

Efectividad de la ozonoterapia en un modelo experimental de hipersensibilidad bronquial en cobayo - Effectiveness of ozonotherapy in an experimental model of bronchial hyperreactivity in guinea pig.

Zayas, Kenia: Dra. Instituto de Ciencias Médicas Básica "Victoria de Girón", Habana, Cuba | **Zamora Rodríguez, Zullyt:** DMV. Departamento de Biomedicina, Laboratorio de Ensayos Biológicos, Centro de Investigaciones del Ozono. Apartado Postal 6414, Ciudad Habana. Cuba. zullyt.zamora@cnic.edu.cu | **Colunga, José Luís:** PhD. Departamento de Biomedicina, Laboratorio de Ensayos Biológicos, Centro de Investigaciones del Ozono. Apartado Postal 6414, Ciudad Habana. Cuba. | **González, Vivian:** PhD. Instituto de Ciencias Médicas Básica "Victoria de Girón", Habana, Cuba

Resumen

El asma bronquial es una afección que en la actualidad es objeto de estudio de un gran número de especialistas en todo el mundo por la alta incidencia de muertes que ocasiona y los elevados costos hospitalarios que su atención demanda. Se conoce que el ozono aplicado por vías y dosis adecuadas, produce acciones biológicas con efectos terapéuticos sin causar reacciones adversas. Esto hace posible su empleo en una gran variedad de procesos patológicos como en el asma. En este trabajo se estudió la presión intrabronquial (PIB), IgG y la actividad de la mieloperoxidasa (MPO) en 5 grupos experimentales tratados con la mezcla ozono/oxígeno (MOO) (0,2 y 1,2 mg/kg) y oxígeno (O₂) (7 mL), donde un grupo fue utilizado en el control de las variables estudiadas y al resto se le aplicó un esquema de hipersensibilidad bronquial con ovoalbúmina. Transcurridas 24 h de la última aplicación de la MOO, se determinaron los parámetros siguientes: Presión intrabronquial (PIB), niveles de IgG en el suero y la actividad de la mieloperoxidasa (MPO) en tejido pulmonar y el análisis histopatológico del tejido. Los resultados mostraron una disminución significativa de la PIB, en los niveles de IgG en suero y de la actividad de la MPO en el tejido pulmonar de los animales tratados con la MOO. Histopatológicamente se confirmó una

disminución en el infiltrado de neutrófilos en el tejido bronquial de animales tratados con la MOO.

Palabras claves: Cobayo | hipersensibilidad bronquial | ozono | mieloperoxidasa | ovoalbúmina.

Abstract

Bronchial asthma is a disease which is currently studied by many specialists in medicine because is causative of a high morbidity and mortality accompanied of high cost of hospitalization and required medical assistance. It is well known that administration of low concentration of ozone in mixture with oxygen by adequate routes produces biological actions with therapeutic effects and without concomitant adverse reactions. It allows the use of ozone/oxygen mixture (OOM) in various diseases such as bronchial asthma. In this research male guinea pigs were used, which were divided in five experimental groups. The animals were sensitized with ovalbumin (OA) in order to induce bronchial hyperresponsiveness. Two groups of guinea pigs were treated with OOM at doses of 0.2 and 1.2 mg/kg, control group was only sensitized with OA. Other group was treated with oxygen alone and the fifth group was the non treated control group. Twenty four hours after the last exposure to OA by inhalation the treatments were performed with ozone by rectal route (15 applications, one daily) 24 hours after the last ozone application, were determined the following parameters: intrabronchial pressure (IBP), IgG levels in serum and myeloperoxidase (MPO) activity in lung tissue. Also a histological study was performed. The results demonstrated a significant decrease of intrabronchial pressure in animals treated with ozone, as well as decrease in MPO activity was also observed in the lungs of these animals, which confirm the decrease of neutrophils infiltration in the lungs by ozone treatment. Ozone also reduced the IgG levels in blood serum as well as the bronchial hyperreactivity in guinea pigs.

Keywords: guinea pig | bronchial hypersensitivity | ozone | myeloperoxidase | ovalbumin.

Introducción

El asma bronquial es una enfermedad crónica no transmisible que se presenta tanto en niños como en adultos, la cual puede comprometer la vida del paciente si no es atendido. Esta patología puede ser causada por diversos factores: infecciosos, inmunitarios,

endocrinos y psicológicos, aunque hay autores que los agrupan en ambientales y genéticos. ⁽¹⁾

Clínicamente se describe como una afección crónica, obstructiva y recurrente de las vías aéreas que se caracteriza por inflamación e hiperreactividad (HRB) del árbol bronquial frente a diversos estímulos. ⁽²⁾ Dicha enfermedad se manifiesta por episodios recurrentes de sibilancia, disnea, opresión torácica y tos fundamentalmente en las noches. Estos síntomas se asocian en grado variable a la obstrucción de las vías aéreas, que generalmente es reversible de forma espontánea o por la acción de medicamentos. ⁽³⁾

En el asma se produce una hipersensibilidad tipo I, donde participan numerosos factores inmunológicos que determinan el aumento de inmunoglobulinas E (IgE). Estos factores reclutan células inflamatorias que liberan mediadores químicos, produciendo un mecanismo de retroalimentación positiva que termina con los procesos descritos anteriormente. ⁽⁴⁾

La respuesta inmunitaria puede ser precoz o tardía. La respuesta precoz produce broncoconstricción que puede prevenirse con estabilizadores de mastocitos como el cromoglicato disódico o con agonistas de receptores β_2 . La respuesta tardía aparece después de 6 a 8 horas y produce un estado continuo de sensibilidad excesiva de las vías aéreas con infiltración eosinofílica y neutrofílica que puede ser tratada con esteroides. ⁽⁵⁾

Estos estímulos causan la liberación de mediadores inflamatorios desde los mastocitos, macrófagos, y células epiteliales. Los mediadores estimulan la migración y activación de un infiltrado inflamatorio compuesto predominantemente de eosinófilos y neutrófilos. Como resultado final de este proceso tenemos: disfunción en el mecanismo neural (tono vago-simpático), con el consiguiente incremento de la contracción del músculo liso bronquial, la obstrucción de las vías aéreas e *injur*ia epitelial que conduce al incremento de la permeabilidad y sensibilidad a los agentes causales. ^(6,7)

El tratamiento médico en el asma bronquial va dirigido a la prevención de los síntomas, de las exacerbaciones y minimizar el número de veces que requieren atención hospitalaria. Este puede ser farmacológico o no farmacológico. El tratamiento farmacológico se aplicará de forma escalonada de acuerdo con el grado de severidad de la enfermedad. Para la broncoconstricción existente en esta patología los medicamentos más factibles son los agonistas β_2 adrenérgicos (salbutamol, fenoterol) y las metilxantinas (teofilinas).

Actualmente es frecuente el uso de agonistas β_2 de acción prolongada como el salmeterol, combinado con corticoesteroides inhalados. Estos últimos son muy útiles en los procesos prolongados por su acción antiinflamatoria.⁽⁸⁻¹⁰⁾ Sin embargo hoy día se trabaja arduamente en la búsqueda de nuevas alternativas de tratamiento para esta entidad.

El ozono es un fuerte agente oxidante que aplicado por otras vías excepto la inhalatoria, se ha demostrado su inocuidad, cuando es aplicado en dosis controladas.⁽¹¹⁾ Desde el punto de vista terapéutico se ha demostrado que tiene efecto modulador de la respuesta inflamatoria sistémica⁽¹²⁾ y del estrés oxidativo.^(13,14,12)

Por otra parte, también se demostró que concentraciones de ozono de 40 mg/L inducen la producción de la enzima Heme oxigenasa-1 (HO-1) y de proteínas de estrés térmico- 70 (PET-70).⁽¹⁵⁾ La ozonoterapia ha sido utilizado en el tratamiento de pacientes con procesos tanto inflamatorios como alérgicos y sus efectos beneficiosos han sido demostrados.⁽¹⁶⁾

En los últimos años se ha venido trabajando en la búsqueda de nuevas alternativas terapéuticas que mejoren, la calidad de vida de los pacientes asmáticos, entre estos tenemos los antagonistas de leucotrienos, anticuerpos monoclonales contra la IgE específica, nuevas generaciones de esteroides inhalados y a pesar de esto, el asma continúa siendo entre las causas de enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), la de mayor repercusión social.⁽¹⁷⁾

Teniendo en cuenta el papel inmunomodulador y estimulador de la defensa antioxidante en el estrés oxidativo del mezcla ozono/oxígeno (MOO), nos proponemos como objetivo el efecto de este tratamiento sobre la resistencia de la vía aérea y en la función inmunológica en un modelo de hipersensibilidad bronquial en cobayo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales: Para la realización de este estudio fueron empleados 50 Cobayos macho de la línea Dunkin Harley (250-300 g) procedentes del Centro Nacional para la Producción de animales de laboratorio (CENPALAB), Habana, Cuba. Los animales se mantuvieron en condiciones ambientales controladas, con ciclos de luz/oscuridad de 12 h, temperatura de 20-22 °C y una humedad relativa del 60 %. La alimentación y el agua fueron suministradas *ad libitum*. Los experimentos se realizaron bajo el cumplimiento de las normas éticas para las investigaciones en animales de laboratorio y fueron

aprobadas por el comité de ética para la experimentación animal del Centro Nacional de Investigaciones Científicas, Habana, Cuba.

Diseño experimental.

Los animales se dividieron en cinco grupos de diez animales cada uno, 1: control sin tratamiento; 2: sensibilizado con ovoalbúmina (OA); 3: sensibilizado con OA y tratado con la MOO (0,2 mg/kg); 4: sensibilizado con OA y tratado con MOO (1,2 mg/kg); 5: sensibilizado con OA y tratado con Oxígeno.

La MOO se generó mediante un equipo OZOMED 01 fabricado por el Centro de Investigaciones del Ozono, Habana, Cuba. La concentración de ozono se determinó mediante un espectrofotómetro a 254 nm.

Sensibilización con ovoalbúmina (OA).

La sensibilización se realizó según el método descrito por Karol en 1989¹⁴⁰, mediante la inyección por vía intraperitoneal (i.p) de 1 mg ovoalbúmina (OA), Sigma, ST. Louis, USA) diluida en 0,5 mL de solución salina, posteriormente los animales son sometidos a exposiciones por vía inhalatoria con aerosol de OVA al 0,5 mg/mL de solución salina durante 15 minutos los días 14, 21, 28, 35 y 42, posterior a la sensibilización inicial.

Tratamientos.

Los tratamientos con la MOO (0,2 y 1,2 mg/kg) y oxígeno comenzaron 24 h después de la última aplicación inhalatoria de OVA, utilizando la vía rectal, durante 15 días una aplicación diaria.

Determinación de la presión intrabronquial (PIB)

Técnica de Konzettl- Rossler

Esta determinación se realizó bajo anestesia, con pentobarbital sódico (30 mg/Kg) i.p ajustado a un volumen de 0,3 mL/100g de peso del animal.

Se realizó una incisión medial en la región anterior del cuello, se decoló y se canuló la traquea. La cánula se conectó a la bomba mecánica estableciendo la ventilación con un flujo y volumen constante. Las varillas de la bomba fueron rígidas (de vidrio) evitando que variara la presión. El otro extremo de las varillas se conectó a dos Y de tal forma que el animal quedó conectado a la bomba y al transductor de presión del polígrafo.

En el polígrafo se utilizó la gaveta del carrier para los registros de presión. El equipo fue balanceado y el registro se realizó con una sensibilidad de 100 y velocidad de 100 mm/min del papel.

Antes de realizar el registro se calibró el equipo con un Barómetro de H₂O donde 7 mm de altura del registro correspondió a 40 cm³ de H₂O con una sensibilidad de 100. En el papel fueron anotados todos los datos del animal: número, peso, sensibilidad y volumen. Culminado el primer registro, se procedió a la sutura de la traquea y la piel del animal. Posterior al último registro de la presión intratraqueal, se abrió la cavidad torácica, se puncionó el ventrículo izquierdo y se extrajo una muestra de sangre, la cual se utilizó para la determinación de los niveles de IgG en el suero.

Determinación de la actividad de la mieloperoxidasa (MPO) en tejido pulmonar.

El tejido pulmonar es pesado y mezclado con un buffer de 50 mM de K₂HPO₄ a pH 6 (0,1g/mL), esto es homogenizado en un destructor de tejido Polytron, en baño de hielo durante 30 seg. Las muestras son centrifugadas a 2 500 g durante 20 min a 4 °C y el sobrenadante se eliminó, el precipitado restante es resuspendido en 1 mL de Buffer 50 mM de K₂HPO₄ con Hexadiacil-primetil Bromuro de amonio (HTAB) al 0,5 % y se realizó una segunda homogenización. Después la muestra es sometida a ultrasonido durante 20 seg, posterior a este tiempo es sometida a congelaciones y descongelaciones por tres veces. La muestra es centrifugada a 2 500 g durante 30 min a 4°C y el sobrenadante resultante fue utilizado para las determinaciones de la actividad de la MPO, mediante el método descrito por Bradley y cols., **1982**.⁽¹⁸⁾

Para lo cual 0,1 mL del sobrenadante son adicionados a 2,9 mL de Buffer 50 mM de fosfato de potasio (pH 6) conteniendo 0,202 mg/mL de O-dianisidina. Después de una incubación a 25 °C durante 2 min, 0,5 mL de 0,0029 % de H₂O₂ fueron adicionados para comenzar la reacción. Entonces la absorbancia de la mezcla de reacción fue medida a 460 nm. La actividad de la MPO fue definida como la conversión de 1µmol de H₂ O₂ en H₂ O por minuto a 25° C y expresada en U por gramos de tejido

Determinaciones de Inmunoglobulina G (IgG).

Los niveles de IgG se determinaron en el suero, mediante un ensayo inmunturbidimétrico, en el cual se le adicionó a la muestra de suero una solución tampón de NaCl 20 mmol/L y polietilenglicol (3,6%) a pH 8, se adicionó el anticuerpo anti-IgG, se determinó la

formación del complejo antígeno-anticuerpo y la turbidez de la aglutinación formada. ⁽¹⁹⁾.

Análisis histopatológico.

El pulmón izquierdo de cada animal, se extrajo y se conservaron en formol tamponado al 12 %, posteriormente se incluyeron en parafina y finalmente se tiñeron con hematoxilina y eosina. Para el análisis histopatológico del tejido se utilizó un microscopio de luz y se realizó por un especialista a doble ciego.

Análisis estadístico.

Los datos fueron expresados como las medias \pm la desviación estándar y analizados estadísticamente mediante el programa estadístico SPSS 10.0 para Windows XP 2001. Se realizaron pruebas de normalidad y de homogeneidad de la varianza a todas las variables y se realizó transformación logarítmica a las variables. Para conocer cuales grupos son distintos y la significación de las diferencias ($p < 0,05$) se realizaron comparaciones múltiples y luego el ajuste de Bonferroni.

RESULTADOS.

Presión intrabronquial (PIB):

La tabla 1 muestra las curvas que representan la PIB antes y después del tratamiento con la MOO, se observan diferencias significativas para cada uno de los grupos entre el registro de la PIB antes y después del tratamiento con la MOO. Los grupos que fueron tratados con MOO muestran una disminución significativa de la PIB respecto al grupo control que fue solamente sensibilizado con OVA. El grupo tratado con oxígeno no mostró disminución significativa de la PIB comparado con el grupo control

Actividad de la MPO.

La Tabla 2, muestra la actividad de la MPO en el tejido pulmonar, la cual se encontró incrementada en el grupo de animales tratados con OA, mientras que en los grupos de animales que fueron tratados con la MOO se muestra una reducción significativa de la actividad de dicha enzima.

Niveles de IgG.

Los niveles de IgG en el suero de animales sensibilizados, mostraron un incremento significativo respecto al control no sensibilizado. El grupo de animales que fue tratado con MOO (0,2 mg/kg) mostró una reducción significativa de los niveles de IgG detectados en el suero respecto al grupo control sensibilizado con

OA. Contrariamente con la dosis de 0,2 mg/kg, la dosis de 1,2 mg/kg no mostró igual reducción en los niveles de IgG. (Tabla 2).

Análisis histológico.

Las figuras 1 A y B muestran los cambios estructurales ocurridos en el tejido pulmonar de cada uno de los grupos experimentales. Los principales cambios inflamatorios fueron encontrados en los animales del grupo control sensibilizado con OA a diferencia del resto de los grupos, lo que muestra una vez más que se reprodujo el modelo experimental. También se encontró en el grupo 5 un engrosamiento de la capa muscular peribronquial, no encontrando este hallazgo en el resto de los grupos.

DISCUSIÓN

Es bien conocida que la hiperreactividad bronquial (HRB) esta presente en los asmáticos y que juega un papel fundamental en la patogenia de esta enfermedad. ⁽²⁰⁾ Nuestros resultados muestran un incremento de la PIB en el grupo de animales sensibilizados con respecto a control negativo (Tabla 1), por lo que podemos plantear que se reprodujo el modelo experimental descrito por Karol en el que se observó un incremento de la presión en los animales expuestos a la OVA. ⁽²¹⁾ El incremento de la PIB observado se considera como un aumento de la resistencia de las vías aéreas al flujo de aire, dado por la hiperreactividad bronquial específica inducida por ovoalbúmina.

En la comparación de los valores de la diferencia entre las medias para las dos presiones (antes y después del tratamiento), vemos que los grupos tratados con la MOO, obtuvieron valores significativamente elevados de diferencias con respecto a los restantes grupos, los cuales no presentaron una marcada variación (Tabla 1).

Durante el tratamiento con la MOO, se conoce que este disminuye la liberación del tromboxano A₂, el cual ejerce un papel fundamental dentro de los mecanismos fisiopatológicos del asma, es vasoconstrictor, induce la agregación plaquetaria y produce contracción de la musculatura lisa bronquial. ⁽²²⁾ Por otra parte, otros estudios relacionados con los efectos de la MOO sobre la sangre, han demostrado que se produce la liberación de eicosanoides como algunas prostaglandinas de la serie E que producen relajación y dilatación del músculo liso bronquial. ⁽²³⁾ Estos en su conjunto disminuyen la respuesta constrictora del bronquio. También se demostró que la MOO induce la liberación de citocinas y de interferón gamma (IFN- γ) de forma endógena, por

tanto, teniendo en cuenta una de las funciones del IFN- γ que es la de limitar la liberación de IL₄ por parte de la célula y de esta forma modula los niveles de IgE y la respuesta exagerada de la vía aérea.^(24,25) Además la IL₄ junto con la IL₁₃ favorece la liberación de quimoquinas que atraen a los eosinófilos en los asmáticos; también actúan sobre el epitelio y el músculo liso bronquial incrementando la secreción de moco y la HRB.⁽²⁶⁾ Pensamos que de esta forma, La MOO al favorecer la relajación del músculo liso bronquial y disminuir la liberación de IL₄, provoque disminución de la respuesta inflamatoria y la HRB con la disminución consecuente de la resistencia de la vía aérea al flujo de aire en este modelo.

Tabla 1. Diferencias entre las medias (mm de H₂O) de las PIB antes y después del período de tratamiento.

Grupos	Antes PIB (mm de H ₂ O)	Después PIB (mm de H ₂ O)	X de las diferencias
(control negativo)	3,84±0,2	3,83±0,1	0,0056±0,01
(control positivo)	4,13±0,3	4,00±0,2	0,13±0,02
MOO (0,2 mg/kg)	4,23±0,1	3,89±0,1	0,33±0,01*
MOO (1,2 mg/kg)	4,41±0,3	3,88±0,2	0,52±0,02*
Oxigeno (7 mL)	4,08±0,2	3,98±0,2	0,10±0,02

Datos representados como las medias \pm la desviación estándar. Las determinaciones de la PIB, se realizaron antes y después del tratamiento con la MOO u oxígeno. Mientras que en el grupo control positivo, se realizó la primera determinación y la segunda se realizó después de transcurrido los 15 días de tratamiento para los otros grupos.

* Diferencias significativas entre antes y después del tratamiento, para una $p < 0.05$

En cuanto a los niveles de IgG en el suero de los cobayos sensibilizados con OA, se demostró un incremento significativo de esta inmunoglobulina en el suero con respecto al grupo control negativo, lo que demuestra la efectividad de la sensibilización (Tabla 2). Sin embargo, en los grupos de animales que recibieron

tratamiento con la MOO (0,2 mg/Kg) los niveles de IgG disminuyeron significativamente con respecto al control sensibilizado, lo que pudiéramos explicar por la acción reguladora e inmunomoduladora de la MOO anteriormente mencionada. Este induce la liberación de pequeñas cantidades de casi todas las citocinas y del interferón gamma de forma endógena por los linfocitos T y los monocitos, pero no sobrepasan los niveles necesarios por la activación fisiológica de elementos capaces de reducir la citotoxicidad autoreactiva, como la IL₁₀ y el factor transformador de crecimiento β_1 que son antagonistas de citocinas^{108, 112-114}. Como planteamos anteriormente, el O₃ modula la respuesta de la IgE a través del interferón gamma que limita la capacidad celular para la síntesis de IL₄.⁽²²⁾ Si en el cobayo la inmunoglobulina que media la respuesta de hipersensibilidad es la IgG, su disminución podría ser por este mecanismo.

Tabla 2. Análisis estadístico del comportamiento de la actividad de la Mieloperoxidasa (MPO) en tejido pulmonar y de los niveles de inmunoglobulina G (IgG) en suero de los cobayos.

Grupos	MPO (U/g de tejido)	IgG (g/l)
control negativo)	0,01 ± 0,00 a	0,85±0,27 a
control positivo)	0,03 ± 0,01 b	1,18±0,20 b
MOO (0,2 mg/Kg.)	0,01 ± 0,00 a	0,82±0,22 a
MOO (1,2 mg/Kg.)	0,01 ±0,01 a	1,36±0,41 b
Oxigeno (7 mL)	0,01 ± 0,00 a	0,99±0,23 a

Datos representados como las medias ± la desviación estándar.
Letras: diferencias significativas con respecto al control negativo, para una p<0.05

Nuestros resultados coinciden con otro estudio donde se demostró que el tratamiento con la MOO a ratones sensibilizados con OA, produjo una disminución significativa de la reacción anafiláctica ensayada en la piel de ratas.⁽²⁷⁾ Estudios realizados en humanos con enfermedades inflamatorias alérgicas y en asmáticos, tratados con la MOO por la vía autohemoterapia e insuflación rectal,

mostraron una disminución significativa de los niveles séricos de IgE en estos pacientes. ⁽²⁵⁾ El incremento de los niveles de IgE en sangre periférica y en el tejido broncoalveolar está asociado directamente con esta patología, ⁽²⁸⁾ además se corresponde con estudios realizados en murinos donde se le provocó una reacción inflamatoria pulmonar por OVA y se comprobó el incremento de los niveles de IgE. ⁽²⁹⁾

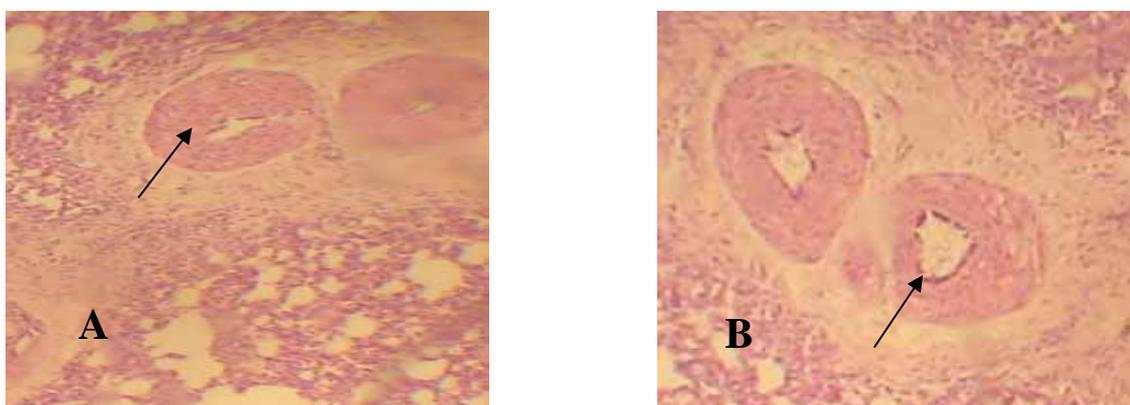
El incremento en los niveles de IgG obtenido para la dosis de la MOO de 1,2 mg/kg (Tabla 2), se encuentra en correspondencia con los resultados obtenidos por Zamora y cols., 2002 ⁽³⁰⁾, que demostraron que en ratones sensibilizados con el virus de la hepatitis B y tratados con la MOO, se incrementó la respuesta humoral específica IgG contra el agente de superficie del virus de la hepatitis B. Por tanto, podríamos plantear que la terapia con MOO, tiene un efecto modulador y regulador de la respuesta inmunológica dependiendo de la dosis utilizada y del modelo experimental empleado.

Las células inflamatorias reclutadas en las vías aéreas hiperreactivas tienen la capacidad excepcional de producir especies reactivas del oxígeno por la activación de los eosinófilos, neutrófilos, monocitos, macrófago y células epiteliales bronquiales. La MPO es una enzima oxidante, la cual se encuentra incrementada en diversas patologías asociadas al estrés oxidativo, en proporción directa con el número y la actividad de los neutrófilos infiltrados en el tejido, por lo que puede ser utilizado como índice de migración leucocitaria y por tanto de estrés oxidativo. ⁽³¹⁾ La MPO cataliza la reacción de H₂O₂ y un haluro (Cl⁻) formando ácido hipocloroso (HOCl), importante en la defensa del organismo contra los agentes infecciosos. ^(32,33) Los oxidantes pueden producir muchas de las manifestaciones del asma, inducen broncoconstricción, incrementan la sensibilidad de la vía y aumentan su permeabilidad. ⁽³³⁾ En nuestro estudio los niveles más altos de MPO fueron hallados en el grupo de animales solamente sensibilizados con OA, lo cual demuestra la reproducibilidad del modelo experimental, y se encuentra en concordancia con los estudios realizados por Susuki y cols., 2004 ⁽³⁴⁾, que demostraron en un modelo de hipersensibilidad bronquial en cobayos por OA, la inducción de broncoconstricción, inflamación de las vías aéreas e infiltración de granulocitos en el tejido y el incremento de la actividad de MPO, lo que demostró el papel de la enzima en la fisiopatología de esta enfermedad, ⁽³⁴⁾ resultados similares se obtuvieron en modelos de ratones sensibilizados con OVA. ⁽³⁵⁾

En el estudio histológico se observaron cambios inflamatorios con infiltrado de eosinófilos y hemorragia intersticial en los animales del

control positivo y del grupo 5, no encontrándose en el resto de los grupos (Fig. 1). Este resultado no se corresponde con lo descrito en el modelo de referencia, donde no se encontró ninguna alteración morfológica del pulmón en los animales sensibilizados. ⁽²¹⁾ Sin embargo, en estudios realizados en ratones sensibilizados con OVA se encontró un incremento significativo de la presencia de eosinófilos en todo el parénquima pulmonar con respecto a los grupos controles. ⁽²⁹⁾

Fig.1. Cambios histopatológicos en el tejido pulmonar y de animales tratados con OA, se observa la infiltración de neutrófilos en el músculo liso y el espacio peribronquial y la presencia de hipertrofia del músculo liso (A). Tejido pulmonar de animales sensibilizados con OA y tratado con la MOO, se observa una ligera infiltración de neutrófilos (B).



En trabajos realizados donde se estudia la inflamación pulmonar inducida por lipopolisacaridasa en relación con la expresión de óxido nítrico sintetasa (ONS), muestran que en los grupos en que se obtuvo mayores niveles de MPO, presentaron cambios inflamatorios significativos con edema e infiltración celular. ⁽³⁶⁾ Estos resultados se corresponden con los obtenidos en nuestro estudio, dado que fue en el control positivo donde se encontraron los valores más altos de MPO.

Se concluye que los tratamientos con la MOO fue capaz de disminuir la respuesta de hipersensibilidad bronquial inducida por la OA, mediante la disminución de la síntesis de IgG con la consiguiente disminución de la respuesta inflamatoria local, por lo que se demuestra la efectividad del tratamiento de la MOO en la hipersensibilidad bronquial.

BIBLIOGRAFÍA

1. Martínez B, Trespalacio MA, Caraballo L. Participación del gen de la sintetasa del óxido nítrico 1 en la patogénesis del asma. Rev cubana Invest Biomed. 2004; 23(2): pdf.
2. Asma y EPOC. Problemática en su práctica diaria. Etiopatogenia del asma. 3 nov 2004. In line: <http://www.asmayepoc.com/asmayepoc/index.htm>.
3. Aquiles J. Relación entre asma, atopia, IgE e hiperreactividad bronquial. Medicina (Buenos Aires) 1998;58(2):243-46
4. Pico MV, Ruíz M, Pico T, García M. El papel del músculo liso bronquial y los nervios en la fisiopatología del asma bronquial. Rev Cubana Med Gen Integr 2001; 17(1).
5. Zapata A, Vegel G. Aspectos farmacológicos de la terapéutica del paciente asmático. 1998. In line: http://bs.sld.cu/revistas/mgi/voll4-6-98/mgi_20698.htm.
6. Principios de urgencias, emergencias y cuidados críticos. Capítulo 2.7. Asma y crisis asmática. 2.Fisiopatología.htm 2000. In line: <http://www.unitet.edu/>
7. Robbins. "Manual de Patología estructural y Funcional". México D. F; Mc Graw-Hill Interamericana; 1995: Cap 15:325-27.
8. Nelson HS, Chapman KR, Pyke SD, Johnson M, Pritchavrd JN. Enhanced synergy between fluticasone propionate and salmeterol inhaled from a single inhaler versus separate inhaler. J Allergy Clin Immunolgy 2003; 112: 29-36.
9. Duce F, Sebastian A. Papel de los agonistas β_2 adrenérgicos en el tratamiento del asma y de la EPOC. ASMA Y EPOC 2004. In line: <http://www.asmayepoc.com/asmayepoc/index.htm/>
10. Brecamonte T, Schaver V, Emeryk A, Godwood A, Balsara S. Efficacy and safety of salmeterol/fluticasone propionate combination delivered by the diskus or pressurized metered-dose inhaler in children with asthma. Clin Drug Invest 2005; 25(1): 1-11.
11. González R, Romay CH, Díaz S. Estudio sobre genotoxicidad del ozono. Invest Biomed 2004; 23(3):177-83.
12. Zamora Z, Guanche D, González R, Hernández F, Alonso Y and Schulz S. Preconditioning with Ozone/Oxygen mixture induces reversion of some indicators of oxidative stress and prevents organic damage in rats with faecal peritonitis. Inflammation Research. 2009; 58 (7): 371 - 375
13. Ajamieh HH, Menendez S, Martinez-Sanchez G, Candelario-Jalil E., Re L., Giuliani A. and Fernandez O.S. Effects of ozone oxidative preconditioning on nitric oxide generation and cellular redox balance in a rat model of hepatic ischaemia-reperfusion. Liver Int 2004; 24, 55-62.
14. Borrego A, Zamora ZB, González R, Romay Ch, Menéndez S, Hernández F, Montero T, Rojas E. Protection by ozone

- preconditioning is mediated by the antioxidant system in cisplatin-induced nephrotoxicity in rats. *Mediat Inflamm* 2004; 13(1):13-19,
15. Bocci V. Ozonation of human blood induces a remarkable upregulation of heme oxygenase-1 and heat stress protein-70. *Mediators Inflamm*, 2007: 26785.
 16. Hernandez FA, Calunga JL, Turrent J, Menendez S, Montenegro A. Ozone therapy effects on biomarkers and lung function in asthma. *Archives of Medical Research* 2005; 36(5): 549-554.
 17. Programa Nacional de Asma Bronquial. Ciudad de La Habana, Cuba: MINSAP, 2000.
 18. Bradley PP, Priebat DA, Christensen RD, Rothstein G. (). Measurement of cutaneous inflammation. Estimation of neutrophil content with an enzyme marker. *J. Invest Dermatol.* 1982; 78:206-209.
 19. Manual Roche Diagnostics GMBH. 2004
 20. Homer A, Boushey I. Hiperreactividad bronquial: definición, correlación clínica. Rubistein. Provocación bronquial 2002; 6: pdf.
 21. Karol MH, Hillebrand JA, Thorne SP. Characteristics of weekly pulmonary hypersensitivity responses elicited in the guinea pigs by inhalation of ovalbumin aerosols. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 1989; 100, 234-246.
 22. Turrent J, Menéndez SA. Ozonoterapia en el Asma bronquial: bases terapéuticas para su aplicación. *Rev CENIC Cien Biol* 1998; 29(3): 161-64.
 23. Bocci V. Ozonization of blood for the therapy of viral diseases and immunodeficiencies. A hypothesis. *Medical Hypotheses* 1992; 39, 30, 1992.
 24. Bocci V. Ozone: a mixer blessing. New Mechanism of the action of ozone on blood cells make ozonated major autohemotherapy a rational approach. *Res Compl Med* 1996; 3:25-33.
 25. Corcho I, Hernández F, Reyes N, Carballo AL, Peña O, Reyes T, Yanes L. Cambios del sistema inmune en procesos inflamatorios durante la aplicación de la ozonoterapia. *Rev CENIC Cien Biol* 1998; 29(3): 203-5.
 26. Zimmermann N, Khurana G, Foster PS, Rothenberg ME. Chemokines in asthma: cooperative interaction between chemokines and IL13. *J Allergy Clin Immunol* 2003; 111(2):227-42
 27. Zamora Z, Turrent J, Méndez S, Carballo A. Anafilaxia cutánea pasiva en ratas usando suero de ratones previamente tratados con ozono mediante insuflación rectal. *Rev CENIC Cienc Biol* 1998; 29(3): 125-7.

28. Maddox L, Schwartz DA. The pathophysiology of asthma. *Annu Rev Med* 2002; 53: 477-498.
29. Matheu V, Navikas V, Issazadeh S. Susceptibilidad de la cepa murina B10.RIII a padecer enfermedad inflamatoria alérgica pulmonar. Un modelo murino de asma. *Alergol Immunol Clin* 2001; 16: 282-290.
30. Zamora Z, Borrego A. La mezcla gaseosa O₃-O₂ incrementa la respuesta humoral contra el antígeno recombinante de superficie del virus de la Hepatitis B en ratones. *Rev CENIC Ciencias Biol* 2002; 33(2):132-36.
31. Exner M, Minar MD, Mlekush MD, Sabeti MD, Amighi MD, Lalouschek MD. Myeloperoxidase predict progression of carotid stenosis in states of low high -density lipoprotein cholesterol. *JACC* 2006; 47: 2212-2218.
32. Maurice L, Deby'dupont G. Oxidative stress. *European Society of anesthesiology* 2005; 12RC7: 261-273.
33. Caramori and Papi A. Oxidants and asthma. Occasional review. *Torax* 2004; 59:170-173.
34. Suzuki Y, Masine E, Mazzocca C, Cuzzocrea S, Ciampa A, Suzuki H, et al. Inhibition of poly (ADP- ribose) polymerase prevents allergen-induced asthma-like reaction in sensitized Guinea pigs. *J Pharmacol Exp Ther* 2004; 311(3): 1241-48.
35. Wang S, Rosenberger CL, Espindola TM, Barrett EG, Tesfaigzi Y, Bice DE, Harrod KS. CCSP modulate airway dysfunction and host responses in an Ova-challenged Mouse model. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2001; 281(5): LI303-LI311.
36. Speyer CL, Neff TA, Warner RL, Guo R, Sarma JV, Riedeman NC, Murphy ME, Murphy H, Sand Ward PA. Regulatory effects of iNOS on acute lung inflammatory responses in mice. *American Journal of Pathology* Dic 2003; 163(6):2319-29.

REDVET: 2009 Vol. 10, Nº 12

Recibido 28.08.09 - Ref. prov. SEP0910B - Revisado 18.09.09 - Aceptado 24.11.09
Ref. def. 120907_RED VET - Publicado 15.12.09

Este artículo está disponible en <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n111109.html>
concretamente en <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n121209/120907.pdf>

REDVET® Revista Electrónica de Veterinaria está editada por Veterinaria Organización®

Se autoriza la difusión y reenvío siempre que enlace con [Veterinaria.org®](http://www.veterinaria.org)
<http://www.veterinaria.org> y con REDVET® - <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet> -
<http://revista.veterinaria.org>