

Cambios en la actividad de algunas enzimas séricas en ratas con hipervitaminosis E

Changes in activity of some serum enzymes in rats with hypervitaminosis E

Oscar M Alarcón C¹, Esther Giménez²

¹Laboratorio de Espectroscopia Molecular. Departamento de Química. Facultad de Química. Universidad de los Andes. Mérida, Venezuela, 5101. Correo electrónico: alarcono@ula.ve.

²Laboratorio de Bioquímica Nutricional. Unidad de Investigación en Bioquímica. Universidad Centrooccidental "Lisandro Alvarado". Barquisimeto, Venezuela.

RESUMEN

Poco se sabe sobre los cambios en la actividad de las enzimas séricas relacionadas con la función hepática durante la hipervitaminosis E. 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 sobre la actividad enzimática sérica 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 edad y peso similares a los animales tratados. Al final del estudio, se tomaron muestras de sangre para la determinación de la vitamina E y la actividad de las enzimas: alanina aminotransferasa (ALT), aspartato aminotransferasa (AST), α -amilasa (AMS), arginasa (ARG), fosfohexosaisomerasa (PHI), fosfatasa alcalina (ALP), γ -glutamyltransferasa (γ -GT) y 5'-nucleotidasa (5'-N). La administración de vitamina E en exceso incrementó de manera significativa ($p < 0,05$) el contenido sérico de la vitamina E y la actividad de todas las enzimas valoradas ($p < 0,05$); mientras que la α -amilasa disminuyó ($p < 0,05$) al ser comparada con los controles no tratados. Nuestros resultados proporcionan evidencia que la administración a corto plazo de dosis altas de vitamina E, produce un incremento en la actividad de las enzimas marcadoras de daño hepático (como aminotransferasas, ARG y PHI) y de colestasis (como ALP, 5'-N y γ -GT), que se corresponde con la forma mixta de enfermedad hepática (daño+colestasis).

Palabras clave: vitamina E, α -tocoferol, hipervitaminosis E, daño hepático, enzimas séricas

Abstract

Little is known about the possible changes in blood enzyme activity related to liver function during hypervitaminosis E. In the present work the effects of intraperitoneal administration of 50, 100, 200 and 400 mg of vitamin E (α -tocopherol) daily for 20 days, respectively, on the serum enzyme activity in 60 white male Wistar rats, aged 12 weeks and weighing 180-200 g, were studied. The group control was integrated by 15 healthy rats with similar characteristics (age and weight) to treated animals. Excess of vitamin E produced a significant ($p < 0.05$) increase in the serum content of vitamin E and in the activity ($p < 0.05$) of the following enzymes: alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), arginase (ARG), phosphohexosaisomerase (PHI), alkaline phosphatase (ALP), γ -glutamyltransferase (γ -

GT) and 5'-nucleotidase (5'-N) while α -amylase (AMS) decreased ($p < 0.05$) on comparing with the control group. 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 produces an increase in the activity of the enzymes marker of liver damage (as aminotransferases, ARG and PHI) and of cholestasis (as ALP, γ -GT and 5'-N) that correspond to the mixed form of liver disease (injury+cholestasis).

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

Recibido: 21 de Abril de 2014 Aprobado: 30 de Julio de 2014

INTRODUCCIÓN

La vitamina E, por lo general, se considera un nutriente relativamente no tóxico para el organismo, aunque su administración en exceso determina la aparición de efectos no deseables, tanto en el humano como en las diversas especies animales (1). La inconsistencia en los efectos de la vitamina E está relacionada con la función compleja y el comportamiento químico de la vitamina, que puede manifestar un efecto antioxidante, neutro o pro-oxidante (2,3). La vitamina E funciona en general como un antioxidante biológico, a cifras bajas de oxígeno, previniendo la oxidación de los ácidos grasos poliinsaturados y de las proteínas. Por lo que se considera, un importante elemento protector en el desarrollo de enfermedades relacionadas con los procesos oxidativos (4,5), aunque a concentraciones más altas de oxígeno, la vitamina E es un pro-oxidante autocatalítico que forma un radical estable (el radical de α -tocoferol), que puede iniciar procesos de peroxidación lipídica con el subsiguiente estrés oxidativo (2) que incrementa el daño y la lesión tisular (necrosis) por radicales libres (6).

Se ha reportado que el exceso de vitamina E, se acumula en el hígado, esto conduce a un incremento de lípidos en este tejido, degeneración grasa y aglomeración de macrófagos en los acino centrolobulillares (7,8). De igual manera se ha señalado, que la hipervitaminosis E determina en el hígado, un aumento de su peso (7), áreas de necrosis focal, dilatación de los capilares sinusoides y de los canalículos biliares en los espacios porta (8), presencia en los capilares sinusoides de células de gran tamaño, con proyecciones citoplasmáticas. Además con el citoplasma cargado de gotas lipídicas de forma y tamaño variable e incluso algunas libres en el interior de los sinusoides (y con menor frecuencia, a nivel de los hepatocitos) (9). Todas estas características histopatológicas sugieren la existencia de cierto grado de obstrucción intrahepática y de lesión (8,9); esto puede distorsionar el mapa enzimático hepático (10). A este respecto, algunos investigadores han señalado que la administración de dosis altas de vitamina E (α -tocoferol) produce incremento en la actividad de las aminotransferasas, aldolasa (enzimas marcadoras de lesión o necrosis hepatocelular), β -glucuronidasa (enzima, relacionada con la integridad lisosomal), fosfatasa alcalina, γ -glutamyl-transpeptidasa (γ -GT), 5'-nucleotidasa (5'-N) y leucinaminopeptidasa (LAP) (enzimas marcadoras de obstrucción biliar) y disminución en la actividad de la amilasa (10). Sin embargo, pese a estos hallazgos, la literatura publicada es muy escasa en lo que respecta a los cambios en la actividad enzimática sérica en humanos y en diversas especies animales tras la administración de dosis elevadas de vitamina E.

Por esta razón, el presente trabajo pretende evaluar el efecto de la administración intraperitoneal de dosis altas de vitamina E (α -tocoferol) sobre la concentración sérica de las siguientes enzimas: aminotransferasas, amilasa, arginasa,

fosfohexosaisomerasa, fosfatasa alcalina, γ -glutamilttransferasa y 5'-nucleotidasa en ratas blancas sanas. Correlacionar los niveles séricos de las enzimas evaluadas entre los grupos: no tratados y tratados a diferentes dosis de vitamina E. Establecer el cociente AST/ALT para cada grupo experimental y estimar su relación con la hipervitaminosis E.

MATERIALES Y MÉTODOS

Fármacos y reactivos.

Para inducir la hipervitaminosis E se administró la vitamina E de los Laboratorios 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. Todos los productos químicos empleados en el presente estudio fueron de grado analítico, Sigma-Aldrich y Merck. Todos los kits empleados para las determinaciones enzimáticas fueron obtenidos de los Laboratorios Sigma-Aldrich Chemical Company (St. Louis, Mo, USA).

Diseño experimental

Se emplearon 75 ratas macho Wistar, de 12 semanas de edad, con pesos entre 180 y 200 gramos, provenientes del Bioterio de la Universidad de Los Andes (BIOULA), 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 (Ratarina (Protinal®) durante el periodo de adaptación. Después de este periodo de adaptación, los animales se distribuyeron al azar en 5 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. Durante la ejecución de la investigación se siguieron las normas éticas nacionales (12) e internacionales para realizar experimentos en animales de laboratorio, establecidas por el Consejo de Organizaciones Internacionales de las Ciencias Médicas, conjuntamente con la OMS y la UNESCO - CIOMS - (13). En este sentido se usó el mínimo número de animales de la especie y calidad apropiada para obtener resultados científicamente válidos.

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 mediante punción cardíaca con la finalidad de obtener un volumen de 3-5 ml. Las muestras se recolectaron en tubos de centrifuga graduados, sin anticoagulante y después se centrifugaron a 2.500 rpm, durante 15 minutos a fin de asegurar la pronta obtención de los sueros, que se utilizaron para las determinaciones bioquímicas correspondientes.

Las actividades de la 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), la α -amilasa (AMS, EC 3.2.1.1), arginasa (ARG:

EC 3.5.3.1), fosfohexosaisomerasa (PHI; EC 5.3.1.9), fosfatasa alcalina (ALP, EC 3.1.3.1) γ -glutamilttransferasa (γ -GT; EC. 2.3.2.2) y 5'-N (5'-nucleotidasa; EC 3.1.3.5) se determinaron de acuerdo con los procedimientos utilizados en estudios previos (14). La vitamina E en sangre se determinó, mediante HPLC (cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa por detección de diodos), de acuerdo con la técnica descrita por Brunetto y col. (15). 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). 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 tanto las concentraciones séricas ($p < 0.05$; $r = 0.999$) y como hepáticas ($p < 0.05$; $r = 0.989$) del α -tocoferol. En relación a los niveles séricos de las aminotransferasas (ver [tabla 1](#)), se observa una correlación positiva significativa ($p < 0.05$) de las enzimas: ALT ($r = 0.949$, $r^2 = 86.97$) y de la AST ($r = 0.997$, $r^2 = 93.90\%$), en relación a las dosis administradas de vitamina E. De igual manera, al estimar el cociente AST/ALT de cada grupo experimental, los valores respectivos (AST/ALT), siempre fueron significativamente inferiores en los animales tratados (0.21-0.36) en comparación con los controles sanos (0.78).

Tabla 1. Actividad sérica de las aminotransferasas y cociente AST/ALT en ratas con hipervitaminosis E.

Enzimas (unidades)	Grupos tratados				
	Grupo Control	Grupo 1 (50 mg) ¹	Grupo 2 (100 mg)	Grupo 3 (200 mg)	Grupo 4 (400 mg)
ALT (UI/ml)	29 \pm 4	112 \pm 15 ^{ab}	129 \pm 10 ^{ac}	162 \pm 11 ^{ad}	240 \pm 26 ^a
AST (UI/ml)	21 \pm 5 ^a	24 \pm 3 ^{ab}	48 \pm 6 ^{ac}	57 \pm 6 ^{ad}	87 \pm 4 ^a
Cociente AST/ALT	0.72	0.21	0.27	0.35	0.36

Los resultados se expresan como promedios \pm desviación estándar.

¹ mg de vitamina E/kg/peso.

ALT= alanina aminotransferasa. AST= aspartato aminotransferasa.

^a $p < 0.05$ al comparar el grupo control con los tratados con vitamina E.

^b $p < 0,05$ al comparar el grupo 1 con los grupos 2 ,3 y 4

^c $p < 0,05$ al comparar el grupo 2 con los grupos 3 y 4

^d $p < 0,05$ al comparar con los grupos 3 y 4

Fuente: Datos de la investigación

De acuerdo con la [tabla 2](#), la α -amilasa disminuyó su actividad en relación directa a la dosis administrada de α -tocoferol al realizar las comparaciones correspondientes ($r=-0.936$, $r^2=87.57\%$); mientras que la ARG ($r= 0.937$, $r^2= 87.76\%$), la PHI ($r= 0.949$, $r^2=89.99\%$), la ALP ($r= 0.908$, $r^2= 76.48\%$), la γ -glutamilttransferasa (γ -GT; $r=0.998$, $r^2= 99.55\%$) y la 5'-N ($r= 0.848$, $r^2= 71.95\%$), incrementaron proporcionalmente ($p<0.05$) sus actividades con la cantidad de vitamina E inyectada. El ANOVA de una vía y cinco periodos también demostró que al menos dos grupos tratados con vitamina E, difieren significativamente al ser comparados 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; $p <0.001$).

Tabla 2. Actividades enzimáticas séricas en ratas con hipervitaminosis E

Enzimas (unidades)	Grupos tratados				
	Grupo Control	Grupo 1 (50 mg) ¹	Grupo 2 (100 mg)	Grupo 3 (200 mg)	Grupo 4 (400 mg)
AMS (UI/ml)	743 ± 23	663 ± 22 ^{ab}	653 ± 24 ^{ac}	587 ± 29 ^{ad}	542 ± 24 ^a
ARG (UI/l)	7 ± 3	21 ± 6 ^{ab}	32 ± 7 ^{ac}	40 ± 7 ^{ad}	52 ± 6 ^a
PHI (UB)	24 ± 1	30 ± 4 ^{ab}	33 ± 2 ^{ac}	37 ± 4 ^a	42 ± 5 ^a
ALP (UI/ml)	43 ± 12	90 ± 17 ^{ab}	121 ± 11 ^{ac}	159 ± 29 ^{ad}	179 ± 12 ^a
γ -GT (UI/ml)	0.96 ± 0.05	1.42 ± 0.77 ^{ab}	2.84 ± 0.56 ^{ac}	4.68 ± 0.75 ^{ad}	8.34 ± 2 ^a
5'-N (UA)	0.43 ± 0.02	0.93 ± 0.01 ^{ab}	1.21 ± 0.05 ^{ac}	1.45 ± 0.2 ^{ad}	1.55 ± 0.3 ^a

Los resultados se expresan como promedios ± desviación estándar.

¹ mg de vitamina E/kg/peso.

MAS= α -amilasa. ALP= fosfatasa alcalina. ARG= arginasa. γ -GT= γ -glutamilttransferasa. 5'-N= 5' nucleotidasa.

PHI= fosfohexosaisomerasa.

^a $p<0.05$ al comparar el grupo control con los tratados con vitamina E.

^b $p<0,05$ al comparar el grupo 1 con los grupos 2 ,3 y 4

^c $p<0,05$ al comparar el grupo 2 con los grupos 3 y 4

^d $p<0,05$ al comparar con los grupos 3 y 4

Fuente: Datos de la investigación

DISCUSIÓN

Nuestros resultados muestran un incremento significativo en la actividad sérica de las aminotransferasas, a predominio de la ALT, que se trata de un indicador sensible y específico, bien establecido, de daño hepático en ratas (16). El incremento en la actividad de las aminotransferasas, aunque no significativa, concuerda con los hallazgos de Dysmsza y Park (17), Wheldon y col. (18), Hale y col. (19), Bendich y Machlin (20) y Batra y Hidiroglu (21) en ratas, humanos y cerdos tratados con dosis elevadas de vitamina E por diferentes periodos de tiempo. Sin embargo, Krasavage y Terhaar (22) y Kappus y Diplock (23) en ratas y Tokuda y Takeuchi (9) en truchas arco iris tratadas con dosis elevadas de vitamina E, encontraron que la actividad de las aminotransferasas, a predominio de la aspartato aminotransferasa (AST), en el suero se mantiene en límites normales, independientemente de la dosis de α -tocoferol.

El valor de los respectivos cocientes AST/ALT, siempre fueron significativamente inferiores en los animales tratados (0.21-0.36) al comparar con los controles sanos (0.78). El hecho que la AST se presente en formas diferentes en la célula y en la mitocondria y que la ALT está confinada casi exclusivamente a la fracción soluble del hígado, llevó a De Ritis y cols (24) a sugerir el uso del cociente AST/ALT como un medio para distinguir las lesiones predominantemente inflamatorias de los procesos

necróticos hepáticos. Valores inferiores a 1 indican inflamación; mientras que los valores superiores a 1 sugieren necrosis, debido a que la AST se libera de la mitocondria (25).

La α -amilasa, una enzima unida a la fracción microsomal del hepatocito, participa en la producción de glucosa por las células hepáticas, disminuyó significativamente ($p < 0.05$) su actividad en las ratas tratadas con vitamina E. Esta hidrolasa se consideró en la presente investigación como marcadora de lesión hepatocelular, ya que en la rata ella se sintetiza única y exclusivamente a nivel del hepatocito (26). Este hallazgo concuerda con los trabajos previos de Alarcón-Corredor y Giménez (10) quienes demostraron una disminución significativa de la enzima en el hígado de ratas tratadas con dosis altas de vitamina E. Por su parte, McGeachin y Potter (27) observaron una disminución del 50 % en el nivel de la amilasa hepática y sérica tras el daño hepático mientras que Bhutta y Rahman (28) en 60 pacientes con enfermedades hepáticas encontraron que la mayoría de los pacientes tenían valores de la amilasa sérica muy por debajo de los valores límites. En este caso, las actividades de la amilasa están relacionadas con el grado de disfunción hepática.

La PHI, enzima que cataliza la conversión reversible de la glucosa-6-fosfato a fructosa-6-fosfato, incrementó su actividad en el suero de los animales tratados con vitamina E. Este incremento concuerda con lo visto en el daño hepático agudo (hepatitis viral aguda), donde su actividad está marcadamente elevada durante las primeras 2 a 3 semanas (29).

La enzima arginasa (ARG) tanto en el hombre como en las diversas especies, se ubica predominantemente en el hígado, donde cataliza la hidrólisis de la arginina en ornitina y urea, por esta razón se considera que es una enzima específica del hígado (30). Nuestros resultados muestran un marcado incremento en la actividad catalítica de esta enzima. Incremento que refleja específicamente una necrosis o una lesión de las células hepáticas (31-33). Si las actividades plasmáticas de la arginasa y de las aminotransferasas se incrementan de forma persistente, se debe sospechar una lesión necrosante progresiva (34).

La fosfatasa alcalina (ALP) una enzima que está comprometida en la hidrólisis de los ésteres fosfóricos incrementó significativamente ($p < 0.05$) su actividad en el suero de los animales tratados con vitamina E. Los incrementos en las concentraciones catalíticas de la ALP en el plasma en la enfermedad hepática son el resultado de una síntesis incrementada de la enzima por las células que se alinean a lo largo de los canalículos biliares, generalmente como respuesta a una colestasis, que puede ser intra- o extrahepática. La colestasis, aunque sea de corta duración, da lugar a una concentración catalítica incrementada hasta dos veces el límite superior de referencia (35).

La γ -GT, una enzima microsomal ampliamente distribuida en los tejidos, incremento su actividad significativamente en el suero de las ratas tratadas con vitamina E, que concuerda con los hallazgos previos de Abdo y col. (7). La fuente predominante de γ -GT en suero es el hígado. La entrada de la γ -glutamilttransferasa en el suero ocurre por la solubilización y la liberación de la enzima unida a la membrana o por la muerte de las células del epitelio biliar (36). En este sentido, la concentración catalítica de la γ -GT en el plasma está incrementada siempre que exista colestasis, y es un indicador muy sensible de alteración hepática. En la lesión hepática aguda, los cambios en la concentración catalítica de la γ -glutamilttransferasa en el plasma son paralelos a los de

las aminotransferasas (35). Aunque, la γ -GT sérica es un indicador sensible de la presencia de lesiones en las vías biliares o del hígado, su uso está limitado por su falta de especificidad, ya que muchos trastornos no hepáticos pueden conducir a su elevación. Por lo tanto, los niveles séricos de esta transferasa pueden ser clínicamente útiles para determinar si una elevación de la fosfatasa alcalina es de origen hepático o de hueso (36). En nuestro caso, el incremento en la actividad de la γ -glutamilttransferasa confirma el origen hepático de los niveles séricos elevados de la ALP, porque la enzima no se incrementa en pacientes con enfermedades óseas (35).

En la presente investigación se encontró un marcado incremento en la actividad catalítica de la 5'-nucleotidasa, una enzima que cataliza la hidrólisis de los nucleótidos, tales como la adenosina 5'-fosfato y la inosina-5'-fosfato. En el hígado, la enzima se encuentra unida a la membrana canalicular y sinusoidal de los hepatocitos. Su actividad es paralela a la de la ALP, probablemente un reflejo de su ubicación similar en los hepatocitos (37). La valoración de la actividad sérica de la 5'-nucleotidasa y/o de la γ -glutamilttransferasa se puede utilizar para confirmar el origen hepato-específico de una elevación de la fosfatasa alcalina sérica (35,38).

De acuerdo con Sahuquillo-Frías y López-Gutiérrez (36) existen muchas causas de enfermedad hepática, que en la clínica generalmente se presentan agrupadas en tres grupos: enfermedad hepatocelular, colestásica o mixta. En las enfermedades hepatocelulares (como hepatitis víricas o alcohólicas) predomina la lesión, la inflamación y la necrosis hepática. En la enfermedad colestásica (colestasis, cirrosis biliar primaria o enfermedades hepáticas inducidas por fármacos) predomina una inhibición del flujo biliar. En la forma mixta (forma colestásica de la hepatitis vírica y en trastornos hepáticos inducidos por fármacos) se observan signos de lesión hepatocelular y colestasis. Los resultados de la presente investigación que muestran un incremento en la actividad de las enzimas marcadoras de lesión hepática (como las aminotransferasas, ARG, PHI, etc.) y de colestasis (como ALP, γ -GT, 5'-N) se corresponden con la forma aguda mixta de enfermedad hepática señalada por Sahuquillo-Frías y López-Gutiérrez (36).

En conclusión, la administración de vitamina E por vía intraperitoneal a dosis superiores a los requerimientos diarios permitidos para la rata macho, incremento significativamente ($p < 0,05$) la concentración sérica de la vitamina y determinó una marcada alteración en la actividad de diversas enzimas vinculadas con la función hepática. El incremento en la cantidad de vitamina E en la sangre de los animales tratados es un hecho reconocido en la literatura consultada (39) y es un factor de riesgo para determinar una hipervitaminosis E. En base a nuestros resultados se sugiere que la determinación de los niveles séricos de aminotransferasas (en especial ALT), AMS, ARG, ALP y γ -GT; son particularmente útiles para caracterizar el efecto de la vitamina E a dosis elevadas, sobre la función hepática.

REFERENCIAS

1. Devlin T. Bioquímica: libro texto con aplicaciones clínicas. 4ta Ed. Barcelona: Editorial Reverté; 2004. p.1178-80.
2. Rietjens IM, Boersma MG, Haan LD y col. The pro-oxidant chemistry of the natural antioxidants vitamin C, vitamin E, carotenoids and flavonoids. Environ. Toxicol. Pharmacol. 2002; 11: 321-33.

3. Stocker R. The ambivalence of vitamin E in atherogenesis. *Trends Biochem. Sci.* 1999; 24: 219-23.
4. Márquez M, Yépez CE, Sutil-Naranjo R, Rincón M. Aspectos básicos y determinación de las vitaminas antioxidantes E y A. *Invest. Clín.* 2002; 43: 191-204.
5. Schneider C. Chemistry and biology of vitamin E. *Mol. Nutr. Food. Res.* 2005; 49:7-30.
6. Murray RK, Granner DK, Rodwell VW. 2007. Harper. *Bioquímica Ilustrada*. 17ª Edición. El Manual Moderno. México. pag. 517.
7. Abdo KM, Rao G, Montgomery CA. Thirteen-week toxicity study of d-alpha-tocopheryl acetate (vitamin E) in Fischer 344 rats. *Food Chem. Toxicol.* 1986; 24: 1043-1050.
8. Sánchez de Molina, D. Distorsión del mapa enzimático hepático por efecto de la hipervitaminosis E. Departamento de Bioquímica. Facultad de Medicina. Universidad de Los Andes. Mérida; 1989.
9. Tokuda M, Takeuchi M. Effects of excess doses of alpha-tocopherol on the lipids and function of rainbow trout liver. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* 1995; 41: 25-32.
10. Alarcón-Corredor OM, Giménez E. Alteraciones enzimáticas hepáticas en ratas tratadas con vitamina E (α -tocoferol). *MedULA. Rev. Fac. Med.* 2013; 22: 40-7.
11. Rivera A. Jr, Abdo KM, Bucher JR y col. Toxicity studies of intravenous vitamin E in newborn rabbits. *Dev. Pharmacol. Ther.* 1990; 14: 231-237.
12. Ministerio del Poder Popular para Ciencia, Tecnología e Industrias Intermedias. Fondo Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación. Código de Bioética y Bioseguridad. Tercera Edición. 2008. Disponible en: <http://www.fonacit.gob.ve/documentos/bioética2009.pdf>
13. Mrad de Osorio A. Ética en la investigación con modelos animales experimentales. Alternativas y las 3 RS de Russel. *Rev Colomb Bioética* 2006; 1: 163-183.
14. Carnevali de Tatá E. El enzimograma o modelo enzimático sérico en pacientes cancerosos. II. Carcinoma de mama, de ovario, de cuello uterino y de pulmón. Trabajo de Ascenso. Facultad de Farmacia. Universidad de Los Andes. Mérida. Venezuela; 1995.
15. Brunetto MR, Alarcón OM, Dávila E, Contreras Y, Gallignani M, Rondón C, Burguera JL, Burguera M, Angarita C. Serum trace elements and fat-soluble vitamins A and E in healthy preschool children from a Venezuelan rural community. *J Trace Elem Med Biol* 1999; 13: 40-50.
16. Raja MMM, Raja A, Imran MM, Santha AMI, Devadesa K. Enzymes application in diagnostic prospects. *Biotechnology* 2011; 10: 51-59.

17. Dysmsza HA, Park J. Excess Dietary Vitamin E in Rats. *Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 1975; 34: 912.
18. Wheldon GH, Bhatt A, Keller P, Hummler H. d,1-alpha-tocopheryl acetate (vitamin E): a long term toxicity and carcinogenicity study in rats. *Int. J. Vitam. Nutr. Res.* 1983; 53: 287-96.
19. Hale WE, Perkins LL, May FE, Marks RG, Stewart RB. Vitamin E effect on symptoms and laboratory values in the elderly. *J. Am. Diet. Assoc.* 1986; 86: 625-29.
20. Bendich A, Machlin LJ. Safety of oral intake of vitamin E. *Am. J. Clin. Nutr.* 1988; 48: 612-19.
21. Batra TR, Hidioglou M. Effects of dietary vitamin E and fat on some serum enzymes in pigs. *Vet. Res.* 1993; 24: 272-77.
22. Krasavage WJ, Terhaar CJ. D- α -tocopheryl poly (ethylene glycol) 1000 succinate. Acute toxicity, subchronic feeding, reproduction, and teratologic studies in the rat. *J. Agric. Food Chem.* 1977; 25: 273-8.
23. Kappus H, Diplock AT. Tolerance and safety of vitamin E: A toxicological position report. *Free Radical Biology Medicine.* 1992; 13: 55-74.
24. De Ritis F, Coltori M, Giusti G. An enzyme test for the diagnosis of viral hepatitis: The transaminase serum activities. *Clin. Chim. Acta.* 1957; 2: 70-5.
25. Alarcón-Corredor OM, Carnevalí de Tata E, Ramírez de Fernández M. Enzimología clínica. Parte 1. Los mapas enzimáticos tisulares y séricos y la utilidad diagnóstica de los cocientes enzimáticos. *MedULA. Rev. Fac. Med.* 1998; 7: 19-24.
26. Brosemer RW, Rutter WJ. Liver amylase. I. Cellular distribution and properties. *J. Biol. Chem.* 1961; 236: 1253-58.
27. McGeachin RL, Potter BA. Amylase in isolated liver cells. *J. Biol. Chem.* 1960; 235: 1354-58.
28. Bhutta IH, Rahman MA. Serum amylase activity in liver disease. *Clin. Chem.* 1971; 17: 1147-49.
29. Amador E, Wacker ECW. Enzymatic methods used for diagnosis. *Meth. Biochem. Anal.* 1965; 13: 263-356.
30. Champe PC, Harvey RA, Ferrier DR. *Bioquímica*. 3ª. Ed. McGrawHill-Interamericana. México. 2006. pp. 288-289.
31. Tietz NW. *Guía Clínica de Pruebas de Laboratorio*. México: Editorial Médica Panamericana; 1985. pp. 200-202.
32. Cargill CF, Shields RP. Plasma arginase as a liver function test. *J. Comp. Pathol.* 1971;81: 447-54.

33. Mia AS, Koger HD. Comparative studies on serum arginase and transaminases in hepatic necrosis in various species of domestic animals. *Vet Clin Pathol* 1979; 8: 9–15.
34. Cacciatore L, Antoniello S, Valentino B, y col. Arginase activity, arginine and ornithine of plasma in experimental liver damage. *Enzyme* 1974;17:269–75.
35. Woreta TA, Alqahtani SA. Evaluation of Abnormal Liver Tests. *Med. Clin. N. Am.* 2014; 98: 1–16.
36. Sahuquillo-Frías L, López-Gutiérrez A. 2010-2011. Estudio de la función hepática: magnitudes bioquímicas. *Ed. Cont. Lab. Clin.* 2010-2011; 14: 78-102.
37. Righetti A, Kaplan MM. Disparate responses of serum and hepatic alkaline phosphatase and 5' nucleotidase to bile duct obstruction in the rat. *Gastroenterology* 1972; 62: 1034–9.
38. Sotil EU, Jensen DM. Serum enzymes associated with cholestasis. *Clin. Liver Dis.* 2004; 8: 41–54.
39. Jensen M, Lindholm A, Hakkarainen J. The vitamin E distribution in serum, liver, adipose and muscle tissues in the pig during depletion and repletion. *Acta Vet. Scand.* 1990; 31:129-136.