

Influencia del aceite de girasol ozonizado sobre parámetros del perfil lipídico, proteico e indicadores de estrés oxidativo en perros

Influence of ozonized sunflower oil on parameters of the lipid profile, protein and indicators of oxidative stress in dogs

Yanaysis Stable- García^{a,*}, Zullyt Zamora- Rodríguez^b, Oscar Ledea- Lozano^a, Axel Mancebo- Rodríguez^c, Daniel Jay- Pérez^c, Avelina León- Goñi^c, Yana Gonzáles- Torres^c, Ailemys Curbelo- Valiente^c, Ambar Oyarzabal Yera^d

^a Unidad de Productos Ozonizados, Departamento de Estudios Biológicos. Centro Nacional de Investigaciones Científicas (CNIC), La Habana, Cuba.

^b Unidad de Productos Naturales, Departamento de Farmacología Experimental. Centro Nacional de Investigaciones Científicas (CNIC), La Habana, Cuba.

^c Unidad de Toxicología experimental (CETEX), Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio, La Habana, Cuba.

^d Unidad de productos Naturales. Centro Nacional de Investigaciones Científicas (CNIC), La Habana, Cuba.

Recibido: 19 de octubre de 2020;

Aceptado: 23 de diciembre de 2020;

RESUMEN

El estrés oxidativo está asociado a la presencia de enfermedades crónicas y trastornos dermatológicos en los perros. El aceite de girasol ozonizado constituye una mezcla de principios activos (hidroperóxidos, peróxidos, aldehídos, ozónidos) con acción germicida, antiinflamatoria y co-estimuladora de los sistemas antioxidantes. El estudio se realizó con el objetivo de evaluar la influencia de la administración tópica de diferentes dosis del AGO sobre el perfil lipídico, proteico e indicadores de estrés oxidativo durante 90 días en perros. Se seleccionaron 30 perros Beagle pertenecientes al CENPALAB, los cuales fueron distribuidos en cinco grupos, un control (agua estéril), un vehículo (aceite de girasol (AG)) y tres grupos con dosis baja, media y alta (4, 20 y 100 mg/kg, respectivamente) de AGO. Los productos se aplicaron durante 90 días. Se tomaron muestras de sangre para la obtención de plasma, al inicio y al final del estudio. Las variables analizadas fueron: albúmina, colesterol, triglicéridos, malondialdehído, grupos sulfhidrilo y actividad de la catalasa. Los resultados evidencian que las aplicaciones de AGO no modificaron el contenido de proteínas, ni lípidos en el plasma. Los niveles de peroxidación lipídica se redujeron con la dosis de 100 mg/kg de AGO, mientras que la actividad de la catalasa, estuvo incrementada después de los 90 días de tratamiento para todas las dosis de AGO evaluadas. Se concluye que el AGO aplicado tópicamente durante 90 días en perros, no influyó sistémicamente sobre el metabolismo de lípidos y proteínas, pero incrementó la actividad de la enzima antioxidante catalasa.

Palabras claves: perros; estrés oxidativo; aceite de girasol ozonizado; albúmina; lípidos; proteínas.

ABSTRACT

Oxidative stress is associated with the presence of chronic diseases and triggers dermatological disorders in dogs. Ozonated sunflower oil (AGO, acronym in Spanish) with germicidal, anti-inflammatory and stimulator of antioxidant systems actions, demonstrated in different experimental studies. The objective of this study was to evaluate the influence of the topical administration of different doses of AGO on the lipid profile, protein and oxidative stress indicators for 90 days in dogs. 30 animals were selected and divided into four treatment groups; a vehicle with sunflower oil (AG) and three groups with low, medium and high doses (4, 20 and 100 mg / kg, respectively) of AGO. The treatments were applied for 90 days. Blood samples were taken to obtain plasma, at the beginning and at the end of the study. The variables analyzed were; albumin, cholesterol, triglycerides, malondialdehyde, sulfhydryl groups and catalase). The results show that the applications of AGO did not modify the content of proteins or lipids in the plasma. The lipid peroxidation levels were reduced with the treatment dose of 100 mg / kg of AGO, while the catalase activity was increased after 90 days of treatment for all the doses of AGO evaluated. It is concluded that AGO applied topically for 90 days in dogs did not systemically influence the metabolism of lipids and proteins, but did increase the activity of the antioxidant enzyme catalase

Keywords: dog; oxidative stress; ozonated sunflower oil.

INTRODUCCION

El estrés oxidativo constituye una alteración producida por un desequilibrio entre la generación de radicales libres y la defensa antioxidante (superóxido dismutasa, catalasa, glutatión peroxidasa), basado en el daño a estructuras celulares como carbohidratos, ácidos nucleicos, lípidos y proteínas (Winterbourn *et al*, 2016). Este daño oxidativo puede atribuirse a una deficiencia de sustancias protectoras, asociado al estado nutricional, y se puede manifestar con la consiguiente presencia de enfermedades de la piel (Cao *et al*, 2020; Huerta *et al*, 2005). Diversos estudios han demostrado que la ingesta inadecuada de nutrientes deprime la acción de algunas enzimas antioxidantes, lo que favorece el estrés oxidativo (Sharifi *et al*, 2020; Colitti *et al*, 2019).

En este sentido el control de la alimentación balanceada en los perros desempeña una función importante en la calidad de vida de los animales, ya que las deficiencias de nutrientes en la dieta constituyen un factor predisponente para el desarrollo de trastornos dermatológicos que involucran un estrés oxidativo. Una alimentación adecuada debe estar compuesta por agua, proteínas, carbohidratos, grasa, vitaminas y minerales para cumplir con los requerimientos nutricionales de cada animal (Colitti *et al*, 2019).

La incorporación de las grasas en las dietas de los perros es una exigencia que favorece la absorción de las vitaminas liposolubles y garantiza una buena palatabilidad del alimento. Por otra parte, los caninos necesitan consumir ácidos grasos esenciales principalmente el ácido linoleico y el ácido araquidónico, ya que, de haber deficiencias de éstos, se presentan afectaciones en la salud de la piel y el pelo. La presencia de lesiones en la piel, así como la ausencia de brillo, la sequedad y la aspereza del pelo son manifestaciones clínicas que acompañan a las dermatopatías (Osorio *et al*, 2010). En este sentido se destacan, la demodicosis (Romanucci *et al* 2011; Martínez *et al*, 2014) y la dermatitis atópica (Almela *et al*, 2018), ambas relacionadas con el estrés oxidativo.

Algunos autores han observado una reducción de los niveles de antioxidantes endógenos (glutatión peroxidasa, catalasa, cobre y zinc) en perros con demodicosis localizada y generalizada (Dimri *et al*, 2008).

El aceite de girasol ozonizado (AGO) es un producto registrado para uso humano con el nombre comercial (OLEOZON®), compuesto por una mezcla de principios activos (hidroperóxidos, peróxidos, aldehídos, ozónidos) obtenidos a partir de la ozonización parcial del aceite de girasol (Díaz *et al*, 2001; Díaz *et al*, 2005; Díaz *et al*, 2008; Ledea, 2004; Ledea *et al*, 2005). Dicho producto ha mostrado su acción germicida como efecto farmacológico principal en diversos estudios (Guerrer *et al*, 2012; Lezcano *et al*, 2000; Sechi *et al*, 2001) y como acciones pleiotrópicas presenta actividad antiinflamatoria (Zamora *et al*, 2006; Zamora *et al*, 2018). Específicamente, el AGO ha mostrado su acción coestimuladora del sistema antioxidante en diferentes modelos experimentales (Zamora *et al* 2007).

Estudios toxicológicos del AGO tópico en dosis repetida, evidencian la seguridad del producto (Díaz *et al*, 2006; Rodríguez *et al*, 1990). Teniendo en cuenta estos antecedentes, el presente trabajo tiene como objetivo evaluar la influencia de la administración tópica de diferentes dosis del aceite de girasol ozonizado en perros sobre el perfil lipídico, proteico e indicadores de estrés oxidativo durante 90 días.

MATERIALES Y MÉTODOS

Sustancias de estudio y/o referencia.

EL AGO procedente del Centro Nacional de Investigaciones Científicas (CNIC) con un índice de peróxido de 600-800 mmol-equiv/kg y como vehículo aceite de girasol refinado, fabricado en Borges-Ecasol, España, ambos almacenados a una temperatura de 2 a 8° C.

Animales

Se emplearon 30 perros hembras y machos sanos de la raza Cenp: BEAG, de 1 a 3 años de edad con un rango de peso corporal de 10 a 18 kg, perteneciente a la Colonia de Caninos de la Dirección de Animales Convencionales del Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB), La Habana. Los parámetros ambientales fueron monitoreados diariamente mediante un medidor de temperatura y humedad relativa RH 600. La temperatura de la sala fue de 22 ± 3 °C, la humedad relativa de 50-80 % y el fotoperíodo de siete horas luz/17 oscuridad con libre acceso a agua y comida. El manejo de los animales se realizó de acuerdo a las normas establecidas en la “Guía Ética para el Manejo de Animales de Laboratorio” (La Habana, Cuba, 1992) y los principios éticos para el uso de animales de laboratorio recomendados en los lineamientos internacionales y en la República de Cuba, “Principios de las Buenas Prácticas de Laboratorio no Clínico de Seguridad Sanitaria y Medioambiental del Centro para el Control Estatal de Medicamentos, Equipos y Dispositivos Médicos 039/2004” (CECMED, 2004).

Grupos experimentales

Concluido el período de readaptación y realizado los exámenes complementarios, se seleccionaron los animales y se distribuyeron al azar en cinco grupos experimentales de seis animales (tres hembras y tres machos) en cada uno. El grupo 1 (Control): tratamiento con agua estéril, el grupo 2 (vehículo): Aceite de girasol sin ozonizar, el grupo 3 (Dosis Baja): AGO (4 mg/kg) el grupo 4 (Dosis Media): AGO (20 mg/kg) y el grupo 5 (Dosis Alta): AGO (100 mg/kg).

Se seleccionaron tres niveles de dosis, donde la dosis alta fue de 100 mg/kg, teniendo en cuenta los resultados previos derivados de estudios de dosis repetida en otras especies (Menéndez *et al*, 1999). La dosis baja fue de 4 mg/kg, la cual se halló ligeramente por encima de la dosis terapéutica recomendada. La dosis media, 20 mg/kg se determinó utilizando un factor 5 entre las 3 dosis.

Diseño experimental

Se realizó el rasurado del 10% de la superficie corporal de los animales en el área seleccionada (dorso-lateral derecha) como sitio de administración de los productos, con dimensiones de aproximadamente 22 x 22 cm para un perro de peso promedio de 10 kg. Posteriormente, cada producto fue administrado tópicamente utilizando jeringuillas de 5 y 10 ml. Una vez aplicado, éste se distribuyó uniformemente por toda la zona con la ayuda de una espátula plástica. Inmediatamente, se colocaron parches de gasa porosa y esparadrapo con el objetivo de evitar que el animal pudiera ingerirlo y asegurar el contacto del producto con la piel durante un período de seis horas.

Todos los productos se administraron una vez al día, en horas de la mañana (9:00 am y 11:00 am), durante cinco días semanales, hasta los 90 días. La duración del estudio se corresponde con una evaluación de toxicidad subcrónica dérmica de 90 días (OECD 1981). Los volúmenes administrados se ajustaron semanalmente en función del peso corporal. En los

grupos Control y Vehículo, el volumen administrado se estableció a partir del esquema utilizado para calcular el volumen a administrar al grupo de dosis alta.

Obtención de las muestras

La sangre se obtuvo de las venas femorales de los animales utilizando jeringuillas de 5 o 10 ml y agujas 21 G x 1½ pulgadas. Los animales se sometieron a ayuno previo de aproximadamente 12 horas. Para la evaluación de indicadores de estrés oxidativo se tomaron dos muestras de sangre para la obtención de plasma, uno con ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) (determinación de malondialdehído (MDA) (Ohkawa, 1979), proteínas totales (Marxwell, 1987) y grupos sulfhídricos (SH) (Miao-Lin, 1994) y el otro con heparina (determinación de catalasa) (Aebi, 1974). Para la evaluación de bioquímica sanguínea se tomaron alícuotas en viales de 2 y 1.5 ml respectivamente donde se dejó coagular y posteriormente se centrifugó a 12 000 r.p.m. en una centrifuga Eppendorf durante 10 minutos.

VARIABLES ANALIZADAS

Se realizaron exámenes de bioquímica sanguínea y estrés oxidativo a todos los animales antes de efectuar la primera aplicación y al finalizar el período de administración.

Determinación bioquímica sanguínea

Se determinaron, la albúmina (Alb) el colesterol (Col) y los triglicéridos (TG), mediante el juego de kits (HELFA ® Diagnósticos (E.P.B. “Carlos J. Finlay”) en un Analizador Automático Cobas Integra 400 PLUS (Roche Diagnostic Systems).

Determinación de proteínas totales

Se determinaron las concentraciones de proteínas totales en el plasma, según el método de Lowry modificado (Marxwell *et al*, 1987).

Determinación de Sustancias Reactivas al Ácido Tiobarbitúrico (SRATB) en plasma

La determinación de las SRATB en el plasma, se realizó según la técnica de Ohkawa *et al*, 1979. Se añadió a la mezcla de reacción (500µL de plasma) 0,2 mL de SDS (Analar, Inglaterra) al 8,1%, 1,5 ml de ácido acético al 20 % ajustada a pH 3,5 y 1,5 mL de una disolución acuosa de ácido tiobarbitúrico al 0,8%. Se extrajo la capa superior orgánica y se realizó la lectura de la absorbancia a 534 nm en un espectrofotómetro UV-vis (GENESYS, China). Los niveles de SRATB se calcularon según las concentraciones de MDA, para lo que se construyó una curva patrón con malondialdehído bis (dimetil acetal, MERCK, EUA). Los valores de MDA se reportaron como mmol de MDA/mg de proteína.

Determinación de la actividad de la catalasa (CAT) en plasma.

La actividad de la CAT se determinó por el método modificado de Aebi, 1974, en el que se monitoreó la desaparición del H₂O₂ a 240 nm durante 5 min en espectrofotómetro. A 10 µL de muestra se añadió 2,89 mL de buffer fosfato de potasio 50 mmol/L (pH 7,4). El tiempo de descomposición del H₂O₂ fue determinado espectrofotométricamente por el cambio de absorbancia a 240 nm. La actividad de la enzima se calculó por el coeficiente de extinción molar (43,6 x 10⁻³) y se expresó en UI/min mg de proteínas x 10⁻¹.

Determinación de las concentraciones de grupos sulfhidrilos en plasma.

La determinación de grupos sulfhidrilo (SH) se realizó mediante la técnica descrita por Miao-Lin Hu, 1994, para ello se tomó una alícuota de 200µL de la muestra de plasma, se le añadió 600µL de buffer TRIS-EDTA 20 mmol/L, pH 8,2; 40 µL de 5,5'- dithiobis-(2-nitrobenzoic acid) (DTNB) 10 mmol/L y 3,16 mL de etanol absoluto. La lectura se realizó a 412 nm en

un espectrofotómetro. El total de grupos SH se calculó usando una absorptividad de 13,600 cm-1M-1 y se expresó en mmol/L.

Análisis estadístico

Las comparaciones entre grupos para todas las variables analizadas se realizaron mediante el ensayo no paramétrico de Tukey's. A priori se fijó el nivel de significación $\alpha = 0,05$. Se utilizó el paquete estadístico del programa GraphPad Prism versión 5,0.

RESULTADOS

En la tabla 1 se describe el comportamiento de los indicadores de estrés oxidativo (MDA, grupos SH y actividad de la CAT) en el plasma de los perros sin tratamiento y tratados con las sustancias vehículo (AG) y de ensayo (AGO). Los grupos de animales tratados tópicamente con el vehículo (AG), dosis baja y media de AGO, no mostraron diferencias significativas ($p < 0,05$) en cuanto a los niveles de MDA antes y después de aplicado los productos durante 90 días. A diferencia de ello, el grupo tratado con dosis alta redujo significativamente los niveles de MDA (2,65 mmol/mg prot) en plasma al final del tratamiento durante 90 días, con respecto al tiempo de inicio del tratamiento (6,21 mmol/mg prot). En cuanto al análisis del comportamiento de los grupos SH en las muestras de plasma, no existieron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los grupos estudiados. Con respecto a la actividad de la CAT, se evidenció que no mostró diferencias significativas ($p < 0,05$), al inicio y al final del estudio, en ninguno de los grupos controles. Sin embargo, los grupos de animales tratados con dosis baja, media y alta de AGO, experimentaron un incremento significativo de la actividad de la CAT (0,57; 0,78; 0,84 UI/min/mg prot, respectivamente) después de 90 días de tratamiento, con respecto al inicio de este (0,20; 0,18; 0,23 UI/min/mg prot respectivamente).

Tabla 1. Comportamiento de indicadores de estrés oxidativo (malondialdehído, grupos sulfhídrido y catalasa) en perros.

Grupos		MDA (mmol/mg prot)	SH (mmol/L)	CAT (UI/min/ mg prot)
		X \pm EEM	X \pm EEM	X \pm EEM
Control	Inicio	5,58 \pm 0,49	0,29 \pm 0,14	0,32 \pm 0,10
	Final	2,08 \pm 0,28	0,12 \pm 0,03	0,27 \pm 0,08
Control	Inicio	3,95 \pm 0,60	0,21 \pm 0,07	0,25 \pm 0,07
	Vehículo Final	4,16 \pm 0,36	0,29 \pm 0,090	0,35 \pm 0,09
AGO	Inicio	5,23 \pm 0,90	0,27 \pm 0,07	0,20 \pm 0,03
	(4 mg/kg) Final	3,81 \pm 0,23	0,25 \pm 0,02	0,57 \pm 0,13*
AGO	Inicio	4,42 \pm 0,63	0,21 \pm 0,05	0,18 \pm 0,03
	(20 mg/kg) Final	4,90 \pm 0,68	0,33 \pm 0,10	0,78 \pm 0,19**
AGO	Inicio	6,21 \pm 0,78	0,29 \pm 0,02	0,23 \pm 0,06
	(100 mg/kg) Final	2,65 \pm 0,28 **	0,40 \pm 0,08	0,84 \pm 0,07**

X \pm EEM: media \pm error estándar de la media * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ Prueba no paramétrica Tukey's.

Las Tablas 2 y 3 muestran el comportamiento de los parámetros bioquímicos asociados al metabolismo proteico (albúmina) y lipídico (colesterol y triglicéridos) en los perros sin tratamiento y tratados con las sustancias vehículo (AG) y de ensayo (diferentes dosis de

AGO). Los niveles de albúmina no mostraron diferencias significativas ($p < 0,05$) en ninguno de los grupos experimentales por sexo, al inicio con respecto al finalizar el estudio. En cuanto al comportamiento del perfil lipídico (colesterol y triglicéridos), no se evidenciaron cambios significativos ($p < 0,05$) para ninguna de las sustancias aplicadas tópicamente durante 90 días en las hembras y los machos.

Tabla 2. Comportamiento del parámetro de perfil proteico (albúmina) en perros hembras y machos.

Grupos		Alb (g/L) X ± EEM	
		Hembras	Machos
Control	Inicio	29,95 ± 7,71	28,8 ± 0,00
	Final	26,40 ± 12,16	20,7 ± 0,00
Control Vehículo	Inicio	33,37 ± 3,25	32,10 ± 1,73
	Final	28,85 ± 5,16	31,45 ± 2,62
AGO (4 mg/kg)	Inicio	32,50 ± 2,02	32,43 ± 3,50
	Final	28,05 ± 1,48	30,25 ± 1,20
AGO (20 mg/kg)	Inicio	34,77 ± 4,22	34,50 ± 2,08
	Final	33,90 ± 1,98	33,05 ± 2,76
AGO (100 mg/kg)	Inicio	33,77 ± 0,74	31,20 ± 0,36
	Final	32,10 ± 3,11	30,35 ± 1,77

X ± EEM: media ± error estándar de la media. Prueba no paramétrica Tukey's.

Tabla 3. Comportamiento del parámetro del perfil lipídico (colesterol y triglicéridos) en perros hembras y machos.

Grupos		Col (mmol/ L) X ± EEM		TG (mmol/ L) X ± EEM	
		Hembras	Machos	Hembras	Machos
Control	Inicio	3,55 ± 0,41	2,96 ± 0,00	0,70 ± 0,02	0,59 ± 0,00
	Final	3,61 ± 1,77	1,77 ± 0,00	0,57 ± 0,04	0,40 ± 0,00
Control Vehículo	Inicio	3,37 ± 1,35	3,35 ± 0,08	0,52 ± 0,03	0,68 ± 0,08
	Final	2,84 ± 1,37	3,25 ± 0,22	0,48 ± 0,04	0,67 ± 0,08
AGO (4 mg/kg)	Inicio	3,72 ± 0,34	3,54 ± 0,74	0,51 ± 0,10	0,55 ± 0,05
	Final	3,44 ± 0,70	2,76 ± 0,74	0,64 ± 0,13	0,46 ± 0,08
AGO (20 mg/kg)	Inicio	3,40 ± 0,60	3,56 ± 0,47	0,40 ± 0,11	0,55 ± 0,08
	Final	3,10 ± 0,12	3,09 ± 0,28	0,49 ± 0,21	0,52 ± 0,11
AGO (100 mg/kg)	Inicio	3,56 ± 0,97	3,20 ± 1, 32	0,61 ± 0,21	0,46 ± 0,12
	Final	3,79 ± 1,12	2,89 ± 0,88	0,60 ± 0,07	0,63 ± 0,22

X±EEM: media ± error estándar de la media. Prueba no paramétrica Tukey's

DISCUSIÓN

La administración tópica de las diferentes dosis de AGO mostró su influencia sobre los indicadores de estrés oxidativo (niveles de MDA y actividad de la CAT) en el plasma de perros tratados durante 90 días.

En estudios anteriores, se ha evidenciado que la aplicación de sustancias ozonizadas como tratamiento de lesiones dérmicas inducidas experimentalmente por luz ultravioleta (UV) en ratas, incrementan la actividad de enzimas antioxidantes en la piel, revirtiendo el daño oxidativo inducido por las radiaciones (Sánchez *et al*, 2011). Por otra parte, la acción citoprotectora gástrica del AGO fue demostrada mediante el incremento de la actividad de antioxidantes enzimáticos en el tejido gástrico de ratas (Zamora *et al*, 2008; Zamora *et al*, 2007). Es importante destacar, que en este estudio se demuestra la influencia sistémica de las aplicaciones de las diferentes dosis de AGO aplicado tópicamente, sobre la liberación de la enzima antioxidante CAT en plasma, resultado que de forma indirecta sugiere la absorción de los principios activos (especies peroxídicas, aldehídos, ácidos, ozónidos, peróxido de hidrógeno e hidroxihidroperóxidos) del AGO a través de la piel. Este resultado sugiere la realización de estudios posteriores que demuestren dicha absorción e influencia sistémicas.

Teniendo en cuenta que el estrés oxidativo constituye un mecanismo de respuesta involucrado en los procesos fisiopatológicos de las enfermedades dermatológicas en caninos (Marlin *et al*, 2002), el uso del AGO constituye un potencial terapéutico para el tratamiento de las dermatopatías caninas, no solo por su actividad estimuladora local de los sistemas antioxidante sino también sistémica, tal como se demuestra en este estudio. En este sentido, vale resaltar que el incremento de la actividad de la CAT, logrado por la dosis de AGO (100 mg/kg), estuvo acompañado del decremento significativo de la peroxidación lipídica (MDA) en los animales tratados durante 90 días. Este resultado muestra que las aplicaciones tópicas

de AGO estimula la actividad del sistema antioxidante endógeno para lograr la homeostasis celular y el equilibrio de sustancias necesarias en la piel de los animales. Con este resultado se demostró por primera vez que el AGO a diferentes dosis (4, 20 y 100 mg/kg) aplicado tópicamente durante 90 días en perros, incrementó de forma significativa, la actividad de la CAT en el plasma, mientras que a la dosis de 100 mg/kg redujo de forma significativa la peroxidación lipídica determinada mediante los niveles de MDA.

Tanto la acción antiinflamatoria (Barroetabeña *et al*, 2002) como cicatrizante (Pai *et al*, 2014) de aceites ozonizados (AOs), ha sido sustentada mediante el incremento de la actividad de enzimas antioxidantes, específicamente de la superóxido dismutasa (SOD).

Un indicador importante en el estudio, considerando que el AGO posee una base lipídica, fue la evaluación de los indicadores lipídicos como los niveles de colesterol y los triglicéridos, los cuales se encontraron entre los valores normales para la especie en estudio. De esta manera se demuestra que las aplicaciones tópicas con diferentes dosis de AGO durante 90 días, no modificaron los parámetros del perfil lipídico evaluados (colesterol y triglicéridos), los cuales se encontraron entre los valores normales, reportados para la especie, según: TG: hembras (0,39- 1,35 mmol/L) y machos (0,39- 1,26 mmol/L) y Col: (Hembras (2,17- 8,27 mmol/L) y machos (2,77- 8,27 mmol/L) (Camps). Sin embargo, no se descarta la posibilidad de ampliar el estudio y profundizar en el comportamiento de otros lípidos plasmáticos como son: lipoproteínas de baja densidad y alta densidad.

Por otro lado, la albúmina constituye una proteína plasmática esencial con diferentes funciones como: mantener el 80 % de la presión oncótica, como principal responsable de los movimientos acuosos intravasculares hacia el intersticio. Además, garantiza el transporte de diferentes sustancias como la bilirrubina, ácidos grasos, medicamentos y hormonas, incluyendo al calcio, por lo que una hipoalbuminemia, se acompaña de una hipocalcemia (Escalante, 2006). En este estudio los niveles de albúmina sérica, entre en los niveles normales reportados para la especie según la edad y sexo (hembras (26-36 g/L), machos (26-39 g/L) (Camps). Teniendo en cuenta las funciones de dicha proteína, y que los niveles de ésta no fueron alterados por las aplicaciones de las sustancias evaluadas, se considera pertinente, observar el comportamiento de esta proteína y otras, en estudios posteriores. Ambos resultados, en cuanto el comportamiento de indicadores proteicos y lipídicos, avalan en parte, la seguridad de las aplicaciones tópicas de AGO a las dosis estudiadas en perros Beagles durante 90 días.

En sentido general, los resultados de este estudio, evidencian que las aplicaciones tópicas del AGO, sugieren una determinada absorción del compuesto a través de la piel, alcanzando compartimientos sistémicos que conllevan al incremento de la actividad de la CAT como enzima antioxidante. Sin embargo, se debe considerar que se trata de un compuesto oleoso que contiene ácidos grasos, además de los principios activos (peróxidos, hidroperóxidos y aldehídos entre otros) y que no se evidenció su influencia sobre el metabolismo de los lípidos (colesterol y triglicéridos) y proteínas (albúmina).

CONCLUSIONES

Las aplicaciones tópicas de AGO durante 90 días, incrementaron la actividad de la catalasa en el plasma, redujeron los niveles de MDA y de albúmina en suero, sin embargo, no modificaron los parámetros del perfil lipídico evaluados en los perros.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aebi, H. (1974). Catalase. In: Bergmeyer HV, editor. *Methods in enzymatic analysis*. New Yor: *Academic press*; 2 (4) p.674-84.
- Almela, M.R., Rubio, P.C., Cerón, J.J., Ansón, A., Tichy, A. & Mayer, U. (2018). Selected serum oxidative stress biomarkers in dogs with non-food and food induced atopic dermatitis. *Vet Dermatol*; 29 (3) 229-e82.
- Barroetabeña, A.R., Sánchez, A. A. & Guerra, J.M (2002). Acción del aceite ozonizado sobre el proceso inflamatorio en heridas de piel de animales de experimentación. *Correo Científico Médico de Holguín*, 6 (2).
- Cao, Ch., Xiao, Z., Wu, Y. & Ge, Ch. (2020). Diet and Skin Aging—From the Perspective of Food Nutrition. *Nutrients*; 12 (870).
- Camps J. Intervalos de referencia para los valores sanguíneos en perros y gatos. Barcelona. Gallina Blanca Purina División Consumo Servicios Profesionales P~ San Juan, 189-08037 Barcelona https://ddd.uac.cat/pub/jcams/jcamsactpro/jcamsactpro_109.pdf
- CECMED. (2004) Resolución 39 del año 2004. Principios de las Buenas Prácticas de Laboratorio no clínico de Seguridad Sanitaria y Medioambiental.
- Colitti, M., Stefanon, B., Gabai, G., Gelain, M.L. & Bonsembiante, F. (2019). Oxidative Stress and Nutraceuticals in the Modulation of the Immune Function: Current Knowledge in Animals of Veterinary Interest. *Antioxidants*; 8 (28).
- Díaz, M., Lezcano, I., Molerio, J. & Hernández, F. (2001). Spectroscopic characterization of ozonides with biological activity. *Ozone-SciEng*; 23(1):35-40.
- Díaz, M., Gavín, J., Ledea, O., Hernández, F., Alaiz, M. & Garcés, R. (2005). Spectroscopic Characterization of Ozonated Sunflower Oil. *Ozone Science and Engineering*; 27 (3): 247-253.
- Díaz, M., García, G., García, K., Sánchez, Y. & Tillan, J. (2006). Evolución de la irritabilidad dérmica, oftálmica y el efecto sensibilizante del OLEOZON® tópico. *REDVET*; 7 (11) <http://www.veterinaria/revistas/redvet/0111106.html>.
- Díaz, M., Gavín, J. & Andrade, J.B. (2008). Structural characterization by Nuclear Magnetic Resonance of ozonized triolein. *Grasas y Aceites*; 59(3): 274-281.
- Dimri, U., Ranjan, R., Kumar, N., Sharma, M.C., Swarup, D., Sharma, B. & Kataria, M. (2008). Changes in oxidative stress indices, zinc and copper concentrations in blood in canine demodicosis. *Veterinary Parasitology, New York*; 154 (1-2), 98-102.
- Escalante, G.C., Zeledon, S.F. & Ulate, M.G (2006). Proteinuria, fisiología y fisiopatología aplicada. *AMC*; 49 (2).
- Huerta, M.J., Ortega, M.C., Cobos M.P., Herrera, J.H., Díaz, A.C. & Guinzberg, R.P. (2005). Estrés oxidativo y el uso de antioxidantes en animales domésticos. *INCI*; 30 (12).
- Guerrer, L.V., Cunha, K.C., Nogueira, C.L., Cardoso, C.C., M.M., Soares, C.N. & Almeida, T.G. (2012). “In Vitro” Antifungal Activity of Ozonized Sunflower Oil on Yeasts from Onychomycosis. *Brazilian Journal of Microbiology*; 1315-1318 ISSN 1517-8382
- Ledea, O.E. (2004). Estudio de la composición química del aceite de girasol ozonizado OLEOZON®. *Revista CENIC Ciencias Químicas*; 35 (1): 33-34.
- Ledea, O.E., González, M., Hernández, C., López, A., Moleiro, J., & Rosado, A. (2005). Validación de un método espectrofotométrico para la determinación del contenido de aldehídos en el aceite de girasol ozonizado (OLEOZON®). *Revista CENIC Ciencias Químicas*, 36 (3), 149-155

- Lezcano, I., Nuñez, N., Espino, M. & Gómez, M. (2000). Antibacterial activity of ozonized sunflower oil, OLEOZON, against *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermitis*. *Ozone SciEng*; 22:207-214.
- Marlin, D.J., Fenn, K., Smith, N., Deaton, C.D., Roberts, C.A., Harris, P.A., Dunster, C. *et al.* (2002). Changes in circulatory antioxidant status in horses during prolonged exercise. *J. Nutr.* 132, 1622S-1627S.
- Martínez, S.S., Bernal, L.J., Tvarijonaviciute, A., Garcia, M.J.D., Tecles, F. & Cerón, J.J. (2014). Canine demodicosis: the relationship between response to treatment of generalized disease and markers for inflammation and oxidative status. *Vet Dermatol*; 25, 72-e24.
- Marxwell, M.A., Haas, S.M., Beiber, L.L. & Tolbert, N.E. (1987). A modification of the Lowry procedure to simplify protein determination in membrane lipoprotein samples. *Anal. Biochem*; 87, 206-209.
- Menéndez, S., Molerio, J., Díaz, W., Lezcano, I., León, F., Ledea, O., Falcón, L., *et al.* (1990). Registro sanitario sobre la aplicación del aceite de girasol ozonizado OLEOZON® en la epidermofitosis. #1498.
- Miao-Lin, H. (1994). Measurement of protein thiole groups and glutatione in plasma. *Methods Enzimology*; 233, 380-382.
- OECD. 1981. Guidelines for testing of Chemicals. Organisation for Economic Co-operation and Development. 411” Subchronic Dermal Toxicity: 90 Days Study”
- Ohkawa, O., Ohishi, I. & Yagi, K. (1979). Assay of lipid peroxides in animal tissues by the thiobarbituric acid reaction. *AnalBiochem*; 95(2): 351-358.
- Osorio, J.H., Suárez, J. & Uribe, L.F. (2010). Metabolismo de los lípidos en caninos en el contexto de salud-enfermedad. *Vet Zootec*; 4(1), 83-97.
- Pai, S.A, Gagangras, S.A., Kulkarni, S.S. & MajumdarA, S. (2014). Potential of ozonatedsesame oil to augment wound healing in rats. *IndianJournal of PharmaceuticalSciences*; 76 (1), 87-92.
- Rodríguez, M.D, Menéndez, S. & Gómez, M. (1990). Estudio teratogénico del aceite ozonizado. Primer Congreso Iberolatinoamericano de Aplicaciones del Ozono. CNIC-CIMEQ, 31 de octubre de 1990.
- Romanucci, M., Bongiovanni, L., Russo, A., Capuccini, S., Mechelli, L., Ordeix, L. & Salda, L.D. (2001). Oxidative stress in the pathogenesis of canine zinc-response dermatosis. *Veterinary Dermatology, Malden*; 22 (1) 31-38.
- Sánchez, Y., Diaz, M.F., Hernández, F., Gil, D. & Garcia, G. (2011). Antioxidant effects of an ozonized theobroma oil formulation on damaged-inflammatory rat skin. *Grasas y aceites*; 62 (1), 105-110.
- Sechi, L.A., Lezcano, I., Nuñez, N., Espim, M., Dupre, I. & Pinna, A. (2001). Antibacterial Activity of Ozonized Sunflower Oil (OLEOZON). *J. ApplMicrobiol*; 90 (2): 279-284.
- Sharifi, R.M., Nanjangud, V., Kumar, A., Zucca, P., Varoni, L.M., Dini, L. & Panzarini, E. (2020). Lifestyle, Oxidative Stress, and Antioxidants: Back and Forth in the Pathophysiology of Chronic Diseases. *Frontiers in Physiology*; 11 article 694.
- Zamora, Z., González, Y.C. & Ledón, N. (2006). Effect of Ozonized sunflower oil on Myeloperoxidase activity in the model of ear oedema in mouse. *Revista Electrónica de Veterinaria REDVET*; 7 (12).
- Zamora, R.Z., González, A.R. & Guanche, D. (2007). Antioxidant mechanism is involved in the gastroprotective effects of ozonized sunflower oil in ethanol-induced ulcers in rats. *Mediators Inflamm* ;65873.

- Zamora, R.Z., Gonzalez, R. & Guanche, D. (2008). Ozonized sunflower oil reduces oxidative damage induced by indomethacin in rat gastric mucosa. *Inflamm Res. Jan*; 57(1): 39-43.
- Zamora, Z.R., Molina, V., Mena, L., & Ledea, O. (2018). Efectos del aceite de girasol ozonizado en el modelo de granuloma por algodón en ratas (modelo de inflamación crónica). *Rev. CENIC Cienc. Biol*, 49(3), 1-12.
- Winterbourn, C.C., Kettle, A.J. & Hampton, M.B. (2016) Reactive oxygen species and neutrophil function. *Annu. Rev. Biochem*; 85, 765–792.