

ALTERACIONES ENZIMÁTICAS HEPÁTICAS EN RATAS TRATADAS CON VITAMINA E (α -tocoferol)

O. M. Alarcón-Corredor, E. Giménez.

¹Laboratorio de Espectroscopia Molecular. Universidad de Los Andes. Mérida, Venezuela. ²Laboratorio de Bioquímica Nutricional. Unidad de Investigación en Bioquímica. Universidad Centro-occidental "Lisandro Alvarado". Barquisimeto, Venezuela.

Resumen

En el presente trabajo se estudió el efecto de la administración intraperitoneal de 50, 100, 200 y 400 mg de vitamina E/día, durante 20 días, respectivamente, sobre la actividad enzimática hepática en 60 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 sexo, edad y peso similares a los animales tratados. Al final el estudio, las ratas se sacrificaron bajo anestesia con éter y se tomaron muestras de sangre y de tejido hepático para la determinación de la vitamina E en suero e hígado y la actividad enzimática hepática. La administración de vitamina E en exceso incrementó de manera significativa ($p < 0.05$) el contenido sérico y hepático de la vitamina e incrementó ($p < 0.05$) la actividad de las siguientes enzimas: alanina aminotransferasa, aspartato aminotransferasa, maltasa ácida (α -1,4-glucosidasa ácida), fosfatasa alcalina, 5'-nucleotidasa, γ -glutamyltranspetidasa, aldolasa y β -glucuronidasa mientras que las actividades de la glucosa-6-fosfatasa, glucógeno fosforilasa, α -amilasa y proteasas ácidas disminuyeron ($p < 0.05$) al comparar con los controles no tratados. Estos cambios son proporcionales a las dosis inyectadas de vitamina E. En conclusión, nuestros resultados proporcionan evidencias que la administración de dosis altas de vitamina E a corto plazo produce una marcada alteración de la actividad de diversas enzimas hepáticas.

Palabras clave: vitamina E, α -tocoferol, hipervitaminosis E, enzimas hepáticas.

Abstract.

Enzyme changes in the liver of vitamin E (α -tocopherol)-treated rats.

In the present paper the effect of intraperitoneal administration of 50, 100, 200 y 400 mg of α -tocopherol daily for 20 days, respectively, on the liver enzyme activity in 60 white male Wistar rats, aged 12 weeks and weighing 180-200 g, has been studied. The group control was integrated by 15 healthy rats with similar characteristics (strain, sex, age and weight) to treated animals. At the end of the study, rats were sacrificed under ether anesthesia. Blood and liver samples were taken for the determination of serum vitamin E and liver enzyme activity. Administration of excess of vitamin E produced a significant ($p < 0.05$) increase in the content of serum and liver vitamin E and increased ($p < 0.05$) the activity of the following enzymes: alanine aminotransferase, aspartate aminotransferase, acid maltase (acid α -1,4-glucosidase), alkaline phosphatase, 5'-nucleotidase, β -glucuronidase, γ -glutamyltranspeptidase and aldolase while glucose-6-phosphatase, glycogen phosphorylase, α -amylase and acid proteases decreased ($p < 0.05$) as compared with untreated controls. These changes depend on the doses given of vitamin E. In conclusion, our results provide evidence that short-term administration of high doses of vitamin E result in a marked alteration of activity of several liver enzymes.

Key words: vitamin E, α -tocopherol, hipervitaminosis E, liver enzymes.

INTRODUCCIÓN.

La vitamina E (VE o α -tocoferol o α -T) se presenta en estado natural, tiene ocho diferentes formas de isómeros, cuatro tocoferoles y cuatro tocotrienoles.

Todos los isómeros tienen un anillo aromático, llamado cromano, con un grupo hidroxilo y una cadena poliprenoide saturada. Cada una de las formas tiene su propia actividad biológica, siendo la

más activa y eficaz el α -tocoferol (α -T), componente integral de las membranas celulares e importante para la función normal de los sistemas esquelético-muscular, reproductor, neural y vascular (Burton 1994).

La vitamina E es generalmente segura cuando se administra en dosis muy altas, aunque la toxicidad ocurre menos frecuentemente con la administración oral de dosis elevadas de VE (Abdo et al. 1986). En este caso, la toxicidad comienza a ocurrir en animales con dosis por arriba de 1000 mg/kg/d (Wheldon et al. 1983). El exceso de vitamina E se acumula en el hígado (Martone et al. 1986) y los animales intoxicados por vitamina E frecuentemente presentan hígados agrandados (Abdo et al. 1986, Phelps 1981, Wheldon et al. 1983) con incremento en el contenido de lípidos del hígado: degeneración grasa (Tokuda y Takeuchi 1995) y aglomeración de macrófagos en los acinos centrolobulillares (Wheldon et al. 1983). La administración de 15-30 mg de vitamina E por vía intravenosa en la forma de una preparación de dl- α -tocoferil acetato a prematuros se asocia con un síndrome de insuficiencia hepática y renal, ascitis, trombocitopenia y muerte (Bove et al. 1985, Lorch et al. 1985, Martone et al. 1986). Estos niños tienen niveles muy altos de vitamina E en suero y en hígado (Martone et al. 1986).

En lechones de uno a dos días de edad tratados con una lenta infusión intravenosa de 7 h con 50 UI/kg/día de vitamina E durante seis días, Hale et al. (1995) demostraron que estas infusiones producen importantes acumulaciones de la vitamina en el hígado y sugieren que, en estas condiciones, la toxicidad neonatal puede ser debida a la acumulación masiva de vitamina E en los órganos neonatales. Por su parte, Sánchez de Molina (1989) demostró que en el hígado de ratas tratadas con dosis altas de vitamina E por vía intraperitoneal se presentan: a) áreas de necrosis focal; b) dilatación de los capilares sinusoides y de los canalículos biliares en los espacios porta; c) presencia en los capilares sinusoides de células de gran tamaño, con proyecciones citoplasmáticas, y con el citoplasma cargado de gotas lipídicas de tamaño variable y d) presencia de gotas lipídicas de forma variable libres en el interior de los sinusoides y, en menor cuantía, a nivel de los hepatocitos, que sugieren la presencia de un cierto grado de obstrucción intrahepática.

Tomando en consideración estos hallazgos se sugiere que la administración de dosis altas de vitamina E (α -tocoferol) produce una marcada alteración de las actividades enzimáticas hepáticas “marcadoras de lesión” (por ejemplo. aminotransferasas, amilasa, aldolasa, etc.), de

“obstrucción intrahepática”, (por ejemplo., fosfatasa alcalina, 5´nucleotidasa, leucinaminopeptidasa, γ -glutamylpeptidasa), lisosomales (β -glucuronidasa, proteasas ácidas y α -1,6-glucosidasa ácida o maltasa ácida) y otras (por ejemplo, glucosa-6-fosfatasa, glucógeno fosforilasa) y a partir de un modelo experimental se pretende evaluar las alteraciones de estas enzimas en relación a las diferentes dosis de α -tocoferol administradas a ratas sanas. Por esta razón, en el presente trabajo se estudió el efecto de la administración intraperitoneal de dosis altas de vitamina E (α -tocoferol) sobre la actividad hepática de las enzimas señaladas en ratas blancas sanas. Simultáneamente se valoró el contenido sérico y hepático de vitamina E en estas ratas.

METODOLOGÍA.

Para inducir la hipervitaminosis E se administró la vitamina E Merck® hidrosoluble (artículo 500862) que contiene 500 mg de DL- α -acetato de tocoferol por ml (1 UI= 1 mg de vitamina E), disuelta en agua a las concentraciones de 50, 100, 200 y 400 UI del compuesto por ml de solución, equivalentes a 50, 100, 200 y 400 mg de DL- α -tocoferol.

El Protocolo fue aprobado por el Laboratorio de Bioquímica Nutricional, 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 75 ratas machos Wistar, de 12 semanas de edad, con pesos entre 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 cinco 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 4 (grupos tratados) recibieron inyecciones intraperitoneales de 50, 100, 200 y 400 mg/día de vitamina E, respectivamente, por 20 días. Al grupo 5 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 E, 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. A las 24 horas de administrada la última dosis de vitamina E o de solución salina, según los casos, los animales se anestesiaron con éter etílico, se les extrajo sangre por punción del seno retro-orbitario, mediante tubos de microhematocrito. Las muestras se recolectaron en tubos de centrifuga graduados, sin anticoagulante y después se centrifugaron a 2500 rpm, durante 15 minutos, a fin de asegurar la pronta obtención de los sueros que se utilizaron para las determinaciones correspondientes. Las ratas inmediatamente 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.

Las actividades de la glucosa-6-fosfatasa (G-6-Pasa, EC 3.1.3.9), glucógeno fosforilasa (GF, EC 2.4.1.1), α -amilasa (AMS, EC 3.2.1.1), maltasa ácida (MA o α -1,4-glucosidasa ácida, EC 3.2.1.20), aspartato aminotransferasa (AST) o transaminasa glutámico-oxaloacética (TGO; EC 2.6.1.1), alanina aminotransferasa (ALT) o transaminasa glutámico-pirúvica (TGP; EC 2.6.1.2), proteasa ácida (PAC, EC 3.4.1.14) y fosfatasa alcalina (ALP, EC 3.1.3.1) se determinaron de acuerdo con los procedimientos utilizados en nuestros estudios previos en homogenatos hepáticos. (Alarcón-Corredor et al. 2011, 2007).

Las técnicas y los sustratos empleados para valorar las actividades de la γ -glutamylpeptidasa (γ -GT; EC. 2.3.2.2), la leucinaminopeptidasa (LAP= l-leucil-peptidohidrolasa; EC 3.4.1.1), la aldolasa (ALD; fructosa-1,6-difosfato-D-gliceraldehido-3-fosfatoliasa. E.C. 4.1.2.13) y la β -glucuronidasa (β -glu.; E.C. 3.2.1.31) también fueron publicadas (Carnevalí de Tatá 1994).

La nomenclatura empleada para cada enzima es la correspondiente a la Unión Internacional de Bioquímica. Todos los químicos y sustratos enzimáticos (Sigma SA®) fueron de grado analítico. La extracción y aislamiento de la vitamina E del hígado como paso previo a su valoración mediante cromatografía líquida se realizó mediante el método de Zaspel y Csallany (1983). La vitamina E en sangre y en tejido hepático se determinó mediante HPCL líquida de alta resolución en fase reversa por detección de diodos, de acuerdo con la técnica descrita por Brunetto et al. (1999).

ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

Los resultados se expresan como promedios \pm desviaciones estándar (DE). Para evaluar las diferencias en la actividad de las enzimas y el contenido sérico de vitamina E, entre el grupo control y los grupos tratados con vitamina E (1-5), se aplicó la prueba de ANOVA de una vía con post-test de Tukey (post-ANOVA) por ser muestras de múltiples rangos. Se realizó el análisis de regresión lineal para establecer las relaciones entre las diversas actividades enzimáticas y las dosis administradas de vitamina E. Se tomó el 95% como índice de confiabilidad estadística ($p < 0.05$). Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el paquete estadístico STATGRAPHICS PLUS 5.0.

RESULTADOS.

La administración intraperitoneal de la vitamina E, a las dosis señaladas, incrementó ($p < 0.05$) las concentraciones séricas ($r = 0.999$) y hepáticas ($r = 0.999$) del α -tocoferol, como se observa en la tabla 1. Las variaciones en las actividades enzimáticas en relación con las dosis de vitamina E inyectadas se muestran en la tabla 2. De acuerdo con la tabla, la glucosa-6-fosfatasa (G-6-Pasa) ($r = -0.847$), la glucógeno fosforilasa ($r = -0.821$), la α -amilasa ($r = -0.876$), y la proteasa ácida ($r = -0.969$) disminuyeron sus actividades en relación directa a la dosis administrada de α -tocoferol al realizar las comparaciones correspondientes. Mientras que, la maltasa ácida ($r = 0.936$), la ALT ($r = 0.791$), la AST ($r = 0.668$), la ALP ($r = 0.839$), la γ -glutamylpeptidasa (γ -GT; $r = 0.960$), la ALD ($r = 0.967$), la β -glucuronidasa ($r = 0.750$), la 5'N ($r = 0.819$) y la LAP ($r = 0.991$) incrementaron significativamente ($p < 0.05$) sus actividades en proporción directa con la cantidad de vitamina E inyectada. El ANOVA de una vía y los cinco periodos también demostraron que al menos dos grupos tratados con vitamina E difieren significativamente al compararse entre sí (especialmente los grupos con mayores dosis de vitamina E) y con el grupo control (en todos los casos $F = < 5.81$; G.L. = 4/45; $p < 0.001$).

DISCUSIÓN

La administración de vitamina E por vía intraperitoneal, a dosis superiores a los requerimientos diarios permitidos de 18 mg/kg dieta/día para la rata macho, incrementó significativamente ($p < 0.05$) las concentraciones séricas y hepáticas de la vitamina y determinó disminuciones significativas en la actividad de las enzimas glucosa-6-fosfatasa, glucógeno fosforilasa, amilasa y proteasas ácidas con un incremento ($p < =$

0.05) en el resto de las enzimas cuantificadas en el nivel hepático, determinando de esta manera un cuadro de hipervitaminosis E. El incremento en la cantidad de vitamina E en la sangre y en el hígado de los animales tratados es un hecho reconocido en la literatura consultada.

Tabla 1. Concentraciones de vitamina E en sangre e hígado de ratas tratadas con vitamina E.

Grupos	GC 0 ¹	G1 50	G2 100	G3 200	G4 400
Sangre (mg/l)	0.98±0.02	12.4±0.03 ^{a,b,c}	53.5±8 ^{a,b,c}	145±35.9 ^{a,b,c}	299.3±43 ^{a,b,c}
Hígado (μ g/g)	1.8±0.2	22.3±8.2 ^{a,b,c}	54.32±14.3 ^{a,b,c}	100.76±23.5 ^{a,b,c}	198.2±54.3 ^{a,b,c}

Los resultados se expresan en promedios \pm desviaciones estándar.

0¹= Dosis de vitamina E administrada en mg/kg/día

^ap<0,05 al comparar el grupo control con los tratados con vitamina E.

^bp<0,05 al comparar con los grupos 2 y 3

^cp<0,05 al comparar con el grupo 3

Tabla 2. Actividades enzimáticas hepáticas en ratas tratadas con vitamina E

Grupos Enzimas	Unidades de actividad	GC 0 ¹	G1 50	G2 100	G3 200	G4 400
Glucosa- 6-Pasa	μ moles de Pi/min/mg	16.70±1,5 ^a	12.21±1.1 ^a	11.56±0.63 ^a	10.67±0.91 ^{ab}	8.01±0.87 ^{abc}
Glucógeno fosforilasa	μ moles de Pi/5 min./30 ⁰ C	150 \pm 7	100 \pm 6 ^a	97±8 ^a	90±7 ^{ab}	70±6 ^{abc}
AMS	milimoles de glucosa/ g de tejido/h	1.91±0.38 ^a	1.41±0.36 ^a	0.90±0.16 ^{ab}	0.46±0.15 ^{ab}	0.34±0.12 ^{abc}
MA	mg glucosa/g/h	5±0.96	7±0.89 ^a	9±0.95 ^{ab}	10±0.89 ^a	12±0.99 ^{abc}
Pac.	μ g tirosina/mg/g	8,35±0.53 ^a	8±0.84	7,1±0.78 ^{ab}	6±0.59 ^{ab}	5±0.44 ^{abc}
AST	UA/g	92±6 ^a	186±6 ^a	187±5 ^a	189±6 ^a	206±13 ^{abc}
ALT	UA/g	104±5 ^a	185±6 ^a	192±7 ^{ab}	197±5 ^{ab}	224±11 ^{abc}
ALD	US/mg	94±9 ^a	151±23 ^a	194±24 ^{ab}	219±17 ^{ab}	300±20 ^{abc}
β -Glu	mg	575±28 ^a	1722±126 ^a	1740±109 ^a	2087±123 ^{ab}	2179±100 ^{abc}
ALP	fenoltaleina/mg μ moles p- nitrofenol/30 min/mg	119±11 ^a	288±21 ^a	488±40 ^{ab}	535±32 ^{ab}	596±56 ^{abc}
γ -GT	UA/mg	4±0,5 ^a	5±1 ^a	7±2 ^{ab}	8±1 ^{ab}	10±2 ^{abc}
LAP	μ M	13±2 ^a	15±1 ^a	34±3 ^{ab}	63±5 ^{ab}	142±22 ^{abc}
5'N	naftilamida/mg/h mg Pi/mg/h	3±0,9	13±2 ^a	15±4 ^a	17±1 ^{ab}	20±2 ^{abc}

Los resultados se expresan en promedio \pm desviaciones estándar

¹ Dosis administradas de vitamina E= mg/kg/día

Abreviaturas: AMS= amilasa. MA (α -1,6-glucosidasa ácida)= maltasa ácida. Pac. = proteasas ácidas. AST = aspartato aminotransferasa. ALT= alanina aminotransferasa. ALD= aldolasa. β -glu = β -glucuronidasa. ALP= fosfatasa alcalina. γ -GT= glutamilpeptidasa. LAP= leucinaminopeptidasa. 5'N= 5' nucleotidasa. UA= unidades de actividad.

^ap<0.05 al comparar el grupo control con los tratados con vitamina E.

^bp<0,05 al comparar con los grupos 2 y 3

^cp<0,05 al comparar con el grupo 3

La cantidad de vitamina que se deposita en el hígado depende de la dosis, de la vía de administración, de la velocidad de administración y del tipo de compuesto empleado (Baxter et al. 2012, Moreira y Mahan 2002, Hale et al. 1995). Moreira y Mahan (2002) señalaron que las concentraciones hepáticas, cardíacas y del tejido adiposo del α -tocoferol se elevan ($p < 0.01$) a medida que los niveles de vitamina E se incrementan en la dieta y sugieren que los tejidos hepático y adiposo también retienen una cantidad sustancial de esta vitamina. Sin embargo, cuando el nivel sanguíneo de α -toc se incrementa el hígado parece retener más vitamina E, cuando los resultados se expresan con base en concentraciones por gramo de tejido, que el tejido adiposo o el muscular. Jensen et al. (1990) también demostraron que el suero y el hígado responden más rápidamente a la vitamina E alimentaria.

La inconsistencia en los efectos de la vitamina E está relacionada con la función compleja y el comportamiento químico de la vitamina E, que puede manifestar un efecto anti-oxidante, neutro o pro-oxidante. La evidencia existente implica que los niveles elevados de α -tocoferol determinan, debido al estrés oxidativo posterior, un aumento de los niveles de radicales α -tocoferol (radicales libres). Estos radicales α -tocoferol pueden iniciar procesos de peroxidación lipídica por sí mismos, con el subsiguiente estrés oxidativo (Rietjens et al. 2002).

La vitamina E por sí sola es un antioxidante a cifras bajas de oxígeno; a concentraciones más altas de oxígeno es un pro-oxidante autocatalítico y forma un radical estable (radical de α -tocoferol) que tiene la capacidad de reaccionar con antioxidantes hidrosolubles o de penetrar más hacia lipoproteínas y tejidos, de manera que incrementa el daño por radicales libres (Murray et al. 2007). Este hecho es de importancia fundamental para explicar los resultados obtenidos en la presente investigación.

La glucosa-6-fosfatasa una enzima multifuncional, de gran importancia en el metabolismo intermediario de los glúcidos, disminuyó su actividad en los animales tratados con vitamina E. El mecanismo de disminución de esta enzima se puede explicar, entre otros, por un efecto directo de la vitamina sobre la enzima o sobre su síntesis, pues se ha visto que la vitamina E disminuye la actividad de la piruvatocinasa y de la glutatión peroxidasa, en el nivel de los eritrocitos (Miniero y col. 1982). Los efectos del D- α -tocoferil-fosfato sobre los diversos sistemas enzimáticos inhibidos pueden obedecer a las características del compuesto de ser un anión con un gran grupo no polar. Otro factor que puede influir son las alteraciones de las suprarrenales,

determinadas por la hipervitaminosis E, caracterizadas por degeneración y disminución de sus pesos relativos (Jenkins y Mitchell 1975) que, a su vez, disminuyen la producción de glucocorticoides (Weber et al. 1964) hormonas que ejercen una marcada influencia sobre la producción y/o actividad de esta glucosa-6-fosfatasa y, finalmente, el depósito de vitamina A en el nivel hepático. Es un hecho conocido que el consumo de 1000 mg de alfa-tocoferol acetato por kilogramo de dieta, incrementa ($p < 0.05$) la concentración de vitamina A en el hígado (Sünder y Flachowsky 2001). Experiencias previas realizadas en nuestro Departamento, muestran que la vitamina A alcohol (retinol), por un mecanismo no bien esclarecido, disminuye de manera significativa la actividad de esta enzima a nivel hepático (Alarcón-Corredor y Alfonso 2007).

La glucógeno fosforilasa que se localiza en la fracción sobrenadante del hígado de rata está estrechamente vinculada con el metabolismo de los glúcidos. Su mecanismo de control es muy complicado y ha sido descrito magistralmente por diversos autores, entre ellos Krebs y Fischer (1962). La reducción en la actividad de la fosforilasa en los animales tratados con vitamina E puede estar influenciada por la disminución del ingreso alimentario, que afecta la cantidad de fosforilasa total presente en los tejidos (Krebs y Fisher 1962), aparentemente por una reducción en la cantidad de proteína enzimática. El otro factor que puede influir es la lesión hepática, a consecuencia del acumulo de vitamina E (Sánchez de Molina 1989). Lesión, que según Kobayashi (1978), puede disminuir la actividad de esta enzima por un mecanismo todavía no bien aclarado.

La α -amilasa que se localiza primariamente en la fracción microsomal, participa en la producción de glucosa por las células hepáticas, también disminuyó significativamente ($p < 0.05$) su actividad por el exceso de vitamina E. Este hallazgo concuerda con los trabajos de McGeachin y Potter (1960), quienes observaron una disminución del 50% en el nivel de la amilasa hepática y sérica tras el daño hepático. Bhutta y Rahman (1971) determinaron la actividad de la amilasa sérica en 60 pacientes con enfermedades hepáticas y encontraron que la mayoría de los pacientes tenían los valores de la amilasa sérica muy por debajo de los valores límites. En este caso, las actividades de la amilasa estaban relacionadas con el grado de disfunción hepática.

Las proteasas ácidas intracelulares participan en la degradación de las proteínas intracelulares y en la formación de derivados polipeptídicos (a partir de amidas y ésteres de aminoácidos). Por tanto, son

enzimas vinculadas muy estrechamente con el catabolismo proteico en el nivel tisular y hepático y localizadas en el nivel de los lisosomas (Murray et al. 2007). Kopitar et al. (1977) demostraron que las células y los tejidos contienen además de estas enzimas proteolíticas sus correspondientes inhibidores inactivos.

Nuestros resultados muestran una marcada y significativa disminución de la actividad proteolítica ácida hepática en las ratas tratadas con vitamina E, al comparar con los controles respectivos. Estos resultados concuerdan con los trabajos de Schwartz (1979) quien demostró que la vitamina E inhibe la actividad de la tripsina (una enzima proteolítica), de la fosfatasa ácida y de la arilsulfatasa A (enzimas lisosomales), estas últimas en cultivos de condrocitos humanos.

El posible mecanismo de producción del fenómeno pudiera explicarse por los siguientes hechos: a. por acción represora de la vitamina E sobre la síntesis proteica (y enzimática). Los trabajos de Zalkin et al. (1962) y de Weinstock y Lukacs (1964) sugieren que el α -tocoferol puede actuar como un represor de la síntesis proteica y, por consiguiente, de selectos sistemas enzimáticos catabólicos: desoxirribonucleasas, ribonucleasas, arilsulfatasas y catepsina; b. por efecto directo de la vitamina E sobre la enzima. En cultivos de cartílago humano, Schwartz (1979) demostró que la vitamina E (añadida al medio de cultivo) inhibe las actividades de la fosfatasa ácida y de la arilsulfatasa A, sin modificar la arilsulfatasa B, enzimas ligadas a los lisosomas (Murray et al. 2007) y, c) por activación de los inhibidores naturales de las proteínas tisulares. Si muy poco se conoce sobre las acciones de la vitamina E a nivel molecular, la existencia de inhibidores inactivos de las proteinasas o proteasas tisulares permite sugerir que la vitamina E en dosis excesivas pudiera activar estos inhibidores, con la inhibición concomitante de las proteasas ácidas tisulares. Esto ha sido descrito para el caso de la ribonucleasa en cataratas seniles humanas (Maione et al. 1968).

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 E, están relacionadas con el catabolismo proteico y sus actividades tisulares aumentan en situaciones de gluconeogénesis incrementada (Murray et al. 2007). El incremento en la actividad de estas aminotransferasas pudiera deberse a la lesión hepática inducida por la vitamina E a dosis elevadas (efecto pro-oxidante: Rietjens et al. 2002), comprobada histológicamente por la existencia de las

áreas de necrosis focal (Sánchez de Molina 1989) y al ingreso alimentario disminuido.

La aldolasa se encuentra ampliamente distribuida en todos los tejidos, debido a su posición central en la vía que participa en el metabolismo intermediario de los glúcidos. En el hígado de rata, la enzima se localiza en el sobrenadante. Con respecto a esta enzima nuestros resultados muestran que su actividad se incrementa en forma proporcional a las dosis administradas de vitamina E. Este incremento se corresponde con los resultados histopatológicos descritos por Sánchez de Molina (1989), pues es un hecho conocido que la aldolasa aumenta su actividad durante la necrosis hepática aguda y en pacientes con hepatitis viral aguda (Wolf et al. 1973). En estos pacientes la actividad de la enzima se eleva en la sangre en proporción directa a la necrosis tisular (Wolf et al. 1973). Respecto a este punto, Henry (2005) ha señalado que la aldolasa se eleva relativamente poco en la ictericia obstructiva y en la cirrosis hepática.

La β -glucuronidasa es una enzima abundante en el hígado, páncreas y otros tejidos y en el nivel celular se encuentra vinculada típicamente con los lisosomas; aunque, muestra una distribución subcelular única en el hígado de ratas, en asociación con las fracciones lisosomal y microsomal. (Swank y Paigen 1973) mientras que la α -1,6-glucosidasa ácida (maltasa ácida) es de localización exclusiva en los lisosomas y está vinculada con el metabolismo glucídico a nivel celular (Murray et al. 2007). La administración de la vitamina E, en las dosis señaladas, incrementó la actividad de estas enzimas en el nivel hepático, incremento que es proporcional a la cantidad inyectada de α -tocoferol. Este incremento puede deberse a la lesión hepática, inducida por la hipervitaminosis E y a la peroxidación lipídica de las membranas lisosomales, por el efecto pro-oxidante de la vitamina E a dosis elevadas (Rietjens IM et al. 2002, Stocker 1999) que se acompaña de una liberación incrementada de las enzimas lisosomales al citoplasma de las células hepáticas, con sus secuelas características, entre ellas la necrosis celular.

Otro hallazgo interesante en la presente investigación es el incremento significativo en la actividad de las enzimas marcadoras de obstrucción intrahepática como son la fosfatasa alcalina, la 5' nucleotidasa, la leucinaminopeptidasa y la γ -glutamylpeptidasa. Sin embargo, en cultivos de hepatocitos de rata tratados con tocoferol, Ong et al. (1993) observaron una disminución significativa en la actividad de la γ -glutamyltranspeptidasa y de la glutatión-S-transferasa. El incremento en la actividad de estas enzimas se explica, en parte, por los resultados previos de

Sánchez de Molina (1989) quien demostró en el hígado de ratas tratadas con vitamina E un cierto grado de obstrucción intrahepática. Rivera et al. (1990) también demostraron en conejos recién nacidos tratados con acetato de α -tocoferil, disuelto en un vehículo de polisorbato, la existencia de un cuadro de estasis biliar leve con niveles elevados de bilirrubina en el suero. En truchas arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) alimentadas con dietas que contienen tres niveles diferentes de α -tocoferol (dieta de 0, 10 y 1000 mg/100 g), Tokuda y Takeuchi (1995) observaron en el hígado la presencia de muchas gotas lipídicas, entre 5-20 micras de diámetro. De estos datos, se considera que el exceso de α -tocoferol promueve la acumulación de lípidos de manera suficiente para formar gotas en el tejido hepático, aunque la función hepática no está afectada. Generalmente se conoce que un hígado graso determina un deterioro de la función hepática en humanos. Estos resultados concuerdan los hallazgos señalados por Sánchez de Molina (1989).

CONCLUSIÓN.

En conclusión, en todos los casos, el grado de variación de la actividad enzimática se relaciona con la dosis y el contenido sérico y hepático de la vitamina E. Además nuestros resultados proporcionan evidencias que la administración de altas dosis de esta vitamina, incluso durante cortos periodos, produce 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, entre otros. Aunque los resultados obtenidos en animales tratados con dosis altas de vitamina E 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.

Abdo KM, Rao G, Montgomery CA. 1986. Thirteen-week toxicity study of d-alpha-tocopheryl acetate (vitamin E) in Fischer 344 rats. Food Chem. Toxicol. 24: 1043-1050

Alarcón-Corredor OM, Villarroel J, Paredes D. 2011. Alteraciones enzimáticas esplénicas en ratas tratadas con dosis altas de vitamina A. MedULA. Revista de Facultad de Medicina. ULA. 20: 31-35

Alarcón-Corredor OM, Alfonso R. 2007. Alteraciones clínicas y bioquímicas en ratas tratadas con vitamina A. Arch. Latinoamer. Nutr. 57: 224-230

Baxter LL, Marugan JJ, Xiao J et al. 2012. Plasma and tissue concentrations of α -tocoferol and δ -

tocoferol following high dose dietary supplementation in mice. Nutrients. 4: 467-490

Bhutta IH, Rahman MA. 1971. Serum amylase activity in liver disease. Clin. Chem. 17: 1147-1149

Bove KE, Kosmetatos N, Wedig KE et al. 1985. Vasculopathic hepatotoxicity associated with E-Ferol syndrome in low-birth-weight infants. JAMA. 254: 2422-2430

Brunetto MR, Alarcón OM, Dávila E et al. 1999. Serum trace elements and fat-soluble vitamins A and E in healthy pre-school children from a Venezuelan rural community. J. Trace Elements Med. Biol. 13: 40-50

Burton GW. 1994. Vitamin E: molecular and biological function. Proc.Nutr. Soc. 53: 251-262

Carnevalí de Tatá, E. 1994. Alteraciones enzimáticas séricas en pacientes cancerosos. I. Carcinomas del tubo digestivo. Trabajo especial para ascender a la Categoría de Prof. Asociado. Departamento de Análisis Clínico. Facultad de Farmacia. ULA. Mérida.

Hale TW, Rais-Bahrami K, Montgomery DL et al. 1995. Vitamin E toxicity in neonatal piglets. J. Toxicol. Clin. Toxicol. 33: 123-130.

Henry JB. 2005. El Laboratorio en el Diagnóstico Clínico. Marbán Libros, SL. Madrid, España.

Jenkins MY, Mitchell GV. 1975. Influence of excess vitamin E on vitamin A toxicity in rats. J. Nutr., 105: 1600-1606

Jensen M, Lindholm A, Hakkarainen J. 1990. The vitamin E distribution in serum, liver, adipose and muscle tissues in the pig during depletion and repletion. Acta Vet. Scand. 31:129-136.

Kobayashi M. 1978. Studies of liver phosphorylase in hepatic injuries. I. Alteration in enzyme activity. Acta Med. Okayama 32: 273-282

Kopitar M, Subar A, Turk V. 1977. Biochemical and biological properties of cell and tissue neutral proteinases and inhibitors. Acta Biol. Med... Germ., 36: 1863-1871

Krebs EG, Fischer EH. 1962. Molecular properties and transformation of glycogen phosphorylase in animal tissues. Acta. Enzymol. 24: 263-290

Lorch V, Murphy D, Hoersten LR et al. 1985. Unusual syndrome among premature infants: association with a new intravenous vitamin E product. Pediatrics. 75: 598-602

Maione M, Maraini G, Carta F. 1968. Ribonuclease activity and polysome profile in human senile cataract. Exp. Eye Res. 7: 546-550

Martone WJ, Williams WW, Mortensen ML et al. 1986. Illness with fatalities in premature infants: association with an intravenous vitamin E preparation, E-Ferol. Pediatrics. 78: 591-600

- McGeachin RL, Potter BA. 1960. Amylase in isolated liver cells. *J. Biol. Chem.* 235: 1354-1358
- Miniero R, Canducci E, Ghigo D et al. 1982. Vitamin E in beta-thalassemia. *Acta Vitaminol. Enzymol.* 4: 21-25.
- Moreira I, Mahan DC. 2002. Effect of dietary levels of vitamin E (all-rac-tocopheryl acetate) with or without added fat on weanling pig performance and tissue alpha-tocopherol concentration. *J Anim Sci.* 80: 663-669.
- Murray RK, Granner DK, Rodwell VW. 2007. Harper. *Bioquímica Ilustrada*. 17ª Edición. El Manual Moderno. México.
- Ong FB, Wan Ngah WZ, Shamaan NA et al. 1993. Glutathione S-transferase and gamma-glutamyl transpeptidase activities in cultured rat hepatocytes treated with tocotrienol and tocopherol. *Comp. Biochem. Physiol C.* 106: 237-240
- Phelps DL. 1981. Local and systemic reactions to the parenteral administration of vitamin E. *Dev. Pharmacol. Ther.* 2: 156-171
- Rietjens IM, Boersma MG, Haan LD et al. 2002. The pro-oxidant chemistry of the natural antioxidants vitamin C, vitamin E, carotenoids and flavonoids. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 11: 321-333
- Rivera A Jr, Abdo KM, Bucher JR et al. 1990. Toxicity studies of intravenous vitamin E in newborn rabbits. *Dev. Pharmacol. Ther.* 14: 231-237
- Sánchez de Molina D. 1989. Distorsión del mapa enzimático hepático por efecto de la hipervitaminosis E. Trabajo de Ascenso a la Categoría de Profesor Agregado. Departamento de Bioquímica. Facultad de Medicina. Universidad de Los Andes. Mérida.
- Schwartz ER. 1979. Effect of vitamin C and E on sulfated proteoglycan metabolism and sulfatase and phosphatase activities in organ cultures of human cartilage. *Calcif. Tissue Int.* 28: 201-208
- Stocker R. 1999. The ambivalence of vitamin E in atherogenesis. *Trends Biochem. Sci.* 24: 219-223
- Sünder A, Flachowsky G. 2001. Influence of high vitamin E dosages on retinol and carotenoid concentration in body tissues and eggs of laying hens. *Arch Tierernähr.* 55: 43-52.
- Swank RT, Paigen K. 1973. Biochemical and genetic evidence for a macromolecular β -glucuronidase complex in microsomal membranes. *J. Mol. Biol.* 77: 371-389
- Tokuda M, Takeuchi M. 1995. Effects of excess doses of alpha-tocopherol on the lipids and function of rainbow trout liver. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* (Tokyo). 41: 25-32
- Weber G, Radhey L, Singhal C. 1964. Role of enzymes in homeostasis. Actinomycin and puromycin inhibition of cortisone-induced synthesis of hepatic glucose-6-phosphatase and fructose 1-6-diphosphatase. *J. Biol. Chem.* 239: 521-526.
- Weinstock IM, Lukas M. 1964. Enzyme studies in muscular dystrophy. IV. Acid deoxyribonuclease in nutritional and hereditary muscular dystrophy. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 115: 716-719
- Wheldon GH, Bhatt A, Keller P. 1986. d,1-alpha-Tocopheryl acetate (vitamin E): a long term toxicity and carcinogenicity study in rats. *Int. J. Vitam. Nutr. Res.* 53: 287-296
- Wolf PL, Williams D. 1973. *Practical Clinical Enzymology and Techniques and Interpretation and Biochemical Profiling*. John Wiley and Sons. New York and London.
- Zalkin A, Tappell AL, Caldwell KA et al 1962. Increased lysosomal enzymes in muscular dystrophy of vitamin E, deficient rabbit. *J. Biol. Chem.* 237: 2678-2682
- Zaspel BJ, Csallany AS. 1983. Determination of alpha-tocopherol in tissues and plasma by high-performance liquid chromatography. *Anal. Biochem.* 130: 146-150.

Recibido: 6 dic 2012 Aceptado: 16 abril 2013

MedULA en Internet

Usted puede acceder y descargar todos los contenidos de la revista **MedULA**, a texto completo con figuras a todo color, desde algunas de las siguientes páginas de la Web, entre otras: www.saber.ula.ve/medula; www.latindex.org; www.periodica.org; www.doaj.org; www.freemedicaljournals.com; www.fj4d.com; <http://dialnet.unirioja.es/servlet/extrev?codigo=7642>; www.portalesmedicos.com; <http://web5.infotrac.galegroup.com>; www.ebsco.com; www.monografias.com; www.imbiomed.com; www.indexcopernicus.com