

Estudio estructural y ultraestructural de la histología del recto en ratones previamente tratados con ozono mediante insuflación rectal

José Turrent Figueras, Carlos Alfonso Sabatier,* Odelsa Ancheta Niebla,** Silvia A. Menéndez Cepero, Angel Casacó Parada,** Ana L. Carballo Reyes, Sandra Rodríguez.**

Centro de Investigaciones del Ozono, Apartado Postal 6880, *Centro de Investigaciones Médico-Quirúrgicas, **Centro Nacional de Investigaciones Científicas, Ciudad de La Habana, Cuba.

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

Palabras clave: ozono, insuflación rectal, histología.
Key words: ozone, rectal insufflation, histology.

RESUMEN. El ozono es reconocido en frecuentes publicaciones como un importante contaminante del aire ambiental con potente poder oxidante, siendo capaz de producir efectos adversos para la salud en humanos y en animales. Por otra parte, en la práctica clínica se conoce de los beneficiosos efectos terapéuticos del ozono cuando se utiliza de forma adecuada. En este trabajo los autores se propusieron la tarea de estudiar, mediante microscopía óptica y electrónica, la histología del recto en ratones previamente tratados con ozono por insuflación rectal (20 sesiones a dosis equivalentes a las terapéuticas usadas en humanos), comparando los resultados con un grupo control. En este estudio, en las muestras de recto analizadas, no se observaron cambios morfológicos.

ABSTRACT. Ozone is recognized in frequent publications as a ubiquitous air pollutant with powerful oxidizing capacity. Higher concentrations of inhaled ozone are sufficient to cause adverse effects to humans and animals. In clinical practice, it has been demonstrated the therapeutic effects of ozone therapy, when it is applied avoiding the airways and at appropriate doses. The aim of this paper is to study the rectal histology (using optical and electronic microscopy) of mice previously treated with rectal ozone (20 sessions, in doses equivalent to therapeutic doses used in humans), comparing with a control group without ozone. In this study any morphological changes were observed.

INTRODUCCION

El ozono es reconocido en frecuentes publicaciones como un importante contaminante del aire ambiental con potente poder oxidante,^{1,2} siendo capaz de producir efectos adversos para la salud cuando se pone en contacto con las vías aéreas tanto de humanos como de animales.³

En humanos, ha sido establecido que cortos periodos de exposición al ozono por vía inhalatoria producen una plétora de respuestas pasajeras que incluyen: reducción en la función ventilatoria; incremento en la sintomatología, permeabilidad y reactividad del árbol respiratorio; aumento de las células y mediadores de la inflamación, así como una

disminución a nivel alveolar de los neumocitos Tipo I.³⁻⁵

Los fluidos obtenidos mediante lavado broncoalveolar en humanos expuestos al ozono por vía respiratoria muestran un incremento en el infiltrado de neutrófilos y citocinas¹ y algunos investigadores de hecho correlacionan el infiltrado de neutrófilos haciéndolo dependiente de los niveles elevados de interleucina 8 (IL-8) encontrados en estos fluidos.³ También ha sido reportado que el daño que causa el gas cuando es inhalado está relacionado con la liberación de ácido araquidónico de la membrana celular, lo que condiciona una elevación de los leucotrienos que son iniciadores de la quimio-

taxis. Por esta vía, los neutrófilos son atraídos hacia el tejido pulmonar causando la injuria tisular.⁶

En animales de experimentación que inhalan ozono durante horas o días se producen alteraciones en la bioquímica y en la morfología pulmonar, así como potenciación en la infección bacteriana respiratoria. Los cambios morfológicos se observan en los bronquiolos terminales y en los alvéolos, apreciándose daños en las células ciliadas y el epitelio alveolar Tipo I. Estas estructuras son reemplazadas con posterioridad por células Clara proliferativas y células epiteliales Tipo II, respectivamente.² También ha sido reportada la presencia de nódulos tumorales (adenomas) sobre la superficie pleural de animales expuestos al ozono por vía respiratoria, con una mayor significación con relación a grupos controles. Otras alteraciones celulares incluyen hiperplasia y metaplasia, las cuales pueden ser consideradas como reacciones inflamatorias.² En este mismo sentido se reporta que en animales, el ozono por la vía inhalatoria causa un efecto dependiente de la dosis, generándose inflamación en la región centriacinar del pulmón con fibrosis ulterior a ese nivel.⁷ Se ha reportado también que la exposición al ozono por esa vía promueve o causa de forma directa, daño sobre el DNA.⁸

No obstante, estas evidencias, otros autores han obtenido resultados que difieren y a veces muestran

cierta paradoja con relación al resto de las investigaciones. Así por ejemplo, se señala que la exposición al ozono por vía inhalatoria no produjo efectos carcinogénicos ni incrementó la incidencia de neoplasmas pulmonares en ratas de ambos sexos⁷ y Schulz reporta inclusive, efectos anticarcinogénicos en ratones NMRI tratados con uretano y ozono.⁹

Ha sido descrito también un fenómeno de tolerancia al ozono cuando éste es inhalado a bajas dosis durante períodos de tiempo prolongados en animales de experimentación, relacionándose este efecto con un incremento en los niveles de enzimas antioxidantes como la glutatión S-transferasa, glutatión peroxidasa, catalasa y superóxido dismutasa, específicamente en aquellos sitios pulmonares mayormente expuestos al gas.^{10,11} Otro estudio encontró atenuación en la injuria aguda pulmonar al ozono cuando previamente expuso ratas a dosis relativamente bajas del gas durante siete días seguidas de altas concentraciones, sugiriendo que la preexposición a estas dosis, disminuye la permeabilidad de las vías aéreas bajas para cuando enfrenten mayores concentraciones de ozono.¹²

Con relación a las discrepancias encontradas relativas al ozono y sus efectos adversos sobre el aparato respiratorio, desde el punto de vista epidemiológico, se plantea que sólo unos pocos trabajos han sido realizados para estudiar los efectos relacionados con la exposición al ozono por vía inhalatoria, y que se necesitan más estudios para designar y distinguir entre efectos agudos y pasajeros del ozono así como para determinar los efectos prolongados de este gas sobre el prematuro envejecimiento pulmonar, la sintomatología y la mortalidad, recomendándose para futuros estudios, la recolección extensiva y detallada de otras variables que pudieran de forma positiva o negativa confundir o modificar los resultados que se obtengan.¹³

En la práctica clínica se conoce de los beneficiosos efectos terapéuticos del ozono cuando se excluye la vía inhalatoria y se utilizan, además, dosis adecuadas.

En este trabajo los autores se propusieron la tarea de estudiar la histología rectal de ratones previamente tratados con ozono por insuflación rectal, teniendo en cuenta que existen trabajos en los cuales se estudian las características histológicas relacionadas con la aplicación

local de este gas, pero que difieren con los esquemas de tratamiento empleados por ellos en sus modelos experimentales.

MATERIALES Y METODOS

Animales

Se emplearon 30 ratones NMRI hembras (Centro Nacional de Producción de Animales para Laboratorio, Ciudad de La Habana) con un peso promedio de 20 g los cuales fueron mantenidos en condiciones *ad libitum* para la realización del experimento. Los animales fueron divididos aleatoriamente en dos grupos equitativos:

- Grupo A: (Control). Estos ratones no recibieron medicación o tratamiento alguno.
- Grupo B: (ozono). Este grupo de animales recibió tratamiento mediante insuflación rectal y se le aplicó 1 ml de una mezcla ozono-oxígeno a una concentración de 39 mg/L, una vez al día, de lunes a viernes, hasta completar 30 aplicaciones. La canulación rectal se logró introduciendo la sonda 1 cm más allá del esfínter anal.

Materiales

Para la insuflación rectal del gas se emplearon cánulas plásticas inertes al ozono de tamaño adecuado y jeringuillas de cristal. La generación del ozono se realizó con un equipo OZOMED (Centro Nacional de Investigaciones Científicas, Ciudad de La Habana).

Obtención de las muestras

Una vez concluida la fase de tratamiento, se procedió al sacrificio de los animales mediante desangrado por la vía axilar delantera derecha. Tras la disección quirúrgica y exposición visceral se obtuvo un fragmento de recto de 1 cm de longitud a una distancia aproximada de 1 cm por encima del esfínter anal. Todas las muestras obtenidas fueron debidamente rotuladas.

Procesamiento histológico

Microscopia óptica. Después de un período de aproximadamente de 10 h de fijación en la disolución de formaldehído al 10 %, a las muestras obtenidas se les realizaron técnicas convencionales de procesamiento histológico para microscopia óptica por inclusión en parafina y coloración con hematoxilina y eosina, realizándose posteriormente cortes de aproximadamente 4 mm de grosor para lo cual se utilizó un micrótopo de corte vertical (Leitz). Las láminas fueron

observadas al microscopio. El estudio histopatológico se realizó a ciegas, ya que el especialista que evaluó las láminas desconocía el método terapéutico aplicado.

Microscopia electrónica. Para este estudio se escogieron al azar dos muestras de animales considerados controles y tres muestras de animales tratados con ozono mediante insuflación rectal. Todas las muestras fueron estudiadas por microscopia electrónica de transmisión. Se prefijaron en glutaraldehído al 3,2 % en amortiguador cacodilato y la fijación se realizó en OsO₄ al 2 % en el mismo amortiguador. Se deshidrataron en alcohol de concentración creciente, se filtraron e incluyeron en resina Spurr. Se realizaron los cortes, se contrastaron y observaron en el microscopio electrónico JEM 100 (JEOL).

RESULTADOS Y DISCUSION

La temática de la ozonoterapia sigue siendo hoy día fuente de grandes controversias a nivel mundial, y uno de los puntos más polémicos de este campo es precisamente el aspecto toxicológico.

Mucho ha sido publicado con relación a los efectos que produce el ozono sobre las vías respiratorias de humanos o animales cuando es inhalado, aunque existen reportes contradictorios. Sin embargo, en lo tocante a otras vías de administración del ozono y estudios histológicos, poco ha sido divulgado.

En la actualidad, no se puede negar que la utilización del ozono con fines terapéuticos ha permitido resultados satisfactorios en una amplia variedad de enfermedades,^{14,15} y además, estos resultados, obtenidos tras la aplicación consecuente y cuidadosa de la ozonoterapia, prometen resultados alentadores.

Dentro de las principales ventajas de la ozonoterapia se destacan: carencia de toxicidad y estimulante de la producción de citocinas, acompañado por un mejoramiento en la oxigenación y el metabolismo.¹⁶

Desafortunadamente, el poco y sencillo estudio de las bases biológicas de la ozonoterapia, la experiencia clínica, que aunque vasta, se ha mantenido limitada a la práctica de la medicina privada resultando en anécdotas y modismos con escasa publicación y finalmente, el conocimiento de que el ozono es uno de los peores contaminantes que puede generar la formación de com-

puestos oxidantes, han originado comprensiblemente un fuerte perjuicio para su empleo.¹⁷

Por todos estos aspectos, se hace necesario la realización de estudios que permitan dilucidar la existencia o no de alteraciones o daño a nivel tisular cuando se emplea el ozono con fines terapéuticos a dosis adecuadas y se excluye la vía inhalatoria para su aplicación. En tal sentido, ha sido orientado el objetivo fundamental del presente trabajo.

Los resultados de este estudio coinciden con los reportes de otros autores, al no encontrar por ninguna de las técnicas empleadas, alteraciones morfológicas cuando el ozono se aplicó de acuerdo con el esquema de tratamiento aquí seguido (Figuras 1 y 2).

En diferentes investigaciones en las cuales ha sido estudiada la morfología tisular tras la aplicación del ozono a dosis adecuadas y excluyendo la vía inhalatoria, no se han reportado alteraciones estructurales.

Rokitansky, en un estudio en el cual trata de esclarecer los efectos del ozono y sus metabolitos sobre diferentes estructuras celulares, demuestra que en animales de experimentación en los cuales se aplica el ozono por vía intravenosa e intraperitoneal no se visualizan daños celulares mediante microscopía electrónica, refutando así, la hipótesis de la citotoxicidad del ozono.¹⁷ Estudios posteriores también han obtenido resultados similares.

En una investigación¹⁸ para la cual se emplearon ratas de la cepa SHR, no se observaron alteraciones morfológicas mediante microscopía óptica en el recto, colon e intestino delgado de esos animales cuando se empleó el ozono por insuflación rectal a dosis variables durante quince días, incluyendo un grupo con una dosificación equivalente a la máxima terapéutica utilizada en el humano. Estos resultados son muy similares a los obtenidos en la presente investigación.

Otro estudio¹⁹ en el que se aplicó ozono a ratas y ovejas por vía intraperitoneal, no se evidenció cambios histológicos en hígado y pulmón y sí corroboró la existencia de alteraciones pulmonares tanto clínicas como morfológicas cuando el ozono se administra por vía inhalatoria.

En estudios ultraestructurales^{20,21} por microscopía electrónica en diferentes vísceras de ratas (corazón, pulmón, hígado y bazo) expuestas al ozono a diferentes concentraciones por vía intraperitoneal e insuflación

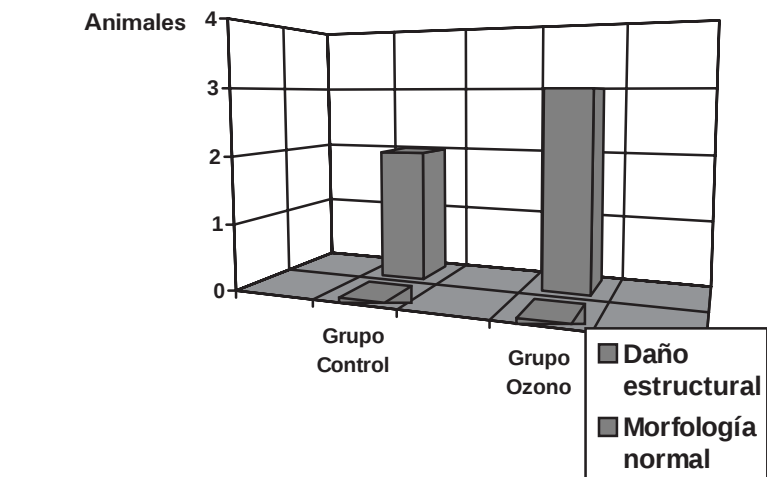


Fig. 1. Resultados correspondientes a los análisis por microscopía óptica.

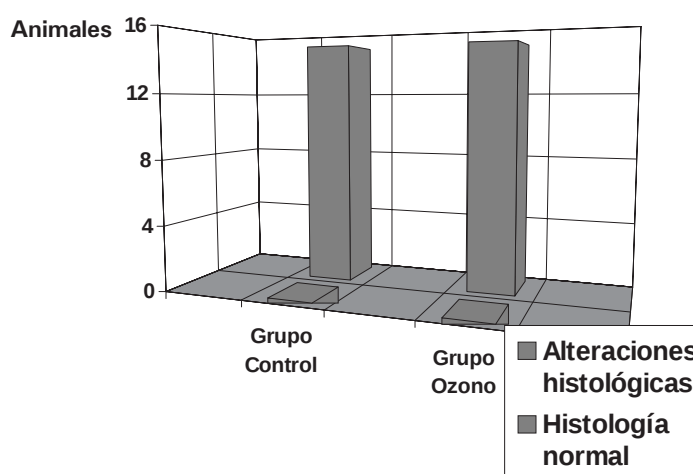


Fig. 2. Resultados correspondientes a los análisis por microscopía electrónica.

rectal, no se evidenciaron cambios morfológicos en las piezas analizadas.

Un experimento realizado en ratas hipercolesterolémicas demostró, mediante microscopía óptica, que no se producen alteraciones morfológicas en diferentes órganos de los animales previamente tratados con ozono y sin embargo, en dos animales en los cuales no se aplicó el ozono, se detectaron zonas de necrosis cardíaca, por lo que se sugirió que el ozono podría ejercer una función protectora a nivel cardiovascular²² y endotelial.²³

La acción protectora de este gas también se pudo apreciar en otro experimento en el cual se empleó el tetracloruro de carbono (conocido inductor del daño hepatocelular condicionado por la generación de especies reactivas del oxígeno) una vez finalizado el tratamiento con ozono mediante insuflación rectal, obteniéndose una correspondencia entre los indicadores oxidativos, los marcadores hepáticos y los estudios histopatológicos. Un hallazgo rele-

vante de este trabajo fue el haber encontrado una disminución significativa en el número de células hepáticas dañadas en el grupo de animales tratados con ozono con relación al control,²⁴ lo cual demuestra que el ozono es capaz de proteger a las células frente a la injuria producida por los radicales libres del oxígeno. Este fenómeno, conocido como preconditionamiento oxidativo, puede estar en relación con los resultados de otros autores que encontraron niveles elevados de enzimas antioxidantes en el pulmón^{10,11} y atenuación del daño tisular pulmonar¹² tras la inhalación del ozono en animales de experimentación.

La continuación de estudios con similares objetivos investigativos, permitirá corroborar el planteamiento de que la aplicación del ozono de forma controlada no produce daño ni alteraciones morfológicas, contribuyendo así, a una mayor y mejor aceptación de esta terapéutica, la cual ha demostrado resultados beneficiosos en una amplia variedad de enfermedades.

CONCLUSIONES

El ozono aplicado mediante insuflación rectal a la dosis y por la vía utilizadas en esta investigación, no produce cambios morfológicos en el recto de los animales estudiados.

BIBLIOGRAFIA

1. Wright D.T. *et al.* Ozone stimulates release of platelet activating factor and activates phospholipases in guinea pig tracheal epithelial cells in primary culture. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 127, 27, 1994.
2. Victorin K. Review of genotoxicity of ozone. *Mutation Research*, 277, 221, 1992.
3. McBride D.E. *et al.* Inflammatory effects of ozone in the upper airways of subjects with asthma. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 149, 1192, 1994.
4. Morton L. Use of human lung tissue for studies of structural changes associated with chronic ozone exposure: Opportunities and critical issues. *Environ. Health Persp.*, 102, 208, 1993.
5. Madden M.C. Eling T.E. Dailey L.A. Friedman M. The effect of ozone exposure on rat alveolar macrophage arachidonic acid metabolism. *Exp. Lung Res.*, 17, 47, 1991.
6. Doelman C.J.A. Reactive oxygen species and airway. Ed. Febodruk, Amsterdam, 7-8, 1991.
7. Boorman G.A. Ozone and ozone-4 (N-nitrosomethylamino-1-3(3-pyridyl)-1-butanone in Fisher-344/N rats. *Tox. and Pathol.*, 22, 545, 1994.
8. Cajigas A., Mitchell G., Beam C., Steinberg J.J. Ozonation of DNA forms adducts: A 32P-DNA labeling and Thin-Layer Chromatography technique to measure DNA environmental biomarkers. *Arch. of Environ. Health*, 49, 25, 1994.
9. Schulz S. Anticarcinogenic effect of inhaled ozone/oxygen in urethan-treated NMRI-mice. *Proceedings of the Ninth Ozone World Congress* (New York), 3, 69, 1989.
10. Plopper C.G., Duan X., Buckpitt A.R., Pinkerton K.E. Dose-dependent tolerance to ozone. IV. Site-specific elevation in antioxidant enzymes in the lung of rats exposed for 90 days or 20 months. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 127, 124, 1994.
11. Duan X., Buckpitt A.R., Plopper C.G. Variation in antioxidant enzyme activities in anatomic subcompartments within rat and rhesus monkey lung. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 123, 73, 1993.
12. Van der Wal W.A., van Bree L., Marra L., Rombout P.J. Attenuation of acute lung injury by ozone inhalation. The effect of low level pre-exposure. *Toxicol. Lett.*, 72(1-3), 291-298, (Jun. 1994)
13. Muñoz A. Design and analysis of studies of the health effects of ozone. *Environ. Health Persp. Supp.*, 101, 231, 1993.
14. Menéndez S., Iglesias O., Bidot C., Puga A., Carballo A. Application of ozone therapy in children with humoral immunity deficiency. *Proceedings of the 12th Ozone World Congress* (Lille, France), 3, 271, 1995.
15. Basabe E., Menéndez S., Segarra F., Ponce de León M. Ozone therapy like a favoring element in the rehabilitation of children with hearing loss. *Proceedings of the 12th Ozone World Congress* (Lille, France), 3, 275, 1995.
16. Bocci V. Ozone therapy today. *Proceedings of the 12th Ozone World Congress* (Lille, France), 3, 13, 1995.
17. Rokitanstsky O., Rokitanstsky A. Electron microscopic studies on capillary endothelium cells and on the peritoneum after application of ozone/oxygen in animals. *Proceedings of the 8th Ozone World Congress* (Zurich, Switzerland), 3, m25, 1987.
18. Noa M., Friman M., Herrera M., Menéndez S., Capote A. Efecto del ozono administrado por insuflación rectal a ratas. *Libro de Resúmenes Primer Congreso Iberoamericano de Aplicaciones del Ozono*. La Habana, 13, 1990.
19. González J., Aguirre A., Salgado J.L. y cols: Estudio toxicológico agudo y crónico del ozono administrado por vía intraperitoneal en distintas especies. *Libro de Resúmenes Primer Congreso Iberoamericano de Aplicaciones del Ozono*. La Habana, 15, 1990.
20. Gómez-Barry H., Barber E., Menéndez S., Gómez M. Estudio estructural y ultraestructural de órganos de ratas sometidas a la administración intraperitoneal de ozono. *Libro de Resúmenes Primer Congreso Iberoamericano de Aplicaciones del Ozono*. La Habana, 15, 1990.
21. Gómez-Barry H., Barber E., Menéndez S., Gómez M. Estudio estructural y ultraestructural de órganos de ratas sometidas a la ozonoterapia por vía de insuflación rectal. *Libro de Resúmenes Primer Congreso Iberoamericano de Aplicaciones del Ozono*. La Habana, 16, 1990.
22. Noa M., Hernández F., Herrera M., Menéndez S., Capote A., Aguilar C. Morphological observations in rats treated with ozone by intramuscular applications. *Proceedings of the 10th Ozone World Congress* (Monaco), 3, 35, 1991.
23. Friman M., Walker D., Eng L., Menéndez S., Gómez M. Efecto del ozono en las células endoteliales circulantes en ratas. *Revista CENIC Ciencias Biológicas*, 20, 25, 1989.
24. León O., Merino N., Menéndez S., Cruz E., Castillo R., Sam S., Pérez L. Ozone oxidative preconditioning: A protection against cellular damage by free radicals. *Proceedings of the 13th Ozone World Congress* (Kyoto, Japan), 2, 707, 1997.