

# EFECTO HISTOLOGICO Y BIOQUIMICO DEL OLEOZON EN EL MODELO DE LA COLA DEL RATON

G. Martínez Sánchez, N. Merino García, S. Sam Rodríguez\*  
y T. Cenarega Alvarez.

Centro de Investigaciones y Evaluaciones Biológicas, Instituto de Farmacia y Alimentos, Universidad de la Habana, Avenida 23 No. 21425 e/ 214 y 222. La Coronela, Lisa, \*Centro Nacional de Investigaciones Científicas, Avenida 25 y 158, Cubanacán, Playa, Ciudad de La Habana, Cuba.

Recibido: 1ro de septiembre de 1996.

**RESUMEN.** La psoriasis es una enfermedad muy común que se caracteriza por un incremento de la proliferación y diferenciación anormal de queratinocitos y otras características. Se sabe además que la enfermedad transcurre con alteraciones del sistema de defensa antioxidante. Por otra parte, es conocido que las terapias con O<sub>3</sub> desencadenan el llamado "Precondicionamiento con O<sub>3</sub>", fenómeno asociado a un aumento de los mecanismos antioxidantes. En el presente trabajo se estudiaron los efectos bioquímicos e histológicos que tuvieron lugar tras treinta aplicaciones de Oleozón (Aceite de girasol ozonizado) a dosis de 1 500 mg/kg de peso corporal en el modelo de la cola del ratón. Los resultados indicaron que en los tratamientos con Oleozón y aceite de girasol el porcentaje de ortoqueratosis se incrementó de forma significativa ( $p < 0,05$ ) con respecto a los controles, aunque la magnitud del efecto encontrado es inferior al que provocan otros agentes usados tradicionalmente en la terapia. Desde el punto de vista bioquímico los efectos más notables fueron la disminución ( $p < 0,05$ ) de los niveles intracelulares del calcio para ambos tratamientos y aumento significativo ( $p < 0,05$ ) de la actividad de la enzima SOD para el tratamiento con Oleozón.

**ABSTRACT.** Psoriasis is a common pathology distinguished by an increase in the keratinocytes growth. There are abnormal differentiations and alterations on the antioxidant defense system. On the other hand, ozone/oxygen therapy causes an "oxidative preconditioning" which gives protection against free radical damage. A protocol with "Mouse tail test" has been developed using four groups (Oleozone, 1 500 mg/kg b.w.; sunflower oil, 3 mL/kg b.w.; and 2 control groups). At the end of the experiment (thirty daily applications) the tail was removed and sections were processed histopathologically and biochemically. The main result indicated a significant increase ( $p < 0,05$ ) in the orthokeratosis percentage to the Oleozone and sunflower oil treatment groups. Even, this effect is not greater than the traditional drug cause. The Biochemical finding aims at an important role of calcium (decreases its intracellular level  $p < 0,05$  in Oleozone and sunflower oil groups) and SOD (increases its enzymatic activity  $p < 0,05$  in Oleozone group) in the action mechanism.

## INTRODUCCION

La psoriasis es una enfermedad muy común caracterizada por un marcado incremento de la proliferación y diferenciación anormal de los queratinocitos, alteraciones de la vasculatura capilar dérmica y por la presencia en la dermis y la epidermis de células T, monocitos/macrófagos y neutrófilos. Se conoce que la enfermedad transcurre con alteraciones del metabolismo de ácidos grasos esenciales, secreción de linfocinas, generación de radicales libres, peroxidación lipídica y síntesis incrementada de eicosanoides.<sup>1</sup>

Por otra parte, es conocido que la terapia con ozono (O<sub>3</sub>) (agente fuertemente oxidante), en dosis apropiadas, induce lo que se ha dado en denominar "Precondicionamiento oxidativo con ozono", fenómeno que promueve un incremento de los mecanismos antioxidantes protectores.

Teniendo en cuenta algunas experiencias clínicas que reportan mejorías en pacientes psoriáticos tratados con aceite ozonizado (Oleozone); tomando como base además, el fenómeno anteriormente descrito para la ozonoterapia y el transcurso de la enfermedad, en cuya etiología están implicados de manera decisiva los radicales O<sub>2</sub><sup>•</sup> y O H<sup>•</sup>,<sup>2</sup> se ha utilizado el modelo de la cola del ratón con aplicaciones repetidas de Oleozone para observar los efectos histológicos y bioquímicos que tienen lugar durante el tratamiento.

El modelo de la cola del ratón, zona donde las características histológicas y bioquímicas semejan las condiciones

de la piel psoriática, presenta en el estrato granuloso una proporción elevada de células paraqueratóticas (nucleadas con formación anormal de queratina). Tras los tratamientos, se determina el incremento de la ortoqueratosis producido por el fármaco empleado y se estudian los indicadores que marcan los principales procesos del metabolismo oxidativo para llegar finalmente a conclusiones, siendo el objetivo del trabajo estudiar los posibles mecanismos de acción del Oleozone en la terapia de la psoriasis.

## MATERIALES Y METODOS

### Modelo animal

Ratones MNRI, machos, sanos con peso entre 28 y 32 g, procedentes del Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio, La Habana, que se mantuvieron 7 d antes del ensayo y durante este con pienso de la misma composición a una temperatura de 20-24 °C y un fotoperíodo de 12x1 2h.

### Grupos y dosis

Se formaron cuatro grupos bajo los tratamientos siguientes:

Grupo	n	Descripción del tratamiento.
I	9	Aceite ozonizado.
II	9	Aceite de girasol.
III	10S	in tratamiento.

Las dosis administradas fueron de 3 mL/kg de peso corporal (p.c.) para el aceite de girasol y 1 500 mg/kg de p.c. de Oleozón con un índice de peróxido de 506 mg/mL, equivalente a 2,9 mL/kg de p.c.

### Procedimiento

Los animales del grupo IV se sacrificaron y se les tomó muestras de la piel de la cola para los estudios histológicos y bioquímicos.

Los grupos I y II se les aplicó sobre la parte proximal de la cola las sustancias ensayadas, dos veces al día, dejándolos 2 h después de cada aplicación con un protector de goma circular, el cual le cubrió la zona tratada para garantizar el contacto piel-fármaco. El protector se le colocó el mismo período de tiempo a los animales del grupo III.

Tras 30 aplicaciones, todos los animales se sacrificaron. Se tomó un fragmento de cola para las mediciones histológicas, éste se incluyó en parafina y se tiñó con la técnica de hematoxilina-eosina y otro fragmento se homogeneizó para posteriores estudios bioquímicos.

### Determinaciones bioquímicas

**Homogenato de la cola.** Para la realización del homogenato se utilizó el homogenizador de cuchillas Edmond Bohler HO<sub>4</sub> (Alemania). Se homogenizó un fragmento previamente pesado el ap ield el ac olac on5m Ld ed isolución amortiguadora KCl-histidina, y posteriormente, se centrifugó a 5 000 r/min, 15 min a 4 °C para obtener el sobrenadante, el cual se congeló a -20 °C hasta el momento de realizar las determinaciones.

**Determinación de proteínas totales.** La técnica utilizada se basa en la reacción de coloración entre el reactivo Coomassie Brilliant Blue G-60 y las proteínas del medio, el producto de esta reacción origina un complejo con un máximo de absorción a 595 nm . En la determinación se empleó BSA como patrón.<sup>3</sup>

**Determinación de catalasa (CAT).** Se realizó mediante una técnica espectrofotométrica que permite la detección del cambio en la absorbancia del medio que produce la descomposición del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, en la región ultra-violeta.<sup>4</sup>

**Determinación de mieloperoxidasa (MPO).** La enzima MPO asociada a membranas se removió con una solución del detergente bromuro de hexadeciltrimetilamonio (HTBA). Posteriormente, se determina su actividad espectrofotométricamente utilizando un sustrato que contenía o-dianisidina-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.<sup>(5)</sup>

**Determinación de xantina oxidasa (XOD).** Se basa en la capacidad de esta enzima de actuar sobre su sustrato (xantina) para producir ácido úrico, este se transforma por acción de la ureasa a un compuesto que en presencia de nitroprusiato sodico rinde un producto coloreado, cuya absorbancia se determina espectrofotométricamente.<sup>6</sup>

**Determinación de la actividad de la superóxido dismutasa (SOD).** Se realizó mediante el método basado en la medición de la inhibición de la autooxidación del pirogalol.<sup>6</sup>

**Determinación de malonildaldehído (MDA).** El MDA es el producto final de la peroxidación lipídica. Este reacciona con el ácido tiobarbitúrico para rendir un compuesto coloreado cuya absorbancia se determina a 435 nm .<sup>7</sup>

**Determinación de las concentraciones de glutatión.** El glutatión reducido (GSH) presente en una muestra reacciona con el colorante DTBN (5,5'-ditiobis-2-ácido nitrobenzoico) para rendir un compuesto coloreado que absorbe a 412 nm. La concentración de GSH se determina mediante el empleo de una curva patrón.<sup>8</sup>

**Determinación de las concentraciones de calcio.** El calcio forma un complejo violeta con la o-cresulfaleína complejona, en medio alcalino; su absorbancia se determina espectrofotométricamente a 570 nm .<sup>9</sup>

**Determinación de fosfolipasa A<sub>2</sub> (FLA<sub>2</sub>).** La FLA<sub>2</sub> presente en la muestra biológica actúa sobre su sustrato, lecitina de huevo, provocando la liberación de lisofosfolípidos y ácidos grasos. Estos últimos acidifican el medio de reacción y originan cambios en la coloración del indicador rojo cresol. La determinación se hace espectrofotométricamente midiendo la variación de densidad óptica en un minuto.

Todos los reactivos empleados fueron p.a. (Sigma, St. Louis, M.O., USA)

### Cálculos

**Ortoqueratosis (OQ).** Se calculó el porcentaje que representa la capa granulosa con respecto a la longitud total de la escama. Se tomaron los porcentajes promedio de diez mediciones por animal. Este estudio se realizó con un sistema automatizado de digitalización de imágenes MADIP.

Las concentraciones de calcio, GSH y MDA se dividieron por el peso del tejido tomado para el homogenato, expresando la concentración en mg/g de tejido.

### Procesamiento estadístico

Con el objetivo de caracterizar la distribución de las variables estudiadas se determinaron indicadores descriptivos y se utilizó el gráfico Stem & Leaf conjuntamente con la prueba de Shapiro Wilks para analizar su normalidad.

Los valores de ortoqueratosis se compararon utilizando la prueba no paramétrica de Mann Whitney (U). Para la comparación de los resultados bioquímicos, se utilizó el ANOVA I y las pruebas de comparación múltiple de Duncan. Los valores  $p < 0,05$  se consideraron significativos.

Todos los datos fueron procesados utilizando los paquetes de programas estadísticos SPSS (V. 5,01) y Statistic (V. 4,5) para Microsoft Windows.

## RESULTADOS Y DISCUSION

### Resultados del estudio histológico

Como se observa en la Tabla I, la OQ se elevó significativamente ( $p < 0,05$ ) para los grupos tratados con Oleozón y aceite de girasol.

**TABLA I**  
Resultados del estudio histológico

Grupo	Escamas medidas	Ortoqueratosis (%)	
		$\bar{X}D$	E
Oleozón	61	30,20*	6,12
Aceite de girasol	55	29,01*	4,50
Control —	335	25,79	4,95
Grupo pre-experimental	19	25,53	4,70

\* Diferencias significativas  $p < 0,05$  con respecto a los grupos Pre-experimental y Control — .

El incremento de la OQ es signo de mejoría debido a que la piel psoriática y la de la cola del ratón normalmente está paraqueratótica, o sea, que en el estrato granuloso se observan células nucleadas en las que la queratina no sigue su mecanismo normal de síntesis. Se conoce que procesos oxidativos, en los que están involucrados metabolitos tóxicos del oxígeno como el radical superóxido, están comprometidos

con los procesos que tienen lugar a este nivel, es por ello que los aceites vegetales ricos en retinoides (antioxidantes) resultan efectivos en estos casos, por tanto era de esperar un incremento de la OQ al administrar el aceite de girasol.

Sin embargo, con la aplicación de esta técnica, se han podido observar incrementos muy superiores de la OQ, utilizando agentes esteroidales como la dexametazona. Atendi-

endo a esto podemos decir que los incrementos en la OQ detectados tras la aplicación del Oleozón y el aceite de girasol son **Incrementos discretos**.

**Resultados de las determinaciones bioquímicas**

Teniendo en cuenta los resultados que se muestran en las figuras 1 y 2, resultan procedentes los análisis siguientes:

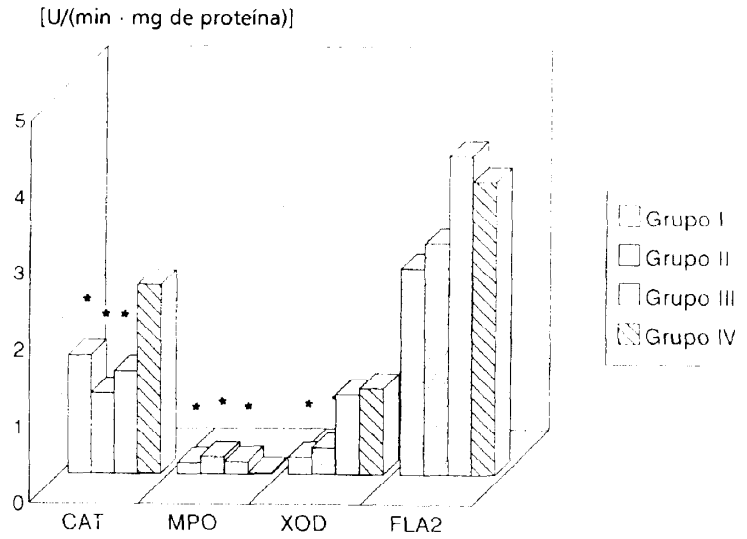


Fig. 1. Comportamiento de la actividad enzimática entre grupos.  
\* Diferencias significativas p < 0,05 con respecto al grupo IV.

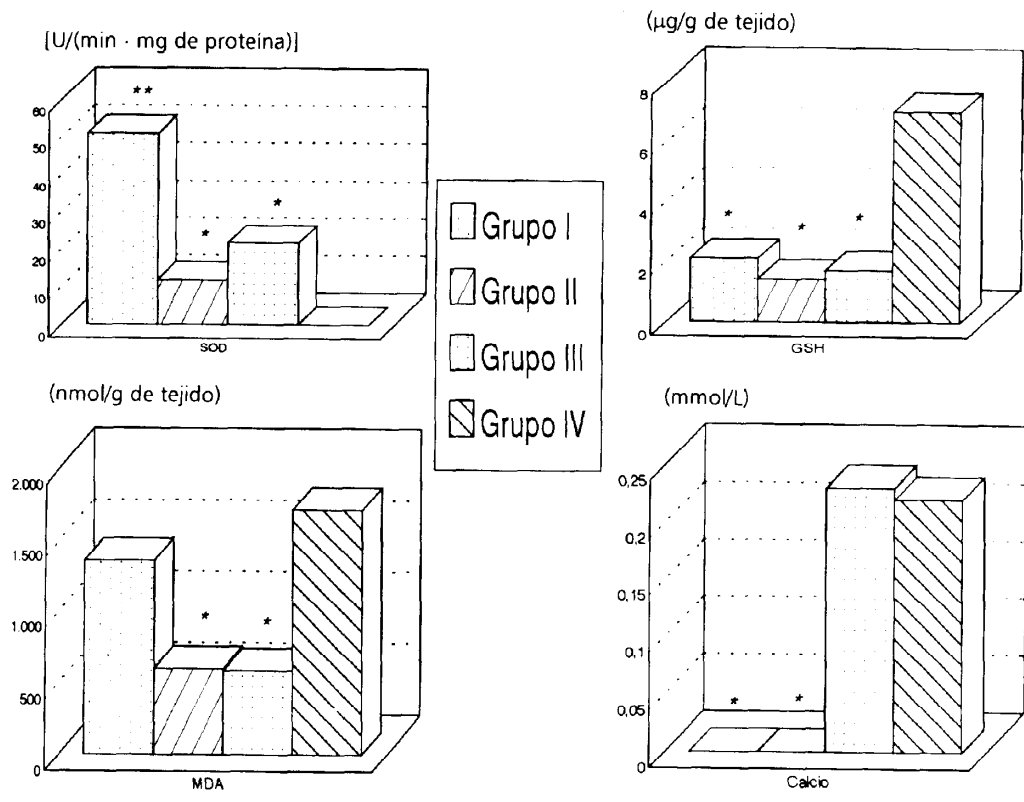


Fig. 2. Actividad de la SOD y otros indicadores.  
Diferencias significativas p < 0,05 con respecto al grupo IV \* y al grupo III\*\*.

Para el asado de la enzima (FLA<sub>2</sub>), enzima clave de la ruta del ácido araquidónico, se observa que a pesar de que el análisis estadístico no muestra diferencias significativas  $p < 0,05$  entre animales controles y tratados, los niveles más bajos corresponden a los últimos, siendo más marcada la disminución en los tratados con Oleozón. Se conoce que en los pacientes psoriáticos los niveles de FLA<sub>2</sub> en piel (tanto sana como lesionada) se encuentran incrementados<sup>11</sup> debido a que existen evidencias de que las prostaglandinas y leucotrienos que se forman debido a su acción, están comprometidas en la patogénesis de la psoriasis,<sup>12</sup> por tanto, atendiendo a este indicador se puede decir que en los grupos I y II existe un efecto positivo, ya que a pesar de que sus valores son inferiores a los controles las diferencias no son significativas.

Si se comparan los resultados correspondientes al grupo seleccionado previo al tratamiento (IV) y el sometido al estrés del tratamiento, sin la aplicación de fármacos (III), se encuentran diferencias significativas  $p < 0,05$  en cuanto a los indicadores GSH, CAT, SOD, MPO y MDA, lo cual evidencia que el régimen de tratamiento (manipulación diaria de los animales) incide en la variación de alguno de aquellos. En el caso del presente trabajo, se produce una disminución  $p < 0,05$  de los niveles de lípidos peroxidados (dado por el MDA) a expensas probablemente del incremento  $p < 0,05$  de la actividad de la enzima SOD como resultado de la existencia de niveles elevados de su sustrato (anión superóxido). Los que a su vez pueden ser los responsables de la inhibición de la CAT<sup>13</sup> y de la disminución del GSH.<sup>14</sup> En este caso, a pesar de producirse un decremento en los niveles de lipoperoxidos, el hecho de que exista similitud entre los grupos III y IV en cuanto a la OQ, es indicativo de que las modificaciones originadas en el sistema oxidativo tras el estrés del tratamiento no conducen a la reducción de los agentes causales de la paraqueratosis [O<sub>2</sub><sup>•</sup> y quizás OH<sup>•</sup>].<sup>2</sup>

La aplicación del aceite de girasol (grupo II) provoca de manera general los efectos siguientes: incremento ( $p < 0,05$ ) de la actividad de SOD y disminución ( $p < 0,05$ ) de niveles de Ca<sup>2+</sup> intracelular, este último incide en la disminución de la actividad de la FLA<sub>2</sub> y por tanto, inhibe la formación de O<sub>2</sub><sup>•</sup> que se desata por esta vía y en la disminución ( $p < 0,05$ ) de la actividad de la XOD. Esto unido al incremento ( $p < 0,05$ ) de la actividad de la SOD favorece una menor disponibilidad de O<sub>2</sub><sup>•</sup> que se refleja en la mejoría del estado paraqueratótico de la piel. La presencia de retinoides en el aceite de girasol y su papel como moduladores biológicos<sup>15</sup> condicionan probablemente que al interactuar con sus receptores, se modifiquen los niveles de Ca<sup>2+</sup> intracelular y con ellos la actividad de las enzimas.

Por otra parte, el efecto de la aplicación del Oleozón (grupo I) difirió en lo fundamental con respecto al tratamiento con aceite de girasol en que el incremento de la SOD es más elevado ( $p < 0,05$ ) y que el nivel de lipoperoxidos toma valores similares a los del grupo IV (animales sin tratamiento) notándose también una disminución ( $p < 0,05$ ) de las concentraciones de Ca<sup>2+</sup>. A pesar de estas diferencias, la OQ para los grupos I y II es similar, lo cual indica que bajo estas condiciones, la generación de O<sub>2</sub><sup>•</sup> disminuye. Se apreció en este caso, un fenómeno característico del preconditionamiento oxidativo<sup>16</sup> dado por el incremento de las enzimas protectoras como la SOD. Sin embargo, sobre la OQ del

Grupo I parece haber influido también el efecto de los retinoides sobre el metabolismo del Ca<sup>2+</sup>. La sumatoria de estos factores explicaría los resultados en cuanto a los valores de OQ y las concentraciones de MDA encontrados en el grupo I.

Adicionalmente, el comportamiento de la actividad de la enzima MPO (marcadora de polimorfos nucleares) es similar entre los grupos I, II y III, lo cual indica la no ocurrencia de inhibición de la migración de polimorfos nucleares hacia la zona tras el tratamiento. La elevación de su actividad ( $p < 0,05$ ) con respecto al grupo IV, puede estar relacionada con los eventos relativos al estrés y la oclusión de la cola durante la manipulación de los animales.

De forma general, el preconditionamiento que al parecer produce el tratamiento con O<sub>3</sub>, en cuanto a la elevación de la actividad de las enzimas protectoras no se alcanza en la misma medida para el Oleozón, por lo que su efecto es leve, y similar al del aceite no ozonizado cuya actividad se atribuye a su contenido en agentes antioxidantes.

## CONCLUSIONES

El aceite de girasol ozonizado y no ozonizado, producen un incremento significativo ( $p < 0,05$ ) de la OQ en el modelo de la cola del ratón.

El efecto a nivel molecular está relacionado con la concentración intracelular de Ca<sup>2+</sup> en ambos casos y al incremento ( $p < 0,05$ ) de la actividad de la SOD. para el tratamiento con Oleozón. La elevación de la OQ producido por el Oleozón es leve, en comparación con la que producen otros agentes utilizados en la terapéutica.

## AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Silvia Menéndez Cepero del Centro de Investigaciones de Ozono, Centro Nacional de Investigaciones Científicas por facilitarnos los materiales objeto de estudio y al Prof. Jesús Núñez Romay del área de Postgrado de este último Centro, por la revisión de la redacción inglesa.

## BIBLIOGRAFIA

- McKay I.A. y Leich I.M. **Clinics in Dermatology**, 2, 105, 1995.
- Yoshihiko Ooyanaqui **Fragrance Journal**, 4, 35, 1990.
- Bradford. M. M. **Anal. Biochem**, 72, 248, 1976.
- Aebi H. Methods of enzymatic analysis. Bergmeyer H.V. (Ed.), Chemie, Weinheim Alemania. 673-684, 1974.
- Hillegas L.M. **Journal of Pharmacological Methods**, 1, 205, 1990.
- Böehringler-Manmheim. Manual de Técnicas y Datos de Bioquímica. 85, 1994.
- Jahanna K. Lang y Carmen Vigo Pesfrey **Chemistry and Physics of Lipids**, 1, 19, 1993.
- Ecobichon D.J. **Drug and Chemical Toxicology**, 4, 345, 1984.
- Barnett R.N. **Amer. J. Clin. Path.**, 1, 836, 1973
- Jueger Bergmeyer Methods of enzymatic analysis Vol. I. 3rd ed., 285-286, 1983.
- Verhagen **British Journal of Dermatology**, 1, 731-732, 1984.
- Voorhees J. J. **Archives of Dermatology**, 1, 541, 1983.
- Kono Y. and Fridovich J. **J. Biol. Chem.**, 1, 5750, 1982.
- García Piñero José C. Especies Reactivas de Oxígeno, Impacto Médico. Centro de Inv. Biomédicas. Ciudad de La Habana, Cuba, 1994 (en prensa).
- Boehm M.P., Heyman, R.A., Patel, S., Steim, R.B. and Nagpal. S. **Expert Opinion on Investigational Drugs**, 7, 593, 1995.
- León F., Olga Sonia Oxidative preconditioning. **Pharmacological Research**, 1995. (en prensa).