

## Evaluación de *L-Carnitina* como tratamiento profiláctico en la intoxicación por compuestos organofosforados

### Evaluation of *L-Carnitine* as a prophylactic treatment in organophosphorus compound poisoning

MACÍAS-PÉREZ, José Roberto<sup>1\*†</sup>, ALDABA-MURUATO, Liseth Rubí<sup>1</sup> y GUERRERO-BARRERA, Alma Lilian<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Universidad Autónoma de San Luis Potosí, Licenciatura en Química Clínica de la Unidad Académica Multidisciplinaria Zona Huasteca. Romualdo del Campo #501 Fraccionamiento Rafael Curiel, CP 79060, Ciudad Valles, San Luis Potosí, México

<sup>2</sup>Universidad Autónoma de Aguascalientes, Laboratorio de B0iología celular, Av. Universidad # 940, Ciudad Universitaria, C. P. 20131, Aguascalientes, Ags. México

ID 1<sup>er</sup> Autor: José Roberto, Macías-Pérez / ORC ID: 0000-0001-7925-2494, Researcher ID Thomson: X-2998-2018, CVU CONACYT ID: 172982

ID 1<sup>er</sup> Coautor: Liseth Rubí, Aldaba-Muruato / ORC ID: 0000-0002-9641-662X, Researcher ID Thomson: X-3211-2018, CVU CONACYT ID: 176507

ID 2<sup>do</sup> Coautor: Alma Lilian, Guerrero-Barrera / ORC ID: 0000-0002-0952-8544, Researcher ID Thomson: X-3047-2018, CVU CONACYT ID: 33863

Recibido Enero 20, 2018; Aceptado Marzo 04, 2018

#### Resumen

Evaluación de *L-Carnitina* como tratamiento profiláctico en la intoxicación por compuestos organofosforados. En México la primera causa de intoxicación por plaguicidas es debido al uso de compuestos organofosforados (OF). El metil paratión (MP) es un pesticida OF, considerado peligroso debido a que puede inducir intoxicaciones mortales. Las medidas de seguridad se basan en evitar la exposición directa de estos, ya que no existen tratamientos profilácticos. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto protector de la *L-carnitina* en la intoxicación inducida por MP (4mg/kg, vía intragástrica) en ratas. Nuestros resultados muestran que después de 4 h de haberse administrado el plaguicida, se redujo la actividad de la acetilcolinesterasa (AChE), mientras que se incrementaron los niveles séricos de las enzimas ALT, AST y FA. Las micrografías con tinción de H&E de hígado, cerebro y cerebelo mostraron el daño generado por MP. Por otra parte, la administración de *L-carnitina* (250 mg/kg, vía intragástrica, 2 horas antes del MP), protege de manera significativa de las alteraciones hemodinámicas e histológicas inducidas por el MP. El presente trabajo sugiere que *L-carnitina* puede ser una estrategia para prevenir el daño inducido por los compuestos OF.

#### Metil paratión, *L-carnitina*, Organofosforados

#### Abstract

Evaluation of *L-Carnitine* as prophylactic treatment in the intoxication by organophosphorus compounds. In Mexico, the first cause of pesticide poisoning is due to the use of organophosphorus compounds (OPs). Methyl parathion (MP) is an OPs pesticide, considered dangerous because it can lead to death. The safety measures are based on avoiding direct exposure of these, since there are no prophylactic treatments. Therefore, the objective of this work was to evaluate the protective effect of *L-carnitine* in MP-induced intoxication (4 mg/kg, intragastric route) in Wistar rats. Our results show that after 4 h of MP exposition, the activity of the acetylcholinesterase (AChE) was reduced, while serum levels of ALT, AST and ALP were increased. The liver, brain and cerebellum micrographs with H&E staining showed the damage generated by the MP. On the other hand, the administration of *L-carnitine* (250 mg/kg, intragastric route, 2 hours before the MP), protects significantly the hemodynamic and histological alterations induced by the MP. The present work suggests that *L-carnitine* may be a new strategy to prevent the damage induced by OPs.

#### Methyl parathion, *L-carnitine*, Organophosphorus

**Citación:** MACÍAS-PÉREZ, José Roberto, ALDABA-MURUATO, Liseth Rubí y GUERRERO-BARRERA, Alma Lilian. Evaluación de *L-Carnitina* como tratamiento profiláctico en la intoxicación por compuestos organofosforados. Revista de Ciencias de la Salud. 2018. 5-14: 25-30.

\*Correspondencia al Autor (Correo Electrónico: roberto.macias@uaslp.mx)

† Investigador contribuyendo como primer Autor

## Introducción

Los compuestos organofosforados (OF) son sustancias químicas que son producidas por el proceso de esterificación entre el ácido fosfórico y el alcohol (Adeyinka and Pierre 2018). Estos químicos son los principales componentes de herbicidas, pesticidas e insecticidas, por lo que es muy frecuente que se presenten intoxicaciones por estos compuestos (Terry 2012). La ruta principal de intoxicación es por inhalación, pero el contacto dérmico y la ingestión inadvertida también pueden presentarse (Edwards and Tchounwou 2005).

El metil paratión (MP) es un compuesto OF de uso restringido que es usado como insecticida agrícola. La Organización Mundial de la Salud (OMS) lo ha clasificado como extremadamente tóxico (Jaga and Dharmani 2006). Estos compuestos desarrollan su toxicidad a través de la inhibición de la enzima acetilcolinesterasa (AChE), con la subsecuente acumulación de acetilcolina (Garcia, Abu-Qare et al. 2003). Además, se ha descrito que la sobre estimulación del sistema nervioso colinérgico mediada por OF va seguida de una generación intensificada de especies reactivas y daño oxidativo (Vanova, Pejchal et al. 2018).

La *L-carnitina* es una sustancia endógena que transporta los ácidos grasos a través de la membrana mitocondrial interna, mecanismo necesario para la beta-oxidación y la producción de ATP. Además, es un potente antioxidante y, por lo tanto, puede proteger a los tejidos del daño oxidativo (Ribas, Vargas et al. 2014). Diversos estudios han sugerido que la suplementación con *L-carnitina* tiene beneficios en la función cerebral, ganancia de masa muscular y masa ósea, y como antídoto contra intoxicaciones agudas inducidas por el ácido valproico (Adeva-Andany, Calvo-Castro et al. 2017; Maldonado, Guevara et al. 2017).

Asimismo, se ha sugerido que debido a que *L-carnitina* puede cruzar fácilmente la barrera hematoencefálica, puede ser benéfica para prevenir el daño neurológico derivado de daño oxidativo (Ribas, Vargas et al. 2014; Mescka, Rosa et al. 2016). Sin embargo, no existe estudios que exploren el efecto *L-carnitina* ante la intoxicación inducida por compuestos OF. Por lo tanto, este trabajo investigó el posible efecto protector de la *L-carnitina* utilizando un modelo experimental en rata.

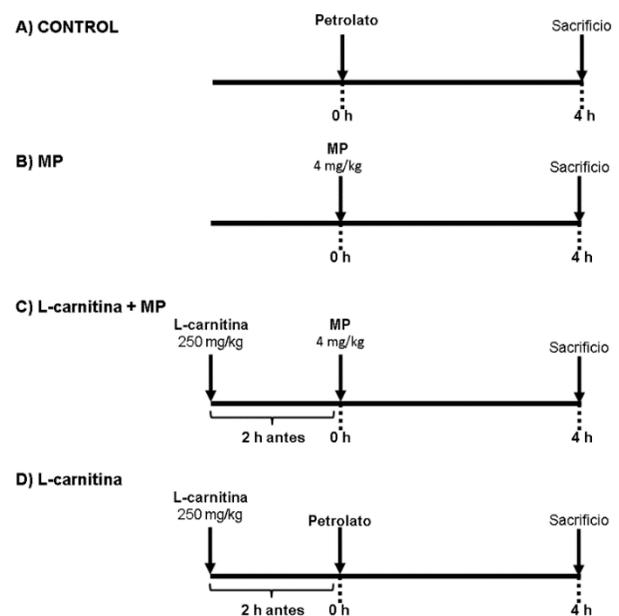
## Metodología a desarrollar

### Animales

En el presente trabajo se emplearon ratas Wistar machos de entre 200 y 250 g de peso. Se mantuvieron con una dieta estándar con libre acceso al agua potable. Recibieron cuidados y atención humana de acuerdo con las directrices de bioética del NIH para la investigación con animales (National-Research-Council 2011).

### Diseño experimental

Las ratas fueron divididas en cuatro grupos, constituidos de 5 ratas cada uno (Figura 1). A los animales del primer grupo se les administró vía intragástrica el petrolato líquido (grupo Control), el cual fue el vehículo utilizado para administrar el MP. Al segundo grupo de ratas se les administró MP (4mg/kg) vía intragástrica (Grupo MP). Al tercer grupo de animales se les administró la *L-carnitina* (250 mg/kg) 2 h antes de la intoxicación con MP (Grupo *L-carnitina* + MP). Finalmente, el cuarto grupo constó en la administración de *L-carnitina*, 2 h antes del petrolato líquido (Grupo *L-carnitina*). Todos los animales fueron sacrificados 4 h después de haber administrado el MP o el petrolato.



**Figura 1** Diseño experimental. A) Grupo control: animales sanos administrados con petrolato (vehículo del MP); B) Grupo MP; C) Grupo *L-carnitina* + MP; D) Grupo *L-carnitina*. MP: metil paratión. n=5 cada grupo

### Sacrificio de los animales

Las ratas fueron anestesiadas con una mezcla de pentobarbital sódico (29 mg/kg, i.p.) y sedaject® (0.6 mL/kg, i.p.). La sangre fue colectada con heparina por punción cardiaca, para posteriormente obtener el suero. Los hígados, cerebros y cerebelos fueron disecados cuidadosamente, y fijados en formalina neutra.

### Determinación de AChE

Para determinar la actividad enzimática de la AChE se mezclaron 10 µL de solución de NaCl y 10 µL del suero. En seguida se incubaron en baño de agua a 60°C, durante 10 minutos. Posteriormente se les agregaron 139 µL de PBS, 100 µL de solución de Rojo Neutro y 200 µL de Cloruro de Acetilcolina. La absorbancia se leyó 30 minutos después a 315 nm (Jaramillo-Juárez 2011).

### Marcadores de daño hepático

Un paso inicial para detectar problemas en el hígado es mediante la determinación en suero o plasma de las enzimas alanina aminotranspeptidasa (ALT), la aspartato aminotransferasa (AST) y la Fosfatasa alcalina (FA). En patologías hepáticas, se elevan los niveles de estas enzimas en la sangre, siendo indicadores del problema. Por lo tanto, en el presente trabajo se midieron las actividades de estas enzimas mediante el uso de kits, siguiendo las especificaciones de los fabricantes (ALT-Beckman Coulter®, AST-Beckman Coulter AU480® y FA-Beckman Coulter AU480®).

### Tinción histológica con H&E

Para visualizar el daño histológico inducido por MP fue utilizada la tinción de hematoxilina y eosina (H&E), como se describe en el “Manual of Histologic Staining Methods of the Armed Forces” (Luna 1968).

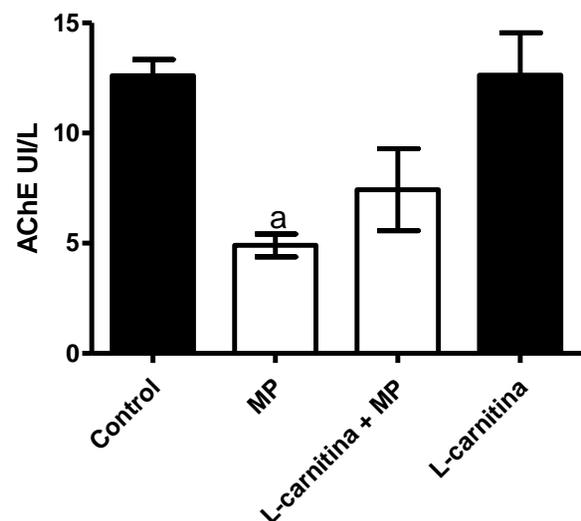
### Resultados

La intoxicación por plaguicidas OF produce daños severos sobre diversos tejidos. En el presente trabajo se utilizó como modelo experimental la intoxicación aguda inducida por MP en la rata, evaluando la capacidad profiláctica de la *L-carnitina* para proteger del daño tóxico sobre el cerebro, cerebelo, así como en el hígado.

### Inhibición de la AChE por MP

Nuestros resultados indican que después de 4 h de haber administrado el MP, se reduce en suero significativamente la actividad de la enzima AChE (Grupo MP) al comparar con el grupo Control. Por otra parte, el pre-tratamiento con *L-carnitina* tiende a regresar a los valores normales (*L-carnitina* + MP) (Figura 2). La evaluación del riesgo de toxicidad hacia plaguicidas OF involucra la determinación de indicadores biológicos de exposición, los cuales pueden servir como una alarma previa a la aparición de las manifestaciones clínicas.

La OMS sugiere la medición de la actividad de AChE plasmática como indicador biológico a la exposición, así como una disminución de la actividad de la colinesterasa de un 30 % indicaría una exposición baja y disminuciones mayores al 50 % indicarían una alta exposición relacionada a una intoxicación aguda (Humani-Pacsi 2005). Nuestros resultados muestran una reducción del 61.1% en la actividad de la AChE (Figura 2).



**Figura 2** Evaluación de la actividad de la enzima AChE en suero. Las ratas fueron divididas en cuatro grupos: Grupo control: animales sanos; Grupo MP; Grupo *L-carnitina* + MP; Grupo *L-carnitina*. MP: metil paratión. n=5 cada grupo. Cada barra representa el valor promedio de los resultados de los animales estudiados, realizados por duplicado  $\pm$  SE (n <5). a: significativamente diferente con respecto al grupo control, p <0.05

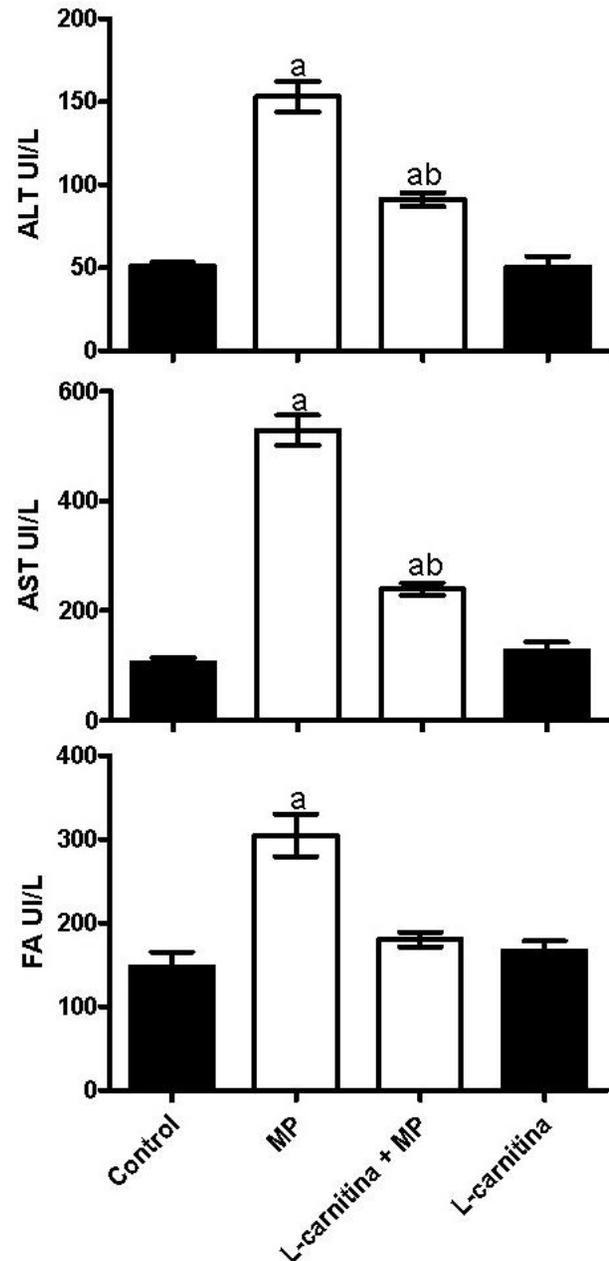
### ***L-carnitina* previene el daño hepático inducido por MP**

Dado que el MP produce hepatotoxicidad subaguda y crónica en la rata (Fuentes-Delgado 2011), en el presente trabajo el daño hepático inducido por MP fue evaluado mediante el análisis en sueros de las actividades enzimáticas de la ALT, la AST y de la FA. Las enzimas ALT y AST son enzimas que se encuentran en el citosol de los hepatocitos y cuando estas células son dañadas, liberan las enzimas hacia el torrente sanguíneo, por lo que niveles incrementados de estas enzimas en suero indican daño hepático.

Así mismo, la enzima FA se encuentra presente en casi todos los tejidos del organismo, siendo particularmente alta en huesos, hígado, placenta, intestinos y riñón. Tanto el aumento, así como su disminución en plasma tienen significado clínico. Cuando existe incremento de la FA, así como de las enzimas ALT y AST, se confirma la presencia de daño hepático. El estudio de la FA a menudo se utiliza para detectar daño de los conductos biliares, ya que esta enzima se encuentra a concentraciones elevadas en los márgenes de las células que limitan los conductos (Reitman and Frankel 1957; Bergmeyer 1983).

Los resultados de los estudios bioquímicos del presente trabajo (Figura 3) muestran que el grupo MP incrementó significativamente la actividad de las enzimas ALT, AST y FA al ser comparado con el grupo Control. Mientras que el grupo *L-carnitina* + MP reduce de manera parcial pero significativamente las actividades de las enzimas ALT y AST, y previene completamente el incremento de la enzima FA.

Por lo que se puede deducir que la *L-carnitina* tiene un efecto hepatoprotector frente a la toxicidad aguda inducida por MP. Consistente con nuestros resultados, otros estudios han sugerido que la suplementación con *L-carnitina* previene el daño hepático inducido con CCl<sub>4</sub>, así como por la ligación del conducto biliar común en la rata (Cetinkaya, Kantarceken et al. 2013; Kaya, Koca et al. 2015). Sin embargo, por primera vez se explora la capacidad hepatoprotectora de la *L-carnitina* durante la exposición aguda con compuestos OF.

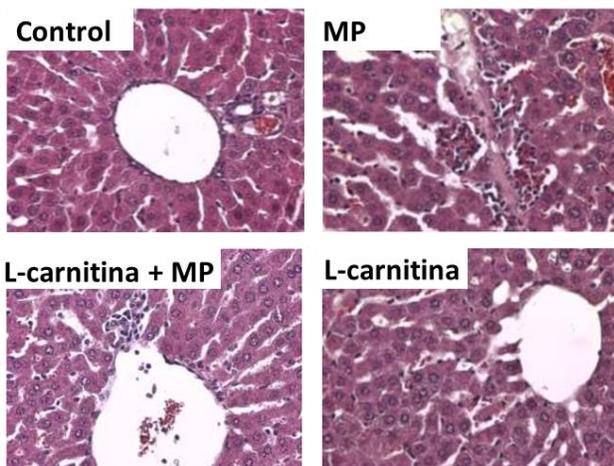


**Figura 3** Evaluación de las actividades enzimáticas de la ALT, AST y FA. Grupo control: animales sanos; Grupo MP; Grupo *L-carnitina* + MP; Grupo *L-carnitina*. MP: metil paratión. n=5 cada grupo. Cada barra representa el valor promedio de los resultados de los animales estudiados de cada grupo, realizados por triplicado  $\pm$  SE (n <5). a: significativamente diferente con respecto al grupo control, p <0.05. b: significativamente diferente con respecto al grupo MP, p <0.05

### ***L-carnitina* previene el daño estructural del parénquima hepático inducido por MP**

Las tinciones histológicas hepáticas (Figura 4) muestran que el grupo Control no presentó alteraciones estructurales en el parénquima hepático. En los hígados del grupo MP se observó una importante presencia de infiltrado inflamatorio con la presencia de pequeñas zonas necróticas.

Por otra parte, los hígados del grupo *L-carnitina* + MP, mostraron una arquitectura y organización celular más parecida al grupo Control, aunque si se puede observar presencia de infiltrado inflamatorio. Finalmente, el parénquima hepático del grupo *L-carnitina* es muy similar al grupo Control. Estos resultados son consistentes con los estudios bioquímicos obtenidos de las enzimas ALT, AST y FA. La necrosis hepática se relaciona directamente con el incremento significativo de las actividades séricas de las transaminasas.



**Figura 4** Microfotografía del hígado teñido con H&E. Fotografías representativas de cada grupo (n=5 cada grupo): Grupo control: animales sanos; Grupo MP: ratas tratadas con MP; Grupo *L-carnitina* + MP; Grupo *L-carnitina*. MP: metil paratión.40X

### *L-carnitina* previene el daño estructural del cerebro y cerebelo

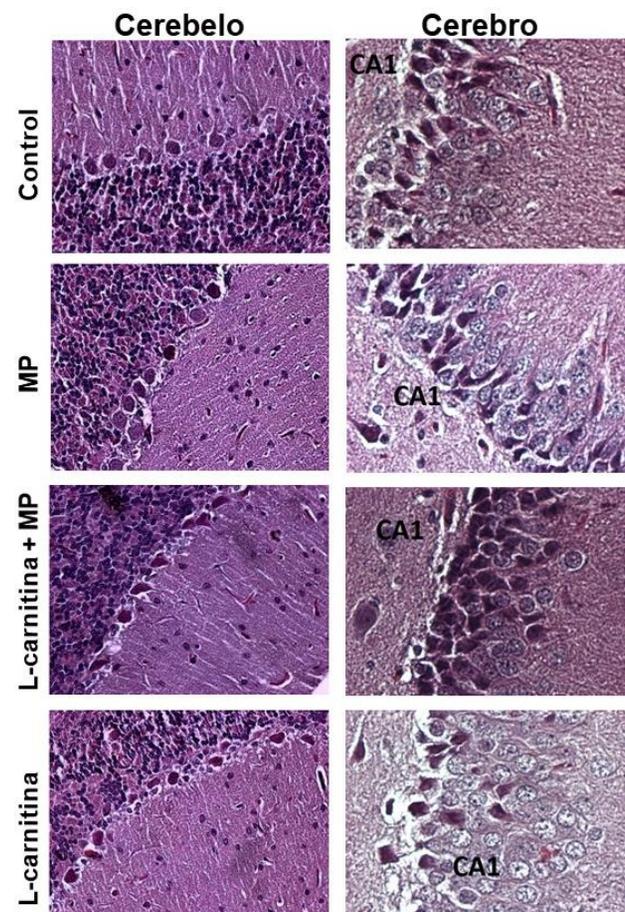
Las tinciones de H&E del cerebelo (Figura 5) en el grupo Control, muestran la histología normal, tanto en la sustancia blanca, como en las tres capas de la sustancia gris. El grupo MP muestra algunas alteraciones en la sustancia gris, siendo más evidente la diferencia entre la eosinofilia de las células de Purkinje, observándose por lo tanto más teñidas que el grupo Control. Las histologías del grupo *L-carnitina* + MP mostraron una apariencia muy parecida al grupo Control. Por otra parte, al observar las células del cerebro se observó una cadena de neuronas del hipocampo que en el caso del grupo con MP desarrollaron daño similar al descrito por isquemia, mientras que este daño disminuyó con *L-carnitina*. Diversos trabajos han descrito que *L-carnitina* posee actividad neuroprotectora (Mescka, Moraes et al. 2011).

### *L-carnitina* aminora los síntomas inducidos por la intoxicación por MP

Los síntomas característicos de la intoxicación por MP, son mareos, vómitos, diarrea, convulsiones, paro respiratorio y en casos extremos la muerte (García, Abu-Qare et al. 2003). En el modelo experimental utilizado en este trabajo, las ratas presentaron signos de intoxicación por la ingesta del MP (grupo MP), caracterizados por temblores y ojos saltados. El grupo *L-carnitina* + MP no mostró signos de intoxicación. Estas observaciones muestran ser congruentes con los resultados bioquímicos e histológicos previamente obtenidos.

### Agradecimiento

Macías Pérez agradece a PRODEP por el apoyo UASLP-PTC-597(511-6/17-7930)



**Figura 5** Microfotografía del cerebelo y cerebro teñido con H&E. Fotografías representativas de cada grupo (n=5 cada grupo): Grupo control: animales sanos; Grupo MP: ratas tratadas con MP; Grupo *L-carnitina* + MP; Grupo *L-carnitina*. MP: metil paratión.40X.

## Conclusiones

Nuestros resultados demuestran que *L-carnitina* disminuye el daño al hígado, cerebelo y cerebro inducido por la intoxicación aguda con MP.

## Referencias

- Adeva-Andany, M. M., I. Calvo-Castro, et al. (2017). "Significance of l-carnitine for human health." *IUBMB Life* 69(8): 578-594.
- Adeyinka, A. and L. Pierre (2018). "Organophosphates."
- Bergmeyer, H. U., Grabl, M., and Walter, H.E. (1983). *Enzymes. In Methods of Enzymatic Analysis*, Verlag-Chemie: Weinheim.
- Cetinkaya, A., B. Kantarceken, et al. (2013). "The effects of L-carnitine and N-acetylcysteine on carbontetrachloride induced acute liver damage in rats." *Bratisl Lek Listy* 114(12): 682-688.
- Edwards, F. L. and P. B. Tchounwou (2005). "Environmental toxicology and health effects associated with methyl parathion exposure--a scientific review." *Int J Environ Res Public Health* 2(3-4): 430-441.
- Fuentes-Delgado, V. H., Quezada-Aguilera, C.L., Martínez-Saldaña, M.C., Jaramillo-Juárez, F., Rodríguez-Vázquez, M.L., Jaramillo-González, F., Reyes-Sánchez, J.L. (2011). "Hepatotoxicidad subaguda y crónica producida por el plaguicida paratión-metílico en la rata." *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas* 42(3).
- García, S. J., A. W. Abu-Qare, et al. (2003). "Methyl parathion: a review of health effects." *J Toxicol Environ Health B Crit Rev* 6(2): 185-210.
- Humani-Pacsi, C., Sánchez-Ramírez, R., Cataño, H., Huguet-Tapia, R., & Carranza, E. (2005). "Actividad de colinesterasa plasmática y sintomatología presente en fumigadores del valle de Mala, expuestos a plaguicidas anticolinesterásicos." *Ciencia e Investigación* 8.
- Jaga, K. and C. Dharmani (2006). "Methyl parathion: an organophosphate insecticide not quite forgotten." *Rev Environ Health* 21(1): 57-67.
- Jaramillo-Juárez, F., Reyes-Sánchez, J. L., & Acevedo, M. S. (2011). *Manual de ejercicios experimentales de Farmacología*. Aguascalientes, Ags., Universidad Autónoma de Aguascalientes.
- Kaya, O., Y. S. Koca, et al. (2015). "L-carnitine reduces acute lung injury in experimental biliary obstruction." *Saudi Med J* 36(9): 1046-1052.
- Luna, L. G. (1968). *Manual of Histologic Staining Methods of the Armed Forces* New York, McGraw-Hill.
- Maldonado, C., N. Guevara, et al. (2017). "L-Carnitine supplementation to reverse hyperammonemia in a patient undergoing chronic valproic acid treatment: A case report." *J Int Med Res* 45(3): 1268-1272.
- Mescka, C., T. Moraes, et al. (2011). "In vivo neuroprotective effect of L-carnitine against oxidative stress in maple syrup urine disease." *Metab Brain Dis* 26(1): 21-28.
- Mescka, C. P., A. P. Rosa, et al. (2016). "L-carnitine Prevents Oxidative Stress in the Brains of Rats Subjected to a Chemically Induced Chronic Model of MSUD." *Mol Neurobiol* 53(9): 6007-6017.
- National-Research-Council (2011). *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*. Washington, D.C., National Academies Press.
- Reitman, S. and S. Frankel (1957). "A colorimetric method for the determination of serum glutamic oxalacetic and glutamic pyruvic transaminases." *Am J Clin Pathol* 28(1): 56-63.
- Ribas, G. S., C. R. Vargas, et al. (2014). "L-carnitine supplementation as a potential antioxidant therapy for inherited neurometabolic disorders." *Gene* 533(2): 469-476.
- Terry, A. V., Jr. (2012). "Functional consequences of repeated organophosphate exposure: potential non-cholinergic mechanisms." *Pharmacol Ther* 134(3): 355-365.
- Vanova, N., J. Pejchal, et al. (2018). "Oxidative stress in organophosphate poisoning: role of standard antidotal therapy." *J Appl Toxicol* 38(8): 1058-1070.