

Instituto de Ciencias Básicas y Preclínicas "Victoria de Girón"
Laboratorio de Fisiología Renal

OZONOTERAPIA EN LA GLOMERULONEFRITIS TÓXICA EXPERIMENTAL POR ADRIAMICINA

Dr. José Luis Calunga Fernández, Lic. Merien Bello Ferro, Dr. Manuel Chaple La Hoz, Dr. Ernesto Barber Gutiérrez, Dra. Silvia Menéndez Cepero y Dr. Nelson Merino

RESUMEN

Se estudió el efecto del ozono por vía rectal a diferentes dosis sobre variables de función renal y la presión arterial sistólica en un modelo de glomerulonefritis tóxica experimental por adriamicina. La glomerulonefritis experimental es causa de insuficiencia renal, caracterizada por un daño renal progresivo. Existen diferentes esquemas de tratamiento, los cuales son muy caros y producen inmunosupresión, que afecta la calidad de vida del paciente. Para desarrollar este trabajo se utilizaron 40 ratas hembras Wistar de 200 g de peso, divididas en 4 grupos, uno control, otro control positivo, que recibieron adriamicina durante un período de 10 semanas, y otros 2 que recibieron terapia con ozono. A todos se les determinó la proteinuria, presión arterial sistólica y diuresis de 24 h. Los resultados mostraron que la terapia con ozono a una dosis de 0,3 mg/kg tuvo efecto renoprotector.

Palabras clave: Glomerulonefritis experimental, adriamicina, ozono, renoprotector, estrés oxidativo

Las glomerulonefritis se encuentran dentro de las primeras causas del síndrome de insuficiencia renal crónica (IRC), a pesar de los adelantos de la ciencia se hace muy difícil el control del paciente portador de IRC.¹⁻³ Ahora bien, existen muchas variedades de glomerulonefritis, en el caso de este trabajo, la glomerulonefritis intercapilar difusa, la cual es un trastorno patológico que a pesar de los múltiples tratamientos, basados en la inmunosupresión fundamentalmente, evoluciona en un gran porcentaje de los casos a la IRC.¹⁻³

Se conoce hoy día que dentro de los aspectos fisiopatológicos que caracterizan a esta entidad está el desencadenamiento de la liberación de especies reactivas del oxígeno (EROS), que afectan directamente estructuras de la nefrona como el glomérulo, la célula epitelial de los túbulos, y modifica la tasa de filtración glomerular.⁴⁻⁸ En este modelo experimental se utilizó la adriamicina, la cual es una antraciclina lipofílica que genera el radical libre anión superóxido, creando severa toxicidad en el tejido renal del animal, que lleva a un esta-

do anatomopatológico de glomerulonefritis intercapilar difusa, similar a lo que sucede en la práctica con pacientes portadores de glomerulonefritis de diferentes causas.^{9,10} El control del paciente con glomerulonefritis es sobre la base de la utilización de drogas antiinflamatorias, inmunosupresoras como los esteroides, citotóxicos y en casos complicados citostáticos; los esquemas de tratamiento son muy largos y a pesar de estos muchos pacientes evolucionan desfavorablemente de la glomerulonefritis hacia la IRC.³ Por otra parte, la ozonoterapia es una terapia oxidativa que a dosis controlada ejerce un efecto beneficioso sobre las propiedades reológicas de la sangre, y evita de esta forma el daño endotelial y la agregación plaquetaria, además, es bien conocido el efecto de esta terapia como potente estimuladora de los sistemas antioxidantes enzimáticos, así como su efecto inmunomodulador al actuar sobre determinadas citoquinas proinflamatorias.¹¹ Conociendo el difícil control y las complicaciones que desde el punto de vista de la función renal puedan tener el paciente portador de glomerulonefritis, se hace necesaria la búsqueda de una herramienta terapéutica que ayude a estos pacientes a mejorar su calidad de vida y a disminuir a la progresión de esta enfermedad. Conociendo las características de la ozonoterapia por la vía rectal, que incrementa la respuesta antioxidante enzimática y mejora el metabolismo del oxígeno, los autores de este trabajo pensaron que pudiera tener un efecto protector de la función renal en la glomerulonefritis creada por adriamicina. A tal efecto se plantearon como objetivo estudiar el efecto del ozono por vía rectal a diferentes dosis, sobre variables de función renal como la proteinuria y diuresis de 24 h, y la evolución de la presión arterial sistólica (PAS) en un modelo de glomerulonefritis tóxica experimental por

adriamicina, comparándolo con el resto del universo que conforma la muestra.

MÉTODOS

Se tomó un universo de 60 ratas Wistar hembras de 190-200 g de peso corporal. Los animales fueron mantenidos a una temperatura entre 20-22 °C con una humedad relativa de 50-52 %. Las ratas fueron alimentadas con dieta estándar de laboratorio, con un consumo libre de agua bajo ciclo de luz-oscuridad artificial de 12 h, según las normas europeas de regulación para animales de experimentación.

Los animales fueron distribuidos en 6 grupos de 10 ratas cada uno:

Control negativo (Grupo I): fueron animales sanos sin la adriamicina y sin tratamiento, previamente se anestesiaron con pentobarbital sódico a la dosis de 30 mg/kg de peso por vía intraperitoneal, practicándosele una incisión en el cuello donde se le aisló la vena yugular interna y se le administró solución salina solamente. Después de esta operación se le practicó la rafia dejándose evolucionar por 10 semanas, pasadas estas se tomó la PAS, los valores fueron tomados como valores fisiológicos de la muestra.

Grupo control positivo (Grupo II): los animales de este grupo fueron sometidos a igual proceder que el grupo anterior pero a este grupo se le administró adriamicina a la dosis de 7,5 mg/kg en una dosis única, posteriormente se dejó evolucionar por 10 semanas, transcurridas estas se determinaron los niveles de proteínas en orina de 24 h, la diuresis en 24 h, el peso corporal y la PAS. Después estos animales evolucionaron durante 15 d, finalizado estos se sometieron a jaulas metabólicas por 24 h; pasado este tiempo, se realizaron las mismas determinaciones señaladas anteriormente, el peso corporal y la PAS.

Grupo III: recibió igual proceder que el grupo anterior lo único que pasadas las 10 semanas se le comenzó el tratamiento con ozono a la dosis de 0,3 mg/kg durante 15 sesiones.

Grupo VI: este grupo sufrió igual proceder que el grupo anterior, lo que la dosis de ozono fue de 0,5 mg/kg.

Grupo V: este recibió la dosis de 0,7 mg/kg.

Grupo VI: recibió la dosis de 1,1 mg/kg.

La determinación de proteínas en orina se realizó por el método de Biuret,¹¹ en cuanto a la PAS, esta se determinó por el método de Riva-Rocci.¹² El estudio histológico fue realizado por microscopia óptica con hematoxilina y eosina, utilizando la parafina como método de inclusión.

Procesamiento estadístico

Se calcularon la media y la desviación estándar para cada grupo y variable, se utilizó el test de Duncan y la prueba t de Student para la comparación de medias entre 2 grupos.

RESULTADOS

Los resultados muestran lo ya reportado por la literatura, el grupo control positivo al cual se le suministró la adriamicina por vía endovenosa desarrolló valores de

proteinuria mayores de forma significativa con respecto al control sano, así como mostró valores superiores de presión arterial sistólica significativamente por encima del grupo control sano, en cuanto a la diuresis de 24 h el control positivo mostró menor diuresis de forma significativa comparado con el control sano; todo esto al finalizar el estudio. El grupo ozono dosis 0,3 mg/kg mostró valores de PAS, superiores al control sano y a la del grupo de 0,5 mg de dosis significativamente, pero inferiores al control positivo y al grupo ozono dosis 0,7 y 1,1 mg/kg, de un modo significativo. En cuanto a la proteinuria de 24 h, el control positivo al finalizar el estudio presentó valores superiores de forma significativa con respecto al control sano, en cambio los animales que recibieron tratamiento con ozono a la dosis de 0,3 mg/kg y 0,5 mg/kg, mostraron valores de proteinuria elevados con respecto al control sano de un modo significativo, pero inferiores con respecto al control positivo, el grupo dosis 0,7 y 1,1 mg/kg, respectivamente. La diuresis presentó una evolución similar y resultó más alta en el grupo que llevó tratamiento con la dosis de 0,5 mg/kg, seguido por el de 0,3 mg/kg. Estos 2 grupos al finalizar el estudio mostraron incremento en la diuresis de 24 h, en cambio los grupos que recibieron la dosis de 0,7 y 1,1 mg/kg mostraron valores de diuresis inferiores significativamente con respecto a los demás grupos (tabla 1).

Tabla 1. Evolución del presión arterial sistólica (PAS), la diuresis de 24 h, la proteinuria en 24 h al inicio y final del estudio en los diferentes grupos.

Grupos Universo	Número	Inicial PAS	Final PAS	Inicial Diuresis	Final Diuresis	Inicial Proteinuria	Final Proteinuria
Control sano	10	120 ± 8	122 ± 15	5,25 ± 0,9	6,01 ± 0,20	2,3 ± 1,10	1,9 ± 1,15
Control positivo	9	157 ± 9*	160 ± 13*	3,03 ± 1,2*	3,04 ± 0,25*	7,8 ± 1,8*	9,5 ± 1,6*
Ozono 0,3	8	160 ± 13	140 ± 15**	4,08 ± 1,3	5,01 ± 1,8	7,7 ± 1,7*	6,2 ± 1,8**
Ozono 0,5	9	160 ± 9	130 ± 9	3,5 ± 1,2*	6,4 ± 1,7	8,5 ± 1,10*	3,7 ± 1,2***
Ozono 1,1	10	170 ± 13	160 ± 11*	2,5 ± 1,25*	3,05 ± 1,2*	7,9 ± 1,7*	7,3 ± 1,2**
Ozono 0,7	10	173 ± 12	170 ± 18	2,30 ± 1,22	3,07 ± 1,40	7,82 ± 1,9	8,5 ± 1,6y*

En cuanto al estudio histológico, el control dañado mostró alteraciones ya descritas en la literatura universal en este modelo de adriamicina. La dosis de 0,5 mg/kg fue la que desde el punto de vista anatomopatológico mostró un papel citoprotector, apareciendo en los cortes histológicos de los animales que recibieron esta dosis menor número de riñones con vacuolización del penacho glomerular, que es indicativo de daño irreversible; en cambio la dosis de 1,1 mg/kg. no mostró ningún efecto protector sobre el tejido renal dañado por adriamicina (tablas 2 y 3).

TABLA 2. Resultados histológicos en los diferentes grupos al final del estudio (dosis de 0,5 mg/kg)

Grupos	CG %	VPG %	AGCB %	DT %
Control negativo	0	0	0	23*
Control positivo	85	80	66	75
Ozono	44*	20*	10*	80

CG: colapso glomerular, VPG: vacuolización del penacho glomerular, AGCB: adherencia del glomérulo a la cápsula de Bowman, DT: dilatación de los túbulos contorneados,

* significación estadística $p < 0,05$.

TABLA 3. Resultados histológicos en los diferentes grupos al final del estudio (dosis de 1,1 mg/kg)

Grupos	CG %	VPG %	AGCB %	EM %	DT %
Control negativo	0	0	0	0	23*
Control positivo	80	80	66	20	75
Ozono	100	85	60	30	77

CG: colapso glomerular, VPG: vacuolización del penacho glomerular, AGCB: adherencia del glomérulo a la cápsula de Bowman, EM: ensanchamiento mesangial, DT: dilatación de los túbulos contorneados,

* significación estadística $p < 0,05$.

DISCUSIÓN

Estos resultados muestran que la ozonoterapia por la vía rectal ofrece pro-

tección en el orden funcional y estructural en riñones sometidos a daño por adriamicina, esto puede deberse al papel del ozono, el cual mejora las propiedades reológicas de la sangre, al menor daño endotelial, al incremento del metabolismo del oxígeno y es posible que en este modelo a la dosis de 0,5 y 0,3 mg/kg, la ozonoterapia esté estimulando la actividad de enzimas antioxidantes en el propio tejido renal.^{6-8,11}

A la dosis de 0,7 y 1,1 mg por kilo de peso el comportamiento de la tensión arterial sistólica al final del estudio fue el mismo, o sea, se mantuvo en límites patológicos; en el caso de la diuresis de 24 h a esta dosis no mostró cambio, existiendo decremento de la diuresis al final del estudio.

La proteinuria de 24 h al final del estudio no mostró reducción, todo lo contrario, mantuvo tendencia al incremento al final del estudio.

Al parecer las dosis de 0,7 y 1,1 mg por kilo de peso no muestra protección en cuanto a las variables fisiológicas, esto puede deberse a que la adriamicina es una antraquinona lipofílica que genera radical libre anión superóxido, luego de haber sido reducida a semiquinona por el NADH2 en la membrana mitocondrial. Como se sabe, los radicales liberados dañan componentes estructurales en la nefrona y crean de esta forma un severo estrés oxidativo en el tejido renal,⁶⁻⁸ por otro lado la ozonoterapia crea un pequeño estrés oxidativo a través del cual dispara sus señales biológicas;¹¹ al parecer a la dosis de 0,7 mg en el tejido renal sometido ya a un daño radicalario creado por la adriamicina, no se disparan los mecanismos citoprotectores de la ozonoterapia rectal.

Se concluye que la ozonoterapia por vía rectal a la dosis de 0,3 y 0,5 mg ejerció un efecto terapéutico sobre la morfofunción renal en ratas sometidas a glomerulonefritis experimental. La dosis de mejores resulta-

dos fue la de 0,5 mg por kilo de peso. Las dosis de 1,1 y 0,7 mg por kilo no tuvieron ningún efecto protector sobre las variables estudiadas.

Se recomienda estudiar el comportamiento de indicadores de estrés oxidativo

en ratas sometidas a glomerulonefritis por adriamicina y tratadas con ozono; estudiar el comportamiento de otras variables de función renal como el flujo plasmático renal y la intensidad de filtración glomerular.

SUMMARY

The effect of ozone by rectal route at different doses on variables of renal function and systolic arterial pressure was studied in a model of experimental toxic glomerulonephritis due to adriamicine. Experimental glomerulonephritis causes renal failure and it is characterized by a progressive renal damage. There are different treatment schemes that are very expensive and produce immunosuppression, affecting the patient's quality of life. To develop this work, 40 Wistar rats of 200 g of weight were used. They were divided into 4 groups: a control group and a positive control group that were administered adriamicine during 10 weeks, and other 2 that received ozone therapy. Proteinuria, systolic arterial pressure and 24-hour diuresis were determined in all of them. The results showed that ozone therapy at a dosis of 0.3 mg/kg had a renal protective effect.

Key words: Experimental glomerulonephritis, adriamicine, ozone, renoprotective, oxidative stress.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Daugherty TM, Ueki IF Mercer PFF, Brenner BM. Dynamics of glomerular ultra filtration in the rat. V. Response to ischemic injury. *J Clin Invest* 1974;53:105-16.
2. Bonventre JV. Mediators of ischemic renal injury. *Annu Rev Med* 1998;39:531-44.
3. Jones DB. Ultrastructure of human acute renal failure. *Lab Invest* 1988;46:254-64.
4. Fanonte JC, Ward PA: Role of oxygen- derived free radicals and metabolites in leukocyte- dependent inflammatory reactions. *Am J Pathol* 1992;107:309-418.
5. McCord JM, Fridovich I. The biology and pathology of oxygen radicals. *Ann Intern Med* 1998;89:122- 7.
6. Shah SV. Role of reactive oxygen metabolites in experimental glomerular disease. *Kidney Int* 1999; 35:1093-106.
7. Yoshioka T, Ichikawa I: Glomerular dysfunction induced by polymorphonuclear leukocyte- derived reactive oxygen species. *Am J Physiol* 1989;257:53- F59.
8. Johnson RJ, Couser WG, Chi EY, Adler S, Klebanoff SJ. New mechanism for glomerular injury. Myeloperoxidase- hydrogen peroxide- halide system. *J Clin Invest* 1987;79:1379-87.
9. Bird JE, Millhoan K, Wilson CB, Young SG, Mundy CA, Parthasarathy S, Blantz RCL. Ischemic acute renal failure and antioxidant therapy in the rat. The relation between glomerular and tubular dysfunction. *J Clin Invest* 1998;81:1630-8.
10. Toshimasa Y, Bills T, Ichikawa I, Role of intrinsic antioxidant enzymes in renal oxidant injury. *Kidney Int* 1990;38:282-8.
11. Barber E, Menéndez S, Calunga JL. Prevention of renal injury after induction of ozone tolerance in rats submitted to warm ischaemia. *Mediators of Inflammation* 1999;8:37-41.
12. Hecht K. Papel del hipocampo en la neurosis experimental. *Disregulación neurótica de la presión sanguínea*. La Habana: Editorial Científico-Técnica; 1979. p. 46-50.

Recibido: 4 de mayo de 2004. Aprobado: 14 de junio de 2004.

Dr. *José Luis Calunga Fernández*. Instituto de Ciencias Básicas y Preclínicas "Victoria de Girón". Avenida 146 y 31. Playa. CP 11600. Ciudad de La Habana. Cuba. Teléfs.: 2084877-2717686