

**Trabajo Original**

**Toxicología Experimental**

## **Efecto de la mezcla ozono/oxígeno en el balance redox tisular en un estudio de toxicidad subcrónica en conejo.**

**Yaima Martínez<sup>1</sup>, Daylen Guancho<sup>1</sup>, Zullyt Zamora<sup>1</sup>, Frank Hernández<sup>1</sup>, Yaima Alonso<sup>1</sup>, Yana González Torres<sup>2</sup>.**

<sup>1</sup>Centro de Investigaciones del Ozono, Calle 230 y Ave 15, Reparto Siboney, Playa, Ciudad de La Habana, Cuba. Teléfono: 2712324, Email: [zullyt@infomed.sld.cu](mailto:zullyt@infomed.sld.cu) y/o [zullyt.zamora@cnic.edu.cu](mailto:zullyt.zamora@cnic.edu.cu)

<sup>2</sup>Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB), Centro de Toxicología Experimental (CETEX), Finca Tirabeque, carretera El Cacahual Km 2½, Bejucal, AP3, La Habana, Cuba, teléfono: 6837225.

---

## Resumen

Se evaluó el estado redox intracelular en tejido hepático y pulmonar en conejo adulto joven hembras de la sublínea Cenp: NZW, utilizados en un estudio de toxicidad subcrónica del ozono. En el estudio se utilizaron 10 animales por grupo, conformándose cuatro grupos: un control con oxígeno y tres grupos con diferentes dosis de la mezcla ozono/oxígeno (MOO), aplicada por vía rectal durante 90 días. Los resultados demostraron que las aplicaciones de la MOO no provocaron un incremento del marcador prooxidante dado por el contenido de las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico en tejido hepático. En cuanto a la actividad de la mieloperoxidasa en pulmón, esta aumentó significativamente solo en el grupo tratado con la dosis media de MOO (1 400). La actividad de la superóxido dismutasa total no mostró diferencias significativas entre los grupos, pero si hubo un aumento significativo en los niveles de la superóxido dismutasa mitocondrial en el grupo de dosis media y una disminución significativa de la actividad de la superóxido dismutasa citosólica en ese mismo grupo de dosis, así como también se observó un aumento significativo en la actividad de la catalasa en el grupo de dosis alta. Se concluyó que las aplicaciones de la MOO no afectaron el balance redox en esos tejidos durante 90 días.

**Palabras claves:** estrés oxidativo, mezcla ozono oxígeno, antioxidante, insuflación rectal.

---

**Abstract**

**Effect of ozone/oxygen mixture in the tisular redox state in a subchronic toxicity study in rabbits**

It was evaluated the redox balance in hepatic and lung tissues of adult young female rabbits Cenp: NZW, used in ozone subchronic toxicity study. In the study were used 10 animals by group conforming four groups, a control with oxygen and three groups with different doses of ozone/oxygen mixture administered by rectal insuflation during 90 days. There was not significant difference in the levels of thiobarbituric acid reactive substances between all the groups tested. The activity of myeloperoxidase had a significant increase in the half dose group (1400). There was not significant difference in the activity of total superoxide dismutase in the all groups. However the activity of cytosolic superoxide dismutase had a significant decrease in the half and high doses groups as where as the activity of mitochondrial superoxide dismutase was significant increased in the half dose group. The activity of catalase was significant increased at the high dose group. Our results demonstrated that ozone oxygen mixture administered did not affect the redox balance in these tissues during 90 days.

**Key words:** oxidative stress, ozone oxygen mixture, antioxidants, rectal insuflation.

## Introducción

Estudios toxicológicos en que el ozono ha sido administrado por otras vías diferentes a la inhalatoria y a dosis bajas los efectos han sido beneficiosos, demostrando la inocuidad del gas por estas otras vías.

Estudio teratogénico donde el ozono se administró por insuflación rectal en ratas (1,2 mg/kg) desde el sexto hasta decimoquinto día de la gestación en ratas Wistar, no mostró efectos teratogénicos ni de ningún otro tipo de toxicidad embrionaria ni sobre el desarrollo del útero <sup>(17)</sup>.

En estudios genotóxicos in vitro, el daño inducido por ozono a concentraciones altas 0,3 y 2 mg/m<sup>3</sup> en el ADN (rotura de la cadena) en leucocitos de sangre periférica no se manifiesta, cuando hay una concentración adecuada de antioxidantes en el medio circundante <sup>(11)</sup>.

La insuflación rectal es una de las vías de aplicación del ozono, se emplea con fines terapéuticos desde 1935 <sup>(15)</sup>. Experiencias en animales han demostrado la acción sistémica del ozono por vía rectal <sup>(3)</sup>. Es una técnica bastante ventajosa para la aplicación del ozono por el hecho de ser no invasiva y que se usa con éxitos en pacientes pediátricos, que requieren las acciones terapéuticas del ozono <sup>(13)</sup>.

## Materiales y Métodos

En el estudio fueron utilizados 40 conejos hembras nulíparas y no grávidas de la sublínea Cenp: NZW con una edad de 12 semanas y un peso promedio 1,5- 1,8 Kg, Los animales fueron distribuidos de forma aleatoria, conformando 4 grupos experimentales, un control tratado con oxígeno y otros tres tratados con la MOO.

La MOO fue aplicada por insuflación rectal, en las dosis seleccionadas de 600, 1400 y 2600 ug/animal, 3 aplicaciones a la semana durante 90 días. La MOO fue generada por un equipo OZOMED 01, fabricado en el Centro de Investigaciones del Ozono, Habana, Cuba.

Los animales se sacrificaron 24 h después de la última aplicación de la MOO y se tomaron muestras de tejidos hepático y pulmonar para las determinaciones bioquímicas empleadas como indicadores de estrés oxidativo.

#### Determinaciones Bioquímicas.

La determinación de la actividad de la mieloperoxidasa (MPO) se utilizó como una medida indirecta de la infiltración de neutrófilos en el tejido y se determinó por el método descrito por Bradley y cols <sup>(5)</sup>. Las sustancias reactiva al ácido tiobarbitúrico (SRATB), se determinó por una versión del método de Botsoglou <sup>(4)</sup>. La actividad de la catalasa (CAT) se determinó de acuerdo al método de Evans y Diplock <sup>(16)</sup>. En cuanto a la actividad de la superóxido dismutasa (SOD), se utilizó una versión modificada del método de Minami y Yoshikawa <sup>(14)</sup>. La inhibición de la isoforma citosólica (Cu/Zn SOD) se realizó agregando a la mezcla de reacción cianida de sodio (25  $\mu$ l) <sup>(1)</sup>. Las proteínas totales se determinaron por el método de Lowry <sup>(12)</sup>.

#### Análisis Estadístico.

Los datos se expresaron como las medias  $\pm$  desviaciones estándar, los cuales fueron procesados a través del paquete estadístico STATISTICA 6.0, utilizando la prueba de ANOVA factorial simple para la comparación de todos los grupos. Se realizó la prueba paramétrica de Dunnett para comparar el grupo control con oxígeno con los demás grupos experimentales y la prueba de rangos múltiples de Duncan para comparar más de un grupo experimental. El nivel de probabilidad utilizado para señalar la significación estadística fue  $p < 0,05$ .

## **Resultados**

En la tabla 1, los niveles de SRATB en los grupos tratados con MOO no presentaron diferencias significativas con respecto al grupo tratado con oxígeno ni entre los diferentes grupos tratados con la MOO. Con respecto a los marcadores antioxidantes, en la actividad de la SOD total no se mostraron diferencias significativas entre los grupos estudiados. Sin embargo, en cuanto a la actividad de la isoforma mitocondrial SOD-Mn se

obtuvo un incremento significativo en el grupo de dosis media (1 400 ug de MOO) con respecto al resto de los grupos. La SOD Cu-Zn en las dosis media (1 400 ug de MOO) y alta (2 600 ug de MOO) tuvo una disminución significativa con respecto al grupo tratado con oxígeno. En cuanto a la actividad de la CAT, se evidenció un aumento significativo de su actividad a la dosis alta de la MOO con respecto al control con oxígeno y al grupo tratado con la dosis media de la MOO.

En la tabla 2 se muestra la actividad de la MPO en pulmón. En el grupo tratado con la dosis media de la MOO, reveló un aumento significativo de su actividad con respecto al grupo control y el resto de las dosis empleadas.

## **Discusión**

La creciente aplicación médica del ozono obliga al estudio de sus posibles efectos tóxicos usando formas de administración relacionadas con su empleo terapéutico. La administración de ozono por estas vías genera un estrés oxidativo moderado inductor frecuentemente de las defensas antioxidantes enzimáticas <sup>(2)</sup>, por la inducción de cascada redox sensible mediadas por las ERO <sup>(9)</sup>.

En nuestros resultados se demostró que no hubo un aumento de los niveles del marcador prooxidante en los grupos tratados con las diferentes dosis por lo que podemos inferir que este hecho pudiera estar determinado por una activación de los sistemas antioxidantes. Resultados anteriores han demostrado que el preconditionamiento oxidativo con ozono (POO) en un modelo de choque endotóxico inducido por LPS (0,1 mg/kg) fue capaz de disminuir significativamente el contenido de SRATB <sup>(19)</sup>.

Las vías distales de los roedores son muy sensibles a los efectos del ozono <sup>(10)</sup>. En nuestros resultados la MPO en pulmón en el grupo tratado con la dosis media presentó un aumento significativo de la actividad de esta enzima, marcador de infiltración leucocitaria, corroborando que los neumocitos son sensibles a la exposición del ozono siendo en este caso una ligera respuesta porque son exposiciones controladas, en

pequeñas dosis y por vías diferentes a la inhalatoria, aspectos que define a la ozonoterapia.

Con respecto a los resultados obtenidos en la SOD, el incremento de la actividad de la isoforma SOD Mn puede estar dado por la estimulación de la síntesis proteica propiciada por la MOO <sup>(1)</sup>. La disminución de la actividad de la isoforma Cu/Zn-SOD citosólica en los grupos de dosis media y alta, coincide con los resultados de Catalá M. <sup>(7)</sup> donde la isoenzima disminuye frente a procesos de estrés oxidativo. La administración exógena de SOD y Catalasa atenúa la generación de las ERO, restringiendo su tiempo de vida media en la circulación <sup>(18)</sup>.

La actividad de la Catalasa en el grupo de dosis alta tuvo un aumento de forma significativa. Se han observado incrementos en la actividad enzimática de la SOD y la CAT en ratas expuestas a tetracloruro de carbono, inductor de daño hepático mediado por radicales libres <sup>(6)</sup>. Se ha encontrado además una familia de receptores tirosin-kinasa Abl que incluyen a los receptores c-Abl and Arg que regulan la actividad de la catalasa y son activados en respuestas al estrés oxidativo <sup>(8)</sup>.

## Conclusiones

Los resultados de este estudio indican que la MOO fue capaz de mantener un balance redox en el organismo por meses, estimulando las defensas antioxidantes, y posiblemente influyendo en la ausencia de efectos nocivos por vía sistémica que caracterizan al POO como alternativa terapéutica viable para numerosas enfermedades en que el estrés oxidativo desempeña un papel patogénico.

**Tabla 1. Comportamiento de los marcadores de estrés oxidativo en tejido hepático en conejos tratados MOO durante 90 días.**

Grupos	Dosis (ug totales)	SRATB (mmol/mg de prot)	SOD total (U/mg prot)	SOD Mn (U/mg prot)	SOD Cu-Zn (U/mg prot)	CAT (UI/g tejido)
Oxígeno	-	1,19 ± 0,73	1,13 ± 0,74	0,67 ± 0,42	0,56 ± 0,34	0,10 ± 0,03
Dosis baja (MOO)	600	1,07 ± 0,65	1,29 ± 0,65	0,68 ± 0,44	0,45 ± 0,30	0,13 ± 0,05
Dosis media (MOO)	1 400	1,75 ± 0,79	1,78 ± 0,43	1,68 ± 0,42 * <sup>a</sup> **	0,1 ± 0,28 *	0,09 ± 0,02
Dosis alta (MOO)	2 600	1,38 ± 0,62	1,06 ± 0,29	0,90 ± 0,28	0,16 ± 0,15*	0,16 ± 0,06 * #

\* Diferencia significativa con respecto al grupo con oxígeno. (p <0,05)

Letra, Diferencia significativa con respecto al grupo de dosis baja. (p <0,05)

#, Diferencia significativa con respecto al grupo de dosis media. (p <0,05)

\*\*, Diferencia significativa con respecto al grupo de dosis alta (p <0,05)

**Tabla 2. Comportamiento de la mieloperoxidasa (MPO) en tejido pulmonar en conejos tratados MOO durante 90 días.**

Grupos	Dosis (ug totales)	MPO pulmón (UI/g tejido)
Oxígeno	-	7,58 ± 3,62
Dosis baja (MOO)	600	10,28 ± 3,64
Dosis media (MOO)	1 400	13,90 ± 2,52 * <sup>a</sup> **
Dosis alta (MOO)	2 600	6,88 ± 4,37

\* Diferencia significativa con respecto al grupo con oxígeno. (p <0,05)

Letra, Diferencia significativa con respecto al grupo de dosis baja. (p <0,05)

#, Diferencia significativa con respecto al grupo de dosis media. (p <0,05)

\*\*, Diferencia significativa con respecto al grupo de dosis alta (p <0,05)

---

## Bibliografía

1. Ajamieh H et al, 2005. Role of protein synthesis in the protection conferred by ozone-oxidative-preconditioning in hepatic I/R. *Transplant International*, 18; 604-612.
2. Ajamieh H, et al, 2002. Similar protective effect of ischaemic and ozone oxidative preconditioning in liver ischemia/reperfusion injury. *Pharmacol Res* , 45: 333.
3. Bocci V. Oxygen Ozone therapy, 2002. A critical evaluation. All Dondrecht, .The Netherlands: Kluwer Academy Publisher: 119-322.
4. Botsoglou NA, Fletouris DL, Papageorgius GE, Vasilopoulos VN, Mantis AJ, Trakatellis A, 1994. Rapid, sensitive and specific thiobarbituric acid method formeasuring lipid peroxidation in animal tissue, food, and feedstuff samples, *J. Agric. Food Chem*; vol. 42, pp. 1931-1937.
5. Bradley PP, Priebe DA, Chirstensen RD, Rothstein G, 1982. Measurement of cutaneous inflammation: Estimation of Neutrophil content wint an enzyme marker, *J Invest Dermatol* ; 78: 206-9.
6. Candelario-Jalil E et al, 2001. Oxidative preconditioning affords protection against carbon tetrachloride-induce glycogen depletion and oxidative stress in rats. *J Appl Toxicol* ; 21:297-301.
7. Catalá M, 2002. Mecanismos Bioquímicos del shock endotóxico: Respuesta hepática al estrés oxidativo. Tesis de Doctorado Universidad Complutense de Madrid.
8. Cheng Cao, Yumei Leng, Donald Kufe, 2003. Catalase Activity Is Regulated by c-Abl and Arg in the Oxidative Stress Response. *The Journal of Biological Chemistry*; Vol. 278, No. 32, Issue of August 8, pp. 29667–29675.
9. Dröge W, 2002. FREE radicals in the physiological control of cell function. *Physiol REV*; 82: 47.
10. Hyde, MD et al, 1994. Morphometric approaches for avaluating pulmonary toxicity in mammals: implication for risk assessment. *Risk anal*; 14:293-302.

11. Larini A, Bocci V, 2005. Effects of ozone and isolated pberiferal blood mononuclear cells. *Toxicol in Vitro*; 19:55-61.
12. Lowry OH, Rosebrough Nj, Farr AL, Randall RJ, 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent *J. Biol. Chem.* vol. 193, no. 1 pp. 265-275.
13. Menéndez, S. y col, 2008. Ozono, aspectos básicos y aplicaciones clínicas. Centro de Investigaciones del Ozono, CNIC, Cuba.
14. Minami M., Yoshikawa H, 1979. A simplify assay method of superoxide dismutase activity for clinical use. *Clin. Chem. Acta* ; vol. 92, pp. 337-342.
15. Payr E.1935. Über Ozonbenhandlung inder chirurgie. *Münech Med Wochensch.*; 82: 220-91
16. Rice-Evans CA, Diplocks AT,1991.Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology, in *Techniques in Free Radicals Research*, van Knippenber PH BurdonRH, Ed. 1991; vol. 22, pp-199-201, Elsevier , Amsterdam.
17. Rodríguez M.D., Menéndez S., Gómez M. y García H, 1989. "Estudio teratogénico del ozono administrado por insuflación rectal a ratas Wistar", *Revista CENIC Ciencias Biológicas*, 20(1-2-3):28-32.
18. White CW, Jackson JH, Abuchowski A, et al, 1989. Polyethylene glycol-attached antioxidant enzymes decrease pulmonary oxigen toxicity in rats. *J Appl Physiol* 1989; 66: 584.
19. Zamora Z. et al, 2005. Effect of ozone oxidative preconditioning on TNF- $\alpha$  release and antioxidant- prooxidant intracellular balance in mice during endotoxic shock. *Mediators of Inflammation*; 1, 16-22.

**Recibido: 01/09/09**

**Aceptado: 09/09/09**