

EFFECTO DEL SUERO OZONIZADO SOBRE EMBRIONES EN CULTIVO

H.D. Rodríguez, S. Henéndez, H. Gómez, O. Ancheta, H. García, L. Eng y M. E. Ramos

CENTRO NACIONAL DE INVESTIGACIONES CIENTIFICAS

RESUMEN. Se estudia la capacidad del ozono para provocar alteraciones en la morfogénesis, embrioletalidad y retardo del crecimiento en un sistema de cultivo de embriones. En estos experimentos fueron cultivados embriones de rata explantados a los diez días de desarrollo y expuestos a dosis de ozono de 50 a 100 veces superiores a las terapéuticas por autohemoterapia, dosificando 40 y 80 g de ozono/mL de suero, como medio de cultivo. El crecimiento embrionario fue evaluado por parámetros morfológicos y bioquímicos.

INTRODUCCION

En años recientes se han estado desarrollando métodos de prueba in vitro como alternativa o complementación a los estudios toxicológicos convenciona-

les. Entre estas pruebas se halla el cultivo de embriones post-implantación utilizado para detectar teratógenos.

Varios factores favorecen el uso de esta técnica, entre otros, los embriones son cultivados durante etapas críticas de la organogénesis en los cuales son altamente sensitivos a las alteraciones por teratógenos. Además, se puede conocer el efecto directo del agente sobre el embrión en desarrollo, sin interferencia con el organismo materno.

El ozono posee dos propiedades importantes que lo hacen útil en el campo de la medicina, su gran poder germicida y su efecto estimulante sobre los procesos de metabolización del oxígeno y la circulación sanguínea.¹

Se han publicado trabajos acerca de los efectos embriotóxicos de la inhalación de ozono en la rata y el ratón.²⁻⁵ Otros investigadores tampoco han encontrado estos efectos al emplear las vías rectal, intramuscular u oral.⁷⁻⁹

Los efectos tóxicos del ozono son atribuidos a su capacidad oxidativa que provoca la formación de lípidos peroxidados.¹⁰ La peroxidación lipídica en las células está asociada con daño serio a componentes estructurales esenciales.¹¹ En este trabajo se aprovecharon las facilidades que brinda el cultivo de embriones post-implantación para observar el efecto de la ozonización del suero sobre el desarrollo del embrión.

MATERIALES Y METODOS

Los embriones se obtuvieron de ratas Sprague-Dawley. Se consideró como día cero, el décimo a partir de la gestación, es decir, el momento a partir del cual se detectaron espermatozoides en el exudado vaginal.

Las ratas preñadas fueron sacrificadas por dislocación cervical y el útero transferido a una placa petri con solución salina Hank.

Los embriones fueron explantados y cultivados según el método descrito por New.¹² Los embriones tenían aproximadamente 10 semitas cuando comenzó el cultivo. La decidua y la membrana de Reichert fueron retiradas sin dañar el saco vitelino, el cono ectoplacental y el amnios.

Se empleó como medio de cultivo, suero homólogo preparado según Steele y New.¹³

Los frascos conteniendo los embriones fueron colocados en una incubadora a 37 °C y rotaron a 30 r/min durante 24 h. Antes de añadir los embriones el medio fue gasificado con 20 % O₂, 5 % CO₂ y 75 % N₂. A la mañana siguiente, el medio fue regasificado con 40 % O₂, 5 % CO₂ y 55 % N₂. Una vez concluido el periodo de cultivo, los embriones se colocaron en solución salina y se revisaron bajo un microscopio de disección. Se tomó como criterio de viabilidad la presencia de una activa circulación en el saco vitelino. Se observaron parámetros de crecimiento y desarrollo que incluyeron longitud cráneo-caudal, número de somitas, proteínas totales y morfogénesis.

El ozono fue administrado en concentraciones de 40 y 80 g/mL (para dosis de ozono de 200 y 400g respectivamente) de suero de cultivo. Se hicieron dos controles. Un grupo de embriones fue cultivado en suero gasificado con oxígeno y el otro grupo se cultivó en suero sin tratar.

La determinación de proteínas se realizó según Lowry y col.¹⁴ en embriones disueltos en hidróxido de sodio.

Los resultados fueron analizados mediante la prueba t de Student.

Para la determinación de peróxidos en el suero se cuantificó el contenido de malonaldehído¹⁵ y se usó el test no paramétrico de Sidak y Vondraek¹⁶ para comparar los valores de este parámetro.

Las muestras de sacos vitelinos que iban a ser estudiadas por microscopia electrónica se fijaron en glutaraldehído al 32 % y tetróxido de osmio al 2 % en buffer cacodilato. Después que las muestras se deshidrataron con alcohol en concentración creciente, fueron ocluidas en resina Spurr.¹⁷ Los bloques se cortaron en un Ultratomec III (LKB) y los cortes se contrastaron con uranil acetato y posteriormente en nitrato de plomo¹⁸ y se examinaron en un microscopio electrónico JEOL modelo JEM 100 S.

RESULTADOS

Los efectos producidos por el ozono sobre los embriones se pueden observar en la Tabla I

Tabla I					
Indices de crecimiento y desarrollo de embriones de rata de 10 d cultivados en suero ozonizado					
	Muestras (cantidad)	Somitas	Longitud craneo/caudal (mm)	Viabilidad (%)	Proteínas (g)
Control oxígeno	23	24,9 ± 1,3	3,6 ± 0,4	100	301 ± 68
Control normal	18	24,6 ± 1,8	3,6 ± 0,4	100	334 ± 70
Ozono (40 g/mL)	21	25,0 ± 1,6	3,6 ± 0,4	100	293 ± 56
Ozono (80 g/mL)	28	24,7 ± 1,6	3,5 ± 0,5	100	338 ± 55

Los embriones tratados con ozono, en general, crecieron y se desarrollaron normalmente. El número de semitas, la longitud cráneo-caudal y el contenido de proteínas mostraron valores comparables a los obtenidos por los controles.

No fueron detectadas malformaciones en ninguno de los embriones de control examinados ni en el grupo tratado con ozono, a la concentración de 40 g/mL. En el grupo cultivado en suero a 80 g/mL, un embrión presentó falta de cierre del tubo neural a nivel del romboencéfalo.

Se encontró un aumento significativo de los lípidos peroxidados en relación con la dosis de ozono administrada (Tabla II).

	N	$\bar{X} \pm OS$ (mmol/L)
Control oxígeno	5	$0,95 \pm 0,17$
Contra 1 normal	5	$1,11 \pm 0,24$
Ozono (40 g/mL)	5	$2,18 \pm 1,01$
Ozono (80 g/mL)	5	$4,18 \pm 2,4$

La ultraestructura de las células del saco vitelino se observó normal, con las características propias de células de intensa síntesis.

La peroxidación lipídica produce cambios en la permeabilidad de las células, pérdida de enzimas intracelulares esenciales e inhibición de cadenas metabólicas mitocondriales o microsomales e incluso si el daño es severo la célula puede morir.

La aparición de un embrión con falta de cierre del tubo neural en uno de los grupos tratados con ozono se atribuyó a la incidencia espontánea de esta malformación en esta línea de ratas según se ha observado en los experimentos *in vivo*.

BIBLIOGRAFIA

- 35

2. Kavlock R.J., Daston G., Grabowski C.T. Studies in the developmental toxicity of ozone. I. Prenatal effects. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 48: 19-28, 1979.
3. Kavlock R.J., Daston G., Grabowski C.T. Studies in the developmental toxicity of ozone: Postnatal effects. *Toxicol. Lett.* 5: 3-9, 1980.
4. Kotin P and Thomas H. Effect of air contaminants on reproduction and offspring survival in mice. *Amer. Med. Ass. Arch. Ind. Health* 16: 411-413, 1957.
5. Veninga T.S. Toxicity of ozone in comparison with ionizing radiation. *Strahlentherapie* 134, 469-477, 1967.
6. Brinkman R., Lamberts H. and Veninga T. Radiomimetic toxicity of ozonized air. *Lancet* 1, 133-136, 1964.
7. Hetka H., Enzelsberger H., Salzer H. und Rokitansky A. Zur Frage der Teratogenität und Toxizität von medizinischem Ozon, eine Studie an trächtigen Ratten. *OzonNachrichten* 7 Heft 1/2, 1988.
8. Rodríguez H.D., Henández S., Gómez H., García H. Estudio teratogénico del ozono administrado por insuflación rectal. I Congreso Nacional de Aplicaciones del Ozono. Ciudad de la Habana, Cuba, 1988.
9. Rodríguez H.D., Henández S., Gómez H., García H., Eng L. Estudio teratogénico del agua ozonizada. I Congreso Nacional de Aplicaciones del Ozono. Ciudad de la Habana, Cuba, 1988.
10. Henzel B.D. Ozone: An overview of its toxicity in man and animals. Hemisphere Publishing Corporation, 183(3)-204(24), 1984.
11. Slater T.F. Free radical mechanisms in tissue injury. *Biochem. J.* 22, 1-15, 1984.
12. New D.A.T. Whole-embryo culture and the study of mammalian embryos during organogenesis. *Biol. Rev.* 53, 81-122, 1978.
13. Steele C.E. and New D.A.T. Serum variants causing the formation of double hearts and other abnormalities in explanted rat embryos. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 31, 707-719, 1974.
14. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr L.J., Randall R.J. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193, 265-275, 1951.
15. Priece J.A. and Aust S.P. *Methods Enzymology* Vol. III, 306-310, 1978.
16. Sidak Z., Vondracek, J. Jedmoduchy neparametrický test. Rozdínosti polohy dvou populací. *Aplikace Matematiky* 2, 215-221, 1957.
17. Spurr A.R. A low-viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy. *J. Ultrastructure Research* 26, 31-43, 1969.
18. Reynolds E.S. The use of lead citrate at high pH as an electronopaque stain in electron microscopy. *J. Cell Biol.* 17, 108, 1963.

19. *Ketterer B., Coles B., Heyer D.J.* The role of glutation in detoxification. *Environ. Health Perspect.* 49, 59-69, 1983.
 20. *Vaca C.E., Wilhelm J., Harms-Ringdahl H.* Interaction of lipid peroxidation products with DNA. *Mutation research* 195, 137-149, 1988.
-