

## EFFECTO DEL OZONO EN LAS CELULAS ENDOTELIALES CIRCULANTES EN RATAS

*H. Friman, D. Walker, L. Eng, S. Henández y H. Gómez*

CENTRO NACIONAL DE INVESTIGACIONES CIENTIFICAS

RESUMEN. La mayoría de las hipótesis que se han formulado acerca de la aterosclerosis postulan que el daño del endotelio arterial puede ser producido por diversos agentes, causando denudación endotelial y que múltiples mecanismos patogénicos contribuyen a la formación de las placas de ateroma. En las **alteraciones circulatorias causadas por el proceso aterogénico que traen como resultado deficiencias de oxígeno**, el empleo de la ozonoterapia ha resultado alentador. El presente estudio muestra que el ozono a la dosis de 30 mg/kg por vía rectal ejerce un efecto protector sobre el endotelio vascular ante la inducción de daño y denudación endotelial por citrato trisódico.

### INTRODUCCION

En las décadas pasadas se hizo énfasis en los estudios moleculares y celulares de la pared vascular, los que han contribuido a esclarecer la etiología y patogénesis del proceso aterogénico. La mayoría de las investigaciones **coinciden al considerar a la aterosclerosis como una respuesta al daño de la pared vascular**, el que puede ser producido por una variedad de agentes **desencadenantes** y que múltiples mecanismos patogénicos **contribuyen** a la formación y desarrollo de las placas<sup>1-3</sup>

**En la enfermedad oclusiva arterial periférica, una de las manifestaciones clínicas de la aterosclerosis, las alteraciones circulatorias** provocan un transporte deficiente de oxígeno. El empleo de la ozonoterapia ha sido útil dada la influencia directa de la mezcla de O<sub>3</sub>/O<sub>2</sub> en el metabolismo del **oxígeno**.<sup>4 5</sup>

**Los planteamientos contradictorios relacionados con los efectos a nivel celular del ozono**, motivó la evaluación de su acción sobre la integridad del endotelio vascular y ante la inducción de daño endotelial con citrato trisódico.

### MATERIALES Y METODOS

#### Inducción del daño

MODELO I. El daño del endotelio fue producido por la inyección intravenosa (0,5 mL/g) de citrato trisódico 2H<sub>2</sub>O (3,04 %, pH 6). La sangre fue obtenida de la aorta abdominal, 5 min después del daño intravenoso.

**MODELO II.** El daño del endotelio fue producido por la inyección intramuscular (1 mL/g) de citrato trisódico 2ifa0 (3,04 % , pH 6 ), durante 7 d

Fueron seleccionados 7 grupos ,experimentales, con 10 ratas cada uno:

- A. Grupo Control. Fue tratado con solución salina
- B. Grupo Control. Se indujo daño endotelial utilizando el Modelo I
- C. Grupo Control. Se indujo daño endotelial utilizando el Modelo II
- D. Animales tratados solamente con la mezcla de 03/02, durante 7 d
- E. Animales tratados posteriormente al tratamiento del daño endotelial (inducido por el Modelo I) con la mezcla de 03/02 durante 7 d
- F. Animales tratados con la mezcla de 03/02 durante 7 d, en los cuales se indujo al mismo tiempo el daño endotelial mediante el Modelo II
- G. El daño del endotelio fue inducido utilizando el Modelo **II**. Al final de **este período, los animales se trataron con la mezcla 03/02 durante 7 d**

La mezcla de 03/02 se administró por vía rectal , a la dosis de 30 mg/kg. El daño del endotelio vascular se determina por la cuantificación del **incremento en la circulación sanguínea de las carcassas anucleares de las células endoteliales decamadas**, siguiendo la técnica descrita por Hladovec.<sup>6 7</sup> **Los conteos se realizaron bajo microscopio óptico, utilizando una cámara de Fuchs-Rosenthal.** La media de 4 conteos se utilizó para el procesamiento de los datos. **Los resultactos se expresan en términos de número de células** contadas por mL de plasma rico en plaquetas (PRP). **Para el análisis estadístico de los resultados se empleó el test t de Student.**

**RESULTAOS.**

**La inyección intravenosa e intramuscular de citrato trisódico en ratas, produjo un considerable incremento de las células endoteliales circulantes en comparación con el grupo control tratado con solución salina (Tabla I).**

Tabla I  
*Comportamiento del daño endotelial en ratas tratadas con ozono*

Grupos	Células endoteliales (células/mL PRP)
A	404 ± 204
B	1 070 ± 95*
C	1 318 ± 172*
D	299 ± 127
E	364 ± 130
F	281 ± 70
G	289 ± 128

\* p < 0,001                      PRP Plasma rico en plaquetas

El tratamiento con la mezcla de 03/02 a la dosis de 30 mg/kg no afectó el número normal de células endoteliales circulantes en la sangre de las ratas. En todos los grupos de animales que se les indujo daño endotelial y que fueron tratados con la mezcla de 03/02, no se encuentra alterado el número de células endoteliales circulantes, a pesar de que el daño endotelial se induce en distintos períodos del tratamiento con ozono, (antes, conjuntamente y después del tratamiento).

#### DISCUSION

Las investigaciones más recientes sobre el endotelio vascular han establecido que las células endoteliales son células activas que llevan a cabo una variedad de funciones decisivas.<sup>1</sup> Se ha esclarecido también que el endotelio responde a diversos estímulos y que la lesión endotelial causa denudación con la subsecuente liberación de PDGF (platelet-derived growth factor) por las plaquetas, lo que conduce a la proliferación y migración de células musculares lisas a la íntima y la secreción de componentes de tejido conectivo. Con la repetición y continuidad de este proceso puede formarse la placa de aterosclerosis.<sup>3,8,9</sup>

Un incremento significativo de la decamación del endotelio ha sido descrito en algunas de las manifestaciones clínicas de la aterosclerosis, postulándose una posible asociación entre este incremento y la anoxia que es común en los pacientes con infarto del miocardio, angina de pecho severa y en la enfermedad oclusiva arterial periférica.<sup>7</sup>

El tratamiento con ozono a los animales a los que no se les indujo lesión del endotelio, no afectó su integridad. Esto coincide con los resultados de Rokitansky que no observó daño celular al microscopio electrónico en el endotelio vascular de conejos, ni en el visceral y parietal del peritoneo de ratas después de la aplicación intravascular e intraperitoneal de ozono.<sup>10</sup>

Se plantea que el ozono tiene una influencia directa sobre el metabolismo del oxígeno a través de su acción directa e indirecta en reacciones tales como

- cambio en las propiedades del flujo sanguíneo
- incremento en la velocidad de glicolisis en los eritrocitos
- activación de enzimas que intervienen en la degradación de peróxidos y radicales libres de oxígeno
- activación de la cadena respiratoria mitocondrial.<sup>4 5</sup>

La inducción del daño endotelial utilizando citrato trisódico provocó niveles elevados de células endoteliales circulantes en la sangre de los animales. Los resultados obtenidos en los grupos experimentales cuando se administró la mezcla 03/02 ante la inducción del daño, demuestran un efecto protector del endotelio vascular a la dosis y por la vía de administración empleadas. Se considera que este efecto debe estar muy relacionado con su

influencia en el metabolismo del oxígeno y la activación del sistema enzimático celular de degradación de peróxidos y radicales libres del oxígeno.

#### CONCLUSIONES

El tratamiento con ozono no provocó daño del endotelio vascular determinado por la cuantificación en la circulación sanguínea, del incremento de las células endoteliales decamadas.

Se observó un efecto protector del endotelio vascular por parte del ozono a la dosis y vía utilizada, cuando se indujo el daño en aquel con citrato trisódico.

#### BIBLIOGRAFIA

1. Munro I.M. , Cotran R.S. Lab. Inv. , 58:249, 1988.
  2. Ross R., Glomset J.A. N. Engl. J. Med. , 295:420, 1976.
  3. Steimberg D. Hypercholesterolemia and Atherosclerosis. Pathogenesis and Prevention, ed. by Steimberg D. , Olefsky L.M. , P.5, New York, Churchill/Livingstone, 1987.
  4. Viebahn R. OzoNachrichten, 4:18, 1985.
  5. Rilling S., Viebahn R. Proceedings 8th Ozone World Congress, Zurich. Vol. 3:N-1, 1987.
  6. Hladovec J. , de Clerk F. Angiology, 32:448, 1981.
  7. Hladovec J. , Rossmann P. Thromb. Res., 3:665, 1973.
  8. Ross R., Glomset J.A. N. Engl. J. Med. , 295:369, 1976.
  9. Ross R. N. Engl. J. Med. , 31:448, 1986.
  10. Rokitansky O. , Rokitansky A. Proceeding 8th Ozone World Congress, Zurich. Vol. 3:M-25, 1987.
-