

Efecto del Aceite de Girasol Ozonizado sobre la Actividad de la Mieloperoxidasa en el Modelo de Edema en la Oreja del Ratón (Effect of Ozonized Sunflower Oil on Myeloperoxidase Activity in the Model of Ear Oedema in Mouse)

Zamora Rodríguez Zamora: Departamento de Biomedicina, Laboratorio de Ensayos Biológicos, Centro de Investigaciones del Ozono. Apartado Postal 6414, Ciudad Habana. Cuba. zullyt70@yahoo.com | **González Carvajal Yousy:** Departamento de Biomedicina, Laboratorio de Ensayos Biológicos, Centro de Investigaciones del Ozono. Apartado Postal 6414, Ciudad Habana. Cuba | **Ledon Nuris:** Centro de Inmunología Molecular, Apartado postal 16040, Ciudad Habana. Cuba

Resumen

El OLEOZON es un producto ozonizado que ha mostrado tener un gran efecto germicida. Tomando en consideración estos hallazgos, nosotros decidimos evaluar el efecto del OLEOZON sobre la actividad de la mieloperoxidasa en un modelo de edema en la oreja del ratón inducido por aceite de croto. Los animales fueron divididos en cinco grupos: el primero recibió, aceite de croto; el segundo grupo, recibió acetona como vehículo del aceite de croto; el tercero, aceite de croto con indometacina como fármaco de referencia; al cuarto grupo, se le aplicó aceite de croto con aceite de girasol y al quinto, se le aplicó aceite de croto con el OLEOZON. A los animales se les practicó la eutanasia por dislocación cervical, se extrae una porción de oreja de 6 mm, fue pesado y se determinó la actividad de la mieloperoxidasa (MPO). Los resultados mostraron que en el grupo de animales que recibieron tratamiento con OLEOZON la actividad de la MPO disminuyó significativamente al igual que el peso del tejido. Estos resultados constituyen la primera evidencia de que el efecto anti-inflamatorio del OLEOZON pudiera estar determinado al menos en parte por una disminución de la infiltración de neutrófilos en el tejido.

Palabras Claves: Aceite de girasol ozonizado | ratón | aceite de croton | mieloperoxidasa

Abstract

OLEOZON[®] is an ozonized product that has shown a great effectiveness as germicide. Taking into account the former findings we decided to evaluate the effect of OLEOZON[®] on myeloperoxidase (MPO) enzyme activity in croton oil-induced Mouse ear oedema. The mice were divided into five groups; first group received croton oil; second one acetone as vehicle of croton oil; the third one, croton oil plus indometacina; the fourth, croton oil plus sunflower oil and the fifth group, croton oil plus Ozonized sunflower oil (OLEOZON[®]). Four hour thereafter, the euthanasia was performed to the animals by cervical dislocation, and 6 mm sections of ears were obtained and weighed for MPO activity determination. Oleozon significantly reduced MPO activity and the weight of the tissue was reduced significantly. These results provide the first evidence that the anti-inflammatory effects of OLEOZON may result, at least partially, from a reduction of neutrophil infiltration into the tissue.

Keywords: Ozonized Sunflower oil | mouse | croton oil | myeloperoxidase

INTRODUCCIÓN

El aceite de girasol ozonizado (OLEOZON®) es el producto de la reacción entre el ozono y el aceite de girasol bajo condiciones apropiadas, de dicha reacción se producen aldehídos, ácidos carboxílicos, hidroperóxidos, ozonidos y otras especies peroxidicas.¹ El OLEOZON® ha sido registrado en Cuba para el tratamiento de la tinia pedis. Este producto tiene un marcado poder germicida y su efecto antimicrobiano ha sido demostrado contra bacterias, virus y hongos^{2, 3} y también en el tratamiento de infecciones producidas por cepas de organismos resistentes,⁴ lo cual ha sido demostrado tanto in vivo como in vitro.

Por otra parte, algunos estudios toxicológicos han demostrado que el producto no es mutagénico ni genotóxico y no posee efectos adversos en pacientes que lo han utilizado.⁵⁻⁷ También ha sido demostrado que aceites no ozonizados no poseen efectos germicidas.^{8,9}

Teniendo en cuenta, que algunos autores han demostrado que productos de la oxidación lipídica, pueden ejercer efectos anti-inflamatorios,^{10,11} y que Oleozon posee un gran efecto germicida nos hemos planteado como objetivo de este estudio evaluar sus efectos como anti-inflamatorio en el modelo del edema en la oreja del ratón inducido por aceite de croto.

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales

Se utilizaron en este estudio ratones de la línea NMRI macho de peso corporal entre 20-25 g, procedentes del Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB). Estos ratones fueron mantenidos en condiciones de temperatura (20-22 °C) y humedad relativa entre 50-55% y fueron alimentados con dieta para ratas suministrada por CENPALAB. El agua fue suministrada *ad limitum* y se cumplió con el ciclo de luz/oscuridad de 12 h.

Todo el experimento fue realizado teniendo en cuenta los códigos éticos establecidos para la experimentación en animales de laboratorio.

Diseño experimental.

Los animales fueron divididos en seis grupos de 10 animales cada uno; grupo I, se le induce la inflamación con aceite de croto, el grupo II se le aplica el aceite de croto con 1 mg de indometacina; grupo III se le aplica el aceite de croto con aceite de girasol; grupo IV, se le aplica la acetona solo como vehículo del aceite de croto y al grupo V, se le aplica el aceite de croto y Oleozon.

Inducción del edema por aceite de croto

Se aplican 10 uL de una disolución de aceite de croto en acetona, este es aplicado tópicamente en la oreja derecha del ratón, mientras que la oreja izquierda fue tomada como control. A los ratones se les practicó la eutanasia 4 horas después, mediante dislocación cervical y se le realizó un ponche en la oreja de 6 mm de diámetro. El edema fue expresado como la diferencia entre el peso del ponche de la oreja inflamada y el control.¹²

Determinación del edema producido.

La porción de ponche de cada una de las orejas, fue pesada y se expresó como la diferencia entre el peso de la oreja derecha y la oreja izquierda que fue el control, expresado en gramos.

Actividad de la mieloperoxidasa.

La actividad de la mieloperoxidasa fue determinada según el método de Bradley y cols. El ponche de tejido es homogenizado en 1 ml de una solución Buffer 50mM K₂HPO₄, pH-6, por 0,1 g de tejido en baño de hielo, utilizando un destructor de tejido Ultra-turrax. La muestra es centrifugada a 6 000 rpm durante 1 h a 4 °C, el sobrenadante es eliminado, el precipitado es resuspendido en 1 mL del Buffer 50mM K₂HPO₄ pH-6 conteniendo HTAB 0,5% y se realiza una segunda homogenización. Las muestras son congeladas a - 20 °C durante toda la noche, se procede a la descongelación, se sonicán durante 90 seg. a la máxima potencia y son incubadas durante 1 h en baño a 60 °C y centrifugadas a 6 000 rpm durante 1 h a 4 °C. 0,1 mL del sobrenadante es adicionado a 2,9 ml de Buffer 50mM K₂HPO₄ pH-6 conteniendo 0,167 mg/mL de o-dianisidina. La reacción fue iniciada mediante la adición de 0,5 ml de H₂O₂ 0,005%. La absorbancia de la muestra fue medida a 460 nm durante 1 min (Espectrofotómetro, Pharmacia). La actividad de la mieloperoxidasa fue expresada en Unidades por gramos de proteína.

Determinación de proteínas

Las concentraciones de las proteínas se determinaron por el método de Lowry y cols, utilizando seroalbúmina bovina como patrón.

Análisis estadístico.

Los datos fueron expresados como las medias \pm las desviaciones estándar. Las diferencias entre las medias de los grupos fueron comparadas por un análisis de varianza (ANOVA) con la prueba de rango múltiple Duncan. Se tomó como nivel de significación estadística $p < 0,05$.

RESULTADOS Y DISCUSION

En el Tabla 1 se observa una disminución significativa de la actividad de la mieloperoxidasa en el grupo tratado con Oleozon con respecto al control tratado con aceite de croto para $p < 0,05$, con un porcentaje de disminución de 51 % por otra parte no se observan diferencias significativas entre los grupos tratados con indometacina, oleozon y el control tratado con aceite de girasol, lo que demuestra una acción antiinflamatoria del propio aceite de girasol sin ozonizar. En cuanto a los pesos de los tejidos (medida de la formación del edema), se corroboró el efecto anti-inflamatorio de dichos compuestos tanto Oleozon como del aceite de girasol con respecto al control tratado con aceite de croto, mediante la disminución significativa del peso de las muestras de tejido (Tabla 2). También fue demostrada la inocuidad del vehículo de aceite de croto que es la acetona (Tabla 1 y 2).

Tabla 1. Muestra los resultados de la actividad de la mieloperoxidasa en tejido de la oreja del ratón

Grupos	MPO (U/g de proteína) Med \pm DE	Inhibición (%)
Aceite de croto	709 \pm 85,23	-
Acetona	51,94 \pm 6,28	-
Indometacina	350,8 \pm 76,65 **	50,5
Aceite de girasol	325,3 \pm 80,44 **	54
Oleozon	345,2 \pm 71,30 **	51,3

Tabla 2. Muestra los valores medios de los pesos de los ponches de las orejas de los ratones

Grupos	Peso del tejido (g) MED ± DE	Índice de inhibición del edema (%)
Aceite de croto	0,0228 ± 0,0032	-
Acetona	0,0015 ± 0,00045	-
Indometacina	0,0048 ± 0,00084 **	78.94
Aceite de girasol	0,0049 ± 0,0014 **	78,50
Oleozon	0,0057 ± 0,00099 **	75

Nuestros resultados muestran una disminución significativa de la actividad de la mieloperoxidasa en los animales que se les aplicó el oleozon, el comportamiento fue similar en los grupos tratados con indometacina y aceite de girasol sin ozonizar. Es conocido que el aceite de girasol esta compuesto por ácidos grasos monoinsaturados, específicamente ácido oleico y linoléico. Ha sido demostrado que el aceite de oliva rico en ácido oleico tiene efecto protector contra el estrés oxidativo y puede ser beneficioso en desórdenes inflamatorios.¹⁵ Los ácidos grasos tienen importancia en el metabolismo de los eicosanoides cutáneos, ya que ellos pueden ejercer marcados efectos sobre la composición de ácidos grasos de fosfolípidos de la epidermis, así como sobre la liberación del ácido araquidónico y más adelante en la biosíntesis de eicosanoides inflamatorios. Por tanto la incorporación de otros ácidos grasos en el tejido induce la biosíntesis de metabolitos con efectos anti-inflamatorios potentes o con efectos inflamatorios menores que los que son derivados del ácido araquidónico.¹⁶ En el tratamiento de enfermedades cutáneas como la psoriasis, usar ácidos grasos como inhibidores de los metabolitos del ácido araquidónico es frecuente.^{17,18}

También se demostró en un modelo de hipersensibilidad que la mezcla de ácidos grasos inhibe la degranulación de células y la quimiotaxis de los neutrófilos en modelos de hipersensibilidad.^{19, 20}

Ha sido demostrado que las deficiencias de ácidos grasos esenciales induce procesos inflamatorios tanto en ratas como en humanos, los cuales pueden ser revertidos mediante la aplicación cutánea de ácido linoléico en diversas formas.²¹

Sadeghi y cols. Reportaron que dietas ricas en ácidos grasos insaturados disminuye la producción de citocinas pro-inflamatorias in vivo, mientras que Pompeia y cols. mostraron que la activación de linfocitos T fue fuertemente inhibida por ácidos grasos.

Esto es corroborado por nuestros resultados donde se observó que no hay diferencias entre el grupo tratado con oleozon y el aceite de girasol, de lo cual pudiéramos preguntarnos ¿Son los compuestos del aceite de girasol los únicos responsables del efecto anti-inflamatorio del oleozon? A lo cual respondemos que también los compuestos formados a partir de la ozonización del aceite de girasol (proceso de oxidación), donde se forman compuestos oxidados tales como lípidos oxidados, peróxidos, hidroperóxidos, aldehídos y ozonidos, tienen efecto anti-inflamatorio, pues se ha demostrado que aldehídos de bajo peso molecular, generados por oxidación de ácidos grasos insaturados, toman parte fundamental en la inhibición de reacciones inflamatorias agudas, mediante la inducción de la síntesis de proteínas anti-inflamatorias.²⁴

Recientemente fue demostrado que el aceite de oliva ozonizado es capaz de inhibir el factor nuclear κ B (FN- κ B), responsable de la transcripción nuclear para expresión de factores proinflamatorios y también inhibió la ciclooxigenasa-2.²⁵ En otro estudio posterior también se evidenció el efecto inhibitor del aceite de oliva ozonizado sobre la producción de óxido nítrico en macrófagos.²⁶

Conclusión

Se concluyendo que teniendo en cuenta el ya demostrado efecto germicida del Oleozon y el efecto anti-inflamatorio demostrado en este estudio, podemos decir que el OLEOZON por poseer dos propiedades fundamentales como son su poder germicida y anti-inflamatorio, se pudiera considerar uno de los fármacos de elección posibles para la terapia de diversas afecciones cutáneas.

BIBLIOGRAFIA

1. Diaz M, Gavin J, Hernandez F, Ledea O, Moleiro J. Study of H NMR methyl linoleate ozonation. *Ozone Sci Eng* 2003; 5: 121-126.
2. Sechi LA, Lezcano I, Nuñez N, Espino M. Antibacterial activity of ozonized sunflower oil (OLEOZON). *J. Appl. Microbiol* 2001; 90: 279-284.
3. Lezcano I, Molerio J, Gómez M, Contreras R, Roura G y Díaz W. Actividad *in vitro* del OLEOZON frente a agentes etiológicos de infecciones en la piel. *Revista CENIC Ciencias Biológicas* 1998; 29: 209.
4. Lezcano I, Nuñez N, Espino M, Gómez M. Antibacterial activity of ozonized sunflower oil, Oleozon[®], against *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus apidermidis*. *Ozone Sci Eng* 2000; 22: 207-214.
5. Llerena C, García G, Moleiro J, Menéndez S. Irritabilidad dérmica del Oleozon. *Revista CENIC Ciencias Biológicas* 1995; 26: 104-109.
6. Martínez G, León OS. Toxicidad aguda dérmica del OLEOZON en ratas y conejos. *Revista CENIC Ciencias Biológicas* 1995; 26: 100-104.
7. Remigio A, Gonzalez Y, Zamora Z, Moleiro J. Evaluación genotóxica del OLEOZON mediante el ensayo de micronúcleos en médula ósea y sangre periférica de ratón. *Revista CENIC, Ciencias Biológicas* 1998; 28: 200-202.
8. Streichsbier F. Mikrobiologische Untersuchungen an ozonisiertem Olivenöl. *Fette Seifen Anstrichmittel* 1982; 84: 304-308.
9. Contreras OR, Gómez M, Menéndez S. Efecto de la sustitución del aceite de oliva por el aceite de girasol, sobre la actividad antimicrobiana del aceite ozonizado. *Revista CENIC, Ciencias Químicas* 1989; 20: 121-124.
10. Kochkov V. and Leitinger N. Anti-inflammatory properties of lipid oxidation products. *J. Mol. Med* 2003; 81: 613-626.
11. Leitinger N. Oxidized phospholipids as modulators of inflammation in atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol* 2003; 14: 421-430.
12. Ledon N, Casacó A, Gonzalez R, Merino N, Gonzalez A, Tolon Z. Antipsoriatic, antiinflammatory and analgesic effects of an extract of red propolis. *Acta pharmacologica Sinica* 1997; 18: 274-276.
13. Bradley PP, Priebat DA, Christensen RD, Rothstein G. Measurement of cutaneous inflammation. Estimation of neutrophil content with an enzyme marker. *J Invest Dermatol*, 78, 206-209, 1982.

14. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem* 1951;193: 165-175.
15. Alarcon CL, Barranco MD, Martin MJ, Herreria J, Motilva V. Extra-virgin olive oil-enriched diets reduce indomethacin-induced gastric oxidative damage in rats. *Digestive Diseases and Sciences* 2002; 47: 2783-2790.
16. Belch JJ, Muir A. n-6 and n-3 essential fatty acids in rheumatoid arthritis and other rheumatic conditions. *Proc. Nutr. Soc* 1998; 57:563-569.
17. Joe B, Griffiths MM, Remmers EF, Wilder RL. Animal models of rheumatoid arthritis and related inflammation. *Curr Rheumatol. Rep.* 1999; 1: 139-148.
18. Volker D, Garg M. Dietary n-3 fatty acid supplementation in rheumatoid arthritis-mechanisms, clinical outcomes, controversies and future directions. *J Clin. Biochem. Nutr* 1996; 20: 83-97.
19. Ledón N, Casacó A, Rodriguez V, Cruz J, Gonzalez R, Tolon Z, Cano M, Rojas E. Anti-inflammatory and analgesic effects of a mixture of fatty acids isolated and purified from sugar cane wax oil. *Planta Med* 2003; 69: 367-369.
20. Ledón N, Romay Ch, Rodriguez V, Cruz J, Rodríguez S, Ancheta O, Gonzalez A, Gonzalez R, Tolon Z, Cano M, Rojas E, Capote A, Valdes T. Further studies on a mixture of fatty acids from sugar cane (*Saccharum officinarum*) wax oil in animal models of hypersensitivity. *Planta Med* 2005; 71: 126-129.
21. Ziboh VA. The significance of polyunsaturated fatty acids in cutaneous biology. *Lipids* 1996; 31: S249-S253.
22. Sadeghi S, Wallace A, Calder PC. Dietary lipids modify the cytokine response to bacterial lipopolysaccharide in mice. *Immunology* 1999; 96: 404-410.
23. Pompeia C, Lopes RL, Miyasaka CK, Procopio J, Sannomiya P, Curi R. Effect of fatty acids on leukocyte function. *Braz J Med Biol Res* 2000; 33:1255-1268.
24. Leonarduzzi G, Scavazza A, Biasi F, Chiarpotto E, Camandola S, Vogel S, Dargel R, Poli G. The lipid peroxidation end product 4-hydroxy-2:3nonenal up-regulates transforming growth factor beta 1 expression in the macrophage lineage: a link between oxidative injury and fibrosclerosis. *FASEB J* 1997; 11: 851-857.
25. Miura T, Yamazaki A, Noji H and Tamoto H. Mechanism on antiinflammatory effects of ozonated oil. *Proceeding of Fifth Congress of Japan Research Association for the Medical & Hygienic Use of Ozone* 2004: 25-33.
26. Nakamuro K, Sakazaki H, Okuno t and Ueno H. Suppressive effects on immune cells and oxidative cytotoxicity of ozonated olive oil. *IOA 17th World Ozone Congress-Stranburg* 2005.

Trabajo recibido el 31/10/2006, nº de referencia 120607_RED VET. Enviado por su autor principal. Publicado en [Revista Electrónica de Veterinaria REDVET®](#), ISSN 1695-7504 el 01/12/06.

[Veterinaria.org®](#) - [Comunidad Virtual Veterinaria.org®](#) - Veterinaria Organización S.L.®

Se autoriza la difusión y reenvío de esta publicación electrónica en su totalidad o parcialmente, siempre que se cite la fuente, enlace con Veterinaria.org – <http://www.veterinaria.org/> y [REDVET® http://www.veterinaria.org/revistas/redvet](http://www.veterinaria.org/revistas/redvet) y se cumplan los requisitos indicados en [Copyright](#) 1996 -2006