

Distorsión del mapa enzimático renal en ratas tratadas con Menadiona (Vitamina K₃)

OSCAR M. ALARCÓN-CORREDOR, YBRAIN GUERRERO, MARÍA L. DI BERNARDO, MARCELA BURGUERA, JOSÉ LUIS BURGUERA, CONSTANTIN R. BURGUERA-PASCU y ANGEL O. ALARCÓN SILVA.

Facultad de Ciencias (Instituto Andino-Venezolano de Investigación Química). Universidad de Los Andes. P.O. Box 542. Mérida 5101-A. Venezuela.

RESUMEN

La menadiona (2-metil-1,4-naftoquinona, vitamina K₃) es una quinona, cuya toxicidad se atribuye al estrés oxidativo inducido por el ciclaje redox de esta droga en las células. Se ha señalado que el riñón es más sensible a la menadiona que otros órganos, incluyendo el corazón y el hígado. El propósito de este estudio es investigar, en ratas blancas, los efectos tóxicos de la menadiona sobre la actividad renal de las siguientes enzimas: deshidrogenasa láctica, maltasa ácida, fosfatasa alcalina, proteasas ácidas y alanina y aspartato aminotransferasas. La administración de menadiona a dosis elevadas determinó un grado variable de lesiones renales y un incremento significativo ($p < 0.05$) en la actividad de todas las enzimas valoradas en comparación con los controles no tratados. El daño renal depende de las dosis administradas de vitamina K₃, y puede ser debido a la liberación de las proteasas ácidas desde los lisosomas, después de la destrucción de sus membranas por el estrés oxidativo inducido por la quinona. Este daño, a su vez, determina el incremento en la actividad de las otras enzimas estudiadas. En conclusión, la vitamina K₃, a dosis elevadas, determina cambios importantes en las actividades enzimáticas renales.

ABSTRACT

Menadione (2-methyl-1,4-naphthoquinone, vitamin K₃) is a quinone whose toxicity is attributed to the oxidative stress induced by the redox cycling of this drug in cells. It has been pointed out that kidney is more sensitive to menadione than other organs, including heart and liver. The purpose of this study is to investigate the toxic effects of menadione on the renal activity of the following enzymes: lactate dehydrogenase, acid maltase, alkaline phosphatase, acid proteases and alanine and aspartate

aminotransferases in white rat. Administration of menadione in excess determined a variable degree of renal lesions and a significant increase ($p < 0.05$) in the activity of all the enzymes measured in comparison with non-treated controls. Renal damage depends on the dose of vitamin K₃, and it can be due to the liberation of acid proteases from lysosomes, after the destruction of its membranes for the oxidative stress induced by the quinone. This damage, in turn, determines the increment in the activity of the other studied enzymes. In conclusion, the vitamin K₃ at high doses determines important changes in renal enzymatic activities.

PALABRAS CLAVE

Menadiona, hipervitaminosis K₃, mapa enzimático renal

INTRODUCCIÓN

La menadiona o vitamina K₃ (VK) es un compuesto de tipo quinona. La toxicidad de las quinonas ha sido atribuida al estrés oxidativo inducido por el proceso de redox cíclico de estas drogas en las células. Chiou et al. (1997) demostraron que la administración intravenosa de dosis únicas (25, 50, 100 y 150 mg/Kg) o múltiples (cinco dosis de 100 y 150 mg/Kg) de menadiona produce lesiones en riñón, corazón, hígado y pulmón de ratas Wistar. Las lesiones renales incluyen dilatación tubular, presencia de cilindros proteicos en la luz de los túbulos, depósitos de Ca²⁺ en el parénquima, vacuolización en los túbulos proximales y distales, degeneración granular en la corteza y necrosis. Las lesiones en corazón incluyen inflamación, hemorragia, vacuolización, edema y necrosis. Las lesiones hepáticas se caracterizan por inflamación, degeneración, vacuolización y necrosis mientras que la única lesión observada en el pulmón es la hemorragia.

A la misma dosis de menadiona, el daño estructural es más severo en riñón que en otros órganos. Vásquez-Royett (1993) describió mediante métodos histoquímicos la presencia de focos de necrosis glomerular y medular renal, túbulos contorneados proximales y distales muy dilatados, con aparente destrucción del ribete en cepillo de los túbulos proximales y presencia de un contenido homogéneo PAS-positivo en la luz tubular, en ratas tratadas con dosis elevadas de menadiona. Rebhun et al. (1984) demostraron la existencia de un cuadro de insuficiencia renal aguda en dos pacientes y en cinco caballos adultos jóvenes tratados con preparaciones de VK a las dosis recomendadas por el fabricante. Las manifestaciones clínicas se caracterizaron por cólicos renales, hematuria, uremia y alteraciones en los electrolitos séricos. Las muestras de tejido renal de los caballos, obtenidas por autopsia, evidenciaron necrosis tisular, fibrosis y dilatación tubular difusa y multifocal.

Es un hecho conocido que la necrosis tisular se acompaña de alteraciones en la actividad enzimática del órgano lesionado (distorsión del mapa enzimático tisular). Por esta razón, en la presente investigación se valoró el efecto de la administración de dosis elevadas de la vitamina K₃ sobre la actividad renal de las siguientes enzimas: transaminasas glutámico-pirúvica (TGP o alanina aminotransferasa ALT; EC. 2.6.1.2) y glutámico-oxaloacética (TGO o aspartato aminotransferasa AST; EC. 2.6.1.1), deshidrogenasa láctica (LDH; E.C.1.1.1.27), proteasas ácidas (E.C. 3.4.1.14), maltasa ácida (α -1,4-glucosidasa ácida; E.C.3.3.1.20) y fosfatasa alcalina (ALP; E.C.3.1.3.1). Estas enzimas se escogieron porque están localizadas en regiones específicas de la célula (de Duve et al. 1962a), se encuentran en el tejido renal (Raab, 1972), son muy conocidas, su evaluación es práctica y precisa y están involucradas en el daño celular y tisular (transaminasas, proteasas y maltasa ácida). Además, todas ellas incrementan su actividad sérica y tisular en diversas enfermedades renales (Wolf et al., 1973; Schmidt y Schmidt, 1974).

MATERIALES Y MÉTODOS

Diseño Experimental

Se emplearon 120 ratas machos Wistar, con pesos que oscilaron entre 160 y 180 g, mantenidas en jaulas metabólicas individuales, en el ambiente de laboratorio, durante una semana para las adaptaciones correspondientes, previas al inicio de las experiencias. Como alimento se les suministró Ratarina Protinal[®] suplementada con vitaminas y minerales, según el

American Institute of Nutrition (1977). Agua de bebida "ad libitum". Al término del periodo de adaptación, los animales se distribuyeron al azar en los grupos experimentales y control que se describen a continuación, sin que hubiese diferencias significativas previas entre los promedios de peso de los distintos grupos.

Producción de la hipervitaminosis K₃.

Para inducir la hipervitaminosis K₃ se empleó la vitamina K₃ Sigma (bisulfito sódico de 2-metil-1,4 naftoquinona, hidrosoluble) disuelta en solución salina normal (NaCl 0.9% p/v), a razón de 10, 20, 30, 40 y 50 mg/mL.

A los grupos experimentales (G1 al G5) se les inyectó diariamente 1 mL, vía intramuscular, de solución salina que contiene 10, 20, 30, 40, ó 50 mg de vitamina K₃/Kg de peso corporal/día, respectivamente, por espacio de siete días (dosis total: 70, 140, 210, 280 ó 350 mg/Kg de peso corporal). Al grupo control se le inyectó por la misma vía 1 mL/día de solución salina normal durante siete días. Todos los grupos, tanto los experimentales como el control, estuvieron constituidos por 20 animales. Durante todo el periodo experimental, los animales recibieron el mismo tipo de alimentación y tuvieron libre acceso al agua de bebida.

Las ratas se pesaron y se examinaron diariamente en busca de manifestaciones patológicas. 24 horas después de la última inyección de vitamina K o de solución salina normal según los experimentos, los animales fueron anestesiados con éter etílico, en campana de vidrio, decapitados mediante el empleo de una guillotina Harvard y desangrados durante 3-5 minutos. Se practicó laparotomía media, se realizó examen macroscópico de los órganos de la cavidad abdominal y se tomaron de inmediato muestras de riñón para los estudios histológicos y bioquímicos, respectivamente.

Para el estudio histológico, el material fue fijado en formol al 10%. El tiempo mínimo de fijación fue de 24 horas. Luego, el material fue incluido en parafina por los procedimientos corrientes y cortado a 7 μ m de espesor. Como método morfológico general se utilizó la hematoxilina-eosina (Pearse, 1980). Para las determinaciones enzimáticas en riñón, los homogenatos se prepararon al 10% (1 g en 10 mL de agua fría, bidestilada y desionizada), según las recomendaciones de Boyd (1962). Estos se congelaron de inmediato y se utilizaron para las determinaciones enzimáticas que se señalan a continuación, en un plazo no mayor de 48 horas.

La actividad de las transaminasas glutámico-pirúvica (TGP o alanina aminotransferasa ALT; EC.

2.6.1.2) y glutámico-oxaloacética (TGO o aspartato aminotransferasa AST; EC. 2.6. 1.1) se determinó según el procedimiento descrito por Reitman y Frankel (1957) usando alanina y aspartato como sustratos, respectivamente. Los resultados se expresaron en U/g de tejido fresco. La actividad de la maltasa ácida (α -1,4-glucosidasa ácida; E.C.3.3.1.20) se determinó según el método de Gamkhou y Scherstén (1972) usando la maltosa (Sigma) como sustrato y estimando la glucosa liberada por el método de la glucosa oxidasa (Trinder, 1969). Los resultados se expresaron en mg de glucosa liberada/g de tejido/hora de incubación. La actividad proteolítica (proteasa ácida; E.C. 3.4.1.14) se determinó empleando como sustrato hemoglobina al 4% (p/v) en buffer acetato 0.1M (pH= 4.5) (Dingle *et al.*, 1966) y se cuantificó la cantidad de tirosina liberada por el método de Folin y Ciocalteu (1929). Los resultados se expresaron en μ g de tirosina liberados/mg de tejido fresco/hora de incubación. La deshidrogenasa láctica (LDH; E.C.1.1.1.27) se cuantificó utilizando el procedimiento colorimétrico basado en el método de Berger-Broida (1968), usando ácido pirúvico como sustrato. Los resultados se expresan en unidades Berger-Broida (UB-B)/g de tejido fresco. Una unidad B-B se define como aquella cantidad de LDH que reduce 4.8×10^{-4} μ M de piruvato por minuto a 25°C. La fosfatasa alcalina (ALP; E.C.3.1.3.1) se determinó según la técnica de Lowry *et al.* (1954) y de Amador *et al.* (1963) empleando como sustrato el p-nitrofenilfosfato. La actividad de la fosfatasa se expresó en U/g de tejido húmedo.

Análisis Estadístico

Los resultados se expresan en promedios \pm desviación estándar (DE). Las diferencias en la actividad de las enzimas entre los grupos tratados y control se analizaron por la prueba de ANOVA de una vía. Las diferencias significativas entre cada subgrupo y el control correspondiente se analizaron mediante la prueba t-Student. Toda $p < 0.05$ se considero estadísticamente significativa.

RESULTADOS

Hallazgos clínicos

Los animales tratados con 10, 20, y 30 mg de menadiona o vitamina K₃ no presentaron manifestaciones patológicas de importancia, con excepción de cinco ejemplares que mostraron una discreta coloración amarillenta de piel y mucosas (ictericia), con la dosis de 30 mg. Los tratados con 40 y 50 mg de vitamina K por el contrario, presentaron una franca ictericia y al ser sacrificados el examen

postmortem mostró al hígado y a los demás órganos de la cavidad abdominal con una marcada coloración amarillenta.

Hallazgos histológicos

El hecho más llamativo observado en el riñón de los animales tratados, fue la presencia en los túbulos proximales y distales de un contenido homogéneo fuertemente PAS-positivo que resiste a la digestión salival, indicación de que se trata de una glucoproteína o de un polisacárido neutro, pero en ningún caso de glucógeno. Además se observan zonas focales y diseminadas de necrosis y hemorragias en los intersticios renales.

Hallazgos bioquímicos

El efecto de las dosis administradas de vitamina K₃ se muestra en la Tabla 1. El análisis de la tabla indica que todas las enzimas valoradas incrementan significativamente ($p < 0.05$) su actividad con las dosis inyectadas de menadiona. En este caso, el incremento es directamente proporcional a las dosis inyectadas ($r = 0.996$).

Tabla 1. Actividades enzimáticas¹ en riñón de ratas tratadas con menadiona (Vitamina K₃)
Grupos Experimentales²

Enzima	G1	G2	G3	G4	G5	Control
AST ³	175 \pm 16 ^{ab}	220 \pm 14 ^{ab}	230 \pm 13 ^{ab}	242 \pm 17 ^{ab}	294 \pm 13 ^{ab}	143 \pm 24
ALT ⁴	149 \pm 18 ^{ab}	182 \pm 17 ^{ab}	197 \pm 13 ^{ab}	216 \pm 17 ^{ab}	541 \pm 15 ^{ab}	131 \pm 28
PA ⁵	3,10 \pm 47 ^{ab}	3,80 \pm 0,72 ^{ab}	4,90 \pm 62 ^{ab}	5,90 \pm 0,95 ^{ab}	6,15 \pm 0,85 ^{ab}	2,00 \pm 0,44
MA ⁶	0,99 \pm 14 ^{ab}	2,00 \pm 67 ^{ab}	2,42 \pm 0,85 ^{ab}	3,73 \pm 0,72 ^{ab}	4,25 \pm 0,71 ^{ab}	0,75 \pm 0,10
ALP ⁷	1000 \pm 12	1185 \pm 130	1583 \pm 118 ^{ab}	1680 \pm 111 ^{ab}	1800 \pm 124 ^{ab}	1000 \pm 13

¹ Los resultados se expresan en promedios \pm DE.

² G1-G5 = Dosis de 10, 20, 30, 40 y 50 mg de vitamina K₃/Kg rata/día, respectivamente.

³ AST (TGO) = aspartato aminotransferasa, U/g de tejido húmedo.

⁴ ALT (TGP) = alanina aminotransferasa, U/g de tejido húmedo.

⁵ PA = proteasas ácidas, μ g de tirosina liberados por mg de tejido fresco, por hora de incubación.

⁶ MA = maltasa ácida, mg de glucosa liberada por g de tejido, por hora de incubación.

⁷ ALP = fosfatasa alcalina, U/g de tejido húmedo.

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

^b $p < 0,05$, estadísticamente significativo al comparar entre sí los promedios de los diferentes grupos (ANOVA).

DISCUSIÓN

La vitamina K₃ en especial con las dosis más elevadas, que sobrepasan en mucho los

requerimientos diarios permitidos para la rata macho (Doisy y Matschiner, 1970) produjo como manifestación clínica más importante la aparición de una marcada ictericia (hiperbilirrubinemia no conjugada), la cual ha sido considerada como el signo típico de la intoxicación por vitamina K (Alarcón *et al.*, 1991), conjuntamente con necrosis, presencia de cilindros proteicos en el interior de los túbulos renales y extravasaciones sanguíneas en riñón. Estos hallazgos clínicos se corresponden parcialmente con lo descrito en la literatura consultada (Chiou *et al.*, 1997).

A nivel renal la menadiona a dosis elevadas produjo la distorsión del mapa enzimático tisular. A este respecto llama la atención el aumento significativo en la actividad de las proteasas ácidas y de la maltasa ácida, que traduce por lo general un aumento en la labilidad de las membranas lisosomales, y/o mitocondriales, o en su defecto alteraciones en estas organelas (de Duve *et al.* 1962b). Estas enzimas lisosomales están a su vez comprometidas en la fagocitosis y en la destrucción autolítica de los tejidos (Brandes *et al.* 1967). También se ha descrito un efecto directo de la vitamina K₃ sobre los lisosomas hepáticos y de otros órganos, con la liberación de diversas hidrolasas ácidas, entre ellas: la fosfatasa ácida, tal como fue descrito por de Duve *et al.* (1962b) en estudios realizados en lisosomas "in vitro". El incremento en la actividad proteolítica tisular explica, a su vez, los hallazgos histológicos renales vistos en la presente investigación. En relación a este punto es interesante señalar que las aminotransferasas, la fosfatasa alcalina y la LDH se han considerado desde el punto de vista clínico como "enzimas marcadoras de lesión" (Wasserstein, 1973), es decir, se trata de enzimas cuyo incremento indica la existencia de un proceso de necrosis celular y/o tisular.

Se dispone de una considerable información acerca de los mecanismos que determinan los efectos tóxicos de la menadiona sobre los tejidos. La toxicidad de las quinonas ha sido atribuida al estrés oxidativo inducido por el proceso de redox cíclico de estas drogas en las células. Su metabolismo puede ocurrir por un proceso de reducción determinado por uno o por dos electrones. La reducción de la menadiona por un electrón determina la formación de un radical semiquinona, que puede ser oxidado por el oxígeno, con producción de un radical superóxido (O₂⁻). La dismutación del radical superóxido produce H₂O₂ que es metabolizado a H₂O por la enzima glutatión peroxidasa, en presencia de glutatión (GSH). La menadiona, también puede reducirse por la presencia de dos electrones a la hidroquinona correspondiente, por la enzima DT-diaforasa, sin la formación de los

radicales libres intermedios de semiquinona (Jewell *et al.*, 1982; Thor *et al.* 1982; Tzeng *et al.*, 1994).

El incremento en la concentración de calcio intracelular [Ca²⁺], la estimulación de la peroxidación lipídica y el agotamiento de los grupos tiol (-SH) son respuestas comunes que ocurren después de la exposición al estrés oxidativo (Reed, 1990). El metabolismo de la menadiona por los hepatocitos aislados y las células epiteliales renales disminuye el glutatión (GSH) y los grupos -SH de las proteínas (Brown *et al.*, 1991; Munday *et al.*, 2001) y favorece el proceso de peroxidación y la ruptura de las macromoléculas vitales. Este proceso, a su vez, daña las membranas plasmáticas y las de las organelas, entre ellas los lisosomas y las mitocondrias. Las mitocondrias y los lisosomas alterados liberan, a su vez, diversas enzimas hidrolíticas. Por consiguiente, la hipervitaminosis K₃ determina la liberación de una gran variedad de hidrolasas ácidas (manosidasas, catepsinas, ribonucleasa, desoxirribonucleasa, fosfatasa, α-1,4-glucosidasa o maltasa ácida, proteasa, β-glucuronidasa y sulfatasa, entre otras), que de acuerdo a de Duve *et al.* (1962 a,b) se encuentran en los lisosomas. Dingle (1963) comprobó que este complejo enzimático es el responsable de muchos de los cambios observados en los tejidos tratados con dosis excesivas de vitamina A u otras vitaminas liposolubles.

CONCLUSIONES

La vitamina K₃, a dosis elevadas:

1. Determina un aumento significativo (p< 0,05) en la actividad de las enzimas TGP (ALT), (TGO AST), LDH, proteasas ácidas, maltasa ácida y ALP a nivel renal.

2. Es tóxica para el riñón como se desprende de los resultados obtenidos. El público en general, y algunos médicos en particular, piensan que esta vitamina es inocua, no peligrosa y hace que ella se administre a grandes dosis, de forma incontrolada, en situaciones que no lo ameritan lo cual representa un grave riesgo para la salud; inclusive, la literatura médica está virtualmente desprovista de datos en relación a los efectos tóxicos de esta vitamina.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alarcón OM, Vásquez RF, Acosta A, Burguera JL, Burguera M, Ortega L SY. 1991. **Alteraciones hematológicas en ratas tratadas con dosis elevadas de vitamina K₃ (menadiona).** Arch Latinoam Nutr 41: 363-374.

- Amador E, Zimmerman AB, Wacker WEC. 1963. **Urinary alkaline phosphatase activity. I. Elevated urinary LDH and alkaline phosphatase activities for the diagnosis of renal carcinomas.** JAMA 185: 769-774.
- American Institute of Nutrition. 1977. **Report of the AIN Ad Hoc Committee of Standards for Nutritional Studies.** J Nutr 107: 1340-1348.
- Berger LC, Broida DT. 1968. **Lactic dehydrogenase determination: Colorimetric method.** Sigma Technical Bulletin No. 500. pp. 2-6.
- 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.
- Brandes D, Anton E, Knokwai L. 1967. **Studies on L-1210 leukemia. II. Ultrastructural and cytochemical changes after treatment with cyclophosphamide and vitamin A.** J Natl Cancer Inst 39: 385-421.
- Brown PC, Dulik DM, Jones TW. 1991. **The toxicity of menadione (2-methyl-1,4-naphthoquinone) and two thioether conjugates studied with isolated renal epithelial cells.** Arch Biochem Biophys 285: 187-196.
- Chiou TJ, Zhang J, Ferrans VJ, Tzeng WF. 1997. **Cardiac and renal toxicity of menadione in rat.** Toxicology 124: 193-202.
- De Duve C, Wattiaux R, Baudhim P. 1962a. **Distribution of enzymes between subcellular fractions in animal tissues.** Adv Enzymol 24: 291-358.
- de Duve C, Wattiaux R, Wibo M. 1962b. **Effects of fat-soluble compounds on lysosomes in vitro.** Biochem Pharmacol 9: 97-116.
- Dingle JT. 1963. **Action of vitamin A on the stability of lysosomes in vivo and in vitro.** CIBA Foundation Symposium on Lysosomes, (De Reuck AVS, Cameron MP, eds.). JA Churchill Ltd. London.
- Dingle JT, Sharman IM, Moore T. 1966. **Nutrition and lysosomal activity. The influence of vitamin A status on the proteolytic activity of extracts from the livers and kidneys of rats.** Biochem J 98: 476-484.
- Doisy EA, Matschiner JT. 1970. **Biochemistry of Vitamin K. En: Fat-soluble vitamins.** Pergamon Press. Oxford. pp. 293-331.
- Folin O, Ciocalteu V. 1929. **On tyrosine and tryptophane determination in proteins.** J Biol Chem 73: 627-635.
- Gamklou R, Scherstén T. 1972. **Activity of α -amylase and α -1,4-glucosidase in human liver tissue.** Scand J Clin Lab Invest 30: 201-208.
- Jewell SA, Bellomo G, Thor H, Orrenius S, Smith MT. 1982. **Bleb formation in hepatocytes during drug metabolism is caused by disturbances in thiol and calcium ion homeostasis.** Science 217: 1257-1258.
- Lowry OH, Roberts NR, Wu M, Hixon WS, Crawford EJ. 1954. **The quantitative histochemistry of brain. II. Enzyme measurements.** J Biol Chem 207: 20-28.
- Munday R, Smith BL, Munday CM. 2001. **Effects of modulation of tissue activities of DT-diaphorase on the toxicity of 2,3-dimethyl-1,4-naphthoquinone to rats.** Chem Biol Interact 134: 87-100.
- Pearse AGE. 1980. **Histochemistry. Theoretical and Applied. Preparative and Optical Technology.** 4th Ed. Vol. 1. Churchill Livingstone. Edinburgh, London and New York. Pp. 97-158.
- Raab WP. 1972. **Diagnostic value of urinary enzyme determinations.** Clin Chem 18: 5-25.
- Rebhun WC, Tennant BC, Dill SG, King JM. 1984. **Vitamin K₃-induced renal toxicosis in the horse.** J Am Vet Med Assoc 184: 1237-1239.
- Reed DJ. 1990. **Glutathione; toxicological implications.** Annu Rev Pharmacol Toxicol 30, 603-631.
- Reitman S, Frankel S. 1957. **Colorimetric method for the determination of serum glutamic-oxalacetic and glutamic-pyruvic transaminase.** Am J Clin Path 28: 56-63.
- Schmidt E, Schmidt F. 1974. **Breve Manual Enzimático. Diagnóstico Enzimático Práctico.** Editorial Boehringer-Mannheim. Depto. Bioquímico. Barcelona. pp. 10-34).
- Thor H, Smith MT, Hartzell P, Bellomo G, Jewell SA, Orrenius S. 1982. **The metabolism of menadione (2-methyl-1,4-naphthoquinone) by isolated hepatocytes.** J Biol Chem 257: 12419-12425.
- Trinder P. 1969. **Determination of glucose in blood using glucose oxidase** Ann Clin Biochem 6: 24-28.
- Tzeng WF, Chiou TJ, Wang CP, Lee JL, Chen YH. 1994. **Cellular thiols as a determinant of responsiveness to menadione in cardiomyocytes.** J Mol Cell Cardiol 26: 889-897.
- Vásquez-Royett F. 1993. **Hipervitaminosis K₃ aguda en ratas. Correlación histoquímica y bioquímica.** Trabajo de Ascenso a la Categoría de Asociado. Universidad de Carabobo. Facultad de Ciencias de la Salud. Escuela de Bioanálisis. Valencia. pp. 9-16.
- Waserstein M. 1973. **Enzimología Clínica en la Patología Hepática.** Editorial Puma. Buenos Aires. pp. 21-28.
- Wolf PL, Williams D, von der Muehl E, Wolf P. 1973. **Practical Clinical Enzymology: Techniques and Interpretations and Biochemical Profiling.** John Wiley and Sons, Inc. New York. pp. 190-205.