

Instituto Superior de Medicina Militar "Dr. Luis Díaz Soto"

Estrés oxidativo en un modelo de ratón quemado tratado con Aloe b, ozono y factor de crecimiento epidérmico

Tte. Cor. Teresita Montero González,¹ Tte. Cor. José Hurtado de Mendoza Amat,² Dr. José Carlos García Piñeiro,³ Dra. Niurka A. Llopiz Janer,⁴ Dra. Silvia Menéndez Cepero⁵ y Dr. Jorge Berlanga Acosta⁶

RESUMEN

La enfermedad por quemadura estimula la respuesta inflamatoria sistémica y el daño múltiple de órganos, su expresión morfológica. Con el propósito de identificar el comportamiento del estrés oxidativo mediante el malondialdehído, la superóxido dismutasa y la catalasa y su modificación con el empleo del tratamiento sistémico con Aloe b, ozono o factor de crecimiento epidérmico, se elaboró un modelo de quemadura seca de un área de 11 %, en ratones hembras, balb/c de 20 ± 2 g (n= 24). Se aplicó eutanasia en diferentes tiempos, se estudiaron los órganos con evaluación cualitativa en grados de intensidad y las variables bioquímicas se obtuvieron del riñón y del hígado. La prueba G se empleó para conocer la dependencia entre las variables y la prueba t se usó al comparar porcentajes. El análisis de varianza bifactorial y la prueba de rango múltiple de Duncan se empleó en las variables del estrés oxidativo estudiadas. Se siguieron las normas éticas en el trabajo con los animales. Existió dependencia entre los diferentes grupos y la vitalidad ($G= 268,83^{***}$) superior en los grupos tratados. Los grupos no tratados tuvieron mayor intensidad del daño múltiple de órganos y peor respuesta del estrés oxidativo. Los grupos con mejor evolución fueron el tratado con ozono y el tratado con factor de crecimiento epidérmico. El tratamiento inmediatamente después de la quemadura con ozono y factor de crecimiento epidérmico resultó favorable para la evolución y supervivencia de los animales.

Palabras clave: Daño múltiple de órganos, modelo experimental de ratón quemado, estrés oxidativo, ozono, Aloe b, factor de crecimiento epidérmico.

En el desarrollo de la terapia intensiva se establece una complicación que compromete la vida de pacientes, que la medicina intensiva logró salvar en los primeros momentos, el síndrome de disfunción múltiple de órganos (SDMO).¹ A las alteraciones morfológicas relacionadas con la disfunción se les denominó daño múltiple de órganos (DMO).²

Los resultados de autopsia de pacientes procedentes de terapia intensiva,³ en politraumatizados, el estudio la enfermedad por quemadura humana⁴ y experimental (Hurtado de Mendoza J. Alteraciones locales y generales en la enfermedad por quemaduras. Estudio histopatológico y ultraestructural en un modelo experimental de ratón quemado. Tesis Doctoral, La Habana, 1983) muestran alteraciones del DMO.

La enfermedad por quemaduras se considera el reto más grande en cuanto al cuidado intensivo que se demanda para salvar la víctima.⁴ En este evento se liberan especies reactivas del oxígeno (ERO) que activan la peroxidación lipídica.⁵ La lesión cutánea es fuente primaria de los mediadores de la inflamación que posteriormente amplifican sus

efectos a escala sistémica y desencadena una respuesta inflamatoria sistémica (RIS).⁶ La clave del tratamiento donde coinciden los estudiosos del tema ha sido en la "prevención".⁷ Entre los productos nacionales que pueden regular la respuesta celular están el tratamiento sistémico con Aloe b, ozono o factor de crecimiento epidérmico (FCE).⁸⁻¹⁰

Con el propósito de identificar el comportamiento del estrés oxidativo a través del malondialdehído (MAD), la superóxido dismutasa (SOD) y la catalasa (CAT) en la quemadura y su modificación con el empleo de estos productos aplicados después de la acción la quemadura en un modelo experimental de ratón quemado se realizó el presente trabajo.

MÉTODOS

Se realizó el estudio sobre la base de un modelo experimental de ratón quemado previamente elaborado.¹¹ Los animales procedían del Centro Nacional para la Producción de Animales de Experimentación. Se consideraron los procedimientos éticos y se laboró bajo los principios de las Buenas Prácticas de Laboratorio.¹²

Los animales fueron ratones de la línea balb/c, hembras, de 20 ± 2 g y de 12 semanas. Se empleó un modelo de quemadura seca paravertebral total en una superficie corporal quemada 11 %, con temperatura de 100 °C y tiempo de exposición de 20 s.¹¹ Los animales se aclimataron durante 7 días y el control de la evolución se realizó 2 veces al día. Se utilizaron 6 grupos con una n= 24 cada grupo y uno testigo (n= 5). Inmediatamente posquemadura se aplicó hidratación y tratamiento de la forma siguiente:

- Grupo no tratado: 1 mL de solución salina (SS) al 0,9 % intraperitoneal (ip) 1er día solo.
- Grupo placebo: 1 mL SS al 0,9% IP durante 14 días.
- Grupo Aloe b: 0,15 mg/kg 1era S, 0,10 mg/kg 2 da S en SS 0,9 % ip 14 días.
- Grupo ozono: 1 mL SS al 0,9 % ipy 2 mg/kg (0,9 mL gas a 37,3 mg/L) por vía transrectal durante 14 días.
- Grupo Aloe b más ozono: 1 mL SS al 0,9 % ip, combinados (primero el Aloe b) por las vías señaladas y durante 14 días.
- Grupo FCE: 1 mL SS al 0,9 % y 500 mg/kg en SS ip hasta 14 días.

Se empleó un equipo OZONIZAN PM 83K, con una presión de oxígeno de 0,10 mmHg.

La vitalidad de los animales se analizó con los criterios siguientes:

- *Moribundos*: pocos reflejos, no se alimentan y no se desplazan.
- *Vitales*: reflejos mantenidos, se alimentan y desplazan con actividad limitada.
- *Activos*: reflejos y alimentación adecuada con movilidad desde las 24 h.

Se aplicó eutanasia a las 24 h, 72 h, 7 días y 14 días y se estudiaron los órganos con evaluación cualitativa en grados de intensidad.¹³

El estudio morfológico se realizó a ciegas. Los criterios de evaluación fueron: 0) negativo; 1) leve; 2) moderado y 3) intenso. El DMO se evaluó por la presencia de lesión en 3 o más órganos. La esplenitis y hepatitis reactiva se consideraron como respuesta del sistema monocítico fagocitario (SMF). Para cada caso se valoró el promedio de las intensidades afectadas (leve, moderada e intensa) y se clasificó el DMO en estos grados.

Se estudiaron 3 variables del estrés oxidativo en tejido (lóbulo izquierdo del hígado y el riñón izquierdo). Se colocaron en congelación a -40 °C y se realizaron los estudios del MAD, CAT y SOD. Las técnicas empleadas se corresponden con las normas operacionales habituales.

Las variables principales estudiadas fueron la vitalidad y la presencia del DMO. Las variables dependientes fueron las alteraciones morfológicas y bioquímicas estudiadas.

Análisis estadístico

Se empleó la prueba de la t de Students al comparar los valores de porcentaje entre los grupos de animales. Se aplicó la prueba G de tablas de contingencia para conocer la dependencia entre la vitalidad de los animales y las afecciones de los órganos en los grupos de estudio. En el análisis de los marcadores del estrés oxidativo estudiados se comparó la normalidad y se empleó un análisis de varianza bifactorial. Los factores fueron los órganos (hígado y riñón) y los grupos de estudio en los animales sacrificados a las 24 h, por encontrarse en este tiempo el mayor número de animales en cada grupo. Para comparar las medias se utilizó la prueba de rangos múltiples de Duncan.¹⁴

RESULTADOS

Se mostró una dependencia significativa entre los grupos de estudio y la vitalidad de los animales en las primeras 24 h ($G= 268.83^{***}$; $p < 0,001$). Se observó buena respuesta en los ratones que sobrevivieron del grupo tratado con Aloe b con actividad vital. Los grupos tratados con ozono y con FCE presentaron mayor movilidad y capacidad de desplazarse desde las primeras 24 h de la quemadura (tabla 1).

Tabla 1. Vitalidad de los grupos de estudio a las 24 h de realizada la quemadura (n= 24)

Grupos de estudio	Fallecidos %	Moribundos %	Vitales(%)	Activos (%)
No tratado	16,7	75	8,3	0
Placebo	0	66,7*	33,3	0
Aloe b	0	0	100	0
Ozono	8,33	19,5	4,17	75
Aloe b + ozono	100	-	-	-
EGF	0	0	20,83	79,67

El 62,5 % de ellos fallece antes de las 48 h.

En cada grupo de estudio existió un comportamiento diferencial entre los órganos y la intensidad de las alteraciones morfológicas. Existió un comportamiento variable entre la intensidad del DMO y los grupos de estudio ($G= 45,11^{***}$). En el análisis de los porcentajes (ts) se observó que los animales de los grupos tratados presentaron mayor

porcentajes del DMO en el grado leve; las cifras fueron significativas en forma favorable en los animales del grupo tratado con ozono y tratado con FCE (ts= 5,74*** y 7,08*** respectivamente) (tabla 2). Estos resultados coinciden con la mejor vitalidad en los animales tratados con ozono y con EGF.

Tabla 2. Presencia del DMO en los diferentes grupos de estudio

Grupo de estudio	n	DMO leve (%)	DMO moderado (%)	Valor de ts
No tratado	6	0	100	-
Placebo	12	16,66	83,33	3,57***
Aloe b	11	36,36	63,63	1,29 ns
Ozono	15	93,33	6,66	5,74***
EGF	20	95	5	7,08***

ns= no significativo.

Las variables del estrés oxidativo presentaron cambios similares en los órganos analizados desde las 24 h. En el grupo tratado con ozono y tratado con FCE la respuesta al MDA se recuperó, respecto al grupo testigo y la CAT mostró una respuesta favorable en ellos. El análisis bifactorial corroboró lo expuesto anteriormente con niveles de significación diferente entre los grupos (letras diferentes) (tabla 3).

Tabla 3. Análisis bifactorial de la variación del MDA y la CAT a las 24 h entre todos los grupos del estudio (órganos y grupos de tratamiento)

Grupo de estudio	Órgano	MDA (nmol/mL)		CAT (μ/mL)	
		X	Letras	X	Letras
Testigo	Hígado	1,33	(c)	346,07	(c)
	Riñón	0,76	(c)	275,95	(c)
No tratado	Hígado	3,45	(b)	434,18	(b)
	Riñón	2,79	(b)	281,73	(c)
Placebo	Hígado	4,62	(a)	342,3	(c)
	Riñón	1,54	(c)	382,87	(c)
Aloe b	Hígado	1,48	(c)	578,85	(b)
	Riñón	1,52	(c)	273,07	(c)
Ozono	Hígado	3,16	(b)	719,23	(a)
	Riñón	3,09	(b)	835,86	(a)
EGF	Hígado	4,75	(a)	739,07	(a)
	Riñón	4,9	(a)	387,49	(b)

Letras diferentes indican significación estadística según prueba de rangos múltiples de Duncan ($p < 0,05$). $S_x A_x B = 0,58^{***}$; $p < 0,001$ para el MDA y $S_x A_x B = 0,24^{**}$; $p < 0,01$ para la CAT.

La SOD mostró solo diferencias en los grupos de estudio. Se estimuló en el grupo

placebo, el tratado con Aloe b y el tratado con FCE en un mismo nivel de significación (a), mientras que en el grupo no tratado y el tratado con ozono no se estimuló (tabla 4).

Tabla 4. Análisis factorial de la variación de la SOD a las 24 h entre todos los grupos del estudio (grupos de tratamiento)

Grupo de estudio	X (μ /mL)	Letras
Testigo	29,06	(b)
Quemado no tratado	32,48	(b)
Placebo	37,44	(a)
Aloe b	34,01	(a)
Ozono	28,25	(b)
EGF	33,98	(a)

Letras diferentes indican significación estadística según prueba de rangos múltiples de Duncan ($p < 0,05$). ($S \times B = 0,46^{**}$; $p < 0,01$).

DISCUSIÓN

La hidratación sostenida es un componente necesario en la terapia de la enfermedad por quemadura. El grupo tratado con ozono alcanzó una supervivencia destacada al incorporar volumen y los efectos de la ozonoterapia, que propicia oxigenación suplementaria a los tejidos.¹⁵

Los efectos terapéuticos del Aloe b y el ozono, aplicados independientes en la enfermedad por quemadura, muestran efectos beneficiosos.^{15,16} La letalidad de la combinación de ambos en presencia de la quemadura se valoró por la acción de las ERO. Estas moléculas en su estructura atómica presentan desapareado uno o más electrones en el orbital externo, lo cual le confiere alta inestabilidad e interacción con las biomoléculas.¹⁷ El peróxido de hidrógeno (H_2O_2) en los sistemas biológicos se descompone fácilmente generando el más tóxico de ellos, el radical hidroxilo (HO) que reacciona con casi todas las biomoléculas de una célula a pesar de su corta vida media y de su limitada difusión.¹⁷

La enfermedad por quemadura *per se* produce gran cantidad de ERO por el efecto directo de la quemadura y por la RIS que se desencadena¹⁸. El ozono tiene amplia capacidad de reacción. A dosis adecuadas, una estimulación sobre los mecanismos enzimáticos de respuesta antioxidantes de las células,¹⁹ el Aloe b estimula también las defensas antioxidantes.²⁰

La corteza es rica en antraquinonas⁸ que en su estructura química presentan varios anillos de benceno con un incremento en los grupos OH, los cuales pueden reaccionar y constituir ERO. El ozono, por su parte, actúa creando un pequeño estrés oxidativo controlado. En esta situación puede ocurrir un fenómeno de potencialización de las ERO por ambos medicamentos junto a los radicales libres que se producen por la quemadura y que se saturan las defensas antioxidantes endógenas del animal; esta reacción en cadena, difícil de controlar, puede provocar la muerte en las primeras 24 h. Las respuestas definitivas a este nuevo problema planteado requieren de estudios futuros en esta línea de investigación.

La administración exógena y sistémica de concentraciones suprafiológicas de FCE, ejerce efecto citoprotector ante la acción de factores agresivos induciendo sobre ellos un estado de protección que le permite tolerar diferentes insultos. La capacidad citoprotectora del FCE se demuestra en la preservación de la viabilidad hística. Esta capacidad del EGF parece estar asociada con la peroxidación lipídica.¹⁰

En condiciones fisiológicas, las ERO se pueden controlar por los mecanismos antioxidantes defensivos de la célula. *Halliwell* define a los antioxidantes como toda sustancia que a bajas concentraciones respecto a un sustrato oxidable, retarda o previene la oxidación de dicho sustrato.²¹ La SOD se descubre en 1975 por *Fridovich* y promueve la reacción química que transforma el $\cdot\text{O}_2$ en H_2O_2 .²² La catalasa acelera la reacción que transforma el H_2O_2 en H_2O . Al no existir el $\cdot\text{O}_2$ ni el H_2O_2 no existe la probabilidad de formar el radical HO, contra el cual no hay antioxidante específico.

Si afecta a los ácidos grasos poliinsaturados, se dañan las membranas celulares con aumento de la permeabilidad de las membranas y la muerte celular. La reacción en cadena de la oxidación de un ácido graso oxida a otras moléculas comenzando el proceso de peroxidación lipídica, reacción en cadena autopropagativa que genera subproductos tóxicos entre ellos radicales lipídicos y lipoperóxidos. Estos pueden descomponerse en subespecies reactivas (lípidos peroxil y alcoxil) hasta formar aldehídos. Muchos de los aldehídos formados son biológicamente activos, tienen alta difusión y atacan a casi todas las biomoléculas, entre ellos el MAD.²³ La presencia de este compuesto en tejido, plasma y orina es un método para evaluar el estrés oxidativo.⁵

Las enzimas antioxidantes se estimularon favorablemente con el empleo del ozono,¹⁵ con mejor evolución de los animales y menores alteraciones morfológicas. A lo largo del tratamiento se ve una disminución significativa de los peróxidos formados (a través del MDA), con un balance entre la dismutación del radical superóxido y la reducción del H_2O_2 formado. La estimulación de los sistemas de defensa antioxidante producido con el tratamiento con O_3 se ha demostrado en diferentes modelos animales (en la isquemia-reperfusión hepática y renal) y en pacientes (con cardiopatía isquémica e hipoxia cerebral).¹⁷

El grupo tratado con Aloe b se comporta de forma estable, con escasa variación entre las diferentes variables. Las vías por la cual se logró esta evolución no está en la proliferación linfocítica ni en la estimulación de la defensa antioxidante. El gel es rico en manosa²⁰ y la presencia de oligosacáridos de manosa para realizar el transporte de proteínas intracelular y para el transporte de glicoproteínas, es importante.²⁴ El mecanismo de acción puede estar vinculado a esta particularidad bioquímica.

La respuesta observada con la aplicación de los diferentes tratamientos aporta resultados satisfactorios tanto en la vitalidad, en la intensidad de las lesiones histológicas observadas del DMO y en la respuesta del estrés oxidativo en los animales tratados con ozono y más aun en el grupo tratado con EGF, aunque la sepsis se presentó en la quemadura de este último grupo.

SUMMARY

Oxidative stress in a model of burnt mouse treated with Aloe b, ozone and epidermal growth factor

Burn disease stimulates systemic inflammatory response and its morphologic expression that is multiple organ failure. With the objective of identifying the behaviour of oxidative stress through malonaldehyde, superoxide dismutase, and catalase, and its change by using the systemic treatment based on Aloe b, ozone or epidermal growth factor, a dry burn model of a 11 % area in balb/c female mice of 20 ± 2 g (n= 24) was designed. Eutanasia was applied at different moments, organs were studied with qualitative evaluation of intensity degrees, and biochemical variables were analyzed from the kidney and the liver of mice. Test G served to find out dependence among variables and Test t was used to compare percentages. Bifactorial variance analysis and Duncan's multiple range test were used in the studied oxidative stress variables. Ethical standards on work with animals were complied with. Dependence was observed among the various groups and survival rate ($G= 268,83^{***}$) was higher in the treated groups. Untreated groups showed more intensive multiple organ damage and worse oxidative stress response. The groups treated with ozone and epidermal growth factor showed better recovery. The treatment with ozone and epidermal growth factor immediately after burning favored recovery and survival of balb/c mice.

Key words: Organ multiple damage, experimental model of burned mouse, oxidative stress, ozone, Aloe b, epidermal growth factor.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Marshall JC, Cook DJ, Christou NV. Multiple organ dysfunction score: a reliable descriptor of a complex clinical outcome. *Crit Care Med.* 1995;23:1638-52.
2. Hurtado de Mendoza JE, Montero T, Walwyn V, Álvarez R. Daño multiorgánico en autopsias realizadas en Cuba en 1994. *Rev Cubana Med. Milit.* 1997;26:19-26.
3. Ruchti C. Pathomorphologic findings following intensive therapy. *Schweiz Med Wochenschr.* 1986;116(21):694-8.
4. Sheridan RL, Ryan CM, Yin LM, Hurley J, Tompkins RG. Death in the burn unit. Sterile multiple organ failure. *Burns.* 1998;24(4):307-311.
5. Niwa Y. Oxidative injury and its defense system in vivo. *Rinsho Byori.* 1999; 47(3):189-209.
6. Kim PK, Deutschman CS. Inflammatory responses and mediators. *Surg Clin North Am.* 2000;80 3):885-94.
7. Sanaic A, Moore FA, Moore EE, Noris JM, Lezotte DC, Hamman RF. Multiple organ failure can be predicted as early as 12 hours after injury. *J Trauma.* 1998;45(2):291-303.
8. González Quevedo M. Compendio de investigaciones sobre el Aloe barbadensis Miller (sábila) cultivada en Cuba. La Habana: Imprenta Dirección Política de las FAR; 1990.
9. Rilling S, Viebahn R. The use of ozone in medicine. Pfalz: Haug Publishers Heidelberg; 1987.
10. Berlanga J, Mella L. Some consideration on the physiological role of epidermal growth factor in relation to its pharmacological applications. *Biotecnol Apl.* 1998;15:141-8.
11. Montero TG, Moreno PQ, Berlanga J, Hurtado de Mendoza JA, Bacardi DF, Urquiza DN, et al. Modelo experimental de ratón quemado en investigaciones biomédicas. *Rev Cubana Med Milit.* 2003;32(2).

12. Código sobre la ética profesional de los trabajadores de las ciencias. La Habana: Universidad de La Habana; 1999.
13. Montero TG, Hurtado de Mendoza JA, Cabrejas OA, Almarales MA. Histopatología del daño múltiple de órganos en un modelo experimental de ratón quemado. *Rev Cubana Med Milit.* 2002;31(1):13-22.
14. Sigarroa A. Biometría y diseño experimental. La Habana: Pueblo y Educación; 743. p. 1985.
15. Antoszewski Z, Kulej J, Wygledowski M, Kozakiewski L, Moszkowicz T, Chmurzewska H. Some aspects of ozone therapy. *Przegl Lek.* 1997;54(7-8):561-4.
16. Mc Analley BH, Carpenter RH, Mc Daniel HR. Use of acemannan. Carrington Laboratories Inc 1994, Irving, Tex. European Patent Application: 0 619 117 A2.
17. Ferreira R. Estrés oxidativo y antioxidantes. De las ciencias básicas a la medicina aplicada. Buenos Aires: Laboratorios Bago SA; 1999.
18. Vallespia M, Alvarez JC, Rodríguez I, Montero T, Garaya H, Reyesa O, et al. A Limulus anti-LPS factor-derived peptide modulates cytokines genes expression and promotes resolution of bacterial acute infection in mice. *Intern Immunopharmacology.* 2003;3:247-56.
19. Calunga JL, Zamora ZOB, Borrego B, del Rio S, Barber E, Menedez S, et al. Protection by ozone preconditioning is mediated by the antioxidant system in cisplatin-induced nephrotoxicity in rats. *Mediator Inflammation.* 2004;13(1):13-9.
20. Sabeh F, Wright T, Norton SJ. Isoenzymes of superoxide dismutase from Aloe vera. *Enzyme Protein.* 1996;49(4):212-21.
21. Halliwell B, Gutteridge JMC. Free radicals in biology and medicine. Oxford: Clarendon Press; 1989.
22. Fridovich I. Superoxide dismutases. *Ann Rev Biochem.* 1975;44:47-59.
23. Cadenas E, Sies H. The lag phase. *Free Radicals Res.* 1998;28(6):601-9.
24. Darnell J, Lodish H, Baltimore D. Biología celular y molecular. 2da ed. Barcelona: Edición Omega SA; 1993.

Recibido: 12 de abril de 2006. Aprobado: 15 de mayo de 2006.

Tte. Cor. *Teresita Montero González*. Instituto Superior de Medicina Militar "Dr. Luis Díaz Soto". Avenida Monumental, Habana del Este, CP 11 700, Ciudad de La Habana, Cuba.

¹Doctora en Ciencias Médicas. Profesora e Investigadora Auxiliar.

²Doctor en Ciencias. Profesor Titular.

³Doctor en Ciencias Médicas. Investigador Titular.

⁴Especialista de I Grado en Bioquímica Clínica.

⁵Doctora en Ciencias Químicas. Investigadora Titular.

⁶Doctor en Ciencias Farmacéuticas. Investigador Titular.