., 3.2.1.1.) se valoró según la técnica de Mc Kelvy y Lee (44), y los resultados fueron expresados en unidades de actividad (UA) por gramo de tejido. La maltasa ácida (E. C., 3.3.1.20.) se cuantificó según la técnica de Hers (45) y la glucosa liberada en la reacción enzimática, según el método de los laboratorios Sigma (46) expresándose los resultados en μM de glucosa liberados por g de tejido y por hora de incubación. La glucógeno fosforilasa (E. C., 2.4.1.1.) se cuantificó según las indicaciones de Niemyer, González y Rossi (47); la actividad de la fosforilasa se expresó en UF/g de tejido, definiéndose unidad de fosforilasa como la cantidad de enzima que libera 1 μM de P (inorgánico) durante 5 min de incubación a 30°C . La arginasa (E. C., 3.5.3.1.) fue cuantificada según las indicaciones de Bhide, Shah y Desai (48), midiéndose la urea producida, durante la acción enzimática, según la reacción de Archibald (49) con α -isonitrosopropiofenona; los resultados se expresaron en μM de urea liberados por g de tejido y por hora. La acetilcolinesterasa (E. C., 3.1.8.7.) se determinó de acuerdo a la técnica potenciométrica de Michel (50), expresándose los resultados en UpH por hora de incubación y por g de tejido. La proteasa ácida (E. C., 3.4.1.14.) se midió como actividad proteolítica ácida total según Dingle, Sharman y Moore (51). El triptofano y la tirosina liberados se determinaron según Folin y Ciocalteu (52), expresándose los resultados en μg de tirosina liberados por mg de tejido y por hora de incubación. Para valorar la actividad de las transaminasas glutámico-pirúvica (TGP; E. C., 2.6.1.2.) y glutámico-oxaloacética (TGO; E. C., 2.6.1.1.) se utilizó el método de Reitman y Frankel (53), expresándose los resultados en U/g de tejido hepático.

Todas las lecturas, con excepción de la acetilcolinesterasa, se hicieron en un Spectronic 710, utilizando las respectivas técnicas.

La vitamina D_2 , a nivel hepático, se valoró según las recomendaciones de Strobecker y Hennings (54) previa separación de la misma mediante cromatografía en capa fina. Los resultados se expresaron en μg de vitamina D_2 por g de tejido húmedo.

En cada caso se calcularon los promedios, las desviaciones y los correspondientes errores tipo, y la significación estadística de las diferencias entre las medias se determinó mediante el análisis de varianza (ANAVA) (55, 56).

RESULTADOS

Las actividades enzimáticas hepáticas, tanto en las ratas normales (Grupo I) como en las sometidas a hipervitaminosis D_2 aguda, se muestran en la Tabla 1. En la misma Tabla se exponen también las probabilidades "P" entre los animales de los diferentes grupos.

En términos generales, la G-6-Pasa tendió a disminuir significativamen-

TABLA 1
EFFECTO DE LA HIPERVITAMINOSIS D₂ SOBRE LAS ACTIVIDADES DE LAS ENZIMAS
HEPATICAS ESTUDIADAS

Enzima	Unidades	Grupo I*	Grupo II*	Grupo III*	Grupo IV*	F	p**
G-6-Pasa	μM P (inorgánico)/ tejido/min	19.56 ± 1.20	15.32 ± 0.87	17.76 ± 6.08	10.93 ± 0.92	11.68	< 0.001
Amilasa	UA/g de tejido	0.37 ± 0.04	0.30 ± 0.02	0.25 ± 0.11	0.16 ± 0.02	8.17	< 0.001
Maltasa ácida	UM glucosa/g de tejido/hr	0.77 ± 0.32	0.71 ± 0.26	1.25 ± 0.11	1.50 ± 0.09	20.96	< 0.001
Fosforilasa	UF/g de tejido	198.00 ± 7.27	151.00 ± 4.56	207.00 ± 10.82	134.00 ± 6.62	27.17	< 0.001
Arginasa	μM urea/g de tejido/ hr	13.82 ± 1.02	14.06 ± 3.06	12.82 ± 1.57	10.55 ± 0.65	2.09	NS***
Acetil-colinesterasa	UpH/g de tejido	0.52 ± 0.15	0.62 ± 0.02	0.58 ± 0.14	0.50 ± 0.02	36.93	0.001
Proteasa ácida	μg/tirosina/mg de tejido/hr	4.23 ± 1.08	7.04 ± 2.27	5.01 ± 0.28	3.44 ± 0.30	18.22	0.001
TGO	U/g de tejido	66.20 ± 8.09	235.50 ± 11.18	415.50 ± 44.37	820.00 ± 52.67	18.32	0.001
TGP	U/g de tejido	37.90 ± 3.29	47.88 ± 3.66	176.90 ± 39.56	585.50 ± 62.78	14.00	0.001

* ±DE; ** GL = 3/57 en todos los casos; *** NS = No significativo.

TGO = Transaminasa glutámica-oxaloacética.

TGP = Transaminasa glutámico-pirúvica.

te ($P < 0.001$) su actividad, de 19.56 ± 1.20 en el Grupo I, a 10.94 ± 0.92 μM de P (inorgánico)/mg de tejido/min en el Grupo IV ($F = 11.68$; G. L. = 3/57; $P < 0.001$). Según revelan los datos, la actividad aminolítica siempre fue significativamente mayor en los animales del Grupo I en relación a los tratados con las diferentes dosis de vitamina D_2 ($F = 8.17$; G. L. = 3/57; $P < 0.001$). La amilasa disminuyó su actividad en los animales del Grupo II, para luego aumentar progresiva y significativamente en las ratas de los Grupos III y IV ($F = 20.97$; G. L. = 3/57; $P < 0.001$). En cuanto a la glucógeno fosforilasa, su actividad siempre fue mayor en el Grupo normal, reduciéndose significativamente en animales que recibieron las dosis de 160,000 y 240,000 UI de vitamina D_2 ($F = 27.17$; G. L. = 3/57; $P < 0.001$). La arginasa, por el contrario, acusó una tendencia a disminuir no significativa, con la hipervitaminosis D_2 aguda ($F = 2.09$; G. L. = 3/57; $P =$ no significativo). Los valores de acetil-colinesterasa ascendieron con las dosis de 80,000 y 160,000 UI de vitamina D_2 , para luego descender al administrarse 240,000 UI de la vitamina ($F = 18.22$; G. L. = 3/57; $P < 0.001$). En los animales tratados, la TGO y la TGP, incrementaron su actividad en función de las dosis de vitamina D_2 y en contraste con el grupo de ratas testigo correspondientes ($F = 30.22$; G. L. = 3/57; $P < 0.001$ y $F = 3.54$; G. L. = 3/57; $P < 0.025$, respectivamente).

En los hígados de ratas normales o control, el contenido de vitamina D_2 alcanzó un valor promedio de 50 $\mu\text{g/g}$ de peso húmedo; la administración de 80,000 UI indujo un aumento hasta de 385 $\mu\text{g/g}$ del contenido hepático; con 160,000 UI de vitamina D_2 , el contenido tisular subió hasta alcanzar 810 $\mu\text{g/g}$, y con la dosis de 240,000 UI de vitamina D_2 , el contenido hepático alcanzó un valor promedio de 1,480 $\mu\text{g/g}$ de peso húmedo ($F = 1,280$; G. L. = 3.57; $P < 0.001$).

DISCUSIÓN

Con muy pequeñas diferencias, las actividades enzimáticas detectadas en el Grupo Control, son muy semejantes a las publicadas por Boyd (40), Clampitt y Hart (41), Firenzuoli y Zanolini (57), Harper (42), así como por Niemeyer, González y Rozzi (47), al igual que el contenido de vitamina D_2 por g de tejido húmedo (58). La administración de dosis elevadas de vitamina D_2 , durante cortos lapsos de tiempo, modificó la mayor parte de las enzimas sometidas a estudio, con excepción de la arginasa, incrementándose de igual manera el contenido hepático de la vitamina. En la mayor parte de los casos, el grado de variación en cuanto a actividad enzimática se relaciona con el contenido hepático de la vitamina D_2 . Los resultados obtenidos por nosotros confirman el trabajo previo de Firenzuoli y Zanolini (57), quienes encontraron alteraciones en diversas enzimas relacionadas con la glicólisis y con el ciclo de Krebs en hígados de ratas blancas tratadas con 900,000 UI de vitamina D_2 (30,000 UI/día/vía oral, por el término de 30 días). Estos hallazgos permiten concluir que las dosis elevadas de vitamina D_2 , incluso por períodos breves (hipervitaminosis D_2 aguda), modifican el mapa enzimático del hígado. Se produce, en consecuencia, una alteración de su metabolismo normal, lo que explica así la fácil tendencia de este órgano a intoxicarse con la sobredosis de vitamina D_2 .

Indiscutiblemente estas alteraciones metabólicas, a su vez, podrían influenciar en una forma u otra los resultados previos de Wataria, Torizawa y Zaeki (35), así como los de Cambria y Billiteri (34), investigadores que han descrito diversos tipos de alteraciones histopatológicas en el hígado, confirmadas por estudios biópsicos y en los informes de Cañada de Zunzunegui *et al.* (37), quienes demostraron variaciones en el enzimograma sérico hepático de ratas con hipervitaminosis D₂. Tal como se pudo observar, el grado de severidad de la lesión enzimática tisular, parece depender de la dosis del compuesto administrada y del tipo de enzima valorada.

Basándonos en estudios previos de otros investigadores, se podrían sugerir algunos posibles mecanismos de producción de estas alteraciones enzimáticas. Por ejemplo, el efecto directo de la vitamina D₂ sobre las membranas de los lisosomas y de las otras organelas citoplasmáticas (59), alteraciones en la distribución electrolítica tisular (60); y sobreproducción de diversas enzimas en aquellas áreas hipóxicas cercanas al sitio de lesión (61).

Es cierto que la mayoría de los resultados obtenidos son inespecíficos y no pueden ser adscritos de manera definitiva a las dosis excesivas de vitamina D₂, pues podrían ser similares a los inducidos por dosis excesivas de las otras vitaminas liposolubles. Consideramos, no obstante, que a pesar de esta posibilidad, se abren nuevas vías de investigación con respecto al efecto que esta vitamina ejerce sobre otros órganos (por ejemplo, pulmón, bazo, suprarrenales, corazón) y otras rutas metabólicas que no se mencionan en la literatura consultada. Incluso, el mapa enzimático hepático descrito puede ser ampliado y sustentado mediante la valoración de otras enzimas "marcadoras de lesión hepatocítica" (62), tales como la glutámico-deshidrogenasa, sorbitol-deshidrogenasa, ornitina-transcarbamilasa, etc., o "marcadoras de colestasis", tales como la fosfatasa alcalina, 5'nucleotidasa, leucinaminopeptidasa y gamma-glutamyltranspeptidasa.

SUMMARY

EFFECT OF HYPERVITAMINOSIS D ON THE ACTIVITIES OF SOME ENZYMES IN THE LIVER OF RATS

The effect of eight doses of 10,000, 20,000 and 30,000 UI of vitamin D₂ administered every other day to three groups of rats, on the activities of some enzymes in the animals' liver was evaluated.

In general terms, findings revealed a decrease in the activities of glucose-6-phosphatase, phosphorylase and arginase. Likewise, an increase of the activities of maltase and of glutamic oxaloacetic and glutamic pyruvic transaminases was observed. Furthermore, the activities of cholinesterase and α -amylase also varied depending on the vitamin D₂ dosis administered.

BIBLIOGRAFIA

1. Pfannestiel, W. Weitere Beobachtungen über wirkungen bestrahlen ergosterins in tiervësuch. München Med. Wschr., 75:1113-1114, 1928.

2. Kreitmar, H. & T. Moll. Hypervitaminose durch grösse dosen vitamin D. *München Med. Wochr.*, 75:637-639, 1928.
3. Clark, I. & R. Geoffroy. Studies in calcium metabolism. *J. Biol. Chem.*, 233: 203-205, 1958.
4. Albright, F., E. Bloomberg, T. Drake & H. W. Sulkowitch. A comparison of the effect of A. T.-10 (dihydrotachysterol) and vitamin D on calcium and phosphorus metabolism in hypoparathyroidism. *J. Clin. Invest.*, 17:317-329, 1938.
5. Albright, F. & E. C. Reifenstein. *Parathyroid Gland and Metabolic Bone Disease: Selected Studies*. Baltimore, William & Wilkins, 1948.
6. Tumulty, P. A. & J. E. Howard. Irradiated ergosterol poisoning. *J.A.M.A.*, 119: 233-236, 1942.
7. Anderson, W. A. A. Hyperparathyroidism and renal disease. *Arch. Path.*, 27: 753-778, 1939.
8. Epstein, F. H., D. M. J. Rivera & P. A. Carone. Effect of hypercalcemia induced by calciferol upon renal concentration ability. *J. Clin. Invest.*, 37:1702-1710, 1958.
9. Gillman, Y., R. A. Grant & M. Hathorn. Histochemical and chemical studies of calciferol induced vascular injuries. *Br. J. Exp. Path.*, 41:1-8, 1960.
10. Grant, R. A., T. Gillman & M. Hathorn. Prolonged chemical and histochemical changes associated with widespread calcification of soft tissues following brief acute calciferol intoxication. *Br. J. Exp. Path.*, 44:220-232, 1963.
11. Chaplin, H., L. D. Clark & M. W. Ropes. Vitamin D in intoxication. *Am. J. Med. Sci.*, 36:77-103, 1960.
12. Ham, A. W. & M. D. Lewis. Hypervitaminosis D. Rickets: Action of vitamin D. *Br. J. Exp. Path.*, 15:228-234, 1934.
13. Harris, L. J. & J. R. M. Innes. Mode of action of vitamin D: Studies on hypervitaminosis D; influence of the calcium phosphate intake. *Biochem. J.*, 25:367-390, 1931.
14. Selye, H. The stimulation of new bone-formation with parathyroid extract, and irradiated ergosterol. *Endocrinology*, 16:547-558, 1932.
15. Thomas, W. C. & H. Morgan. The effect of cortisone in experimental hypervitaminosis D. *Endocrinology*, 63:57-64, 1958.
16. Eisenstein, R., R. Dedman, S. Papajiannis & A. Hemmes. Effect of hypervitaminosis D on serum factors in the rabbit. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 109:482-484, 1962.
17. Eisenstein, R. & W. A. Groff. Experimental hypervitaminosis D: Hypercalcemia, hypermucoproteinemia, and metastatic calcification. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 94:441-444, 1957.
18. Scarpelli, D. G., G. Tremblay & A. G. E. Pearse. Comparative cytochemical and cytologic study of vitamin D induced nephrocalcinosis. *Am. J. Path.*, 36:331-354, 1960.
19. Carone, F. A., F. A. Epstein, D. Beck & H. Levitin. The effects of transient hypercalcemia induced by parathyroid extract upon the kidney. *Am. J. Path.*, 36:77-103, 1960.
20. Epstein, F. H., D. Beck, F. A. Carone, H. Levitin & A. Manitus. Changes in renal concentrating ability produced by parathyroid extract. *J. Clin. Invest.*, 38:1214-1221, 1959.
21. Haddy, F. J. Local effects of sodium, calcium and magnesium upon small and blood vessel of the dog forelimb. *Circ. Res.*, 8:57-70, 1960.
22. Lavander, A. R. & T. N. Pullman. Changes in inorganic phosphate excretion

- induced by renal arterial infusion of calcium. *Am. J. Physiol.*, **205**:1025-1032, 1963.
23. Torrealba, F. Estudio de las diversas constantes hematológicas en ratas intoxicadas con vitamina D₂ (ergocalciferol). Trabajo de Ascenso a Prof. Asistente. Esc. de Bioanálisis, Fac. Ciencias de la Salud, Univ. de Carabobo, Valencia, Venezuela, 1978.
 24. Alarcón, O. M., R. de Castro, N. López & R. Ruiz. Hipervitaminosis D en ratas. *Acta Cient. Venez.*, **28**(1): 68, 1976.
 25. Lucy, J. A. & J. T. Dingle. Fat-soluble vitamins and biological membranes. *Nature*, **204**:156-161, 1964.
 26. Hanna, S., N. Alcock, B. Lazarus & B. Mullan. Changes in urinary citrate following a low calcium and magnesium diet and administration of vitamin D₂. *J. Lab. Clin. Med.*, **61**:220-229, 1963.
 27. Guest, G. M. & J. Warkany. Effect of overdosage of irradiated ergosterol in rabbits. Changes in distribution of phosphorus in blood cells and plasma. *J. Biol. Chem.*, **100**:445-454, 1933.
 28. Frolik, C. A. & H. F. DeLuca. Metabolism of 1,25-dihydroxycholecalciferol in the rat. *J. Clin. Invest.*, **51**:2900-2906, 1972.
 29. White, A., P. Handler & E. L. Smith. En: *Principles of Biochemistry*. New York, N. Y., McGraw-Hill, 1968, p. 1052.
 30. Neville, P. F. & H. F. DeLuca. The synthesis of (1,2-³H) vitamin D₃ and the tissue localization of a 0.25 µg (10 UI) dose per rat. *Biochem.*, **5**:2201-2207, 1966.
 31. Ponchon, G. & H. F. DeLuca. The role of the liver in the metabolism of vitamin D. *J. Clin. Invest.*, **48**:1273-1279, 1969.
 32. Olson, E. B., J. C. Knutson, M. H. Bhattacharyya & H. F. DeLuca. The effect of hepatectomy on the synthesis of 25-hydroxyvitamin D₃.
 33. DeLuca, H. F. Recent advances in our understanding of the vitamin D endocrine system. *J. Lab. Clin. Med.*, **87**:7-26, 1976.
 34. Cambria, A. & A. Billiteri. Modificazione biochimiche e morfologiche dei mitocondri epatici del ratto in ipervitaminosi D. *Boll. Soc. Ital. Biol. Sper.*, **46**: 621-626, 1970.
 35. Watari, N., K. Torizawa & S. Saeki. Ultrastructural alterations of liver after the overdose administration of vitamin A and D. *Simposia Cell Biol.*, **23**:145-154, 1972.
 36. Steck, I. E., H. Deutsch, C. I. Reed & H. C. Struck. Further studies on intoxication with vitamin D. *Ann. Int. Med.*, **10**:951-1004, 1937.
 37. Cañada de Zunzunegui, M., O. M. Alarcón, J. A. Burguera, J. L. Burguera & M. Burguera. Efecto de la vitamina D₂ en la concentración sérica de algunas enzimas hepáticas en ratas. *Acta Cient. Venez.*, **35**:107-110, 1984.
 38. Clark, I. & C. A. L. Bassett. The amelioration of hypervitaminosis D in rats with vitamin A. *J. Exp. Med.*, **115**:147-156, 1962.
 39. Hass, G. M., R. E. Trueheart, C. B. Taylor & M. Stumpe. An experimental histologic study of hypervitaminosis D. *Am. J. Path.*, **34**:395-431, 1958.
 40. Boyd, J. W. The comparative activity of some enzymes in sheep, cattle and rats - normal serum and tissue levels and changes during experimental liver necrosis. *Res. Vet. Med.*, **3**:256-268, 1962.
 41. Clampitt, R. B. & R. J. Hart. The tissue activities of some diagnostic enzymes in ten mammalian species. *J. Comp. Path.*, **88**:607-621, 1978.
 42. Harper, A. E. Glucose-6-phosphatase. En: *Methods of Enzymatic Analysis*.

- U. U. Bergmeyer (Ed.). New York, Academic Press, 1963.
43. Fiske, C. H. & Y. Subbarow. Colorimetric determination of phosphorus. *J. Biol. Chem.*, **66**:375-383, 1925.
 44. McKelvy, J. F. & Y. C. Lee. Microheterogeneity of the carbohydrate group of *Aspergillus oryzae* α -amylase. *Arch. Biochem. Biophys.*, **132**:99-108, 1969.
 45. Hers, H. G. Glycogen storage diseases. En: *Advances in Metabolic Disorders*. R. Levine & R. Luft (Eds.). Vol. 1, New York, N. Y., Academic Press, 1961.
 46. Sigma Chemical Co., Maltase diagnostic kit, Sigma Chemicals, St. Louis, Mo., U.S.A. 63172.
 47. Niemeier, H., C. Gonzalez & R. Rozzi. The influence of diet on liver phosphorylase. I. Effect of fasting and refeeding. *J. Biol. Chem.*, **236**:610-613, 1961.
 48. Bhide, S. V., S. Shah & M. P. Desai. Arginase and xantine oxidase activity in liver tissue in pathological conditions. *Biochem. Med.*, **9**:386-389, 1974.
 49. Archibald, R. M. Colorimetric determination of urea. *J. Biol. Chem.*, **156**:507-512, 1944.
 50. Michel, O. Cholinesterase in human red blood cells and plasma. En: *Standard Methods of Clinical Chemistry*. D. Seligson (Ed.). Vol. 3, New York, N. Y., Academic Press, 1961.
 51. Dingle, J. T., I. M. Sharman & T. Moore. 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.
 52. Folin, O. & V. Ciocalteu. On tyrosine and tryptophane determination in proteins. *J. Biol. Chem.*, **73**:627-635, 1929.
 53. Reitman, S. & S. Frankel. Colorimetric method for the determination of serum glutamic oxalacetic and glutamic pyruvic transaminases. *Am. J. Clin. Path.*, **28**:56-62, 1957.
 54. Strobecer, R. & H. M. Hennings. *Análisis de Vitaminas. Métodos Comprobados*. Madrid, Editorial Paz Montalvo, 1967, p. 303-339.
 55. Bergmeyer, H. U. & E. Bern. En: *Methods of Enzymatic Analysis*. 2nd English Edition. Vol. 2, Section C. H. U. Bergmeyer (Ed.). New York, N. Y., Academic Press, 1974, p. 725-752.
 56. Doménech, J.M. *Bioestadística. Métodos Estadísticos para Investigadores*. Barcelona, Editorial Herder, 1977, p. 400-415.
 57. Firenzuoli, A. M. & A. Zanobini. Effect of calciferol on enzyme levels in kidney, liver and intestinal mucosa of rat. *Life Sci.* **11**(II):287-291, 1972.
 58. Cruickshank, E. M., E. Kodicek & P. Armitage. The vitamin D content of tissues of rats given ergocalciferol. *Biochem. J.*, **58**:172-175, 1954.
 59. de Duve, C., R. Wattiaux & M. Wibo. Effects of fat-soluble compounds on lysosomes *in vitro*. *Biochem. Pharmacol.*, **9**:97-116, 1962.
 60. Lorente de Grimaldo, A. L. Efecto de las dosis tóxicas de vitamina D₂ sobre la concentración sérica y tisular de diversos electrolitos. Facultad de Farmacia, Universidad de Los Andes, Mérida, Venezuela, 1981.
 61. Ticktin, H. E. & N. P. Trujillo. Serum enzymes in diagnosis. *D. M.*, **3**:40-51, 1966.
 62. Wasserstein, M. *Enzimología Clínica en la Patología Hepática*. Buenos Aires. Editorial Puma, Publicaciones Médicas Argentinas, 1973, p. 20-21.