

## EFECTO 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 CIENTÍFICAS

**RESUMEN.** Se estudia la capacidad del ozono para provocar alteraciones en la morfogénesis, embriofetalidad y retardo del crecimiento en un sistema de cultivo de embriones. En estos experimentos fueron cultivados embriones de rata explantadas 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 convencional-

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 estadías críticas de la organogénesis en los cuales son altamente sensativos 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.<sup>1</sup>

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

Los efectos tóxicos del ozono son atribuidos a su capacidad oxidativa que provoca la formación de lipídicos peroxidados.<sup>6</sup> La peroxidación lipídica en las células está asociada con daño serio a componentes estructurales esenciales.<sup>11</sup> 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.<sup>12</sup> Los embriones tenían aproximadamente 10 somitas 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.<sup>13</sup>

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 % O<sub>2</sub>, 5 % CO<sub>2</sub> y 75 % N<sub>2</sub>. A la mañana siguiente, el medio fue regasificado con 40 % O<sub>2</sub>, 5 % CO<sub>2</sub> y 55 % N<sub>2</sub>. 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 400 g 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.<sup>14</sup> 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 malonaldehído<sup>15</sup> y se usó el test no paramétrico de Sidak y Vondraek<sup>16</sup> para comparar los valores de este parámetro.

Las muestras de sacos vitelinos que iban a ser estudiadas por microscopía electrónica se fijaron en glutaraldehído al 32% y tetróxido de osmio al 2% en buffer cacodilato. Despues que las muestras se deshidrataron con **azales en concentración creciente**, fueron ocluidas en resina Spurr.<sup>17</sup> Los bloques se cortaron en un Ultrotomec III (LKB) y los cortes se contrastaron con uranil acetato y posteriormente en nitrato de plomo<sup>18</sup> 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 <b>oxígeno</b>	23	24,9 ± 1,3	3,6 ± 0,4	100	301 ± 68
Control <b>normal</b>	18	24,6 ± 1,8	3,6 ± 0,4	100	334 ± 70
<b>Ozono</b> (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 somitas, la longitud craneo-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).

Tabla II  
Lipoperóxidos en el suero de cultivo

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

<sup>a</sup>  
 $p < 0,05$  respecto a ambos controles.

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

#### DISCUSION

La peroxidación lipídica produce cambios en la permeabilidad de las células, pérdida de enzimas intracelulares esenciales e inhibición de cadenas metabólicas mitocondriales o microsómicas e incluso si el daño es severo la célula puede morir.<sup>10</sup>

La aplicación de ozono provocó una elevación significativa, dosis dependiente, de los lípidos peroxidados del suero. Este alto nivel de lipoperóxidos en el suero, sin embargo, no alteró las funciones del saco vitelino. El buen desarrollo morfogenético alcanzado por los embriones evidencia que no hubo alteración de la función histiotrófica del saco vitelino. Por otra parte, la microscopía electrónica no reveló alteraciones ultraestructurales de este tejido.

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*.

Las células cuentan con eficientes mecanismos de defensa contra el estrés oxidativo. El glutatión juega un importante papel en la detoxificación de metabolitos electrofílicos de los xenobióticos<sup>19</sup> y pudiera haber sido de importancia crítica en la protección de las células del saco vitelino. También debe tenerse en cuenta que otros mecanismos defensivos del organismo donde participan enzimas responsables de la degradación de los peróxidos tales como la catalasa, la superóxido dismutasa y la glutatión peroxidasa pudieran estar involucrados en la protección de los embriones.<sup>1,2</sup>

#### BIBLIOGRAFIA

1. Viebahn R. The biochemical process underlying ozone therapy. OzoNachrichten, 4 1/2: 18-30, 1985.

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 trachtigen Ratten. *OzoNachrichten* 7 Heft 1/2, 1988.
8. *Rodríguez H.D., Henéndez 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., Henéndez 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. *Priest J.A. and Aust S.P.* Methods Enzymology Vol. III, 306-310, 1978.
16. *Sidak Z., Vondracek, J.* Jedmoduchy neparametricky test. Rozdinsti polohy duou populaci. *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.
-