

Anafilaxia cutánea pasiva en ratas usando suero de ratones previamente tratados con ozono mediante insuflación rectal

Zullyt B. Zamora Rodríguez, José Turrent Figuera, Silvia Menéndez Cepero y Ana Carballo Reyes.

Centro de Investigaciones del Ozono, Centro Nacional de Investigaciones Científicas, Apartado Postal 6990, Ciudad de La Habana, Cuba.

Recibido: 25 de noviembre de 1997. Aceptado: 20 de diciembre de 1997.

Palabras claves: anafilaxia, ratón, ovoalbúmina, reacción anafiláctica.
Key words: anaphylaxy, mouse, ovalbumin, anaphylactic reaction.

RESUMEN. El empleo de la ozonoterapia es muy discutida. Algunos reportes muestran que el ozono es un potente agente oxidante al ser empleado por vía inhalatoria, provocando diferentes daños (asma bronquial obstrucción pulmonar crónica y fibrosis intersticial del pulmón). Otros artículos abordan beneficios terapéuticos cuando el gas no es administrado por vía inhalatoria y se suministra en dosis controlada. En este trabajo se utiliza la reacción de Anafilaxia Cutánea Pasiva para realizar un estudio preliminar que aborda el efecto del ozono sobre la reacción anafiláctica. Para ello, se emplearon 90 ratones NMRI, los cuales se dividieron en tres grupos de 30 animales cada uno. Al primer grupo se le aplicaron 20 tratamientos de ozono (1 mL) a una concentración de 50 µg/mL diariamente, utilizando la vía rectal; el segundo fue tratado con oxígeno y el tercero se consideró grupo control. Todos los animales fueron sensibilizados con una disolución de ovoalbumina, a los 5 y 19 d. Después de terminado el tratamiento (24 h), los animales fueron sacrificados y su sangre total fue colectada. los sueros se conservaron a -70 °C. Posteriormente, estos sueros fueron inoculados intradérmicamente (0,1 mL) en la espalda de ratas machos Sprague Dawley. Transcurridas 24 h, se les inyectó por vía endovenosa una disolución de albúmina con Azul de Evans y pasada 1 h de la inoculación, se realizó la evaluación de la reacción teniendo en cuenta el diámetro de la mancha. Los resultados indicaron que hay una disminución estadísticamente significativa de la reacción anafiláctica del grupo ozono con 1,2 mm, en comparación con el obtenida con el oxígeno de 8,6 mm y con el grupo control 12,4 mm. Por lo cual se puede concluir que el ozono interviene en la síntesis de anticuerpos reagínicos.

ABSTRACT. Ozone therapy applications are a very controvertial topic. Many papers show this potent oxidant agent as a pollutant related with the incidence of different illnesses (bronchial asthma, chronic obstructive pulmonary disease and interstitial pulmonary fibrosis). Other papers report therapeutical benefits when the gas is applied by a not harmful way and with a suitable dose. Based on the passive anaphylaxis cutaneous reaction, a preliminary study about the ozone effect on this anaphylactic reaction is performed. 90 NMRI mice were used, divided into three groups of 30 animals each. One milliliter a mixture ozone/oxygen at a concentration of 50 µg/mL was applied daily, up to 20 treatments to the first group using rectal via. Group 2 received oxygen in the same way and time as group 1, and group 3 received no treatment (positive control group). All animals were sensitized with an ovalbumin solution at the day 5 and 19. Twenty four hours after finishing the treatments, animals were sacrificed, total blood was collected and the correspondent serum was stored at -70 °C. The serum (0.1 mL) of the different groups was injected at both sides back of Sprague Dawley male rats (that were not submitted to any kind of medication or drug). After 24 h, an ovalbumin solution with Evans' Blue dye was injected intravenously and the reaction measured one hour later. The results indicated the presence of significant statistical differences on the anaphylactic reactions based on rats skin lesion diameters, among ozone (1.2 mm), oxygen (8.6 mm) and positive control group (12.4 mm). It is concluded that ozone, applied by rectal insufflation in mice, influenced on the reaginic antibody synthesis reaction.

INTRODUCCION

La anafilaxia está caracterizada por un colapso circulatorio que ocurre a veces cuando una persona que fue intensamente inmunizada contra un antígeno, recibe por vía intravenosa una dosis subsiguiente de dicho antígeno específico. Probablemente se hayan formado antígenos en todos los tejidos, en estrecha relación con el sistema vascular, de manera que inmediatamente después de inyectar el antígeno, la lesión celular libera las sustancias tóxicas.¹ Los mastocitos son recubiertos por un determinado tipo de anticuerpos, cuya región Fc se une específicamente a sitios de la superficie del mastocito.² Los anticuerpos homocitotrópicos más efectivos pertenecen a la clase IgE, pero se sabe que anticuerpos IgG también pueden actuar como reaginas, aunque aún no se ha determinado el grado de su contribución al estado alérgico en el hombre.² Las reaginas IgG se diferencian de las IgE en su insensibilidad relativa al calor suave y a la reducción con 2-mercaptoetanol, y particularmente en su menor afinidad por los mastocitos. Mientras que los anticuerpos IgE se detectan en el sitio de la inyección intradérmica que se ha efectuado a un individuo normal durante varias semanas, la IgG se dispersa en un día.² La sensibilidad anafiláctica puede ser observada en piel, usando la anafilaxia cutánea pasiva (ACP) introducida por Ovary, que utiliza esta reacción

dérmica como un indicador extremadamente sensible de anticuerpos reagínicos. Por ejemplo, se puede inyectar a un animal normal diluciones altas de suero de cobayo, con anticuerpos de la clase α_1 -globulina, y a continuación efectuar una inyección intravenosa del antígeno con un colorante (Azul de Evans), la reacción anafiláctica en la piel originará la liberación de aminas vasoactivas y, por tanto, ocasionará una concentración local del colorante azul.²

Las IgE se encuentran presentes en el suero, y sólo una proporción muy pequeña de células plasmáticas en el organismo sintetizan esta inmunoglobulina.² Este anticuerpo se encuentra estrechamente vinculado con el proceso alérgico, el cual reflejaría el estado de inmunidad y protección contra un antígeno particular.³ Se ha demostrado que el proceso de síntesis de la IgE se encuentra regulado por diferentes citocinas (IL-4 y IFN- γ).³

Recientes reportes han demostrado que el ozono actúa como un inductor de citocinas, por lo cual se le atribuye la propiedad de inmunomodulador.⁴⁻⁸

El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto del ozono sobre la formación de inmunocomplejos, determinados biológicamente mediante el modelo de anafilaxia cutánea pasiva.

MATERIALES Y METODOS

Animales

Fueron utilizados 90 ratones hembras pertenecientes a la línea NMRI (20-22 g) y cinco ratas macho Sprague Dawley (180-200g) provenientes del Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB), los cuales fueron mantenidos en condiciones de bio-terio, con temperatura y humedad controlados. Además, fueron alimentados con una dieta estándar (CENPALAB) y agua *ad libitum*.

Tratamiento y sensibilización

Los animales se dividieron en tres grupos de 30 cada uno. El primer grupo fue tratado con ozono a una dosis de 2,8 mg/kg de peso, al segundo se le administró oxígeno, utilizando para ello en ambos casos la vía rectal, mientras que el tercer grupo se clasificó como control sin tratamiento. En total fueron aplicadas 20 sesiones de cada tratamiento. Estos animales a la vez fueron sometidos a un proceso de inmunización para lo cual se siguió el esquema siguiente: al quinto día de haber co-

menzado el tratamiento, se realizó una primera inyección intraperitoneal de una disolución con 0,05 mg de ovoalbúmina (BDH, USA) y 0,01 g de $KAl(SO_4)_2 \cdot 12H_2O$ (URSS) por cada animal en 0,2 mL de disolución salina, después a los 14 d se les inyecta una segunda dosis (0,2 mL) con la misma disolución pero diluida 1/49 en PBS. A los 21 d después de la inmunización, los animales fueron desangrados. Se colectó una mezcla de sangre por cada uno de los grupos, en tubos de ensayo de 10 mL y se sometió a centrifugación de 3 000 r/min. Los sueros obtenidos fueron conservados a -70 °C.

Prueba anafiláctica

Esta prueba fue realizada en las ratas macho Sprague Dawley. Estas fueron rasuradas en la zona de la espalda, donde 24 h después, el suero diluido 1/50 en disolución salina, fue intradérmicamente inyectado por duplicado (cada muestra fue ensayada en la piel de cinco ratas receptoras). Trascorridas 24 h del período de sensibilización, los animales fueron inyectados por vía intravenosa con 1mL de una disolución de Azul de Evans 1 % y ovoalbúmina 0,1 %, utilizando para ello, la vena del pene. Treinta minutos después, los animales fueron sacrificados en atmósfera de éter, la piel dorsal fue removida y se realizó la evaluación por la porción interna de la piel, mediante el método de medición del diámetro de las reacciones.⁹

Análisis estadístico

Los datos fueron procesados estadísticamente, mediante la prueba no paramétrica Kruskal Wallis para la comparación entre grupos ($p < 0,05$).

RESULTADOS Y DISCUSION

El grupo tratado con ozono presentó un valor significativamente

inferior al resto (Control y tratamiento con oxígeno), lo que sugiere una relación entre la síntesis de anticuerpos reagínicos y el tratamiento con ozono en ratones NMRI (Tabla 1).

El mecanismo de producción de estos anticuerpos se encuentra regulado por citocinas. Estudios realizados recientemente,³ muestran que en el proceso de secreción de la IgE, están involucradas la IL-4 y el IFN- γ , según plantean los autores, la IL-4 parece ser un factor crucial que promueve la inducción o mejoramiento de la secreción de IgE por células mononucleares.¹⁰ Este efecto de la IL-4 sobre la síntesis de IgE es suprimido por IFN. Bocci y colaboradores⁵ han demostrado que el ozono a concentraciones comprendidas entre 10-80 μ g/mL de sangre, produce la liberación de citocinas tales como interferón IFN γ y β , factor de necrosis tumoral (TNF- α) interleucinas IL1 β , 2, 4, 6, 8 y 10, factor estimulador de colonia granulocito-macrófago GM-CSF y activa el factor de crecimiento transformante TGF- β 1.⁵

Teniendo en cuenta los resultados de este trabajo y lo demostrado por Bocci y colaboradores en 1992, se puede sugerir una hipótesis que explique la posible vía por la cual el ozono puede suprimir la síntesis de anticuerpos reagínicos y es la siguiente: el ozono incrementa la liberación de IFN γ , el cual actúa como fuerte antagonista de la actividad de la IL-4.

Conociendo que una de las funciones de la IL-4 es la inducción de la síntesis de isotipos de IgE se puede esperar la disminución en la concentración de esta inmunoglobulina.

Dicha hipótesis será dilucidada en estudios futuros mediante la determinación de citocinas en el mecanismo referido.

Tabla 1. Resultados del análisis estadístico.

	Grupo	n	$\bar{X} \pm DE$ (mm)
	Ozono (1)	10	1,2 \pm 0,421
	Oxígeno (2)	10	8,6 \pm 3,405
	Control (3)	10	12,4 \pm 1,074
$p < 0,05$	1/2		0,000 2
$p < 0,05$	1/3		0,000 2
$p < 0,05$	2/3		0,001 5

CONCLUSIONES

En condiciones de trabajo como las de este estudio, el ozono es capaz de intervenir en la síntesis de anticuerpos reagínicos IgE.

Corroborar los resultados obtenidos, aplicando un método cuantitativo de determinación de IgE.

BIBLIOGRAFIA

1. Guyton A. Tratado de fisiología Médica. Capítulo 14, 2da Edición, Edición Revolucionaria, La Habana, 167, 1966.
2. Roitt M.I. Inmunología Esencial, Capítulo 8 Hipersensibilidad, Edición Revolucionaria, 210, 1982.
3. Sutherland M., Blaser K., Péne J. Effects of interleukin-4 and interferon on the secretion of IgG4 from human peripheral blood mononuclear cells, *Allergy*, **48**, 504, 1993.
4. Bocci V. Ozonization of Blood for the therapy of viral diseases and Immunodeficiencies. A hypothesis, *Medical Hypotheses*, **39**, 30, 1992.
5. Bocci V., Luzzi E., Corradeschi F., Paulesu L., Di Stefano A. Studies on the biological effects of ozone: 3. An attempt to define conditions for optimal induction of cytokines, *Lymphokine Cytokine Res.*, **12**, 121, 1993.
6. Bocci V., Luzzi E., Corradeschi F., Paulesu L., Rossi R., Cardaioli E., Di Simplicio P. Studies on the biological effects of ozone: 4 Cytokine production and glutathione levels in human erythrocytes, *J. Biol. Regul. Homeost. Agents*, **7**, 133, 1993.
7. Bocci V., Paulesu L. Studies on the biological effects of ozone: 1 Induction of interferon gamma on human leucocytes, *Haematologica*, **75**, 510, 1990.
8. Bocci V., Luzzi E., Corradeschi F., Silvestri S. Studies on the biological effects of ozone: 6 Production of transforming growth factor b by human blood after ozone treatment, *J. Biol. Regul. Homeost. Agents*, **8**, 108, 1994.
9. Ovary Z. Handbook of Experimental Immunology, Immunochimistry Edited by D.M. Weir, Blackwell Scientific Publication, Vol. 1, Fourth Edition, 33.1, 1986.
10. Del Prete G., Maggi E., Parronchi P., Chretien I., Tiri A., Macchia D., Ricci M., Banchereau J. Jan De Vries and Romagnani S. IL-4 is an essential factor for the IgE synthesis induced in vitro by human T cell clones and supernatants, *J. Immunol.*, **140**, 4193, 1988.