

Alarcón et al. 2011. Alteraciones enzimáticas esplénicas en ratas con hipervitaminosis. *MedULA* 20: 31-35.

ALTERACIONES ENZIMÁTICAS ESPLÉNICAS EN RATAS TRATADAS CON DOSIS ALTAS DE VITAMINA A.

O. M. Alarcón-Corredor¹, J. Villarroel², D. Paredes³, E. Giménez⁴

¹Laboratorio de Espectroscopia Molecular. Departamento de Química. Facultad de Química. ²Escuela de Nutrición y Dietética. Facultad de Medicina. ³Departamento de Bioquímica. Facultad de Medicina. Universidad de Los Andes. Mérida. Venezuela. ⁴Laboratorio de Bioquímica Nutricional, Decanato de Ciencias de la Salud, Universidad Centro Occidental "Lisandro Alvarado". Barquisimeto. Lara. Venezuela.

Resumen

Los trabajos respecto a los efectos de la hipervitaminosis A aguda sobre el mapa enzimático del bazo son escasos. Por esta razón, en la presente investigación se estudió el efecto de la administración intramuscular de 100.000 UI de vitamina A palmitato/día, durante 7 días, sobre la actividad de diversas enzimas en el bazo de ratas macho blancas. La administración de la vitamina A en exceso determinó un incremento significativo ($p < 0.05$) en el contenido esplénico de vitamina A y en la actividad de las siguientes enzimas: aminotransferasas, α -1,4-glucosidasa ácida, fosfatasas ácida y alcalina, y proteasas ácidas en comparación con los controles no tratados. El daño tisular y los cambios enzimáticos dependen de las dosis administradas de vitamina A. Estas alteraciones se deben a la liberación de las hidrolasas ácidas desde los lisosomas que determina la necrosis tisular y el incremento en la actividad de las aminotransferasas, enzimas indicadoras de daño tisular.

Palabras claves: bazo, hipervitaminosis A aguda, lisosomas, hidrolasas ácidas.

Anstract

Enzyme alterations in spleen of rats treated with high doses of vitamin A.

Literature reports of effects of hypervitaminosis A on spleen enzymology are scarce. Thus, in the present investigation the effect of intramuscular administration of 100.000 IU of vitamin A palmitate daily for seven days on the tissue enzyme pattern of spleen in white male rats has been studied. Administration of excess of vitamin A determined a significantly ($p < 0.05$) increase in the content of vitamin A and in the activity of the following enzymes: aminotransferases, α -1,4-acid glucosidase, acid and alkaline phosphatases, and acid proteases in spleen on comparing with untreated controls. The damage of tissue and enzyme changes depends on the doses given of vitamin A. These alterations may be due to the release of acid hydrolases from lysosomes, by excess vitamin A, which determine the tissue necrosis and the increased activity of aminotransferases, enzymes indicative of tissue damage.

Key words: spleen, acute hypervitaminosis A, lysosomas, acid hydrolases.

INTRODUCCIÓN.

La vitamina A (holo-trans-retinol), una vitamina liposoluble, y sus derivados: 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 (Perrotta et al. 2002). La vitamina A es esencial durante toda la vida, sin embargo, su influencia es particularmente crítica en aquellos períodos cuando las células proliferan y se diferencian muy rápidamente, por ejemplo durante el embarazo y la primera infancia. En los animales, la vitamina A ejerce una poderosa influencia sobre la función de diversos tejidos y órganos incluyendo el ojo, el sistema nervioso, el tracto respiratorio, el hígado, el bazo, el riñón, ciertas glándulas (entre ellas la tiroideas y las suprarrenales), los órganos reproductores, el

esqueleto y el pulmón (Chytil, 1992; Chataing y Alarcón, 2005). Por consiguiente, su carencia (hipovitaminosis) o su administración en exceso (hipervitaminosis) determinan graves alteraciones corporales, que pueden llevar a la muerte.

La hipervitaminosis ocurre cuando la cantidad de vitamina A consumida o administrada intramuscularmente excede a su capacidad de unión con su proteína transportadora (RBP). Su absorción relativamente rápida con su baja depuración plasmática puede producir la hipervitaminosis A aguda, a las pocas horas después ser consumida o inyectada una dosis lo suficientemente alta del compuesto. 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 (Perrotta et al, 2002). 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

Alarcón et al. 2011. Alteraciones enzimáticas esplénicas en ratas con hipervitaminosis. *MedULA* 20: 31-35.

(Rodahl, 1950). Aunque es un hecho conocido que la hipervitaminosis A crónica afecta profundamente al bazo, tal como lo demuestran los trabajos previos de Strauss (1934-1935), Cornil et al. (1939), Maddock et al. (1949), Polliack y Drexler (1972), Stimson (1961), Gerber et al. (1954), Shaw y Niccoli (1953), Clark (1971) y Galal et al. (1991) quienes al estudiar, mediante métodos histoquímicos, los efectos de dosis altas de vitamina A sobre el bazo notaron pérdida linfocítica en las pulpas blanca y roja que contenían núcleos picnóticos mientras que en la pulpa roja se encontraron numerosos macrófagos, megacariocitos y células PAS positivas, sin cambios en las fibras reticulares y del colágeno del bazo.

Sin embargo, de acuerdo con nuestro conocimiento, los trabajos respecto a los efectos de la hipervitaminosis A aguda sobre la enzimología del bazo son escasos. Por esta razón, en la presente investigación se estudió el efecto de la administración intramuscular de 100.000 UI de vitamina A palmitato/día durante 7 días sobre la actividad de diversas enzimas lisosomales (glucosidasa, fosfatasa ácida y proteasas) y citoplasmáticas (aminotransferasas y fosfatasa alcalina) en el bazo de ratas macho blancas.

METODOLOGÍA.

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. Para la producción de la hipervitaminosis aguda se utilizó la vitamina A palmitato hidrosoluble Merck; 1 ml = 100.000 UI.

Diseño experimental. Se emplearon 30 ratas macho Wistar, con pesos que oscilaron entre 180 y 200 g, 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. La fórmula para la dieta basal fue similar a la recomendada por el American Institute of Nutrition (1977). Después de este periodo de adaptación, los animales se distribuyeron al azar en dos grupos, de 15 ratas cada uno, sin que hubiese diferencias significativas previas entre los promedios de peso de los distintos grupos. Los animales del grupo tratado (grupo 1) recibieron inyecciones intramusculares de 100.000 UI de vitamina A palmitato/día por siete días. Al grupo control (grupo 2) 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 y tuvieron libre acceso al agua de bebida. 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 y se desangraron durante 1-3 min. Se practicó laparotomía mediana dejando al descubierto el bazo, que fue resecado y colocado en cápsulas de Petri, sobre baño de hielo. Los homogenatos que se prepararon al 10% en agua bidestilada y deionizada, según las recomendaciones de Boyd (1962) y de Clampitt y Hart (1978), se congelaron de inmediato y se utilizaron para las determinaciones enzimáticas, en un plazo no mayor de 48 h.

Actividades enzimáticas determinadas. La α -1,4-glucosidasa ácida (GA; E.C. 3.2.1.20) se cuantificó según la técnica de Gamkhou y Scherstén modificada (1972), utilizando un sustrato tamponado de maltosa. La glucosa liberada durante el proceso se cuantificó mediante el método de la glucosa oxidasa (Sigma, Boletín Técnico No. 510. January 1978. Sigma Chemical Company. St. Louis, Mo. USA). Los resultados se expresan en milimoles de glucosa liberados por gramo de tejido y por hora de incubación. La aspartato aminotransferasa (AST; E.C. 2.6.1.1) y la alanina aminotransferasa (ALT; E.C. 2.6.1.2) se determinaron mediante el método de Reitman y Frankel (1957), utilizando aspartato y D,L-alanina como sustratos, respectivamente. Los resultados se expresan en unidades de actividad por gramo de tejido fresco. La proteasa ácida (Pac; E.C., 3.4.1.14.) se determinó como actividad proteolítica ácida total empleando como sustrato hemoglobina al 4% en buffer acetato 0.1M (pH 4.5) y se cuantificó la cantidad de tirosina liberada en la reacción enzimática según el método de Folin y Ciocalteu (1927). Los resultados se expresaron en μ g de tirosina liberados por mg de tejido y por hora de incubación. Las fosfatasa alcalina (AIP; E.C.3.1.3.1) y ácida (AcP; E.C. 3.2.3.2) se estimaron mediante el método de Walter y Schütt (1974), empleando una solución tamponada de p-nitrofenilfosfato (pH 9,8 ó 5,9, respectivamente). Las actividades de las enzimas se expresaron en micromoles de p-nitrofenol liberados en 30 min por mg de proteína.

Alarcón et al. 2011. Alteraciones enzimáticas esplénicas en ratas con hipervitaminosis. *MedULA* 20: 31-35.

Contenido de vitamina A en bazo. El contenido de vitamina A en bazo se determinó de acuerdo con la técnica de Neeld y Pearson (1963); los resultados se expresan en µg por gramo de peso húmedo.

Las lecturas se realizaron para todas las enzimas en un Spectronic 20 B&L, en las longitudes correspondientes a cada técnica. Los resultados para las actividades enzimáticas se expresan en las unidades ya indicadas. La nomenclatura empleada para cada enzima es la correspondiente a la Unión Internacional de Bioquímica.

Análisis estadístico. Los resultados se expresan como promedios ± desviaciones estándar (DE). Las diferencias significativas entre los grupos tratado y control se analizaron mediante la t de Student. Toda $p < 0.05$ se consideró estadísticamente significativa. Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el paquete estadístico Statgraphics plus 5.0.

RESULTADOS.

El contenido de vitamina A se incrementó ($p < 0,05$) en el bazo del grupo tratado (22 ± 1) en comparación con el grupo control (1.8 ± 0.1 µg/g de tejido húmedo). Los resultados en cuanto a las actividades enzimáticas se muestran en la tabla 1.

Tabla 1. Actividades enzimáticas en el bazo de ratas tratadas con vitamina A

Enzimas	Unidades de actividad	GRUPO 1 (Tratado)	GRUPO 2 (Control)
Aspartato aminotransferasa	U/g de tejido húmedo	31 ± 2^a	7.08 ± 0.8
Alanina aminotransferasa	U/g de tejido húmedo	13 ± 1^a	4 ± 0.25
Fosfatasa alcalina	µmoles de p-nitrofenol/30 min/g de tejido húmedo	34 ± 4^a	6 ± 2.6
Fosfatasa ácida	µmoles de p-nitrofenol/30 min/g de tejido húmedo	333 ± 12^a	144 ± 18
Proteasas ácidas	µg tirosina/mg tejido/h	16.5 ± 0.9^a	2.8 ± 0.8
α-1,4-glucosidasa ácida	mmoles de glucosa/g de tejido/h	3.3 ± 0.8^a	0.21 ± 0.06

Los resultados se expresan como promedios ± desviaciones estándar.

^a $p < 0,05$ estadísticamente significativo al comparar el grupo tratado con el control.

La administración de vitamina A a dosis altas incremento significativamente ($p < 0,05$) la actividad de todas las enzimas valoradas en el bazo de los animales tratados al comparar con el grupo control.

DISCUSIÓN.

La vitamina A administrada en exceso determinó una hipervitaminosis aguda que se demostró por el marcado incremento de los niveles de retinol y las alteraciones en las actividades enzimáticas a nivel esplénico.

La acción fisiológica del retinol depende de la dosis aplicada, del tiempo de acción y, en parte, de las especies animales; acción que se extiende a todo el organismo mostrando un modo de acción específico y diferenciado sobre tejidos individuales. El retinol es uno de los compuestos labilizadores más potentes que actúan sobre las membranas lisosomales (Roels 1973). El exceso de vitamina A libre labiliza las membranas lisosomales de las células del bazo, al igual que lo que sucede en hígado y en otros tejidos de rata, por su actividad detergente tensoactiva y membranólítica y determina la liberación de una gran variedad de hidrolasas ácidas (manosidasas, proteasas, catepsinas, ribonucleasas, desoxirribonucleasas, fosfatasa, α-1.4-glucosidasa, β-glucuronidasa y sulfatasa, entre otras), que se encuentran en los lisosomas (Wolf, 1984). Dingle (1963) comprobó que este complejo enzimático es

el responsable de muchos de los cambios observados en los tejidos de los animales tratados con dosis excesivas de vitamina A. El incremento en la actividad de las hidrolasas ácidas lisosomales (proteasa, fosfatasa y glucosidasa) en el bazo de los animales tratados concuerda con estos resultados previos. Schmidt et al. (1992) en conejos tratados con 200.000 U de retinol por kg de peso durante 72-168 horas/v.i.p, también demostraron un marcado incremento en la actividad de las hidrolasas esplénicas lisosomales que, en general, sobrepasan las del hígado, obteniéndose valores de hasta 2-5 veces superiores, que corroboran los datos de la presente investigación. Estas enzimas lisosomales están comprometidas en procesos inflamatorios y en la destrucción autofágica de los tejidos (Brandes et al. 1967), con producción de zonas de necrosis focales o generalizadas, que confirman los estudios histoquímicos previos que muestran zonas de

Alarcón et al. 2011. Alteraciones enzimáticas esplénicas en ratas con hipervitaminosis. *MedULA* 20: 31-35.

necrosis en el bazo de conejos tratados con dosis elevadas de retinol (Alarcón 1972). El incremento en la actividad de las proteasas explica la disminución en la reacción de las proteínas esplénicas al azul de bromofenol (método histoquímico para la localización de las proteínas en general) que se detecta en el bazo de conejos tratados con dosis altas de vitamina A retinol (Alarcón 1972).

Las enzimas alanina (ALT) y aspartato aminotransferasa (AST) que incrementan significativamente ($p < 0,05$) su actividad en el bazo de ratas tratadas con vitamina A, están relacionadas con el catabolismo proteico y sus actividades tisulares aumentan en situaciones de gluconeogénesis incrementada (Murray et al. 2007). Estas enzimas se consideran "indicadoras de daño tisular" (Coodley, 1972) y son una expresión de la necrosis del órgano, inducida por la hipervitaminosis A aguda (Alarcón 1972; Gadal et al. 1991). Llama la atención que este aumento sea más notorio con la AST. Este hecho es interesante pues se ha señalado que el predominio de la ALT indica una alteración de la membrana celular, mientras que el predominio de la AST revela la lesión de las organelas citoplasmáticas (Coodley, 1972).

Nuestros resultados también muestran un marcado incremento en la actividad de las fosfatasa ácida y alcalina en los animales tratados que concuerda con los estudios previos de Alarcón (1972) quien con diferentes técnicas histoquímicas, demostró una reacción positiva e intensa de las enzimas en el citoplasma de todas las células esplénicas. Las fosfatasa ácidas revelan el estado lisosomal en un momento determinado de la vida tisular. El aumento en la actividad de fosfatasa ácida, por efecto de la vitamina A a altas dosis puede ser explicado por la alteración en la permeabilidad de los lisosomas. El incremento en la actividad de la fosfatasa alcalina, al igual que lo que sucede en los hepatocitos, se puede relacionar a la unión del retinol a los receptores nucleares de las células esplénicas que pueden aumentar la diferenciación celular y la expresión de los genes, que coincide con los niveles elevados de la ALP (Hui et al. 1993). El ácido retinoico, un derivado natural de la vitamina A, también se ha demostrado que es un potente inductor de la expresión de la fosfatasa alcalina tisular no específica en osteoblastos y fibroblastos (Reese et al. 1992) y en los neutrófilos (Sato et al. 1989).

CONCLUSIÓN.

La administración de vitamina A incrementó ($p < 0,05$) el contenido esplénico de retinol y la actividad de las enzimas valoradas en comparación con los controles no tratados. Las alteraciones dependen de las dosis administradas de vitamina A. Estas alteraciones pueden ser debidas a la liberación de las hidrolasas ácidas desde los lisosomas, después de la destrucción de sus membranas por el exceso de vitamina A libre, que determinan la necrosis tisular y el incremento en la actividad de las aminotransferasas, enzimas indicadoras de daño tisular. Por consiguiente, el bazo, al igual que otros órganos (riñón, pulmón, hígado, cartílago, etc.) es muy susceptible de alterar su actividad enzimática y su función por la hipervitaminosis A aguda.

REFERENCIAS.

- Alarcón OM. 1972. Hipervitaminosis A aguda en conejos: Aspectos bioquímicos e histoquímicos. Facultad de Medicina. Universidad de los Andes. Mérida. Venezuela.
- Anonymous. 1977. Report of the American Institute of Nutrition ad hoc Committee on Standards for Nutritional Studies. *J Nutr.* 107: 1340-1348.
- Brandes D, Anton E, Lam KW. 1967. Studies of L1210 leukemia: II. Ultrastructural and cytochemical changes after treatment with cyclophosphamide and vitamin A. *J. Natl. Cancer Inst.* 39: 385-421.
- Boyd JM. 1962. 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.
- Chataing B, Alarcón OM. 2005. Una aproximación a la investigación de los organismos vivos. Tomo II. Las Vitaminas. Universidad de Los Andes. Consejo de Publicaciones. Consejo de Desarrollo Científico Humanístico y Tecnológico.
- Chytil F. 1992. The lungs and vitamin A. *Am. J. Physiol.* 262: L517-L527.
- Clampitt RB, Hart RJ. 1978. The tissue activities of some diagnostic enzymes in ten mammalian species *J. Comp. Path.* 88: 607-621.
- Clark L. 1971. Hypervitaminosis A: A review. *Aust. Vet. J.* 47: 568-571
- Coodley EL. 1972. Diagnóstico Enzimológico. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires. pp. 17-54.
- Cornil L, Chevallier A, Paillas JE. 1939. Étude histologique de lésions expérimentales de la survitaminose A chez de cobaye. *Ann. d'anat. Pathol.* 16: 74-83
- Dingle JT. 1963. Action of vitamin A on the stability of lysosomes in vivo and in vitro. CIBA

Alarcón et al. 2011. Alteraciones enzimáticas esplénicas en ratas con hipervitaminosis. *MedULA* 20: 31-35.

Foundation Symposium on Lysosomes, (De Reuck A VS, Cameron MP, eds.). J.A. Churchill Ltd. London.

Dingle JT, Sharman IM, Moore T. 1966. 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.* 98: 476-484.

Folin O, Ciocalteu V. 1927. On tyrosine and tryptophane determinations in proteins. *J. Biol. Chem.* 73: 627 - 650.

Galal MG, Ibrahim SN, El-Sady EA, Hamdi KN. 1991. Histological and histochemical Studies on the toxic effects of hipervitaminosis A on the liver and Spleen of the albino rat. *Sci. Med. J. Cai. Med. Synd.* 3: 171-187.

Gamklou R, Scherstén T. 1972. Activity of α -amylase and α -1,4-glucosidase in human liver tissue. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 30: 201-207.

Gerber A, Raab AP, Sobel AE. 1954. Vitamin A poisoning in adults with description of a case. *Am. J. Med.* 16:729-745.

Hui M, Hu M, Tenenbaum HC. 1993. Changes in cell adhesion and cell proliferation are associated with expression of tissue non-specific alkaline phosphatase. *Cell Tissue Res.* 274: 429-437.

Maddock CL, Wolbach SB, Maddock S. 1949. Hypervitaminosis A in the dog. *J. Nutr.*, 39: 117-139.

Murray RK, Granner DK, Rodwell VW. 2007. Harper. *Bioquímica Ilustrada*. 17ª Edición. Editorial El Manual Moderno. México.

Neeld JB Jr, Pearson WN. 1963. Macro-and micromethods for the determination of serum vitamin A using trifluoroacetic acid. *J. Nutr.* 79: 454-462.

Perrotta S, Nobili B, Rossi F et al. 2002. Infant hypervitaminosis A causes severe anemia and thrombocytopenia: evidence of a retinol-dependent bone marrow cell growth inhibition. *Blood* 99: 2017-22.

Polliack A, Drexler R. 1972. A light and electron

microscopic study of the lymphomyeloid complex in hypervitaminosis A. *Blood.* 40: 528-541.

Reese DH, Larsen RA, Hornicek FJ. 1992. Control of alkaline phosphatase activity in C3H10T1/2 cells: role of retinoic acid and cell density. *J. Cell Physiol.* 151: 239-248.

Reitman S, Frankel SA. 1957. Colorimetric method for the determination of serum glutamic oxalacetic and glutamic pyruvic transaminases. *Am. J. Clin. Pathol.* 28: 56-63.

Rodahl K. 1950. Hypervitaminosis A in the rat. *J. Nutr.* 41: 399-421.

Roels OA. 1973. The influence of vitamins A and E on lysosomes. In: *Lysosomes* (Dingle JT, Fell HB (eds.). Elsevier North-Holland Publ. Co. Amsterdam 2: 254-273.

Sato N, Takatani O, Koeffler HP, et al. 1989. Modulation by retinoids and interferons of alkaline phosphatase activity in granulocytes induced by granulocyte colony-stimulating factor. *Exp. Hematol.* 17: 258-262.

Schmidt M, Kołataj A, Bulla J. et al. 1992. Activity of some lysosomal enzymes in plasma and leucocytes of rabbits exposed to effect of retinol and hydrocortisone. *Horm. Metab. Res.* 24: 21-25.

Shaw EW, Niccoli JZ. 1953. Hypervitaminosis A: report of a case in an adult male. *Ann. Intern. Med.* 39:131-134.

Stimson WH. 1961. Vitamin A intoxication in adults: report of a case with a summary of the literature. *New Eng. J. Med.* 265: 369-373.

Strauss K. 1934-1935. Beobachtungen bei Hypervitaminose A. *Beitr Pathol Anat u. Allg Pathol.* 94: 345-352.

Walter K, Schütt C. 1974. Acid and alkaline phosphatases in serum (two point methods). In: *Methods of Enzymatic Analysis*. (Bergmeyer HU, ed.). Vol. 2. Verlag Chemie Weinheim. Academic Press. Inc. New York,

Wolf G. 1984. Multiple functions of vitamin A. *Physiol. Rev.* 64: 873-937.

Recibido: 20 abril 2011. Aceptado: 15 junio 2011.

MedULA le invita a publicar en sus páginas, los resultados de sus investigaciones u otra información en ciencias de la salud.

Apartado 870. Mérida. Venezuela.

medula@ula.ve