

Efecto de la asociación de vitamina C - trimetazidina en la sobrevida de ratas intoxicadas por paraquat

Y. Aular¹; Y. Fernández²; G. Landaeta²; R. Suti¹; M. Muñoz³ R. Oviedo⁴.

Departamento de Farmacología y Toxicología. Escuela Medicina. Facultad de Ciencias de la Salud.
Universidad de Carabobo. Valencia, Venezuela. E- mail: yaular@postgrado.uc.edu.ve

1 Farmacéutico, Profesor Titular del Dpto. de Farmacología y Toxicología. Escuela de Medicina. Facultad de Ciencias de la Salud.

2 Lic. en Bioanálisis. Cursante Maestría en Toxicología Analítica.

3 Lic. en Bioanálisis. Dpto. Farmacología y Toxicología

4 Dpto. Farmacología y Toxicología

Resumen

La vitamina C (VC) y la trimetazidina (TMZ) como antioxidantes y la posible acción antiinflamatoria de esta última podrían ser de utilidad en la intoxicación por paraquat. Por tal razón se decidió evaluar el efecto de esta asociación en los niveles de VC, peso y sobrevida de ratas intoxicadas por paraquat, para ello se diseñó un estudio con 56 ratas divididas en 8 grupos: A (control negativo); B (control positivo, recibieron 11 mg/Kg. de paraquat IP); C (pre tratadas con 28.5mg/Kg. VC oral); D (tratadas con 28.5mg/Kg. VC post intoxicación); E (pre tratadas con 5mg/Kg. TMZ oral); F (tratadas con 5mg/Kg. TMZ post intoxicación); G (pre tratadas con VC- TMZ); H (tratadas con VC- TMZ post intoxicación). Se determinaron niveles de VC, cambios de peso y sobrevida en los grupos experimentales durante 31 días. Los resultados mostraron el día 24 de experimentación: disminución de los niveles de VC en el grupo E ($p < 0.05$) y aumento en el grupo G ($p < 0.001$), sobrevida de 62.5% (grupo G), 50% (grupos E y H) y 25% (grupos C y D). Se concluye que la asociación VC- TMZ aumentó la sobrevida de ratas intoxicadas por paraquat.

Palabras Clave: Intoxicación, Paraquat, Ratas, Vitamina C, Trimetazidina, Sobrevida.

Abstract

Effect of vitamin C-trimetazidine relationship in survival of paraquat intoxicated rats. Vitamin C (VC) and trimetazidine (TMZ) as antioxidants and the possible anti-inflammatory effect of the latter could be useful for paraquat intoxication. Thus, the effect of this relationship in VC levels, weight and survival of paraquat intoxicated rats was assessed. A study was carried out with 56 rats, divided in 8 groups: A (negative control); B (positive control, with 11mg/Kg of paraquat IP); C (pre-treated with 28.5mg/Kg oral VC); D (treated with 28.5mg/Kg VC post-intoxication); E (pre-treated with 5mg/Kg. oral TMZ); F (treated with 5mg/Kg. TMZ post-intoxication); G (pre-treated with VC-TMZ); H (treated with VC-TMZ post-intoxication). VC levels, weight and survival changes were determined in the experimental groups during 31 days. At day 24 of experimentation, the results showed: VC level decrease in group E ($P < 0.05$) and an increase in group G ($P < 0.001$), survival of 62.5% (group G), 50% (groups E and H) and 25% (groups C and D). It can be concluded that the VC-TMZ relationship increased the survival of paraquat intoxicated rats.

Key Words: Intoxication, Paraquat, Rats, Vitamin C, Trimetazidine, Survival.

Introducción

El paraquat (PQ) un herbicida de contacto, es un compuesto altamente tóxico para humanos y animales. En las últimas décadas se han reportado muchos casos de intoxicación aguda y muerte por exposición aguda accidental o intencional. [1,2].

La intoxicación aguda por PQ puede ocasionar lesiones en órganos como riñón, hígado, corazón, tracto intestinal y pulmones; siendo estos últimos los mas susceptibles a su acción tóxica. [3,4]

La toxicidad es debida a que el PQ es reducido por la NADPH-citocromo C-reductasa en presencia de NADPH y a continuación es reoxidado por el oxígeno; con gran producción de radicales superóxido (O_2^-) que luego se oxidan a peróxido (H_2O_2), los cuales atacan las membranas celulares produciendo una gran agresión a la estructura y función celular, por daño mitocondrial y de otros elementos celulares (peroxidación lipídica) favoreciendo la fibrosis pulmonar [5,6,7].

Para contrarrestar los efectos oxidantes de los radicales libres, como los anteriormente mencionados, el organismo cuenta con un sistema de defensa antioxidante que interactúa con las especies reactivas de oxígeno para mantener el equilibrio prooxidante/antioxidante y así protegen al organismo de los riesgos que conlleva el estrés oxidativo. Este sistema está constituido por antioxidantes primarios o endógenos: Superóxido dismutasa (SOD), Catalasa (CAT), Glutación peroxidasa (GPx), Ferritina, Ceruloplasmina y antioxidantes secundario o exógenos: Vitaminas A, E, C, Betacaroteno [8,9].

La VC, es un elemento importante de fuente exógena capaz de captar e inhibir los radicales libres tanto en el desarrollo de enfermedades degenerativas como en los daños de las membranas celulares producidas por tóxicos [10,11,12]. En relación a la trimetazidina, estudios experimentales han determinado que produce depleción de neutrófilos e inhibe la infiltración de leucocitos [13]. Además activa sistemas antioxidantes enzimáticos como la glutación peroxidasa (GPx) que reaccionan directamente con los radicales libres, lo que podría contribuir a aumentar la sobrevida [14,15].

Tomando en consideración que la VC y la TMZ son efectivos antioxidantes, que pueden ser utilizados para remover radicales libres en estados agudos de peroxidación lipídica, estos podrían contribuir a prevenir la fibrosis pulmonar y la muerte producto de la intoxicación con el PQ, se decidió realizar la presente investigación con el objetivo de evaluar el efecto de la asociación vitamina VC - TM2 en los niveles de VC, peso y sobrevida de ratas intoxicadas por PQ.

Materiales y métodos

Tipo de Investigación.

Está basada en un estudio básico de tipo experimental, de nivel explicativo.

Muestra

Se utilizaron 56 ratas machos Sprague Dawley, con peso corporal entre 250-350 g de peso, suministradas por el Bioterio Central de la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad de Carabobo, las mismas se mantuvieron en el Bioterio del Departamento de Farmacología de la Escuela de Medicina de la Universidad de Carabobo.

Los animales se dividieron al azar en 8 grupos:

Grupo A: Control Negativo: Ratas a las que sólo se les administró por vía oral solución fisiológica y no recibieron ningún tratamiento.

Grupo B: Control Positivo: Ratas a las que se les administró por vía intraperitoneal una dosis única de PQ (11 mg/Kg. peso) [16], no recibieron ningún tratamiento.

Grupo C: Ratas a las que se les administró 28.5mg/Kg. peso de VC diarios por vía oral [17], 10 días antes de la intoxicación con 11mg/Kg. peso de PQ, luego de la intoxicación se continuó el tratamiento por 21 días.

Grupo D: Ratas a las que se les administró 11mg/Kg. peso de PQ e inmediatamente 28.5 mg/Kg. peso de VC por vía oral por 21 días.

Grupo E: Ratas a las que se les administró 5mg/Kg. peso de TMZ vía oral [15] ,10 días antes de la intoxicación con 11mg/Kg. peso de PQ, luego de la intoxicación se mantuvo el tratamiento por 21 días.

Grupo F: Ratas a las cuales se les administró 11mg/Kg. peso de PQ por vía intraperitoneal e inmediatamente 5mg/Kg. peso de TMZ vía oral por 21 días.

Grupo G: Se le administró 28.5 mg/Kg. peso de VC por vía oral y 5 mg/Kg. peso de TMZ vía oral, 10 días antes de la intoxicación con 11m/Kg. peso de PQ, luego de la intoxicación se continúa el tratamiento por 21 días.

Grupo H: Ratas a las que se les administró 11mg/Kg. peso de PQ e inmediatamente 28.5 mg/Kg. peso de VC por vía oral y 5 mg/Kg. peso de TMZ vía oral por 21 días.

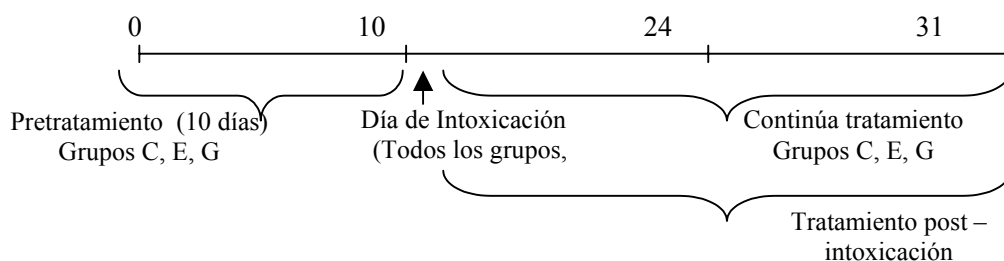
Recolección de datos

Los días 0, 10, 24 y 31 de experimentación se extrajeron “previo ayuno” de 12 horas, 2 ml de sangre sin anticoagulante de la vena de la cola [16] para la determinación de los niveles séricos de VC, utilizando para ello el método de Roe y Kuether modificado [17].

Todos los animales en estudio fueron pesados semanalmente, siempre a la misma hora para evitar errores.

Diariamente se realizó reporte de la sobrevida de los grupos experimentales.

Procedimiento



Análisis Estadísticos

Los resultados se expresaron como media \pm desviación estándar, valores absolutos y porcentajes, tabulados y analizados con el paquete estadístico SPSS versión 12.0, utilizando ANOVA, Test de Tukey y Test de Sobrevida Kaplan Meier.

Resultados

Niveles de Vitamina C:

Los valores medios de los niveles de VC por grupo de tratamiento se muestra en la tabla 1, en los grupos C y D a los cuales se les administraron VC sola antes y después de la intoxicación con PQ respectivamente, no se evidenciaron cambios significativos en los niveles de VC durante el periodo experimental. En el grupo E (TMZ sola, antes de la intoxicación con PQ) se observó disminución significativa de los niveles de VC para el día 31 de experimentación, a diferencia del grupo G (TMZ +VC, antes de la intoxicación con PQ) en el cual se observó aumento significativo de los niveles de VC el día 24 de experimentación.

Tabla 1. Valores promedio de Vitamina C sérica de los grupos experimentales

Grupo	Vitamina C (mg/dl)			
	Día 0 (Basal)	Día 10	Día 24	Día 31
A (n=6)	1.80 \pm 0.14	1.75 \pm 0.07	1.80 \pm 0.12	1.76 \pm 0.09
B(n=6)	1.61 \pm 0.19	1.61 \pm 0.20	---	---
C (n=8)	1.77 \pm 0.12	1.94 \pm 0.13	2.11 \pm 0.15	1.79 \pm 0.01
D(n=8)	1.74 \pm 0.20	1.76 \pm 0.21	1.67 \pm 0.15	1.53 \pm 0.09
E(n=8)	1.91 \pm 0.17	1.82 \pm 0.30	1.66 \pm 0.20 ^{*b}	1.65 \pm 0.17 ^{*b}
F(n=8)	1.65 \pm 0.14	1.66 \pm 0.14	---	---
G(n=8)	1.63 \pm 0.10	1.92 \pm 0.13 ^{***b}	2.04 \pm 0.25 ^{***b}	1.80 \pm 0.17
H(n=8)	1.94 \pm 0.14	1.97 \pm 0.15	1.86 \pm 0.12	1.83 \pm 0.11

^{*b} p<0.05; ^{**b} p<0.01; ^{***b} p<0.001

Valores X±DS. A: control negativo, B: control positivo, C: pretratados con vitamina C, D: vitamina C post intoxicación, E: pretratadas con trimetazidina, F: trimetazidina post intoxicación, G: pretratada con vitamina C y trimetazidina, H: vitamina C y trimetazidina post intoxicación

Peso

Los animales de los diferentes grupos experimentales mostraron aumento de peso durante las dos primeras semanas de experimentación, con disminución del mismo para la tercera semana. Sin embargo para la cuarta semana se obtuvo recuperación del peso en los grupos que sobrevivieron con aumento del mismo al final del estudio (Tabla 2).

Tabla 2. Valores promedio de peso de los grupos experimentales.

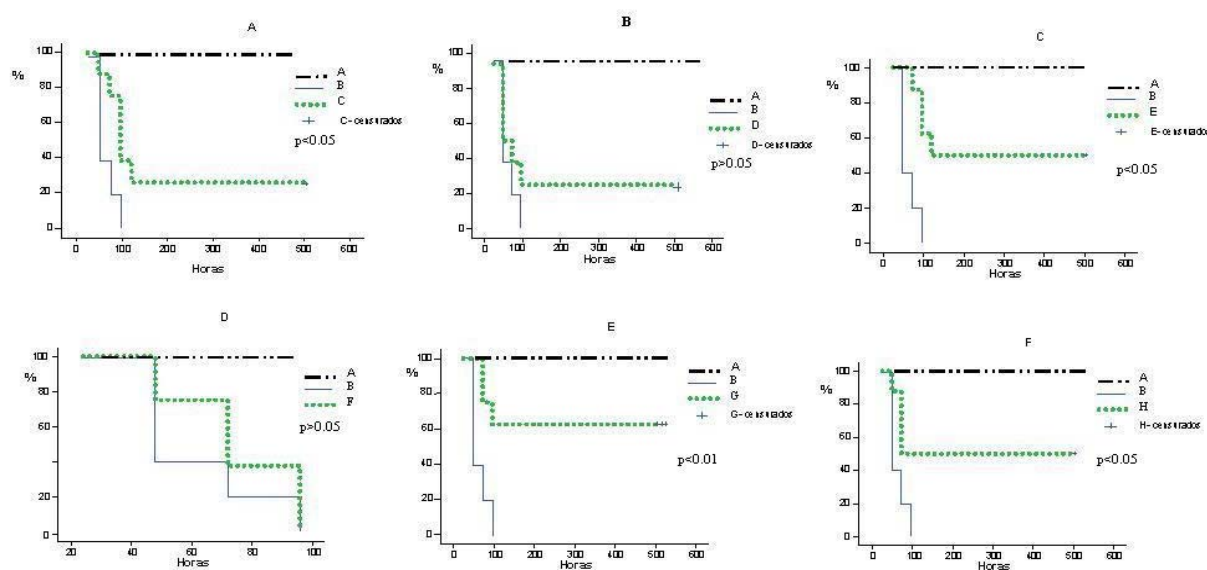
Grupos	Peso (g)					
	Semana 0	Semana 1	Semana 2	Semana 3	Semana 4	Semana 5
A(n=6)	322±19.96	355±17.10	375±21.91	390±50.39	402±52.35	418±43.18
B(n=6)	326±32.71	344±43.22	368±52.48	348±13.44	384±24.75	398±38.18
C(n=8)	288±29.27	315±21.67	328±30.49	352±2.12	374±9.19	386±12.73
D(n=8)	278±15	292±14.33	303±15.90	299±1.41	304±15.56	337±10.61
E(n=8)	324±20.03	354±13.86	364±13.51	347±38.55	374±22.53	390±16.40
F(n=8)	283±13.36	293±19	306±20.83	---	---	---
G(n=8)	308±14.74	383±14.70	399±14.73	351±14.38	372±18.89	380±17.98
H(n=8)	282±14.46	295±15.44	307±14.77	299±10.23	309±11.58	303±18.76

Valores X±DS. A: control negativo, B: control positivo, C: pretratados con vitamina C, D: vitamina C post intoxicación, E: pretratadas con trimetazidina, F: trimetazidina post intoxicación, G: pretratada con vitamina C y trimetazidina, H: vitamina C y trimetazidina post intoxicación

Sobrevida

Como se observa en el gráfico 1, los grupos B y F mostraron una disminución del porcentaje de sobrevida a las 24 horas acentuándose a las 48 y 72 horas con fallecimiento de todos los animales a las 96 horas (D). Los grupos C y D también arrojaron disminución del porcentaje de sobrevida a las 24, 48 y 72 horas; manteniéndose en 25% de sobrevida a partir de las 120 horas (A y B) y en los grupos E, G y H la sobrevida se ubica en un 50 y 62,5 % a partir de las 96 horas de la intoxicación, manteniéndose esos valores hasta 504 horas (21 días de intoxicación) (C, E, F).

Grafico 1. Sobrevida en los grupos experimentales. Test Kaplan Meier



A: control positivo (CP) vs grupo C (pretratados con vitamina C), **B:** CP vs grupo D (vitamina C post intoxicación), **C:** CP vs grupo E (pretratadas con trimetazidina), **D:** CP vs grupo F (trimetazidina post intoxicación), **E:** CP vs grupo G (pretratada con vitamina C y trimetazidina), **F:** CP vs grupo H (vitamina C y trimetazidina post intoxicación)

Discusión

La generación de radicales libres en el organismo, provenientes del estrés oxidativo o no, es controlado fisiológicamente por sistemas enzimáticos como la glutatión peroxidasa, catalasa y superóxido dismutasa [20] y a su vez también puede ser controlado por sistemas no enzimáticos como la VC. El mecanismo para el efecto protector de la VC ha sido atribuido a su capacidad para eliminar y/o “barrer” radicales generados por el ciclo redox del paraquat antes que ataque otras biomoléculas; lo que contribuye a prevenir la fibrosis pulmonar producida por la intoxicación por PQ y aumentar la sobrevida [21].

Asimismo, la TMZ ha sido relacionada con acciones teóricamente útiles para prevenir los daños producidos por el PQ tales como la preservación de la función mitocondrial, prevención de la acidosis intracelular y la reducción del daño inducido por los radicales libres.

En el presente estudio, se evaluó el efecto de la asociación VC-TMZ en la sobrevida de ratas intoxicadas por PQ. Los resultados obtenidos mostraron que los grupos (C y D) tratados con VC (pre y post intoxicación) mantuvieron los niveles de VC en valores similares a la basal, inclusive después de la intoxicación por PQ. Sin embargo a pesar de que los niveles del antioxidante no son modificados por la acción del tóxico, la sobrevida de estos grupos fue de 25% al final del periodo experimental, a diferencia de los grupos G y H que mostraron una sobrevida del 62,5% y 50% respectivamente. Este menor efecto de la

VC sobre la sobrevida podría ser explicado porque aparentemente la VC puede aumentar la generación de radicales hidróxilos por aceleración del ciclo redox de los iones metálicos libres ($\text{Fe}^{+3}/\text{Fe}^{+2}$) en la fase acuosa cuando el daño inducido por el PQ está en progreso, agravando el daño oxidativo [1].

En el caso de los grupos G y H en los cuales la VC se administró asociada a TMZ se obtuvo mayores porcentajes de sobrevida a partir de las 96 horas de la intoxicación, manteniéndose estos valores hasta el final del periodo experimental, este efecto probablemente es debido a que se suman los efectos antioxidantes de la VC y la TMZ, además del efecto antiinflamatorio exhibido por la TMZ, de acuerdo a lo reportado por Tellier en 1999 [13]. En contraste a los resultados del presente estudio, una investigación [15] donde se evaluó la sobrevida de ratas intoxicadas experimentalmente con PQ, utilizando carboximetilcisteína, propofol y TMZ, esta última no produjo cambios significativos en la sobrevida cuando se aplicó como tratamiento post intoxicación.

En relación al peso, los grupos D, E, G, H disminuyeron de peso en la semana tres de experimentación (post intoxicación), sin embargo a partir de la semana cuatro, se recupera el peso observándose ganancia del mismo al final del periodo experimental. Resultados similares a los de la presente investigación fueron reportados por Chung-Ming y Ahai (2000) [22] en un estudio para evaluar la toxicidad pulmonar del PQ en ratas, mostrando que el descenso del peso en la fase inicial de la intoxicación podría ser debido a la acción deletérea de PQ en la etapa aguda de la intoxicación, el cual es recuperado en aquellos animales que lograron sobrevivir.

En conclusión, en base a los resultados obtenidos se puede señalar que la asociación VC-TMZ pre y post intoxicación aumentó la sobrevida de ratas intoxicadas con PQ.

Agradecimiento

Este trabajo forma parte del proyecto financiado por el C.D.C.H. de la U.C, bajo el N° 2005-003

Bibliografía

1. Zacarías, S. (2002). Role of antioxidants an paraquat toxicity. *Toxicology*, 180: 65-77.
2. Gisbert JA, Villanueva E. (2001). *Medicina Legal y Toxicología*. 5ta edición. Masson S.A. Barcelona: pp 813-815
3. Trujillo MH, González CL. (1989). Intoxicación por paraquat. *Med Crit Venez* 4 (3-4): 50-53
4. Klaassen CD, Watkins JB. (2001). *Casarett & Doull: Manual de Toxicología*. Quinta Edición, McGraw Hill. México DF: pp 640-646
5. García J, Frontado C, Tilac C, Rendón C, Brewster F, González A, et al. (2000) Intoxicación moderada a severa por paraquat tratada con esteroides e inmunosupresores. Datos preliminares. *Med Intern (Caracas)*; 16 (3)

6. Ladrón J, Moya V. (1995). Toxicología médica, clínica y laboral. Interamerica Mc Graw Hill. Madrid. pp 491- 495
7. Nogué S, Dueñas A. (2000). Intoxicación por paraquat: un puzzle al que le falta piezas. Med Clin (Barcelona) 115: 546-548
8. Venereo JR. (2002). Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes. Rev Cubana Med Milit; 31 (2): 126-33
9. Romero L, Falcón C. (1995). Niveles séricos de vitamina C y vitamina E en Ancianos. Trabajo de Ascenso. Valencia: Universidad de Carabobo.
10. Botella J, Belenguer JE. (2000). Intoxicación por paraquat Estudio de 29 casos y evaluación del tratamiento con a la pauta caribeña. Med Clin (Barc); 115: 530-533
11. Hong SY, Hwang KY, Lee EY, Eun SW, Cho SR Han CS, et al. (2002). Effect of vitamin C on plasma total antioxidant status in patient with paraquat intoxication. Toxicol Lett 126: 51-59
12. Ikeda K, Kamagai Y, Nagano Y, Matzuzawa N, Kojo S. (2003). Change in the concentration of vitamins C and E in Rat Tissues by paraquat administration. **Biosci Biotechnol Biochem** 67 (5): 1130-1131.
13. Tellier P. Trimetazidina: Del efecto citoprotector a la eficacia antiisquemica. Antiox Calid Vid [en línea] 1999 Octubre [Fecha de acceso 15 de Junio de 2004]. URL disponible: <http://www.antioxidantes.com.ar>
14. Tikhaze AK, Lankin VZ, Zharova EA, Kolycheva SV. (2000). Trimetazidine as indirect antioxidant. Bull Exp Biol Med 2000 130 (10): 951-953.
15. Lugo NV, Maradei I, Ramírez M, Sosa M, Pascuzzo C. (1999). Uso de Trimetazidina en la intoxicación por paraquat en ratas. Act Cient Venez 50 (2): 243
16. Lugo N, Pascuzzo C, Maradei I, Ramírez M, Sosa M, Agüero R, Granado A. (2002). Prolonged Survival after experimental paraquat intoxication. Role of alternative antioxidants. Vet Human. Toxicol 44 (1): 40-41.
17. Córdoba, D. (2001). Toxicología. 4ª Edición. Manual Moderno. Bogotá: pp 156-167
18. Duran DJ. Introducción a la ciencia de los animales de laboratorio. Universidad de los Andes. 1998
19. Roe JH, Kuether CA. (1943). Determination of ascorbic acid in whole blood and urine through the 2,4- dinitrophenylhydrazine derivade of dehydroascorbic acid. J Biol Chem 147: 399-407.
20. Macmillan-Crow LA. (2001). Invited review manganese superoxide dismutase. Free Radic Res. 34:325-336
21. Orfila L, Mendoza S, Rodríguez J, Arvelo F. (2002). Participación de la Dexametasona y las vitaminas C y E en la modulación del efecto hepatóxico inducido por herbicidas fomesafén y 2,4- D amino, en ratas. Act Cient Venez; 53: 60-65
22. Chung-Ming, C, Ahai, CL. (2000). Lung Toxicite of Paraquat in the rat. J. of Toxicol and Environmental. Health. Part A, 59: 477-487.