

Efecto Citoprotector del Oleozon[®] Oral en el Modelo de Úlceras Gástricas Inducidas por Etanol en Ratas.

Zullyt B. Zamora Rodríguez, Ricardo González Álvarez, Silvia Menéndez Cepero, Frank Hernández Rosales.

¹ Centro de Investigaciones del Ozono, Departamento de Investigaciones Biomédicas, Laboratorio de Ensayos Biológicos. Avenida 25 y 158, Cubanacan, Playa, Apartado Postal 6414, Ciudad de La Habana, Cuba.

Telf. 271-2324

Fax: 271 0233

Email: zullyt.zamora@cenic.edu.cu

RESUMEN: El Oleozon[®] oral es un producto ozonizado, al cual se le han demostrado propiedades como giardicida, por lo cual se le otorgó el registro sanitario para ese uso terapéutico. Teniendo en cuenta lo anterior, decidimos evaluar la efectividad del Oleozon sobre las lesiones gástricas inducidas en ratas por el etanol. Se utilizaron ratas de la línea Sprague Dawley machos de 180-200g de peso corporal, estas fueron divididas aleatoriamente en grupos de 5 animales cada uno. A tres grupos se les administró Oleozon[®] oral (0,1; 0,3 y 0,6 mL/animal. Otros dos grupos fueron utilizados como controles, uno con etanol absoluto (1mL/200g de peso corporal y el otro grupo como control negativo. Tanto el Oleozon como el etanol fueron aplicados mediante una cánula intragástrica. El Oleozon fue aplicado de forma profiláctica (una administración diaria por 4 días) y una hora después de la última aplicación del fármaco, se administró el etanol, evaluándose 1 hora después las lesiones gástricas. Como resultado se observó una disminución significativa de las lesiones gástricas en los grupos pretratados con Oleozon así como una disminución significativa del peso del órgano. En cuanto a la permeabilidad vascular, hubo una reducción entre el 76 y el 83 % en los grupos pretratados con Oleozon con respecto al control con etanol. En conclusión, el Oleozon oral ejerció un efecto citoprotector en la mucosa gástrica. La disminución en la permeabilidad vascular producida por el Oleozon contribuyó al efecto protector de la mucosa.

ABSTRACT: Oleozon[®] is an ozonized product that has shown a great effectiveness as germicidal agent against *Giardia lamblia* and recently it was approved as drug in Cuba for the treatment of this infectious disease. Taking into account the former findings we decided to evaluate the potential effect of Oleozon on the gastric lesions induced by ethanol in rats. Male Sprague Drawly rats (180-200g b.w) were used. They were divided at random in groups of five animals each one. To three groups Oleozon was administered orally (0.1, 0.3 and 0.6 ml/animal). Other two groups were used as controls, one with absolute ethanol (1 ml/200g b.w) and the other one as negative control. Both agents, Oleozon and ethanol were applied using intragastric cannula. Oleozon was applied prophylactically (one daily administration for 4 days) and one hour after the last application of the drug, ethanol was administered. One hour thereafter, the gastric lesions were evaluated. Oleozon significantly reduced both, the gastric lesions and the weight of the organ. In relation with the vascular permeability, there was a great reduction of it (76-83 %) in the groups pretreated with Oleozon with respect to ethanol control group. In conclusion oral Oleozon exerted a cytoprotective effect in the gastric mucous. The decrease in vascular permeability induced by Oleozon contributed to its protective effect of the mucous.

Palabras Claves: Oleozon oral, lesiones gástricas, rata, citoprotector, etanol,

Key Words: oral Oleozon, gastric lesions, rat, citoprotector, ethanol.

INTRODUCCIÓN

El aceite de girasol ozonizado (OLEOZON®) es un fármaco registrado en Cuba para su uso en el tratamiento de la giardiasis, demostrándose en los ensayos clínicos realizados¹ que posee una efectividad terapéutica comparable a la del Ornidazol, un nitroimidazol considerado fármaco de elección en la giardiasis. Los principales constituyentes del Oleozon oral son los productos resultantes de la ozonólisis de los triglicéridos insaturados tales como los peróxidos, hidroperóxidos aldehídos, ozónidos y los ácidos carboxílicos,² los cuales han sido debidamente caracterizados por espectrometría de masa acoplada a cromatografía de gases, habiéndose demostrado experimentalmente que estas sustancias ejercen efectos antimicrobianos contra bacterias, hongos y protozoos como la *Giardia lamblia*.^{3,4,5}

Tomando en cuenta lo anterior, decidimos evaluar los efectos del Oleozon oral en las lesiones gástricas inducidas por etanol.

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales y Tratamientos

Se utilizaron ratas de la línea SD, macho, 180-250g de peso corporal, provenientes del Centro para la Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB), Habana, Cuba. Estos animales fueron mantenidos durante todo el experimento en condiciones de temperatura y humedad controlados, incluyendo ciclos de luz-oscuridad, con alimentación y agua *ad libitum*.

Los tratamientos con Oleozon fueron aplicados intragástricamente mediante una cánula en ambos experimentos. La administración de etanol fue de 1ml/200g de peso corporal de la rata.

Diseño experimental para el modelo de lesiones gástricas inducidas por etanol

Los animales fueron distribuidos aleatoriamente en 6 grupos experimentales: grupo I, etanol 1ml/200g i.g; grupo II pretratado con aceite de girasol sin ozonizar (0,1ml); grupo III, pretratado con Oleozon (0,1 ml); grupo IV, pretratado con Oleozon (0,3ml); grupo V, pretratado con Oleozon (0,6ml) y el grupo VI fue utilizado como control negativo sin tratamiento. Para la aplicación del Oleozon, se le retira el alimento al animal durante una hora, se aplica el producto y se le incorpora el alimento 2 horas después, con el objetivo de evitar la interacción del Oleozon con el alimento. Los tratamientos se aplicaron cada 24 h durante 4 días. La lesión gástrica fue inducida previo ayuno de 24 h y una hora después de la última aplicación del Oleozon, mediante la instilación intragástrica de etanol (1ml/200g). Transcurrida una hora, los animales fueron sacrificados bajo atmósfera de éter, los estómagos fueron extraídos y abiertos por la curvatura mayor. Posteriormente se procede al análisis de los parámetros: índice de ulceración y peso del órgano. Para la determinación de la permeabilidad vascular, se realizó otro experimento.

Índice de ulceración

Se determinó como la media de la longitud de cada una de las lesiones por grupo.

Permeabilidad vascular

Este experimento fue realizado en otros animales utilizando el mismo diseño experimental descrito anteriormente, induciendo las lesiones gástricas con etanol una hora después de la última aplicación del Oleozon. La permeabilidad vascular fue evaluada de acuerdo a lo descrito por Szabo (1985) así de esta forma 45 min. después de la administración del etanol cada rata recibió 10 mg/kg de azul de Evans por vía endovenosa. Pasados 15 min. las ratas fueron sacrificada bajo atmósfera de éter, los estómagos y una porción del duodeno fueron extraídos, las muestras fueron homogenizadas añadiendo 1ml de solución salina (0,9 %), mediante el empleo de un homogenizador de tejido Ultra-turrax T25 Polytron.

Posteriormente a cada homogenizado se le añadió 2,5 ml de HCL (32%), transcurridas dos horas a temperatura ambiente se le extrajo el azul de Evans, mediante la adición de 2,5 ml de cloroformo y se centrifugó a 3000 g durante 15 min. La concentración de este colorante fue medida en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 610 nm. La cantidad de colorante fue expresada en µg/g de tejido.

Análisis estadístico

Los datos fueron procesados estadísticamente mediante el método no paramétrico de Mann Whitney. Los datos fueron expresados como las medias ± el error estándar.

RESULTADOS

La tabla 1 muestra los resultados correspondientes al índice de ulceración, obtenido en el experimento sobre el efecto de las aplicaciones profilácticas del Oleozon en las lesiones gástricas inducidas por etanol, donde se muestra que hubo una reducción significativa del índice de ulceración en los grupos pretratados con Oleozon. En cuanto al peso de los estómagos, se observó una disminución significativa en los grupos pretratados con los volúmenes mas bajos de Oleozon (0,1 y 0,3 mL) con respecto al grupo control con etanol, mientras que el grupo pretratado con el volumen de Oleozon de 0,6 ml, no tuvo diferencias significativas con respecto al control con etanol, aunque el índice de ulceración obtenido, demostró que el tratamiento fue efectivo. Tabla 2. En concordancia con lo anterior, el ensayo de permeabilidad vascular demostró una reducción significativa de la misma en los grupos pretratados con Oleozon con respecto al control con etanol. Tabla 3.

Tabla 1. Análisis estadístico del índice de ulceración.

Grupos	n	X ± DS	Reducción %
I (Etanol)	4	31.82 ± 15.84	
II (Aceite virgen, 0.1mL) + Etanol	5	43.18 ± 21.81	- 35.7
III (OLEOZON, 0,1 mL) + Etanol	5	4.6 ± 5.81**	85.54
IV (OLEOZON, 0,3 mL) + Etanol	5	0 ± 0**	100
V (OLEOZON, 0,6 mL) + Etanol	5	0 ± 0**	100
VI (Control neg)	5	0 ± 0**	100

** p ≤ 0,05

La significación estadística es con respecto al control con etanol.

Tabla 2. Análisis estadístico del peso de los estómagos

Grupos	n	X ± DS (g)
I (Etanol)	4	2.78 ± 0.67 ^a
II (Aceite virgen, 0.1mL) + Etanol	5	2.98 ± 0.41 ^a
III (OLEOZON , 0,1 mL) + Etanol	5	2.17 ± 0.33 ^b
IV (OLEOZON , 0,3 mL) + Etanol	5	2.28 ± 0.21 ^b
V (OLEOZON , 0,6 mL) + Etanol	5	2.90 ± 0.20 ^a
VI (Control neg)	5	1.49 ± 0.08 ^c

Letras iguales p ≥ 0,05, letras diferentes p ≤ 0,05

Tabla 3. Comportamiento de la permeabilidad vascular.

Grupos	n	X ± DS µg/ g de tejido	Reducción (%)
I (Etanol)	5	0.145 ± 0.014 ^a	
II (Control neg)	5	0.015 ± 0.006 ^b	
III (Aceite virgen, 0.1mL) + Etanol			
IV (OLEOZON , 0,1 mL) + Etanol	5	0.028 ± 0.006 ^b	80.6
V (OLEOZON , 0,3 mL) + Etanol	5	0.024 ± 0.006 ^b	83
VI (OLEOZON , 0,6 mL) + Etanol	5	0.035 ± 0.014 ^b	76.5

Letras iguales p ≥ 0,05, letras diferentes p ≤ 0,05

DISCUSIÓN

Nuestros resultados mostrados en las Tablas I, II y III demuestran claramente que el pretratamiento con Oleozon ejerce un efecto citoprotector en la mucosa gástrica dañada en forma aguda por el etanol, cuando este es administrado intragástricamente en concentraciones entre 50-100 %, observándose las erosiones hemorrágicas y las úlceras entre 1 y 2 horas posteriores a la aplicación del etanol. A diferencia de otros modelos experimentales agudos de úlcera gástrica como son las inducidas por ácido acetilsalicílico y la indometacina,⁶ el del etanol no es dependiente de un exceso de la secreción de ácido del estómago, razón por la cual el pretratamiento con fármacos antisecretorios efectivos como los bloqueadores de los receptores H₂ de la histamina no ejercen protección de la mucosa gástrica contra el efecto ulcerogénico del etanol^{7, 8}. Sin embargo, se han acumulado evidencias sólidas de que otros factores tales como la producción deprimida de mucus gástrico, la disminución de la producción de prostaglandinas,^{9,10, 11} la producción incrementada de especies reactivas del oxígeno (EROs)^{12, 13, 14} así como un incremento de la permeabilidad vascular asociada con un flujo sanguíneo disminuido en la mucosa gástrica están involucrados en la etiopatogenia de la úlcera gástrica inducida por etanol.¹²

Nuestros resultados demuestran que el Oleozon oral ejerce efecto citoprotector en este modelo al reducir el índice de ulceración y el peso de los estómagos de las ratas tratadas (Tabla I y II). Con independencia de que otros factores pudieran o no estar involucrados en la acción del Oleozon, en nuestra opinión la disminución en la permeabilidad vascular producida por este fármaco (Tabla III) contribuye de forma importante a su efecto protector de la mucosa gástrica contra el daño tisular inducido por el etanol.

Actualmente otras investigaciones están en ejecución en nuestro laboratorio con vistas a esclarecer otros aspectos vinculados a la actividad antiulcerosa del Oleozon.

CONCLUSIÓN

El Oleozon oral tuvo un efecto citoprotector de la mucosa gástrica en el modelo de lesiones gástricas inducidas por etanol en ratas. Estos resultados avalan que se continúe la evaluación del Oleozon en otros modelos experimentales de úlcera gástrica y duodenal.

BIBLIOGRAFÍA

1. Amoroto R.M., Fernández C.M., Rodríguez Y.M., Calcagno E., Robaine M.G., González M.E., Fernández C., Obrera G., Sayú P., Moran I.M., Escobedo A.A., Palomino A., Acosta M., Pantaleón B., Fernández J., Dueñas L., Menéndez S., Calunga J.L. Eficacia del aceite ozonizado (OLEOZON oral) en el tratamiento de la giardiasis. Ensayo clínico fase III, Aleatorizado, Abierto y Controlado. **Revista Cubana de Farmacia**, **42** (Especial), 173, 2002.
2. Jardines D., Correa T., Ledea O., Zamora Z., Rosado A. y Molerio J. Gas Chromatography–Mass Spectrometry profile of urinary organic acids of wistar rats orally treated with ozonized unsaturated triglycerides and ozonized sunflower oil. **Journal of Chromatography B**, **783**, 517-525, 2003.
3. Lezcano I., Molerio J., Gómez M., Contreras R., Roura G. y Diaz W. Actividad *in vitro* del OLEOZON frente a agentes etiológicos de infecciones en la piel. **Revista CENIC Ciencias Biológicas**, **29**, 209, 1998.
4. Gell A., Menéndez S., Gómez M., Ruiz A., Pérez O., Lastre M., Eng L. Evaluation of ozone therapy in humans and in animals infected with *Giardia lamblia*. Proceeding, of the 10th Ozone World Congress, Mónaco. 1991
5. Hernández D., Hernández F., Zamora Z., González M., Ancheta O., Torres D. y Bouza M. In vitro and in vivo effects of oral Oleozon on *Giardia Lamblia* Trophozoites. XIII Scientific Seminar, III Simposio Internacional de Aplicaciones del Ozono. Resúmenes. 2000.
6. Sekiguchi H, Hamada, Taga F and Nishino K. Effects of the new histamine H₂– receptor antagonist N-Ethyl-N- [3-[3-(piperidinomethyl) phenoxy] propyl] urea with potent gastric mucosal protective activity on acute gastric lesions and duodenal ulcers in rats. **Arzneimittel-Forschung/Drug. Res.**, **43**(I), 2, 134-138, 1993.
7. Szabo S., Trier J.S., Brown A., Schncor J. Early vascular injury and increased vascular permeability in gastric mucosal injury caused by ethanol in the rat. **Gastroenterology**, **88**, 228-336, 1985.
8. Szabo S., Trier J.S., Brown A., Maull E.A. Increased vascular permeability appears early in ethanol induced gastric injury and is reduced by prostaglandins. **Gastroenterology**, **82**, 1191, 1982.

9. Johansson C., Bergstrom A. Prostaglandins and protection of the gastroduodenal mucosa. **Scand. J. Gastroenterol.**, **77 (Suppl.)**, 21-46, 1982.
10. Robert A: Cytoprotection by prostaglandins. **Gastroenterology**, **77**, 1086-1094, 1979.
11. Motilva V., Alarcon de La Lastra C., Martin M. J. Ulcer-protecting effects of naringenin on gastric lesions induced by ethanol in rats: role of endogenous prostaglandins. **J. Pharm. Pharmacol.**, **46**, 91-94, 1994.
12. Glavin G.B and Szabo S. Experimental gastric mucosal injury: laboratory models reveal mechanisms of pathogenesis and new therapeutic strategies. **FASEB J.**, **6**, 825-831, 1992.
13. Mehmet E.B., Taysi S., Polat F., Goecer F. Mechanism of the beneficial effects of dantrolene sodium on ethanol-induced acute gastric mucosal injury in rats. **Pharmacological. Res.**, **45**, 421-425, 2002.
14. Martin MJ, La Casa C, Alarcon de L Lastra C., Cabeza J., Villegas I and Motilva V. Antioxidant mechanism Involved in gastroprotective effects of quercetin. **Zeitschrift Naturforschung**, **53**, 82-88, 1998.