

REPUBLICA DE CUBA
CENTRO NACIONAL DE INVESTIGACIONES CIENTIFICAS
CENTRO DE INVESTIGACIONES DEL OZONO
INSTITUTO DE CIENCIAS BASICAS Y PRECLINICAS:
“ VICTORIA DE GIRON ”



**EFFECTO DEL PRECONDICIONAMIENTO OXIDATIVO CON OZONO EN LA PREVENCION DEL
DAÑO RENAL AGUDO EN UN MODELO DE ISQUEMIA-REPERFUSION**

**Tesis presentada en opción al grado científico de Doctor en Ciencias
Médicas**

AUTOR: Dr.José Luis Calunga Fernández

TUTORES: Dr.CQ.Silvia Menéndez Cepero

Dr.CM. Belsis Díaz Rondón

Ciudad de la Habana

2008

AGRADECIMIENTOS

A toda mi familia: A mi madre por enseñarme el camino correcto y sembrar en mí los valores y principios más justos del ser humano, a mi hermana por ser mi apoyo incondicional, a mi esposa Anay por su amor, comprensión y dedicación a mí en todo momento, a mi hijo por ser la luz que me ilumina e impulsa día a día y finalmente a mi abuela Evelia por guiarme y estar a mi lado todos estos años.

Agradezco a mi tutora la doctora Belsis Díaz Rondón por confiar en mí, a todas las instituciones que contribuyeron a la realización de este trabajo, a investigadores, técnicos y profesionales.

Instituciones:

- Centro de Investigaciones del Ozono.
- I.C.B.P Victoria de Girón.
- Universidad Autónoma de México.
- Instituto de Farmacia y Alimentos.
- Centro Nacional de Investigaciones Científicas.
- Centro de Química Farmacéutica.
- Instituto Nacional de Nefrología

A mi tutora:

Dra. C. Silvia Menéndez Cepero, jefa de la Clínica Internacional del Centro de Investigaciones del Ozono, quien es mi ejemplo diario, por contribuir enormemente a mi formación como médico, investigador y especialista.

Profesionales, Investigadores y técnicos.

- A los técnicos Maritza Victorio del I.C.B.P. "Victoria de Girón", Yaima Alonso del Centro de Investigaciones del Ozono y Dalia Alvarez del Instituto de Farmacia y Alimentos.
- Investigadores: Dr C. Carlos Hernández, Dr C. Ricardo González, Dr C. Tomas Moreira, Dr C. Lidia Asela Fernández, Dr C. Mayra Bataller, Dr C. Frank Hernández, Ms.C. Aluet Borrego, Lic. Ana Carballo.
- A especialistas en Fisiología del I.C.B.P. " Victoria de Girón" de Ciudad de la Habana, como del resto del país.

A mis amigos Alain, Itsandro, Gerardo, Alberto y Sergio, por ser fieles amigos, por contar con ellos siempre.

Una mención especial a la Dra Irina Wilkins y a su esposo Armando Méndez por su apoyo incondicional y por su amistad.

Agradecimientos

A mis compañeras colegas de la Clínica de Ozono: Tec. Mercedes Poey y Dra Ivonne Méndez.

A todos los que de una forma u otra me brindaron su apoyo incondicional:

Dra. Maria O. Barber, Dra. Luisa Castillo, Dra. Aydelin Perez, Dra. Katiana Galvizu, Dra. Yanelis Trujillo, Dra. Mercedes Games, Dr. Nivaldo Hernández, Dra. Sarahí Del Río.

A todos Muchas Gracias.

DEDICATORIA.

**A NUESTRO QUERIDISIMO Y SIEMPRE PRESENTE
DR. PROFESOR ERNESTO BARBER GUTIERREZ,
POR ENSEÑARNOS EL CAMINO CORRECTO COMO
MEDICO, INVESTIGADOR Y COMO SER HUMANO,
PARA TODO LOS TIEMPOS.**

COLABORADORES PRINCIPALES.

1. Dr C. Stefan Mihailescu. Jefe del Departamento de Fisiología de la Universidad Autónoma de México.
2. Dr C. Frank Hernández. Jefe del Departamento de Biomedicina. Centro de Investigaciones del Ozono.
3. Dr C. Lucía González. Profesora e Investigadora Titular. Instituto Nacional de Nefrología.
4. MsC. Sandra Rodríguez. Investigadora. Centro Nacional de Investigaciones Científicas.
5. Dr C. Olga Sonia León. Investigador Titular. Centro de Investigaciones y Evaluaciones Biológicas. Instituto de Farmacia y Alimentos. Universidad de La Habana.
6. Dr C. Nelson Merino. Investigador Titular. Centro de Química Farmacéutica.
7. Tec. Maritza Victorio. I.C.B.P " Victoria de Girón".
8. Dra. Zullyt Zamora. Investigador Auxiliar. Centro de Investigaciones del Ozono.
9. Dra. Irina Wilkins Pérez. Representante del CIREN en Mexico.

ABREVIATURAS.

1	All	Angiostensina II.
2	ADH	Hormona Antidiurética.
3	ADN	Acido Desoxirribonucleico.
4	ADP	Disfosfato de Adenosina.
5	AE	Actividad Enzimática.
6	AGPI	Acidos Grasos Polinsaturados.
7	AMP	Monofosfato de Adenosina.
8	ATP	Trisfosfato de Adenosina.
9	ATPasa Ca ⁺⁺	Enzima ATPasa Ca ⁺⁺ dependiente de ATP.
10	ATPasa Na/K	Enzima ATPasa Na/K dependiente de ATP.
11	Bcl-2	Proteína antiapoptótica
12	Bcl-X	Proteína antiapoptótica.
13	BCC	Bloqueadores del Calcio
14	Ca ⁺⁺	Ion Calcio.
15	CAT	Catalasa.
16	2.3 DPG	2.3 Disfosfoglicerato.
17	Δ D.O	Variación de Densidad Óptica
18	EDTA	Sal sódica del Acido Etilendiamino Tetracético
19	ERO	Especies Reactivas del Oxígeno.
20	ET-1	Endotelina A3
21	FCS	Factor Estimulante de Colonias.
22	FLA ₂	Fosfolipasa A ₂ .
23	F.P.R	Flujo plasmático renal
24	F.S.R	Flujo sanguíneo renal.
25	F.F	Fracción de Filtración.
26	GSH-Px	Glutación Peroxidasa.
27	GSH-R	Glutación Reductasa.
28	GSH	Glutación Reducido.
29	GSSG	Glutación Oxidado.
30	HCl	Acido clorhídrico.
31	HO [·]	Radical Hidroxilo.
32	Kf	Coeficiente de Filtración.
33	HO-1	Enzima Hemooxigenasa.
34	H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrógeno.
35	HOCL	Acido Hipocloroso.
36	ICAM-1	Molécula 1 de Adhesión Intercelular.
37	I.F.G	Intensidad de Filtración Glomerular.
38	IGF-1	Factor de crecimiento similar a la insulina.

39	INF	Interferon.
40	IL-1	Interleucina 1.
41	IL-6	Interleucina 6.
42	I/R	Isquemia Reperfusión.
43	IRA	Insuficiencia Renal Aguda.
44	KC	Quimoquina.
45	KCl	Cloruro de Potasio.
46	LTB ₄ , C ₄ , D ₄	Leucotrienos B ₄ ,C ₄ ,D ₆
47	MPO	Mieloperoxidasa.
48	NADPH	Nicotinamina Adenina Disfosfato.
49	NF-κβ	Factor Transcripcional NF-κβ.
50	NTA	Necrosis Tubular Aguda.
51	O ₂ ^{•-}	Radical Anión Superóxido.
52	¹ O ₂	Oxígeno singlete.
53	ON [•]	Oxido Nítrico.
54	O=NOO [•]	Radical peroxinitrito.
55	O ₃	Molécula de Ozono.
56	PAG	Productos Avanzados de la Glicosilación de Proteínas.
57	PAH	Acido para amino-hipúrico.
58	PDE 5	Enzima fosfodiesterasa 5.
59	PDGF	Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas.
60	PGE ₂	Prostaglandina E ₂ .
61	PMR	Potencial de Membrana em Reposo.
62	PNA	Péptido natriurético atrial.
63	PreOzo	Precondicionamiento Oxidativo con Ozono.
64	SOD	Enzima Superóxido Dismutasa.
65	SRATB	Sustancias Reactivas al Acido Tiobarbitúrico.
66	TBXA ₂	Tromboxano A ₂ .
67	TGF _β	Factor Transformador de Crecimiento.
68	TNFα	Factor de Necrosis Tumoral Alfa.
69	TPM	Transición de la Permeabilidad Mitocondrial.
70	XDH	Enzima xantina deshidrogenasa.
71	XOD	Xantina Oxidasa.

SINTESIS

Los tejidos sometidos a isquemia reperusión (I/R) pueden recuperarse, siempre que se logre interrumpir a tiempo, las vías del daño celular involucradas en la I/R. En varias situaciones clínicas el tiempo de isquemia renal sobrepasa los 45 min, tiempo de isquemia en el cual se potencian mecanismos lesivos que interfieren con la adecuada reparación del tejido renal sometido a I/R. Fue interés de nuestra investigación valorar el efecto del preconditionamiento oxidativo con ozono sobre la función y estructura de riñones sometidos a un tiempo de isquemia de 60 min, seguidos por 180 min de reperusión. Como resultado se obtuvo que el preconditionamiento oxidativo con ozono preservó la función renal, comprobado por el incremento del flujo plasmático renal (F.P.R), la fracción de filtración (F.F) y la intensidad de filtración glomerular (I.F.G) en riñones postisquémicos preconditionados con ozono con respecto a riñones postisquémicos sin pretratamiento.

El preconditionamiento oxidativo con ozono preservó la integridad de componentes de la nefrona, como glomérulos y túbulos proximales, frente al daño isquémico de 60 minutos. Bajo nuestras condiciones de trabajo el preconditionamiento mostró un efecto beneficioso sobre el balance REDOX tisular, en riñones postisquémicos, mediado este efecto por la activación de enzimas antioxidantes en el tejido renal lesionado, la regulación a nivel renal de la

interleucina proinflamatoria número 6, la disminución de la actividad de la enzima fosfolipasa A₂, así como la preservación de los niveles renales de productos avanzados de la glicosilación. Se concluyó en nuestro trabajo que el preconditionamiento oxidativo con ozono, a tres niveles de dosis, muestra un efecto positivo en la preservación del tejido renal frente al daño ocasionado por el síndrome de I/R, con resultados más favorables con la dosis de 0,5 mg/kg.

INDICE

INTRODUCCIÒN -----	1
1.REVISIÒN BIBLIOGRAFICA -----	11
1.1 El Daño Renal por I/R-----	11
1.2 Mediadores del daño por I/R renal.-----	15
1.3 Las Especies Reactivas del Oxigeno en los Sistemas Biológicos. -----	23
1.4 Mecanismos protectores contra el daño por I/R renal -----	25
1.4.1 El Precondicionamiento isquémico.-----	25
1.4.2 El precondicionamiento renal farmacológico.-----	27
1.5 Estrategias empleadas en el manejo de la insuficiencia Renal Aguda causada por I/R. Ventajas y desventajas frente al PreOzo-----	30
1.6 Ozonoterapia como herramienta terapéutica . Generalidades.-----	34
1.6.1 Mecanismos biológicos asociados a la eficacia de la Ozonoterapia.-----	36
2. MATERIALES Y METODOS -----	43
2.1 Materiales.-----	43
2.1.1 Reactivos-----	43
2.2 Métodos-----	44
2.2.1 Administración del Ozono-----	44
2.2.1a Criterios de selección de los niveles de dosis y esquemas de precondicionamiento con Ozono-----	45
2.2.2 Biomodelos-----	46
2.2.3 Procedimiento quirúrgico para la I/R renal.-----	46
2.2.4 Proceder para la realización de los aclaramientos Plasmáticos .-----	47
2.3 Diseños Experimentales-----	48
2.3.1 Diseño No.1.Precondicionamiento oxidativo con ozono en riñones sanos-----	48
2.3.2 Diseño No.2. Papel del PreOzo sobre la función renal , estructura renal y algunas variables indicadoras de estés oxidativo en riñones sometidos a 60 min de isquemia y 180 min de reperfusión -----	50

2.3.3 Diseño No.3. Efecto del PreOzo sobre la expresión de interleucina 6(IL-6) en riñones sometidos a 60 min de isquemia seguido por 180 min de reperusión -----	53
2.4 Determinaciones bioquímicas -----	54
2.4.1 Técnicas para la determinación en plasma de las concentraciones de PAH e inulina-----	54
2.4.2 Técnicas para la determinación en plasma de creatinina	55
2.4.3 Determinaciones bioquímicas de parámetros indicadores de estrés oxidativo a nivel de tejido renal-----	55
2.4.3.1 Determinación del GSH-----	56
2.4.4.1 Actividad enzimática (AE) de la SOD (superóxido dismutasa)-----	57
2.4.4.2 AE de la CAT (catalasa)-----	57
2.4.4.3 AE de la GSH-Px (glutación peroxidasa)-----	58
2.4.4.4 Determinación de las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (SRATB)-----	58
2.4.4.5 Determinación de las proteínas -----	59
2.4.4.6 Técnicas para la medición de fructosamina-	59
2.4.4.7 Técnicas para la medición de la actividad tisular de FLA2 -----	60
2.5 Inmunohistoquímica para la visualización de la inmunoreactividad de la IL-6 en tejido renal sometido a isquemia y pretratado con ozono-----	60
2.5.1 Estudios Histopatológicos -----	61
2.5.1.1 Microscopía Óptica (Hemotoxilina-Eosina) y Microscopía Óptica de Alta Resolución-----	61
2.6 Análisis Estadístico de los Resultados -----	63
3. RESULTADOS -----	65
3.1 Efecto del acondicionamiento oxidativo con ozono (PreOzo) sobre pruebas de función renal: Flujo Plasmático Renal (FPR), Intensidad de filtración Glomerular (I.F.G), Fracción de Filtración (FF) , niveles plasmáticos de creatinina y estructura de riñones sanos-----	65
3.2 Efecto del Acondicionamiento oxidativo con ozono (PreOzo) , sobre parámetros bioquímicos , indicadores del estrés oxidativo-----	67
3.3 Papel del pretratamiento con ozono (PreOzo) sobre la actividad tisular de la fosfolipasa A2 (FLA2)y los niveles renales de fructosamina -----	70
3.4 Efecto del PreOzo en la disminución de la interleucina pro-inflamatoria (IL-6) en riñones sometidos a isquemia de 60min, seguida de 180min de reperusión -----	73
3.5 Eficacia del PreOzo sobre las pruebas de función renal : F.P.R, I.F.G,F.F,	

niveles plasmáticos de creatinina y estructura de riñones sometidos a I/R-----	75
3.6 Efecto del PreOzo sobre la estructura de riñones sometidos a I/R. (Análisis Cualitativo)-----	78
3.6a Estudio Morfométrico Análisis cuantitativo -----	80
4.DISCUSIÓN. -----	83
5.CONCLUSIONES. -----	101
5.1.RECOMENDACIONES. -----	102
REFERENCIAS	
BIBLIOGRAFICAS.	
ANEXOS.	
AUTOBIOGRAFIA.	

INTRODUCCIÓN.

El fenómeno de isquemia/reperfusión (I/R) es el cese del riego sanguíneo a una célula por un tiempo determinado y su posterior reoxigenación durante el periodo de reperfusión (Barber *et al.*, **1999**).

Se reporta que la complicación mas frecuente de la I/R renal es la necrosis tubular aguda (NTA), apareciendo con mayor frecuencia cuando los tiempos de isquemia pasan los 30 minutos, por lo que se refleja que los tiempos de isquemia son determinantes en la viabilidad del riñón a la hora de la reoxigenación (Barber *et al.*, **1999**).

Durante la isquemia ocurren cambios que dañan a la célula y estos proporcionan las bases bioquímicas y fisiopatológicas para el desencadenamiento de una cascada de eventos lesivos los cuales se incrementan en la fase de reperfusión. (Ramzi *et al.*, **2000**).

La vasoconstricción renal y la disfunción tubular han sido claramente definidas como los mecanismos más importantes que afectan el funcionamiento de la nefrona después de la I/R (Brenner, **2000**).

La isquemia provoca daño al endotelio y por tanto conlleva a la disfunción endotelial, lo que crea un desequilibrio entre los agentes vasodilatadores [óxido

nítrico (ON[•]), adenosina, prostaglandina E₂ (PGE₂)] y los agentes vasoconstrictores [endotelina 1 (ET-1), angiotensina AII, tromboxano A₂ (TBxA₂), leucotrienos] desplazándose el equilibrio hacia la producción de estos últimos, culminado con una vasoconstricción no controlada. Todo esto trae como resultado la disminución del coeficiente de filtración glomerular (kf), la intensidad de filtración glomerular (I.F.G), el aumento de la resistencia vascular a nivel de las arteriolas aferentes y eferentes, con la consecuente disminución del flujo sanguíneo renal (F.S.R) (Brenner, **2000**). Durante la reoxigenación tisular, previa isquemia, se crea un flujo sanguíneo turbulento, el cual es capaz de dañar las paredes del endotelio, aumentando las fuerzas de cizallamiento sobre la íntima endotelial. Como consecuencia de esto, el endotelio comienza a liberar agentes vasoconstrictores los cuales son responsables de la vasoconstricción mantenida en la fase de reperfusión, favoreciéndose de esta forma la caída de la I.F.G en el riñón postisquémico (Brenner, **2000**).

La disfunción tubular aparece producto de la disminución del adenosintrisfosfato (ATP) y la privación de oxígeno, esto lleva a una disfunción celular, daño subletal y a la muerte celular. Todo esto a nivel del epitelio tubular culmina con la descamación de la célula epitelial, lo cual provoca la obstrucción de los túbulos, con incremento de la presión hidrostática de la cápsula de Bowman y la caída de la IFG (Ramzi, **2000**; Brenner, **2000**; Bonventre, **1993**).

Actualmente en la fisiopatología de la I/R se ha dado un papel protagónico a las especies reactivas del oxígeno (ERO), como el radical anión superóxido ($O_2^{\bullet-}$), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el radical hidroxilo (HO^{\bullet}), el oxígeno singlete (1O_2), el óxido nítrico (ON^{\bullet}), el peroxinitrito ($O=NOO$), el ácido hipocloroso ($HOCL$), entre otras, las cuales al aumentar crónicamente originan un desequilibrio entre la actividad de sistemas prooxidantes y la actividad de sistemas antioxidantes, con predominio de la actividad de los primeros, lo cual es conocido como estrés oxidativo (Rodríguez *et al.*, **1996**).

Existen sistemas antioxidantes endógenos y exógenos que limitan la actividad y producción de las ERO, por lo que se mantiene un equilibrio prooxidante – antioxidante y se evita el estrés oxidativo. Dentro de los antioxidantes endógenos se encuentran: las enzimas superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), glutatión peroxidasa (GSH-Px) y glutatión reductasa (GSH-R), proteínas antioxidantes como la transferrina, el glutatión reducido (GSH), la ceruloplasmina y dentro de los sistemas exógenos están las vitaminas A, E y C, así como los metales cobre y selenio (Rodríguez *et al.*, **1996**; Annuk *et al.*, **2001**).

Las ERO, al estar aumentadas y no ser neutralizadas por las sustancias antioxidantes, son capaces de inducir daño a membranas, atacando los dobles enlaces C=C de los ácidos grasos poliinsaturados, lo que provoca alteración de su estructura y función. Además, producen la oxidación de las cadenas laterales de

los residuos de aminoácidos, formación de enlaces cruzados proteína-proteína y la oxidación del esqueleto proteico que ocasiona la fragmentación de la proteína y alteración de su función, afectando a enzimas de naturaleza proteica como la Na⁺/K⁺ ATPasa y la Ca⁺⁺ ATPasa. Por otro lado, las ERO son capaces de reaccionar con la timina del ADN nuclear y mitocondrial originando fragmentación mono catenaria del ADN, lo que inhibe la reparación y proliferación de la célula (León *et al.*, **2005**).

Hay investigadores que han tratado de neutralizar el daño provocado por las ERO en eventos de I/R a través del uso de enzimas antioxidantes como la SOD, CAT, GSH-Px y del allopurinol (inhibidor de la XOD); otros han usado la deferoxamina la cual inhibe la reacción de Fenton por una unión al hierro libre. Todos ellos han reducido la severidad del daño celular y la disfunción del órgano por la I/R (Brawn *et al.*, **1985**; Brenner, **2000**). Estos estudios reflejan el papel importante de las ERO en el deterioro celular en el proceso de I/R.

Se reporta que la sensibilidad de la nefrona al daño isquémico varía a lo largo de la misma, existiendo una sensibilidad mayor en la porción proximal con respecto a la porción distal, lo que se correlaciona con un balance antiapoptótico de las proteínas Bcl-2 y Bcl-X1, las cuales realizan la inhibición de la apoptosis, a través de un mecanismo antioxidante (Gobé *et al.*, **1999**; Cuttle *et al.*, **2001**), que favorece a las células epiteliales del túbulo distal y las hace adaptativamente resistente al daño por I/R (Caballero *et al.*, **2000**). Además, la zona distal funciona como almacén para la producción de factores de crecimiento para su

mantenimiento y regeneración, de esta forma esta zona protege y preserva también el túbulo proximal (Hammerman *et al.*, 2000; Caballero *et al.*, 2000).

Actualmente existen estrategias protectoras contra el daño mediado por la I/R, pero estas alternativas farmacológicas y no farmacológicas necesitan una mejor evaluación, ya que unas muestran efectos adversos y otras no han sido del todo validada en la práctica clínica. (**Tabla del Anexo 5**)

Desde hace más de 100 años se viene usando el ozono (O₃), variación alotrópica del oxígeno, para fines médicos. Se postula que su mecanismo de acción está relacionado con la generación de productos secundarios en su reacción con los dobles enlaces en los lípidos, enlaces bisulfuro y grupos sulfhidrilos de proteínas presentes en las membranas celulares. Ha sido descrita la generación de lipoperóxidos, peróxidos de hidrógeno, aldehídos y ozónidos como compuestos activos capaces de activar mecanismos bioquímicos y expresión de genes, de esta forma están involucrados en disímiles procesos celulares (Bocci, 1997; Prior *et al.*, 1993).

El preconditionamiento oxidativo con ozono (PreOzo) fue demostrado por León y colaboradores en 1998 (León *et al.*, 1998). Este mecanismo de acción propuesto para el ozono con fines médico plantea que la aplicación de este gas a concentraciones controladas (25-50 mg/L) produce un estrés oxidativo ligero, el cuál estimula los mecanismos antioxidantes endógenos, preparando al hospedero a enfrentar condiciones fisiopatológicas mediadas por ERO. Otros autores han utilizado el PreOzo en modelos experimentales de I/R renal y hepática. A nivel

renal se reporta un efecto protector del PreOzo sobre variables de función renal en riñones sometidos a I/R, siendo los tiempos de isquemia y reperfusión de 30 y 180 min, respectivamente (Barber *et al.*, 1999). A nivel hepático se comprobó que este preconditionamiento oxidativo protegió al hígado contra el deterioro tisular mediado por I/R siendo el tiempo de isquemia hepática de 90 min (Peralta *et al.*, 2000). Ambos estudios mostraron los efectos citoprotectores del PreOzo en la preparación del tejido para enfrentar la I/R.

Teniendo en cuenta las premisas expresadas en los párrafos anteriores, se concibió el siguiente problema e hipótesis de trabajo:

-Problema.

La isquemia/reperfusión (IR) renal es consecuencia de muchas afecciones frecuentes (hemorragia aguda, shock, trasplante renal) y además es causa de complicaciones renales graves, que ponen en juego la vida del paciente, así como su calidad de vida futura. Actualmente, las terapias empleadas para el manejo del daño renal agudo por I/R poseen un alcance limitado, por lo que resulta necesaria la búsqueda de nuevas terapias. Además, se conoce que en varias situaciones clínicas el tiempo de isquemia renal excede los 30 minutos. Por otra parte la ozonoterapia ha mostrado buenos efectos en la prevención del daño celular mediado por I/R.

¿Podría el preconditionamiento oxidativo con ozono prevenir el daño renal provocado por una isquemia de una hora y una reperfusión de tres horas?

Tomando en consideración los antecedentes antes mencionado, formulamos la siguiente:

-Hipótesis.

El preconditionamiento oxidativo con ozono, puede proteger contra una hora de isquemia caliente y 3 horas de reperfusión, en un modelo de daño renal agudo por I/R, a través de la activación de sistemas que regulan el estrés oxidativo.

Teniendo en cuenta esta Hipótesis se plantearon los siguientes:

OBJETIVOS.

OBJETIVO GENERAL:

Valorar el efecto protector del preconditionamiento oxidativo con ozono a nivel experimental en la prevención del daño renal por isquemia reperfusión.

OBJETIVOS ESPECIFICOS:

1. Valorar el efecto del preconditionamiento oxidativo con ozono sobre pruebas de función renal y estructura de riñones sanos.
2. Valorar el efecto del preconditionamiento oxidativo con ozono sobre las pruebas de función renal en riñones postisquémico
3. Valorar el efecto del preconditionamiento oxidativo con ozono sobre variables indicadoras del estrés oxidativo a nivel renal.

4. Valorar el efecto del preconditionamiento oxidativo con ozono sobre la estructura de riñones postisquémicos.
5. Valorar el efecto del preconditionamiento oxidativo con ozono sobre la expresión renal de interleucina 6 en riñones postisquémicos.

Resultado económico, social o científico que aportará el tema al sector o rama.

ECONÓMICOS: La aplicación de la ozonoterapia por vía rectal, a pacientes con riesgo de daño renal agudo por I/R, será una herramienta terapéutica de gran utilidad, ya que no presenta reacciones adversas, el proceder es de fácil manipulación, la vía de aplicación es tolerable por los pacientes, los equipos de ozono de uso médico son de producción nacional y se fabrican en el Centro de Investigaciones del Ozono, perteneciente al Centro Nacional de Investigaciones Científicas. Por otra parte los fármacos y procedimientos empleados en el mundo actual para aminorar la lesión del tejido renal, después de haber sufrido la falta de riego sanguíneo, son de difícil manipulación, muchas de las vías de aplicación de estos son invasivas y muestran reacciones adversas a corto y a largo plazo. Además, en nuestro país no se dispone de una producción nacional de algunos de estos fármacos, por lo que hay que importarlos para su uso en el orden clínico, aspecto que eleva aún más sus costos. Sin embargo, la ozonoterapia podría sustituir a esos fármacos.

SOCIALES: La protección de la función renal se inicia en el momento en que se identifican las posibles noxas que pueden producir su alteración, por lo que los resultados de este estudio permitirán proponer un esquema de tratamiento de ozonoterapia en el cual se pretrate al paciente con riesgo de sufrir un daño renal agudo por I/R, evitando de esta forma que el paciente caiga en insuficiencia renal aguda con sus múltiples complicaciones. Se conoce que la I/R es causa del 70 % de las insuficiencias renales agudas y un aspecto determinante es la prolongación por cualquier causa del tiempo de isquemia renal sobre todo cuando excede a los 45 minutos, llegando a la Necrosis Tubular Aguda. Una vez identificado adecuadamente al paciente con riesgo elevado de padecer de Insuficiencia Renal Aguda (IRA) mediada por I/R, se le puede aplicar previamente la ozonoterapia por vía rectal con el objetivo de prevenir el daño renal. El preconditionamiento oxidativo con ozono prepararía al riñón a soportar el insulto isquémico, sobre todo cuando sea mayor de los 45 min y así evitar que el paciente pueda desarrollar, entre otras alteraciones, la IRA por I/R no controlada. Además, el pretratamiento con ozono sería un proceder fácil de aceptar por el paciente, a dosis ya estudiadas, sin ningún efecto adverso y lográndose una mejor calidad de vida.

CIENTÍFICOS: El estudio del efecto del pretratamiento con ozono sobre variables funcionales, bioquímicas, inmunológicas e histológicas en un modelo de daño renal agudo por I/R es una investigación de gran impacto en el campo de la medicina en general. Los resultados de esta investigación permitirán profundizar

en el estudio de los efectos de la ozonoterapia sobre mediadores moleculares del daño renal agudo por I/R. Además, este estudio muestra que el preconditionamiento oxidativo con ozono protegió al tejido renal, a un tiempo de isquemia mayor al anteriormente reportado, es decir a una hora. Este estudio refleja que este efecto citoprotector del preconditionamiento oxidativo frente al daño inducido por la isquemia reperusión es mediado en gran medida por la activación a nivel renal de sistemas antioxidantes endógenos, así como la modulación de la expresión renal de la interleucina 6, interleucina proinflamatoria relacionada con la inflamación en tejidos sometidos a fenómenos de isquemia reperusión. En esta investigación se utilizaron 3 niveles de dosis de preconditionamiento con ozono, aspecto importante ya que se obtuvo que la dosis de 0.5 mg/kg es la óptima para la preparación del tejido renal para enfrentar una hora de isquemia.

1. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.

1.1. El Daño Renal por I/R.

El fenómeno de I/R renal está presente en varios procesos patológicos de la práctica clínica diaria. Este fenómeno es causa fundamental del fallo renal agudo que, de no ser solucionado a tiempo, conlleva a la necrosis tubular aguda (NTA) y a la insuficiencia renal aguda (IRA). Al producirse el cierre de los vasos renales, en situaciones como el shock, la hipovolemia y otras como el trasplante renal, los riñones son sometidos a un período variable de hipoperfusión el cual es determinante para la viabilidad del órgano a la hora de la reperfusión (Brenner, **2000**). Durante el periodo de isquemia ocurre una disminución energética, la cual es responsable de una cascada de eventos bioquímicos que conducen al deterioro celular, que de no ser este detenido a tiempo, podría conllevar a la muerte celular (Brenner, **2000**). Se reporta que la caída del trifosfato de adenosina (ATP), a nivel de las células del epitelio tubular renal, produce un desequilibrio en los gradientes iónicos que determinan la polaridad de dicho epitelio y daño al citoesqueleto con alteraciones de la arquitectura de la célula epitelial tubular (Brenner, **2000**). El daño al citoesqueleto producto de la caída del ATP provoca una redistribución anormal de ácidos grasos, de proteínas, de enzimas como la ATPasa dependiente de sodio y potasio (Na^+/K^+ ATPasa) a nivel de la membrana basolateral y apical de la célula tubular. Poco a poco se genera pérdida de la polaridad de la célula epitelial, necrosis y descamación celular (Brenner, **2000**). De esta forma, las células

descamadas van ocluyendo la luz tubular, aumentando la presión hidrostática de la cápsula de Bowman, con la consecuente caída de la IFG (Brenner, **2000**).

En la fase isquémica de la I/R renal, el ATP es degradado a ADP y AMP en las células del parénquima renal y en las células endoteliales. Es bien reportado que estos precursores del ATP no poseen la capacidad de atravesar las membranas celulares. Sin embargo, de prolongarse la isquemia el ATP continuará degradándose de AMP a Xantina e Hipoxantina. Estas purinas si poseen la capacidad de atravesar las membranas y escaparse al exterior de las células, provocando una pérdida de metabolitos para la resíntesis del ATP (Brenner, **2000**).

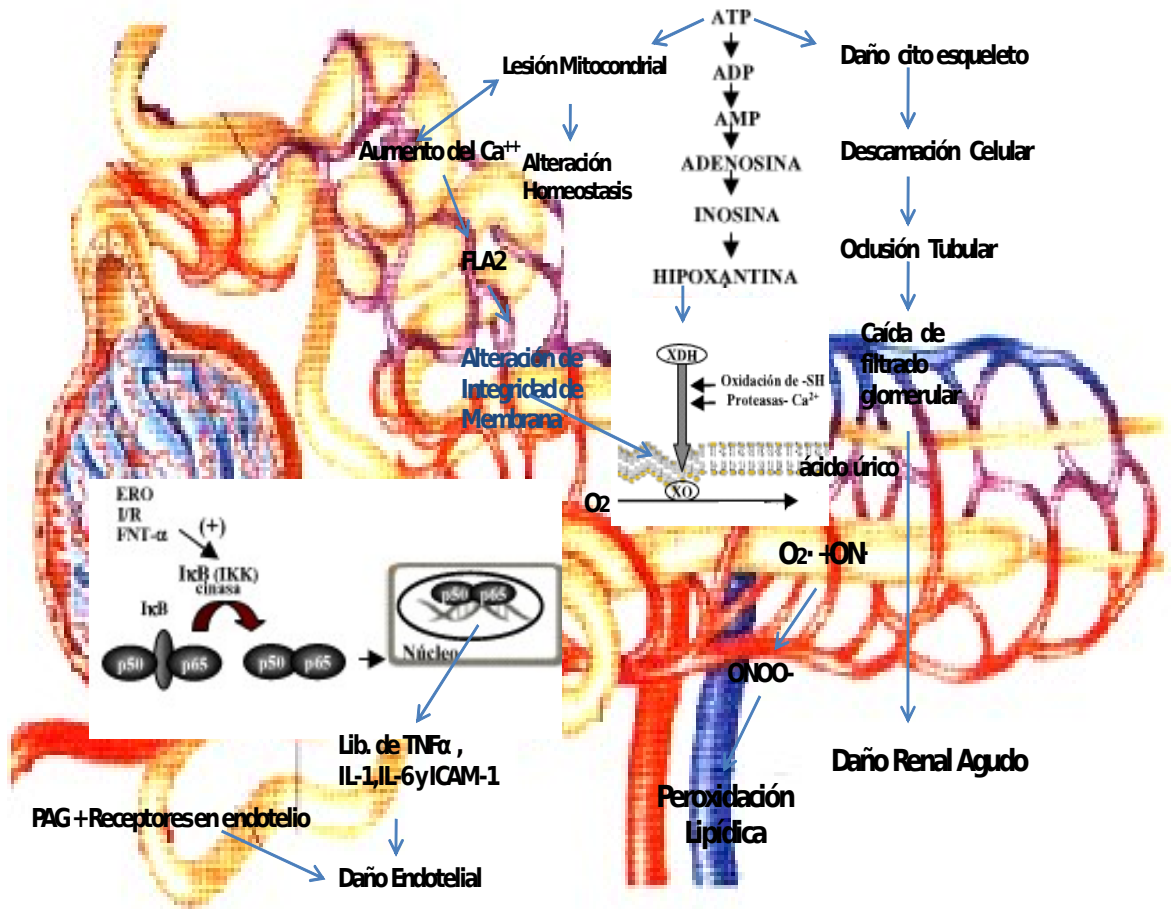
En el daño renal causado por la reperfusión se reportan alrededor de cuatro mecanismos involucrados en ella, estos son: 1- Disminución del fosfato de alta energía, el cual es originado por el desbalance entre la reposición y el consumo de ATP, ya que durante la reperfusión se dañan los complejos I y III de la cadena transportadora de electrones provocando afectación en la fosforilación oxidativa y apertura transitoria del poro de transición mitocondrial (TPM), activándose de esta forma la apoptosis en el tejido renal postisquémico (Kirton *et al.*, **1999**). 2- Producción de radicales libres liberados por neutrófilos y mastocitos activados, provocando la peroxidación de las membranas lipídicas, desnaturalización de enzimas y disfunción de organelos. 3- Inadecuada reperfusión tisular, también

conocida como el síndrome de no reflujo, en el cual el tejido isquémico no logra alcanzar los niveles de flujo existentes antes de someterse a la isquemia.

Se plantea que este fenómeno puede ser ocasionado por trombosis microvascular, daño endotelial o tapones leucocitarios y/o plaquetarios. 4- Sobrecarga de Ca^{++} , la cual es secundaria al deterioro de la actividad del retículo sarcoplásmico. (Dirnagl *et al.*, **1999**; Lipton, **1999**; Grace, **1994**; Jounberg, **1999**).

En la **Figura 1** se muestran los eventos fundamentales asociados al daño por I/R renal, donde se evidencia la diversidad de mediadores involucrados en dicho proceso.

Figura 1. Eventos moleculares asociados a la fisiopatología de la I/R.



Brenner *et al.*, 2000.

1.2. Mediadores del daño por I/R renal.

En el daño provocado por I/R renal se reporta el desequilibrio que ocurre en el sistema XDH/XOD, a consecuencia de la falta de oxígeno y el agotamiento energético. En condiciones fisiológicas, la XDH es enzima dependiente del cofactor NAD^+ y en esta forma es incapaz de producir ERO. Sin embargo, durante la isquemia por oxidación de los grupos sulfhidrilos o por acción de una proteasa dependiente de Ca^{++} , la XDH se convierte en XOD. Esta conversión, sobre todo durante la reperfusión, conlleva a la producción del radical $\text{O}_2^{\cdot-}$, promoviéndose de esta forma el daño celular por un ataque radicalario. El exceso de $\text{O}_2^{\cdot-}$ en presencia de H_2O_2 conlleva a la formación de un radical más potente, el radical hidroxilo (HO^{\cdot}) (Hamer *et al.*, 1995)□.

Un mediador de la I/R renal es la endotelina (ET-1), potente vasoconstrictor y que además provoca daño tubular. (Brenner, 2000). Es reportado que la vasoconstricción intrarrenal en el periodo postisquémico es atenuada por el empleo de anticuerpo contra la ET-1 (Brenner, 2000), estudio que demuestra el papel de la ET-1 en la alteración de la hemodinámica intrarrenal a la hora de la reoxigenación.

Importante es comentar que la I/R se caracteriza, entre otros aspectos, por el daño endotelial y este se convierte en el precursor del desbalance entre la ET-1 y el ON^{\cdot} (vasodilatador por excelencia de la musculatura lisa vascular). Es bien estudiado que durante la I/R se produce un decremento del ON^{\cdot} debido a que la isquemia

provoca por si sola disminución de la actividad de la enzima óxido nítrico sintasa constitutiva a nivel de células endoteliales renales (Brenner, **2000**). De esta forma tambien se comienzan a dañar los mecanismos de autorregulación del flujo sanguíneo (Brenner, **2000**).

Otro mediador importante de la I/R renal es el calcio (Ca^{++}). Cuando los niveles de Ca^{++} libres en el citosol exceden los 500 nM, estos son capaces de dañar la mitocondria, activar proteasas y activar fosfolipasas. Se ha demostrado que el Ca^{+} es capaz de activar fosfolipasas dependiente de calcio con la consecuente liberación de ácidos grasos libres tóxicos, los cuales son capaces de desacoplar la fosforilación oxidativa contribuyendo al fallo energético celular (Brenner, **2000**). Otros aspectos importantes que contribuyen al deterioro tisular durante la I/R son: el trastorno en el metabolismo del ácido araquidónico y la activación de fosfolipasas. El ácido araquidónico se encuentra formando parte de la estructura de los fosfolípidos de membrana, esterificado a la posición Sn-2 (Campanioni *et al.*, **1995**). Se reporta que la concentración del ácido araquidónico libre es muy baja (10^{-6} Molar), de manera que el primer paso en su metabolismo consiste en su liberación de los fosfolípidos de membrana, catalizado por la fosfolipasa A_2 (Campanioni *et al.*, **1995**). Esta reacción enzimática se estimula en estados fisiológicos (estímulos hormonales: angiotensina, bradiquinina, epinefrina) o en estados patológicos (daño mecánico, isquemia, veneno, calcio, etc) (Campanioni *et al* **1995**).

Actualmente se reporta un mecanismo que conlleva a la peroxidación no enzimática del ácido araquidónico. Este mecanismo es por acción de las ERO, dando lugar a la formación de isoprostanos los que se comportan como agentes quimiotácticos, atrayendo células inflamatorias al tejido lesionado, lo cual conlleva a la disfunción del órgano sometido a insulto isquémico (Brenner, **2000**). En experimentos en los cuales se produce la isquemia por oclusión de la arteria coronaria en animales de laboratorio, el metabolismo del ácido araquidónico se incrementa con abundante producción de leucotrienos, prostaglandina y tromboxano, contribuyendo de esta forma al deterioro del miocardio (Campanioni *et al.*, **1995**). Por lo que esto refleja una vez más el papel que tiene el metabolismo del ácido araquidónico en el tejido sometido a daño, como la I/R y su relación con las ERO.

Los derivados del ácido araquidónico son compuestos biológicos muy activos; las prostaglandinas y tromboxanos son considerados hormonas locales que ejercen su acción en el lugar donde se sintetizan. Muchos de estos metabolitos están involucrados en procesos inflamatorios como la I/R. Por ejemplo, los leucotrienos (LTB₄, C₄, D₄) provocan agregación de polimorfonucleares, inducen la adhesión de leucocitos a células endoteliales y son potentes constrictores de la musculatura lisa vascular (Campanioni *et al.*, **1995**), estas razones muestran el papel de los derivados del ácido araquidónico en la cascada de eventos moleculares que contribuyen al deterioro tisular en los órganos sometidos a la I/R

La activación de fosfolipasas también juega un papel importante en los eventos moleculares que ocurren durante la I/R renal (Weinberg, **1991**). Esta activación, durante la I/R renal, provoca alteración en la composición y propiedades funcionales de la bicapa lipídica de membranas plasmáticas y a nivel de membranas presentes en los organelos membranosos intracelulares (mitocondrias, etc). Este hecho ha sido estudiado en diferentes órganos como corazón, intestino, hígado y riñón. (Brenner, **2000**). El daño celular isquémico se caracteriza por la activación de diferentes tipos de fosfolipasas (Brenner, **2000**). Por ejemplo, el incremento del diacilglicerol y del ácido fosfatídico es compatible con la activación de las fosfolipasas C y D, mientras que el incremento de los lisofosfolípidos en el tejido renal después de la isquemia es compatible con la activación de la fosfolipasa A₂ (FLA₂). En la actualidad se reporta la actividad de una isoforma, la FLA₂ Ca⁺⁺ independiente, a nivel de los túbulos proximales. Su activación juega un papel fundamental en la patogénesis del daño hipóxico a nivel del túbulo proximal (Portilla *et al.*, **1994**).

Otros agentes mediadores de la I/R, que ocasionan daño al tejido renal postisquémico, son los productos avanzados de la glicosilación de proteínas (PAG) (Barber *et al.*, **1999**). Estos productos son compuestos inestables que durante la I/R se depositan en las paredes de los vasos sanguíneos generando una lesión que evolutivamente culmina con el daño endotelial (Thornalley *et al.*, **1998**). Se han demostrado receptores específicos para los productos terminales

de la glicosilación avanzada de proteínas, éstos se encuentran localizados en macrófagos, células mesangiales y células endoteliales, entre otros (Stitt *et al.*, **2002**). Cuando los PAG interactúan con sus receptores a nivel celular se disparan mecanismos secretores de interleucinas pro inflamatorias (TNF α ., IL-1, IL-6, PDGF) y mecanismos productores de ERO, afectando al tejido renal postisquémico (Stitt *et al.*, **2002**). En párrafos anteriores se comentó el papel de las ERO en los sistemas biológicos, pero estas también juegan un papel como mediadores en eventos moleculares que ocasionan daño celular en la I/R renal (Hui Chen *et al.*, **2008**). En el caso del riñón, el aumento de las ERO por encima del sistema antioxidante (estrés oxidativo de carácter crónico) representa un punto de convergencia del mecanismo de daño renal provocado por I/R y nefropatías resultantes de muy diversas etiologías (Hahn *et al.*, **1998**). Es por ello que se reporta que la injuria que puede sufrir el riñón expuesto a isquemia se asocia a un predominio prooxidante respecto a las defensas antioxidantes (Klahr, **1997**). Los lípidos de las membranas de las células renales, durante la I/R, son el blanco frecuente del ataque de las ERO y genera su peroxidación. Esta lipoperoxidación compromete la integridad de la membrana basal y también al epitelio de los túbulos renales y afecta grandemente las funciones de transporte realizada por los túbulos renales (Gwinner *et al.*, **1998**).

Se reporta que del sistema antioxidante enzimático, las enzimas SOD, CAT y GSH-Px son las enzimas que representan la mayor defensa contra las ERO dentro de la célula del túbulo proximal, el cual es el segmento más sensible al daño en la I/R renal (Molitoris *et al.*, **1993**).

Durante la injuria oxidativa que se crea durante la I/R renal se ven afectadas diferentes partes de la nefrona. Por ejemplo, en el glomérulo las ERO son capaces de alterar la estructura glomerular, debido a su efecto sobre las células del mesangio y células endoteliales (Klahr *et al.*, **1997**). El glomérulo es considerado una estructura sensible al daño por ERO. Se reporta que la administración de alfa tocoferol brinda un efecto protector a nivel glomerular, en un modelo de ratas nefrectomizadas (Hahn *et al.*, **1998**).

El estrés oxidativo tiene un papel importante en el deterioro renal inducido por hiperlipoproteinemia, debido a la acumulación en el glomérulo de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) oxidadas, llevando a la disfunción endotelial a nivel de los capilares glomerulares, con deterioro de la función glomerular (Lee *et al.*, **1998**). Se ha estudiado que la oxidación de las LDL por las células del mesangio podría constituir un punto de activación para la apoptosis en células endoteliales y mesangiales. Esto lo reflejó una investigación realizada *in vitro* en células mesangiales y endoteliales humanas. En este estudio también se comprobó el efecto protector de los antioxidantes retardando la apoptosis en dichas células (Galle *et al.*, **1999**). Este estudio es importante ya que refleja el papel del uso de antioxidantes como protectores del endotelio frente a las ERO.

Sharma en el año 2000, mostró que las ERO inducían la producción de citocinas en las células glomerulares, comprobado a través de la producción del factor

transformador del crecimiento beta (TGF- β), el cual medió el incremento de la permeabilidad de la barrera glomerular a la albúmina. (Sharma *et al.*, **2000**).

Moreno y colaboradores mostraron la participación del radical $O_2^{\cdot-}$ en la apoptosis de las células glomerulares inducida por el factor de necrosis tumoral alfa (TNF - α). (Moreno *et al.*, **2000**).

De lo comentado anteriormente se extrae claramente que las ERO están involucradas en la fisiopatología de las lesiones glomerulares de carácter inflamatorio como el producido por la I/R. Por otra parte se ha visto que las células mesangiales pueden ser activadas por el radical $O_2^{\cdot-}$ (Sandau *et al.*, **1997**).

Durante la I/R las células de los túbulos renales, al igual que los glomérulos, se hacen sensibles al ataque de las ERO. Se reporta que un ambiente oxidativo a nivel de los túbulos renales es capaz de activar a la hemoxygenasa, enzima que cataliza la degradación del grupo hemo de la hemoglobina y mioglobina (Barrouillet *et al.*, **1999**). Como producto de esta reacción se libera hierro, el cual puede acelerar la formación de radicales HO^{\cdot} y lesionar el epitelio tubular.

Este efecto citotóxico es atenuado por la administración de depuradores de radicales HO^{\cdot} (Agarwal *et al.*, **2001**).

Se reporta que la inhibición del factor transcripcional NF- $\kappa\beta$, mediada por el uso de quercetina, se asoció a una disminución a nivel transcripcional de interleucinas proinflamatorias (IL-1, TNF α) en las células del túbulo proximal. Este mismo efecto se reportó con la administración de antioxidantes que inhibieron la respuesta vía

NF- κ B en el epitelio tubular, comprobándose una vez más la activación de factores transcripcionales para la síntesis de citocinas proinflamatorias inducida por ERO a nivel tubular (Ou *et al.*, **1999**).

Otro aspecto importante en la cascada de eventos moleculares en la I/R renal es la activación de las moléculas de adhesión intercelular provocada por las interleucinas proinflamatorias (IL-1, IL-6, TNF α) (Brady, **1994**). Se reportan que las interleucinas proinflamatorias inducen la expresión de moléculas de adhesión intercelular (ICAM-1) (Brady, **1994**). Durante la I/R se produce un aumento de las ICAM, las cuales facilitan la unión de monocitos a células endoteliales provocando obliteración de capilares, potenciándose este efecto en tejido renal postisquémico (Brady, **1994**). Se ha referido, que en la I/R las citocinas proinflamatorias activan al NF- κ B promoviendo el aumento del ARN mensajero para la síntesis de la ICAM-1, aumentándose su expresión en tejido renal postisquémico con el consecuente daño endotelial (Brady, **1994**). Se han utilizado inhibidores de las ICAM-1 (anticuerpos monoclonales contra β 2 integrina e ICAM-1), con buenos resultados en órganos sometidos a I/R. (Brady, **1994**)

Es de destacar que existe una relación estrecha entre la producción de ERO durante la I/R y la disfunción endotelial (Boventre-Weinberg, **2003**). En investigaciones recientes se reporta que el incremento de ERO se asocia con la proliferación de células musculares lisas del endotelio vascular, lo cual provoca el desarrollo de la hipertensión, en modelos experimentales y también se ha

corroborado este hallazgo en estudios con humanos (Castillo *et al.*, **2003**; Berry *et al.*, **2000**).

Las ERO ejercen importantes efectos en la regulación de las funciones vasculares (Berry *et al.*, **2000**).

El ON^{\bullet} tiene una vida media corta e interactúa eficientemente con los grupos sulfhidrilos de proteínas y con las ERO. El incremento vascular del radical $\text{O}_2^{\bullet-}$ provoca la reducción en la biodisponibilidad del ON^{\bullet} e impide la relajación del endotelio (Evelson *et al.*, **2001**).

Se reporta el papel de la angiotensina II (Ang II) en la I/R renal (Hannken *et al.*, **1998**). La Ang II media la activación de la nicotin adenin disfosfato oxidasa (NADPH oxidasa) unida a membrana. Esto provoca la generación de altos niveles de $\text{O}_2^{\bullet-}$, provocando una peroxidación lipídica a nivel de las células del epitelio tubular (Kinter, **1999**).

1.3. Las Especies Reactivas de Oxígeno en los sistemas biológicos.

Los primeros organismos que aparecieron en la tierra eran anaeróbicos, ya que vivían en una atmósfera que contenía poco oxígeno. Estos organismos sobrevivieron hasta nuestros días, pero su crecimiento es inhibido y con frecuencia pueden ser eliminados con exposiciones a un 21 % de O_2 , o sea a un nivel atmosférico normal. Mientras el contenido de O_2 de la atmósfera se incrementó, debido a la evolución de los organismos con capacidad fotosintética

de provocar ruptura del agua, probablemente muchos de estos organismos anaeróbicos primitivos murieron.

Con el proceso evolutivo aparecieron otros organismos los cuales comenzaron a desarrollar sistemas de defensas antioxidantes para protegerse de la toxicidad del oxígeno. Esto constituyó un gran salto evolutivo, ya que estos organismos que soportaban la presencia del oxígeno podían utilizarlo para transformaciones metabólicas (involucrando enzimas como las oxidasas y oxigenasas) y para la producción eficiente de energía. A altas concentraciones, los efectos dañinos del oxígeno en los organismos aerobios varían considerablemente de acuerdo al organismo estudiado, la edad, el estado fisiológico y la dieta, siendo afectados diferentes tejidos en disímiles formas. En 1954, ciertos autores propusieron que los efectos dañinos del O₂ podrían ser atribuidos a la formación de radicales del propio O₂. (Gerschman *et al.*, **1954**)

Un hallazgo trascendental fue el descubrimiento por McCord y Fridovich de la enzima superóxido dismutasa (SOD) en el año 1969, en un estudio en células eritrocitarias (McCord *et al.*, **1969**). A partir de esta fecha las ERO comenzaron a ser investigadas desde una perspectiva biológica. Ya a partir de las décadas del 70 y el 80 del siglo XX, bioquímicos y biólogos dedicados a la radiación se sintieron atraídos por el papel de las ERO como generadores de daño irreversible o modificadores de la estructura de moléculas biológicas.

Sin embargo en la década de los 90, las ERO fueron reconocidas por diferentes investigadores como mediadores claves en los procesos fisiológicos de

señalización celular. (Halliwell-Cross, **1994**). Esto hecho conllevó a la realización de varias investigaciones relacionadas con la asociación de las ERO con los procesos fisiológicos. (Yoshikawa *et al.*, **2000**).

Las diferentes vías relacionadas con la generación de ERO aparecen reflejadas en **Anexo1**.

Los sistemas antioxidantes endógenos se fueron desarrollando simultáneamente con la evolución de los organismos aerobios (Martínez *et al.*, **2004**). De esta forma se establecieron diferentes interacciones entre ambos sistemas: generadores y secuestradores de ERO, dirigidos a garantizar un equilibrio o estado redox celular basal, indispensable para el mantenimiento de la vida. En el **Anexo 2** se muestran las interacciones más importantes entre ambos sistemas y cómo la pérdida de este equilibrio repercute negativamente sobre diferentes biomoléculas esenciales.

1.4. Mecanismos protectores contra el daño por I/R renal.

1.4.1. El preconditionamiento isquémico.

Actualmente el descubrimiento de los mecanismos que caracterizan al conocido preconditionamiento isquémico, como terapia protectora celular endógena contra la I/R, ha constituido un peldaño superior en el conocimiento de nuevas vías naturales que pueden ayudar a las células a hacerse más resistentes ante el daño causado por la I/R (Yellon *et al.*, **2000**). Este preconditionamiento consiste en incrementar la resistencia al tejido contra la I/R. Este efecto se logra por la pre-

exposición a uno o más periodos breves de hipoxia seguidos por reoxigenación (Yellon *et al.*, **2000**).

El preconditionamiento isquémico fue descrito por primera vez por Murry en el miocardio (Murry *et al.*, **1986**), aunque en la actualidad se ha observado en otros tejidos (Yellon *et al.*, **2000**). En la literatura se plantea que este mecanismo de preconditionamiento se puede lograr en dos fases: la primera es la fase temprana (precondicionamiento temprano) que ocurre inmediatamente después de la hipoxia temporal y tiene una duración de dos a tres horas, este preconditionamiento temprano involucra la modulación directa de funciones celulares específicas (Cohen *et al.*, **2000**) y la fase tardía (precondicionamiento tardío), la cual comienza entre 12 y 24 h a partir de la isquemia transitoria y tiene una duración de aproximadamente cuatro días, esta involucra la activación de múltiples genes de respuesta al estrés, así como la síntesis de algunas proteínas (Bolli *et al.*, **2000**; Cohen, **2000**; Yellon, **2000**).

Se reporta que en experimentos a nivel del corazón sometido a I/R se ha encontrado la generación de metabolitos como adenosina, ON^{*}, bradiquinina, noradrenalina, los cuales han sido capaces de disparar el preconditionamiento isquémico (Schulz *et al.*, **2001**; Mubagwa *et al.*, **2001**). El estudio de este tipo de preconditionamiento indica que el mismo brinda a la célula un estado adaptativo contra condiciones que generen estrés subletales (Carini *et al.*, **2003**). Sin embargo, este preconditionamiento isquémico tiene sus limitantes, ya que es un proceder quirúrgico, siendo invasivo, tiene una extensión de solo 4 días, no se

tiene el total conocimiento de que el órgano sometido a breves periodo de isquemia soporte mejor la misma o incrementa adecuadamente la respuesta citoprotectora contra el daño por I/R.

1.4.2. El preconditionamiento renal farmacológico.

Al riñón, al igual que otros órganos sometidos al fenómeno de I/R, se le ha tratado de proteger contra el daño isquémico a través de diferentes métodos. A. Torres y colaboradores, demostraron los efectos nefroprotectores de la prostaglandina E₁ (PGE₁) contra la I/R renal. En este trabajo experimental se suministró PGE₁ a riñones de ratas que fueron sometidos a diferentes tiempos de isquemia (15 a 60 min) y diferentes tiempos de reperfusión (24 h a 7 d). La PGE₁, es un eicosanoide que proviene del ácido araquidónico, el cual se une a su receptor provocando un cambio del AMPc en la célula diana. Este efecto disminuye la liberación de enzimas lisosomales, reduce el calcio citosólico al inhibir la fosfolipasa C y sus metabolitos, inhibe la agregación plaquetaria y la infiltración de neutrófilos. Debido a estos efectos, estos autores mostraron que el preconditionamiento con PGE₁ reduce el daño renal así como la necrosis tubular aguda (NTA) provocada por I/R (Torres *et al.*, **2001**). Sin embargo, este preconditionamiento farmacológico tiene sus desventajas. Por ejemplo, su aplicación es intraarterial por lo que es invasiva, la obtención del compuesto es costosa ya que se requiere de un oligómero de glucosa para estabilizar a la PGE₁, además, se reporta que el efecto protector de la PGE₁ frente a la I/R se pierde a los 30 min de reperfusión (Torres *et al.*, **2001**).

Por otra parte investigadores como Lledó García y Rodríguez Martínez, reportaron el efecto beneficioso del sildenafil contra la I/R renal. Estos autores administraron el fármaco una hora antes del trasplante renal (en cerdos) y los tiempos de isquemia a los cuales fueron sometidos los riñones fueron de 45 y 60 min, respectivamente. Sildenafil puede intensificar la acción del GMP cíclico (GMPc), aumentar indirectamente la producción de ON^{*} y atenuar la disfunción endotelial. El mecanismo de acción de este fármaco implica la inhibición de la enzima fosfodiesterasa tipo 5 (PDE5), lo que resultaría en un aumento de la concentración de GMPc y en la relajación del músculo liso. Estos efectos permitieron a este fármaco ser beneficioso en la protección de riñones sometidos a I/R, preservando los niveles de óxido nítrico y mejorando las pruebas de función renal, pero actualmente tiene limitaciones en su uso. Se reporta que este fármaco protege hasta 45 min de isquemia, además, su efecto protector ha sido estudiado en solo 60 min de repercusión. En la práctica clínica se conoce que los tiempos de isquemia y de reperusión en varias ocasiones son superiores. Por otra parte, este fármaco carece de estudios sobre su posible efecto en riñones con isquemia normotérmica y posterior implante (Lledó *et al.*, **2008**).

Barber y colaboradores, reportaron por primera vez el PreOzo en riñones sometidos a 30 min de isquemia y 3 h de reperusión. En dicho estudio se observó que el ozono administrado por vía rectal, previno al daño isquémico y fue capaz de mantener el flujo sanguíneo renal y la intensidad de filtración glomerular a valores

de riñones sanos. Se demostró el efecto del PreOzo sobre niveles titulares de PAG (fructosamina) en riñones postisquémicos y se evidenció que fue capaz de reducir la actividad de la enzima FLA₂ en el propio tejido renal lesionado. También se observó el incremento de la actividad de la SOD en el tejido renal preconditionado con ozono. Con este primer trabajo, estos autores mostraron el papel beneficioso del PreOzo en la preservación de la función y estructura renal en riñones sometidos a I/R, pero este trabajo presentó sus limitantes. En primer lugar el tiempo de isquemia renal fue de solo 30 min, en segundo lugar se aplicó un solo nivel de dosis y en tercer lugar no se estudió el papel del PreOzo sobre otras variables del estrés oxidativo (Barber *et al.*, **1999**).

Hui Chen y colaboradores, mostraron algunos de los mecanismos asociados a los efectos de la ozonoterapia en la prevención del daño renal durante el fenómeno de I/R. El PreOzo fue capaz de inhibir la inflamación y la apoptosis en riñones de ratas sometidos a isquemia de 45 min y 24 h de reperusión. En este trabajo se reflejó el efecto del PreOzo sobre marcadores de la inflamación y la apoptosis, mediado dicho efecto por la inhibición de la actividad de la caspasa, así como por la reducción de la peroxidación lipídica. Además, se reportó el efecto del PreOzo en la reducción de los niveles del RNA mensajero para las interleucinas proinflamatorias (TNF α e IL-1). Este efecto fue logrado a una dosis de ozono de 1 mg/kg, durante 10 sesiones, aplicado por la vía rectal antes del daño isquémico (Hui Chen *et al.*, **2008**). Este trabajo esclareció muchas de las vías del PreOzo en la protección frente a la I/R renal, aunque el tiempo de isquemia fue de solo 45 min y se utilizó un solo nivel de dosis de PreOzo, con 15

sesiones de tratamiento con ozono previo al daño.

Existen otros trabajos que reportan acerca del PreOzo en el daño renal agudo. Borrego y colaboradores, mostraron en un modelo de nefrotoxicidad renal aguda mediada por cisplatino, que el PreOzo fue capaz de proteger al tejido renal contra el daño oxidativo que causa este fármaco sobre los riñones (Borrego *et al.*, 2004).

1.5. Estrategias empleadas en el manejo de la Insuficiencia Renal Aguda causada por I/R renal. Ventajas y desventajas frente al PreOzo.

En el orden clínico y preclínico los fenómenos de I/R renal son los protagónicos del fallo renal agudo, así que las estrategias empleadas para el manejo de la insuficiencia renal aguda (IRA) van encaminadas fundamentalmente a disminuir, por diferentes vías, los eventos moleculares que ocurren durante la I/R. Actualmente se han empleado diferentes fármacos, pero estos poseen limitaciones en su uso, como se ha señalado en párrafos anteriores. (**Tabla del Anexo 5**).

El manitol, diurético que se ha empleado como tratamiento profiláctico de la insuficiencia renal aguda, en el trasplante renal y en la rabiomiolisis masiva, su ventaja frente al PreOzo es que se ha reportado que su empleo disminuye la aparición de la NTA en humanos (Nakhoul *et al.*, 1995). En cuanto a sus desventajas, se conoce que el uso del manitol incrementa el consumo de oxígeno a nivel tubular renal en la IRA, no modifica la I.F.G, por lo que está en contra de

los mecanismos de preservación renal. Por otro lado, se conoce que a dosis elevadas puede causar vasoconstricción y fallo renal agudo con vacuolización de las células tubulares (nefrosis osmótica). Recientemente, se ha informado que la IRA puede ser provocada por el manitol cuando se utiliza asociado a inhibidores de la enzima convertasa (Nakhoul *et al.*, **1995**).

Otro fármaco perteneciente a los diuréticos empleados en el fallo renal agudo es la furosemida. En un principio se informó sobre el efecto beneficioso logrado por la utilización de la furosemida a dosis altas en el tratamiento del fallo renal agudo experimental, así como a nivel clínico. Respecto a las ventajas frente al PreOzo, se piensa que no posea ninguna, sin embargo, se estudió que este fármaco no tenía ningún efecto sobre los niveles de retención nitrogenada, ni modifica la tasa de mortalidad cuando la IRA se ha establecido, además el sobre uso de este fármaco incrementa el riesgo de la hipoperfusión renal y la hipovolemia (Solomon *et al.*, **1994**).

Se han empleado agentes vasoactivos como la dopamina, la cual es un agente vasopresor muy utilizado para mejorar la presión arterial en pacientes bajo estado de shock. La ventaja de su utilización frente al PreOzo es que se emplea en la fase oligúrica del paciente con IRA en estadios avanzados. Si presenta desventajas frente al PreOzo; pues su uso promueve la aparición de arritmias e incrementa el consumo de O₂ por el miocardio. En la actualidad no se reportan estudios del empleo de la dopamina como proceder terapéutico preventivo contra la IRA por I/R (Myles *etal.*, **1993**).

Se han empleado también fármacos bloqueadores del Ca^{++} (BCC). En el riñón, el aumento del Ca^{++} citosólico en las células musculares lisas y mesangiales altera la función renal y produce vasoconstricción arteriolar, provocando a nivel del glomérulo una disminución del coeficiente de filtración (kf), resultando en una caída de la I.F.G. Se reporta en muchos trabajos, la eficacia de las sustancias bloqueadoras de canales de Ca^{++} en preservar el flujo sanguíneo renal (F.S.R) en los estados preisquémicos y en atenuar la vasoconstricción de la arteriola aferente inducida por agentes vasoconstrictores potentes, como la ET-1, la norepinefrina, la All y los agentes de radio contraste. Se piensa que su ventaja frente al PreOzo es que se han utilizado los BCC en pacientes con nefropatías diabética e hipertensiva que desarrollan IRA. Sin embargo, cuando los BCC son administrados en períodos postisquémicos sus efectos son menos efectivos, además son fármacos costosos y no existen experiencias preclínicas ni clínicas de su uso en la prevención de la IRA por I/R (Ladefoget *et al.*, **1994**).

Otra sustancia empleada en el fallo renal agudo de causa isquémica es el péptido natriurético atrial (PNA). Existen estudios que reportan que el PNA disminuye la severidad del daño renal en riñones isquémicos y acelera la recuperación en el tejido renal sometido a I/R. Su ventaja frente al PreOzo es que su efectividad ha sido mostrada antes, durante y después de la injuria renal aguda. En cuanto a la desventaja de este fármaco frente al PreOzo es que puede presentar como efectos adversos la hiponatremia y la hipotensión (Pollock *et al.*, **1992**).

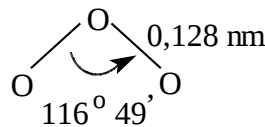
Se reporta el uso de factores de crecimiento para preservar al tejido renal durante la I/R. Se han utilizado estos factores de crecimiento en modelos de IRA vía I/R, comprobándose los efectos de algunos factores de crecimiento en la recuperación del tejido renal postisquémico. Se ha estudiado que el uso de factor de crecimiento alfa transformante (TGF_{β}) en la etapa temprana postisquémica acelera la recuperación del túbulo renal. Este factor de crecimiento tiene sus limitantes, ya que en el daño renal crónico se relaciona con el desarrollo de la glomeruloesclerosis. Además, en la clínica estos factores de crecimiento no se han utilizado; otra desventaja es que su aplicación, para atenuar el daño renal isquémico, es por vía parenteral y que también el uso de estos factores es altamente costoso (Miller *et al.*, **1992**).

Otra sustancia empleada como estrategia contra el daño oxidativo durante la I/R es la n-acetil cisteína, ya que actúa como un vasodilatador aumentando y prolongando la formación del óxido nítrico y reduce la formación de radicales libres. Sin embargo, carece de estudios que demuestren sus efectos nefroprotectores en la prevención del insulto renal en la I/R (Doberenz *et al.*, **2005**).

Otra estrategia que se reporta contra la I/R es la terapia de genes desarrollada hasta ahora a nivel experimental. Todavía este tipo de terapia requiere más estudio para que pueda llegar a su total aplicación en la práctica médica (Selzner *et al.*, **2003**).

1.6. Ozonoterapia como herramienta terapéutica. Generalidades.

El ozono es una de las dos formas alotrópicas del oxígeno, compuesto por tres átomos del mismo. El ozono a elevadas concentraciones toma un color azul y tiene la característica de tener un olor peculiar. Los átomos de oxígeno que componen la molécula de ozono se enlazan entre sí formando un ángulo de $116^{\circ} 49' \pm 35'$ con una distancia de enlace ($0,128 \pm 0,003$ nm) intermedia entre el correspondiente a un simple enlace O-O ($0,149$ nm) y a un doble enlace O=O ($0,121$ nm), lo que le proporciona un marcado carácter de doble enlace (80 %). (Viebahn, **1994**; Bocci, **1994**):



La molécula de ozono es inestable, se descompone espontáneamente en oxígeno con una constante de velocidad del orden de 10^{-4} s^{-1} y ocurre con desprendimiento de energía. La historia relata que alrededor de 1785 el físico alemán Van Marum (1750-1837) se percató del peculiar olor que se generaba en zonas cercanas a máquinas que funcionaban con electricidad. Sin embargo, fue Christian Friedrich Schönbein (1799-1868) quien en 1840 descubrió al ozono y le dio el nombre que hoy posee. Ozono es una palabra que viene del griego "ozein" que significa oloroso (Bocci, **1994**).

El primer equipo generador de ozono fue desarrollado por el ingeniero e inventor Werner Von Siemens en el año 1857. Con este primer equipo generador de ozono, el investigador Kleinman, realizó los primeros ensayos bacteriológicos sobre gérmenes patógenos y la primera insuflación de este gas, estudiando además, la influencia del ozono sobre las mucosas de humanos y animales (Viebahn, **1994**; Bocci, **1994**).

En 1872, Sir Benjamin Collins Brodie (1817-1880) dio a conocer la naturaleza química del ozono y posteriormente, en 1873, Fox descubrió la capacidad de eliminación de los microorganismos por este agente químico. Muchas décadas de silencio pasaron desde su descubrimiento hasta que durante la Primera Guerra Mundial, el ozono fue utilizado por primera vez por Albert Wolf, con fines terapéuticos, para la curación de heridas y fístulas. Wolf también empleó el ozono atendiendo a sus propiedades desodorantes durante el examen a pacientes con cáncer rectal y ginecológico (Hórvath y col.; 1985). Posteriormente, la no disponibilidad de materiales adecuados para las aplicaciones del gas, el descubrimiento de nuevas drogas antibióticas (sulfonamidas y penicilinas) y cierto escepticismo que siempre ha estado asociado a las aplicaciones del ozono en el campo de la medicina, repercutieron de forma negativa en el desarrollo y aplicación de este proceder. A finales de la década del 50 con la introducción de los materiales plásticos y el diseño del primer ozonizador con fines terapéuticos,

por el Dr. Joachim Hänsler en Alemania, se abrieron nuevos caminos para la aplicación y extensión de la ozonoterapia (Viebahn, **1994**).

La ozonoterapia se ha extendido a países como Austria, Suiza, Francia, Japón, Estados Unidos, Italia, España, Rusia, México, India, Egipto y otros. Actualmente existen sociedades nacionales de ozonoterapia en muchos países que permanecen afiliadas a la Asociación Internacional del Ozono. A pesar de esto, la ozonoterapia continúa provocando controversia y dudas, motivadas por el hecho de que el ozono es uno de los peores contaminantes ambientales y el tercer oxidante más poderoso que se puede encontrar en la naturaleza. Hay suficiente investigación sobre las bases biológicas de la ozonoterapia que ha permitido la utilización en gran número de países y se sigue ampliando cada vez más. Aunque sabemos que todo lo referente a los mecanismos biológicos de la ozonoterapia no está del todo estudiado, esto es un verdadero reto para las investigaciones de hoy, por lo que resulta importante continuar investigando y profundizando en los conocimientos para dilucidar los aspectos que aún quedan referentes a los efectos beneficiosos de la ozonoterapia.

1.6.1. Mecanismos biológicos asociados a la eficacia de la Ozonoterapia.

La solubilidad del ozono en agua es 10 veces mayor que la del oxígeno (Viebahn, **1994**). Cuando el ozono se disuelve en el plasma se descompone rápidamente al reaccionar con las biomoléculas, originando especies reactivas del oxígeno (ERO), entre las que se encuentran los aldehídos (4 hidroxialquenal), peróxido de hidrógeno, ozónidos e hidroxihidroperóxidos, entre otros, las cuales son altamente

inestables. Esta cascada de ERO, generada por la reacción del ozono con las biomoléculas, originan efectos sobre las células y su metabolismo (Giamalva *et al.*, **1985**; Berté *et al.*, **1990**; Cross *et al.*, **1992**; O'Neill *et al.*, **1993**; Pryor, **1994**; Viebahn, **1994**). Se reporta que los mecanismos de acción de este agente están relacionados con la generación de productos secundarios (Gabrielson *et al.*, **1994**), a partir de una interacción selectiva con los dobles enlaces carbono-carbono (C=C) de los compuestos orgánicos presentes en el plasma y membranas celulares.

El gran poder oxidante del ozono le permite reaccionar con casi todas las biomoléculas. Dentro de los constituyentes orgánicos que más reaccionan con el ozono se encuentran los ácidos grasos polinsaturados (AGPI) presentes en los fosfolípidos y triacilglicéridos, las vitaminas antioxidantes (alfa tocoferol y el ascorbato), los grupos sulfhidrilo, los enlaces bisulfuro, los aminoácidos de las proteínas. El compuesto con mayor velocidad de reacción con el ozono es la cisteína, seguida por los ácidos grasos poliinsaturados, la metionina, el triptófano, la tirosina, el ácido 3-hexanoico y la histidina. Los nucleótidos aunque en menor grado con respecto a los compuestos anteriormente mencionados, también pueden reaccionar con el ozono (Gabrielson *et al.*, **1994**; Pryor *et al.*, **1994**).

Los ácidos grasos insaturados se encuentran en un porcentaje elevado en los fluidos y estructuras celulares del organismo. La reacción del ozono con ellos genera peróxidos orgánicos, ozónidos y aldehídos como el 4 hidroxialquenal (Pryor, **1994**), los cuales en cantidades adecuadas y controladas ejercen

diferentes acciones biológicas, que le confieren al ozono una serie de propiedades terapéuticas (Lettieri *et al.*, **1991**; Luongo *et al.*, **1991**; Carpendale *et al.*, **1993**, **1993a**; Romero *et al.*, **1993**, **1993a**; Bocci, **1994**, **1994a**; Viebahn, **1994**; Basabe *et al.*, **1995**; Menéndez *et al.*, **1995**).

Se reporta que la acción del ozono sobre las células sanguíneas va más allá de su reacción con componentes de la membrana; sino que también la ozonoterapia es capaz de activar el metabolismo del eritrocito, haciéndolo más flexible. También actúa sobre monocitos y linfocitos, provocando en ellos una activación, la cual hace que estas células comiencen a liberar sustancias bioactivas tales como: citocinas (McKinney *et al.*, **1998**), factores de crecimiento, compuestos como el ATP y posiblemente eicosanoides (Bocci, **1994a**). En este proceso se involucran varios mecanismos celulares (Bocci, **2002**).

Entre las propiedades más relevantes del ozono tenemos su poder germicida, su efecto beneficioso sobre la circulación sanguínea y su efecto sobre la hemorreología de los eritrocitos. Respecto a su poder germicida, al reaccionar el ozono con los ácidos grasos insaturados de la capa fosfolipídica de la membrana de los eritrocitos da lugar a una serie de peróxidos de cadena corta y de carácter hidrofílico. La célula infectada produce como función defensiva peróxido de hidrógeno, de forma tal que no soportaría más peróxidos formados y se destruiría, o los nuevos peróxidos formados introducen un efecto sinérgico destruyendo a los microorganismos que han penetrado en la célula. Se ha demostrado que cuando se expone la sangre humana a dosis terapéuticas de

O₃ (10 a 80 µg/mL) se activan vías metabólicas que favorecen la formación del 2,3 difosfoglicerato (2.3 DPG), el cual favorece la liberación de oxígeno a los tejidos y mejora la reología de los eritrocitos (Hernández, **1993**).

El efecto sobre la hemorreología de los eritrocitos se obtiene con una infusión intravascular a concentraciones pequeñas. En estas condiciones la ozonoterapia actúa sobre el eritrocito haciéndolo más elástico, de manera que se deforma más fácilmente, lo cual le permite oxigenar mejor el tejido (Bocci, **1994a**). En este sentido se reporta que los compuestos formados por la reacción de la ozonoterapia con las biomoléculas, en el eritrocito, potencia la actividad antioxidante. Esto tiene un efecto positivo en el aumento en el consumo de glucosa por dicha célula, por lo que trae como consecuencia un incremento en la vía glicolítica, paralelo al incremento de la actividad de la glucosa 6 fosfato deshidrogenasa (G6PDH). Todo ello trae como resultado un mayor aporte de NADPH, por lo que mejora el metabolismo eritrocitario y se incrementa los niveles de ATP, favoreciendo el funcionamiento de ATPasas, como la ATPasa Na/K. Al mejorar el funcionamiento de esta bomba, permite un mejor mantenimiento del potencial de membrana en reposo (PMR), confiriéndole al eritrocito una mejor flexibilidad y una mayor calidad (Bocci, **2002**).

De igual forma se han evidenciado sus acciones como inductor de monocitos y linfocitos T, provocando la liberación de Interferón (INF), Interleucinas (ILS), Factor de Necrosis Tumoral (TNFα) y Factor Estimulante de Colonias (FES),

comprobándose la presencia de estos mediadores en circulación sistémica (Bocci, **2002**).

Se ha demostrado que la eficacia de la ozonoterapia está mediada, por la capacidad del ozono de estimular los sistemas antioxidantes endógenos. Este mecanismo fue denominado Precondicionamiento Oxidativo por Ozono (PreOzo), (León *et al.*, **1998**; Zamora *et al.*, **2005**) y se fundamenta en las propiedades oxidantes del ozono el cual, al ser administrado a dosis y número de tratamientos controlados, origina un estrés oxidativo transitorio y controlado que estimula estos sistemas antioxidantes. Este mecanismo fue invocado en analogía al reconocido mecanismo de Precondicionamiento Isquémico enunciado por el investigador Murry en el año 1986 (Murry *et al.*, **1986**), el que refiere que la aplicación de cortos períodos de I/R protegen el miocardio contra una I/R sostenida, como aquellas que se originan en entidades nosológicas como el infarto del miocardio y en los trasplantes de órganos. La veracidad de este mecanismo cardioprotector ha sido demostrada en estudios experimentales y en la práctica clínica (Frank *et al.*, **1993**; Cochrane, **1999**).

Otras investigaciones han revelado la eficacia del PreOzo en modelos experimentales donde se reproducen enfermedades en las cuales el deterioro de órganos es inducido por la alta generación de ERO no controladas (Barber *et al.*, **1999**; Al-Dalain *et al.*, **2001**; Candelario-Jalil *et al.*, **2001**).

En la actualidad existen diferentes estrategias contra la I/R, pero muchas de estas están en estudio o en fase de ensayos clínico, por lo que su uso es limitado en el orden médico práctico. Por tanto persiste la necesidad de buscar herramientas terapéuticas capaces de preservar al riñón sin efectos colaterales durante la I/R presente en varias situaciones clínicas.

2. MATERIALES Y METODOS.

2.1. Materiales.

2.1.1. Reactivos.

Los reactivos empleados para la determinación de creatinina fueron: el tungstato de sodio 10%, el ácido sulfúrico al 0.2 N, el reactivo desproteinizador de ácido tungstico y la solución estándar de creatinina, todos ellos se obtuvieron de los laboratorios Sigma (St. Louis, MO). Para la determinación del ácido para-amino-hipúrico (PAH) y la inulina se emplearon la solución de ácido clorhídrico (HCl 1.2 N), la solución de nitrato de sodio (NO_2Na 100 mg/L), la solución de sulfamato de amonio a una concentración de 500 mg/L, la solución de diclorhidrato N (1-naftil) etilendiamino a una concentración de 100 mg/L, la solución estándar de PAH a una concentración de 1 mg/ml de una muestra secada de ácido -p-amino hipúrico (la sal sódica es higroscópica) y la solución de sulfato de cadmio, todos también de los laboratorios Sigma (St. Louis, MO). Otros juegos de reactivos procedieron de la Boehringer-Mannheim. El resto de los reactivos utilizados eran de calidad para análisis de los laboratorios Merck (Alemania) o BDH (U.K).

2.2 Métodos.

2.2.1. Administración del Ozono.

El ozono se administró por vía rectal y fue generado por un equipo OZOMED, fabricado en el Centro de Investigaciones del Ozono, ubicado en Ciudad de la Habana. El ozono se obtuvo a partir del oxígeno medicinal utilizándose inmediatamente después de ser generado; este constituyó alrededor del 3 % de la mezcla gaseosa ozono-oxígeno ($O_2 + O_3$). La concentración de ozono se determinó a través de un espectrofotómetro, a 254 nm (exactitud 0,002 a 1 D.O, repetibilidad 0,001 D.O y calibrado con un estándar interno).

La dosis de ozono se determinó multiplicando la concentración de ozono expresada en miligramos por litro (mg/L) por el volumen de la mezcla gaseosa $O_2 + O_3$. A partir del peso de los animales, se calculó la dosis de ozono en mg/kg según estudios anteriormente publicados (Barber *et al.*, **1999**; León *et al.*, **1998**; Peralta *et al.*, **2000**). En nuestro estudio, la dosis de ozono empleada en los diferentes grupos, se seleccionó sobre la base de la dosis utilizada en la práctica clínica y preclínica.

2.2.1a) Criterios de Selección de los niveles de dosis y esquema de Precondicionamiento con Ozono.

En este estudio se utilizaron tres niveles de dosis (0.3, 0.5 y 1.1mg/kg). En la literatura a nivel preclínico se han utilizado dosis de 1.1mg/kg (Ajamieh *et al.*, **2005**) de precondicionamiento con ozono frente al daño hepático por I/R obteniéndose buenos resultados en la protección del hígado a esta dosis y con un esquema de 15 sesiones por vía rectal previo al daño isquémico; en cuanto al riñón se ha empleado una dosis de 0.5mg/kg de precondicionamiento por vía rectal frente a isquemia de 30 minutos seguida de 3 horas de reperfusión (Barber *et al.*, **1999**) durante 15 sesiones; en el año 2008 en una investigación, se sometió a un tiempo de isquemia renal de 45 minutos con 24 horas de reperfusión empleándose una dosis de precondicionamiento con ozono por vía rectal de 1mg/kg durante 15 sesiones previo al daño isquémico (Hui Chen *et al.* , **2008**). En nuestro estudio se empleó tres niveles de dosis con el objetivo de conocer si el efecto nefroprotector del precondicionamiento con ozono en el caso de I/R renal se mantenía a dosis diferentes de las anteriormente reportadas, y a un tiempo de isquemia mayor (60 min), además en nuestro trabajo se estudió si el efecto nefroprotector del precondicionamiento con ozono se lograba a un número menor de sesiones (10 sesiones). Por otra parte se reporta en la literatura a nivel preclínico que las dosis de 0.7mg/kg y 1.1mg/kg en un modelo glomerulonefritis tóxica crónica experimental por Adriamicina (Calunga *et al.* , **2004**), incrementaron el daño renal, por lo que en nuestro estudio quisimos corroborar si en un modelo

de daño renal agudo como lo es la I/R, los niveles de dosis utilizadas, pudieran tener algún efecto tóxico sobre variable funcionales y estructura renal bajo nuestras condiciones experimentales.

2.2.2. Biomodelos.

Se emplearon Ratas Wistar hembras (n = 124) con un peso entre 220 - 250 gramos (g). Todos los animales procedían del Centro de Experimentación para Animales de Laboratorio (CENPALAB), ubicado en la Calzada de Bejucal en La Habana. Los animales fueron mantenidos 7 días, antes y durante el desarrollo del estudio, a una temperatura de 20 ± 2 °C, a una humedad relativa entre 50 - 70 % y a un ciclo de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad. Los animales en todos los casos tuvieron libre acceso a los alimentos (dieta estándar CENPALAB) y agua corriente. En nuestro trabajo, todos los procedimientos fueron realizados según lo aprobado por los Comités Internacionales para el cuidado de los animales, de acuerdo con las regulaciones ya establecidas para la experimentación animal (ICILAS, 2000).

2.2.3. Procedimiento quirúrgico para la I/R renal.

A cada rata, previamente pesadas, se les anestesió con pentobarbital sódico por vía intraperitoneal a la dosis de 30 mg/kg de peso corporal y se les administró 50 unidades internacionales (UI) de heparina por la misma vía. Posteriormente, se

realizó la laparotomía por incisión longitudinal en su línea media. Después se disecó y se expusieron los paquetes vasculares renales, aislándose ambas arterias renales en las cuales se colocaran las piezas de compresión y oclusión (clanes), provocando una isquemia durante 60 min. Luego fueron retirados los clanes, permitiendo la reperfusión de los riñones durante 3 h (180 min). Durante todo el proceso de I/R los animales fueron mantenidos bajo una fuente de luz y cubiertos con una gasa impregnada de solución salina, cambiándose este cada 15 minutos. La temperatura corporal del animal se observó mediante el uso de un termómetro clínico en la zona rectal, todo este proceder se realizó con el objetivo de evitar la hipotermia.

2.2.4. Proceder para la realización de los Aclaramientos Plasmáticos.

Todos los animales sin excepción, pasado el tiempo de reperfusión y previamente pesados, anestesiados y rasurados, fueron sometidos a una incisión inguinal oblicua en ambos miembros. Se disecó y canuló la vena femoral izquierda por donde se le administró 0,8 mL de una solución de PAH (12 mg/mL) e igual volumen de una solución de inulina (2 mg/mL), para alcanzar niveles plasmáticos adecuados de esas sustancias: Posteriormente, se disecó y canuló la arteria del lado contrario. Con la primera administración de los bolos se define el tiempo cero y se comienza a extraer 0,2 mL de sangre cada 10 min hasta completar 10 muestras. En todos los experimentos se incluyó un grupo control negativo, donde los animales de dicho grupo se les sometieron a anestesia, laparotomía

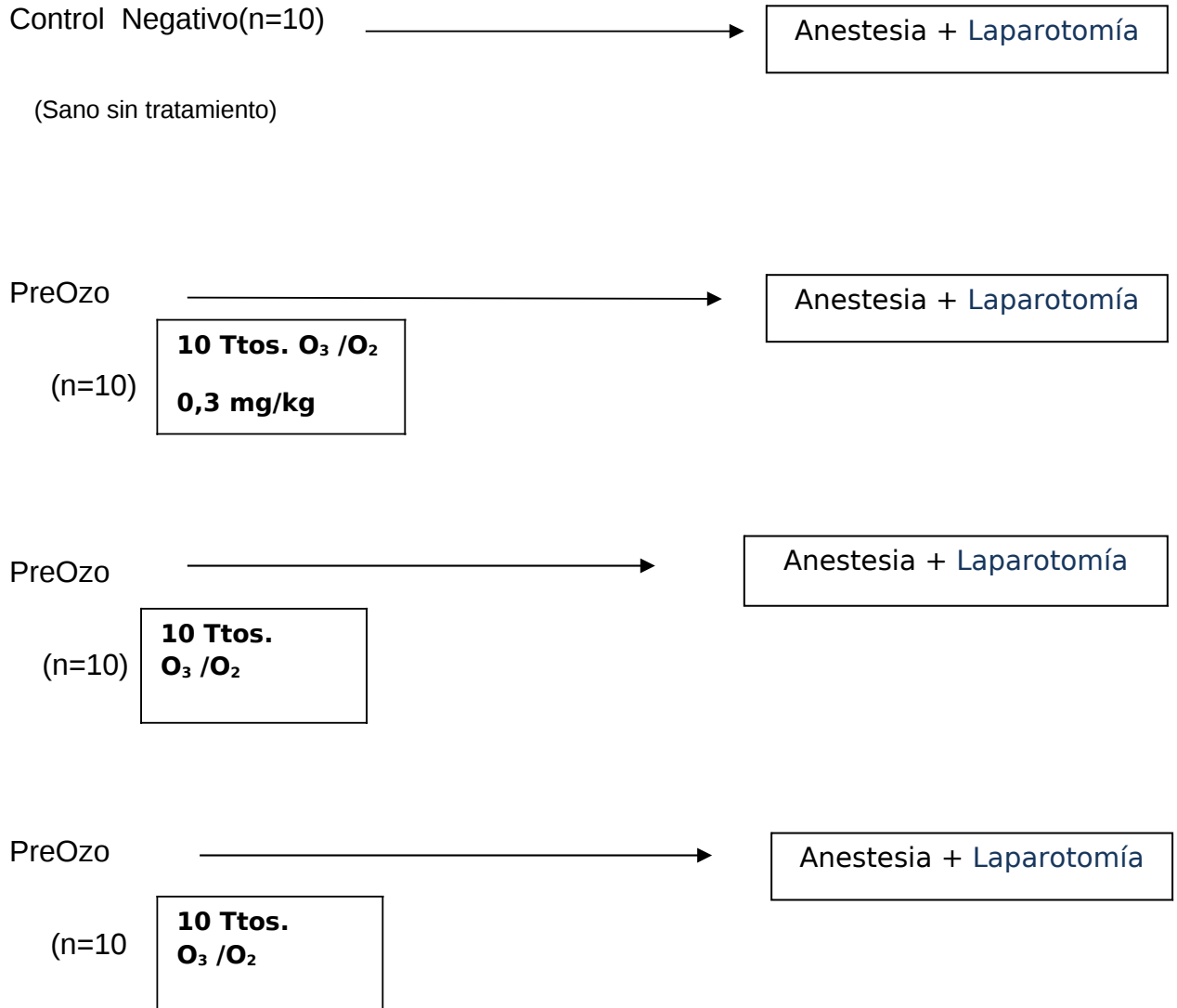
(incluyendo el aislamiento de ambas arterias y venas renales), pero sin inducción de la isquemia.

2.3. Diseños Experimentales.

Los diferentes diseños experimentales estuvieron dirigidos, en primer término, a confirmar si el PreOzo, era capaz de proteger contra el daño por I/R renal y en una segunda etapa, estudiar los eventos asociados a los efectos protectores del mecanismo de PreOzo, contra el daño por I/R ya estudiados.

2.3.1. Diseño No.1. Precondicionamiento oxidativo con ozono en riñones sanos.

Se utilizó para este diseño una muestra de 40 animales. Este estudio fue desarrollado con el fin de confirmar, bajo nuestras condiciones experimentales, si el PreOzo a 3 niveles de dosis, no afectaba la función renal y la estructura renal. En este diseño experimental se incluyeron: un control sano sin tratamiento y 3 grupos controles negativos pretratados con ozono por vía rectal a tres niveles de dosis (0,3; 0,5 y 1,1 mg/kg), con el objetivo de valorar el efecto de las dosis utilizadas sobre las pruebas de función renal en animales sanos no sometidos a I/R renal. Además se realizó un estudio histológico a nivel de Microscopía Óptica, con el objetivo de observar las posibles alteraciones estructurales.



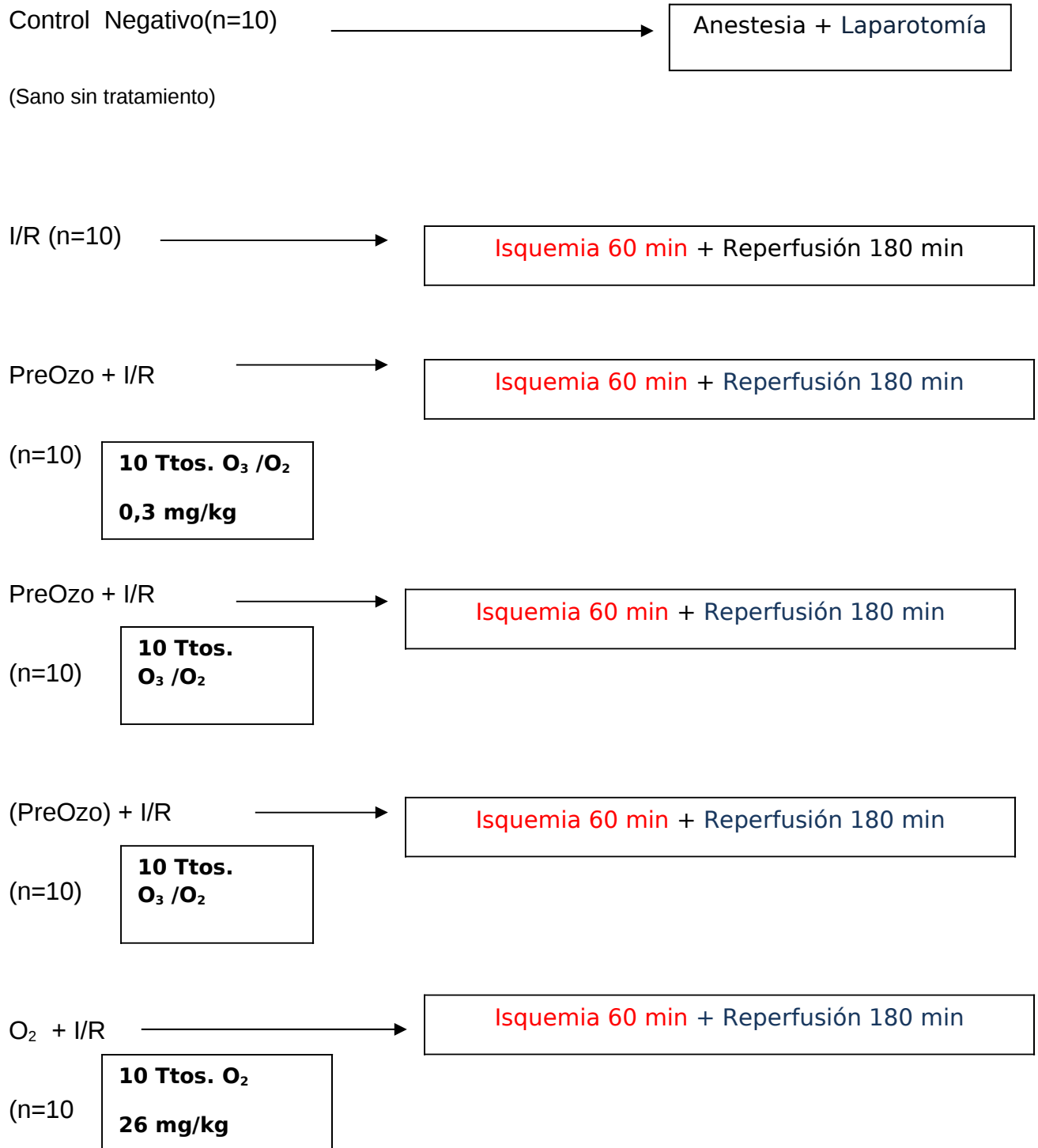
Parámetros evaluados en este diseño:

En este diseño experimental, como prueba de función renal se evaluaron los siguientes parámetros: flujo plasmático renal (aclaramiento plasmático de PAH), intensidad de filtración glomerular (aclaramiento plasmático de inulina), fracción de filtración (FF) y niveles plasmáticos de creatinina. Microscopía Óptica de corteza y médula renal para detectar las posibles alteraciones estructurales a nivel de tejido renal.

2.3.2. Diseño No 2. Papel del PreOzo sobre la función renal, estructura renal y algunas variables indicadoras de estrés oxidativo en riñones sometidos a 60 min de isquemia y 180 min de reperfusión.

Se utilizó una muestra de 60 animales. Este estudio fue desarrollado con el fin de evaluar, bajo nuestras condiciones experimentales, si el PreOzo a 3 niveles de dosis protegía contra el daño por I/R renal. Se incluyeron un control negativo (animales sanos sin tratamiento), un control positivo (I/R), 3 grupos con PreOzo a 3 niveles de dosis (0,3; 0,5 y 1,1 mg/kg) y luego sometidos a la I/R y un grupo pretratado con oxígeno (O₂) a la dosis de 26 mg/kg durante 10 sesiones previo al daño isquémico.

EFFECTO DEL PRECONDICIONAMIENTO OXIDATIVO CON OZONO EN LA PREVENCION DEL DAÑO RENAL AGUDO EN UN MODELO DE ISQUEMIA-REPERFUSION



Al culminar las tres horas de reperfusión se extrajo el riñón izquierdo de cada animal con el objetivo de caracterizar el estado redox, el riñón derecho se extrajo para el estudio histológico el cual abarcó el empleo de Microscopía de Alta Resolución y un estudio morfométrico.

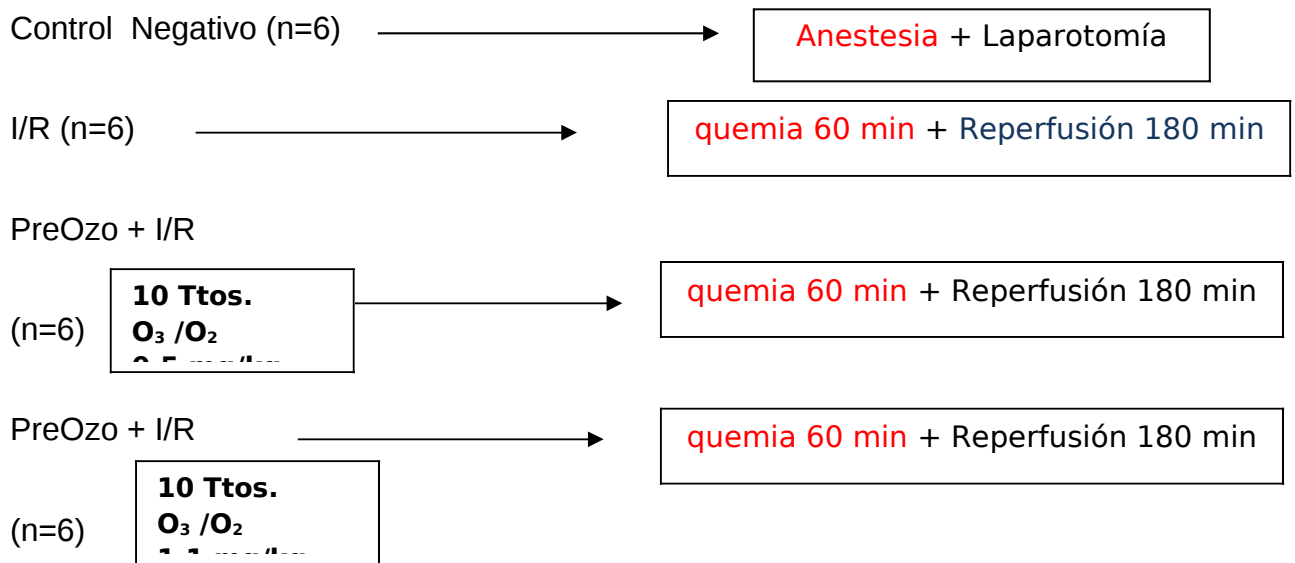
Parámetros evaluados en este diseño:

Como prueba de función renal se evaluaron el flujo plasmático renal (aclaramiento de PAH), intensidad de filtración glomerular (aclaramiento de inulina), la fracción de filtración (cociente IFG/FPR) y niveles plasmáticos de creatinina. En cuanto a los parámetros de estrés oxidativo se midieron: sustancia reactiva al ácido tiobarbitúrico (SRATB), actividad de la superóxido dismutasa (SOD), niveles renales de glutatión reducido (GSH), actividad de la catalasa (CAT), actividad de la glutatión peroxidasa (GSH-Px), actividad de la fosfolipasa (FLA₂) y niveles renales de fructosamina. Microscopía Óptica de corteza y médula renal para detectar las posibles alteraciones estructurales a nivel de tejido renal, además se utilizó un estudio morfométrico con el objetivo de determinar el área y el perímetro de túbulos proximales así como la cantidad de núcleos presentes en la luz tubular

2.3.3. Diseño No 3. Efecto del PreOzo sobre la expresión de interleucina 6 (IL-6) en riñones sometidos a 60 min de isquemia seguidos por 180 min de reperfusión.

Se utilizó una muestra de 24 animales. Este estudio fue desarrollado con el fin de evaluar, bajo nuestras condiciones experimentales, si el PreOzo a 2 niveles de dosis (0,5 y 1,1 mg/kg), por vía rectal, era capaz de atenuar la expresión a nivel de tejido renal postisquémico de la interleucina 6 proinflamatoria (IL-6).

Se incluyó un control negativo (animales sanos sin tratamiento), un control positivo (I/R) y 2 grupos con PreOzo a las dosis de 0,5 y 1,1 mg/kg.



Al culminar las tres horas de reperfusión se pasó a la técnica de reperfusión cardiovascular y acto seguido ambos riñones fueron extraídos para la determinación de la expresión renal de IL- 6.

Parámetros evaluados en este diseño:

Expresión a nivel del tejido renal de Interleucina 6 (IL-6).

2.4. Determinaciones bioquímicas.

2.4.1. Técnicas para la determinación en plasma de las concentraciones de PAH e inulina.

Para las determinaciones de PAH e inulina las muestras de sangre fueron centrifugadas a 3500 rpm, durante 15 min, separando los elementos figurados (glóbulos rojos, blancos y plaquetas) y decantando el plasma. El plasma fue sometido a un proceso de desproteinización por la técnica del sulfato de cadmio, obteniéndose los filtrados libres de proteínas, donde se determinó el PAH y la inulina. Para la determinación del PAH se siguió la técnica fotolorimétrica de Bratton y Marshal (Bratton *et al.*, **1939**), modificado por Homer y Smith (Smith *et al.*, **1945**). La inulina se determinó por fotolorimetría usando el método directo del resorcinol sin tratamiento alcalino (Bratton *et al.*, **1939**).

2.4.2. Técnica para la determinación en plasma de creatinina.

La concentración de creatinina en plasma se determinó en filtrados libres de proteínas por el método de tungstato de sodio, utilizando para su valoración el método del ácido pirúvico, modificado por Brot y Sirata (Brot, **1948**), leyéndose las soluciones coloreadas en un espectrofotómetro de registro visible (UU160 Shimadzu) (Oser, **1965**).

2.4.3. Determinaciones bioquímicas de variables indicadoras de estrés oxidativo a nivel de tejido renal.

Primero se realizó una perfusión a los órganos (riñones) con solución salina, después se enjuagaron con solución salina isotónica, se secaron con papel de filtro y después estos riñones se homogenizaron en tampón KCl 100 mM con EDTA 0,3 mM (1:10 w/v) a 4° C, utilizando un homogenizador Ultraturrax T-25 Polytron. Este homogenato fue centrifugado a 600 g durante 60 min a 4° C. Se desechó el precipitado y se guardó el sobrenadante para las determinaciones de GSH, SRATB, GSH-Px y SOD.

Para el ensayo de actividad enzimática de la CAT se utilizó un homogenato preparado en tampón fosfato 50 mM (pH 7), que contenía tritón X-100 al 1 % (1:9 w/v), en las mismas condiciones que se mencionaron anteriormente.

2.4.3.1. Determinación del GSH.

La concentración renal de GSH se determinó mediante una versión modificada del método de Beutler (Beutler *et al.*, **1963**). Se adicionó 1 ml del sobrenadante del homogenato a 1 mL de ácido metafosfórico al 5 %, se mezclaron enérgicamente y se centrifugaron a 3000 g durante 10 min a temperatura ambiente. Se tomaron 0,5 mL de este sobrenadante, mezclándolos con 2 mL de tampón fosfato 0,2 M y 0,25 mL de ácido 5,5' ditio-bis (2-nitro benzoico) (DTNB) al 0,04 %, disuelto en tampón fosfato 0,2 M. Cada muestra se preparó con su blanco, en el que se sustituyeron los 0,25 mL de DTNB al 0,04 % por el mismo volumen de agua destilada. Se preparó un blanco control con tampón fosfato 0,2 M solamente y un blanco reactivo en el que se sustituyeron los 0,5 mL de la muestra por el mismo volumen de agua destilada. La densidad óptica de las soluciones se midió a 412 nm en un lapso de tiempo inferior a los 10 min. Para cuantificar la concentración de GSH renal se utilizó el coeficiente de extinción molar de $13,6 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$, que describe la formación del anión tiolato, por la reacción de los grupos sulfhidrido del GSH con el DTNB a 412 nm. La concentración renal de GSH se expresó como nmol/mg de proteínas.

2.4.4.1. Actividad enzimática (AE) de la SOD (superóxido dismutasa).

Se utilizó una versión modificada del método de Minami y Yoshikawa (Minami *et al.*, **1979**), que se basa en la generación de aniones superóxido por autooxidación del pirogalol, los cuales forman compuestos de formazán con el azul de nitrotetrazolio (NBT), midiéndose la inhibición del desarrollo de color por la eliminación de radicales superóxido por la SOD. La mezcla de reacción se incubó durante 5 minutos a 37° C antes de añadirsele 0,010 mL de pirogalol 9 mM (disuelto en ácido clorhídrico 10 mM). La mezcla de reacción se incubó a continuación durante 5 minutos a 37° C. La reacción se detuvo añadiendo 0,3 mL de tampón fórmico 2M (pH 3,5), que contenía tritón X-100 al 16 %, midiéndose la densidad óptica a 540 nm.

2.4.4.2. AE de la CAT (catalasa).

La AE de la CAT se determinó de acuerdo al método de Evans y Diplock (Rice *et al.*, **1991**). El sobrenadante se diluyó en el tampón fosfato 50 mM (pH 7) para obtener una dilución adecuada de la enzima, correspondiente a una densidad óptica de 0,5 unidades aproximadamente, medida a 240 nm. Una vez ajustada la densidad óptica se añadieron 2 mL de la dilución a una cubeta y se mezclaron suavemente con 1 mL de H₂O₂ 30 mM. Se midió la densidad óptica a 240 nm durante 30 s. La actividad enzimática de la CAT se expresó como la constante cinética de primer orden que describe la descomposición del H₂O₂ a la temperatura ambiente, por gramo de tejido.

2.4.4.3. AE de la GSH-Px (Glutación Peroxidasa).

Se utilizó una versión modificada del método de Thonson (Faraji *et al.*, **1987**), en el cual se utiliza la reacción acoplada de la GSH reductasa, que reduce el glutati6n oxidado por la GSH-Px (GSSG), tomando los equivalentes de reducci6n del NADPH. Se mide a 340 nm el gasto del NADPH, que equivale a la actividad de la GSH-Px para reducir los hidroper6xidos, utilizando los equivalentes de reducci6n del GSH. La mezcla de reacci6n consisti6 en 0,0988 mL de tamp6n fosfato de sodio 20 mM con EDTA 6 mM (pH 7), 0,7 mL de GSH 2,86 mM disuelto en el tamp6n fosfato de sodio 20 mM con EDTA 6 mM (pH 7), 0,1 mL de azida s6dica 1 mM, 0,1 mL de NADPH 1 mM, disuelto en el mismo tamp6n que el GSH y 0,0012 mL de GSH reductasa (0,5 unidades, Randox).

2.4.4.4. Determinaci6n de las sustancias reactivas al 6cido tiobarbit6rico (SRATB).

Este ensayo se utiliz6 para determinar los niveles de la peroxidaci6n lip6dica, seg6n lo descrito por Ohkawa. (Ohkawa *et al.*, **1979**) Se adicionaron 0,2 mL del sobrenadante renal a 0,1 mL de dodecil sulfato de sodio (SDS) al 8,1 %; 0,75 mL de 6cido ac6tico al 20 % (pH 3,5); 0,75 mL de 6cido tiobarbit6rico al 0,6 % y 0,3 mL de agua destilada. Se agitaron y se incubaron a 95° C durante 60 minutos. A

continuación se dejaron enfriar y una vez fríos se les añadió 2,5 mL de una mezcla butanol-piridina (15:1 v/v). Se mezcló vigorosamente y se centrifugó a 2000 g durante 15 minutos. La densidad óptica de la capa superior se leyó a 532 nm cuidando de no alterar la capa inferior.

2.4.4.5. Determinación de las proteínas.

Las concentraciones de las proteínas se determinaron por el método de Lowry, utilizando seroalbúmina bovina como patrón (Lowry *et al.*, **1951**).

2.4.4.6. Técnica para la medición de fructosamina.

La fructosamina es una proteína de suero enlazada a una azúcar y su contenido relativo se determina por la reducción que los precursores de la glicosilación originan sobre el indicador NBT. El contenido relativo de fructosamina se determina según la expresión:

$$CRF = D.O_2 - D.O_1$$

D.O₁ - densidad óptica de la lectura 1.

D.O₂ - densidad óptica de la lectura 2.

CRF - contenido relativo de fructosamina.

La variación de densidad óptica (Δ D.O) se registra a una longitud de onda de 530 nm (Thome *et al.*, 1996).

2.4.4.7. Técnica para la medición de la actividad tisular de FLA₂.

Es una técnica espectrofotométrica en la cual la enzima actúa sobre los fosfolípidos, provocando la liberación de lisofosfolípidos y ácidos grasos. Estos últimos acidifican el medio ocasionando cambios en la absorbancia de la solución sustrato (mezcla de lecitina de huevo, metanol, tween 20, rojo cresol, solución de glicilglicina y cloruro de calcio). La solución se preparó en el momento de procesar las muestras. Las lecturas se realizaron a una longitud de onda, $\lambda = 578$ nm, determinada por la hidrólisis espontánea del sustrato, a tiempo de 30 y 90 s (Raduany *et al.*, 1987).

2.5. Inmunohistoquímica para la visualización de la inmunoreactividad de la IL-6 en tejido renal sometido a isquemia y pretratado con ozono.

Las secciones de tejido (5 μ m) se colocaron en láminas en poli-L-lisina (SIGMA, St. Louis, MO). El antígeno se obtuvo por incubación en buffer de citrato (pH 6.0) a 120 Lb por 3 min y después las láminas se lavaron con solución buffer de fosfato (SBF). La peroxidasa endógena se bloqueó con 3 % de H₂O₂ (J.T. Baker,

Phillipsburg NJ, USA) por 10 min. Las secciones del tejido se enjuagaron varias veces con SBF-albúmina, lavadas por 10 min con SBF (MP Biomedicals, Germany) e incubadas por 1 h a 37°C con antígeno de carnero anti-IL-6 (Santacruz Biotechnology, California, USA) diluido 1:100 en SBFT (SBT con 0,1 % de tween 20 y albúmina). Después, las secciones fueron lavadas con SBF e incubadas por 30 min a 37 °C con el anticuerpo secundario anti-carnero biotinilado (Santacruz Biotechnology, California, USA), enjuagado varias veces con SBF e incubado por 30 min a 37 °C con el complejo estreptavidina-HRP (Santacruz Biotechnology, California, USA). La inmunoreactividad se visualizó por incubación en 3,3'- tetrahidrocloruro de diaminobenzidina al 0,05 % (Zymed, San Francisco, California, USA). Las muestras con omisión del anticuerpo primario fueron también incluidas como controles negativos (Hirano, **1994**).

2.5.1. Estudios Histopatológicos.

2.5.1.1. Microscopía óptica (Hemotoxilina – Eosina) y Microscopía Óptica de Alta Resolución.

Las muestras de tejido se lavaron con solución salina y se fijaron en formol neutro al 10 %. El método utilizado fue el convencional de inclusión en parafina (58 C) a doble ciego, por 2 especialistas en anatomía patológica. La evaluación microscópica se realizó en un microscopio óptico (OPTRON) con magnificaciones de 100, 250 y 400 X (Barber et al., 1999). Para el estudio morfométrico se tomaron fragmentos de la corteza renal de 12 ratas pertenecientes a tres grupos: Control

sano, Control positivo (dañadas por isquemia reperfusión) y preconditionadas con tratamiento de ozono 1,1 mg/kg, administrado por vía rectal durante 10 días con anterioridad al daño renal por isquemia-reperfusión (PreOzo). Se tomaron muestras de 4 animales por grupo.

Los fragmentos de riñón se procesaron por la técnica de inclusión en resina. Previamente se fijaron en glutaraldehído al 3,2 % en buffer fosfato de sodio 0,1 M, pH 7,4; se postfijaron en tetróxido de osmio al 2 %, se deshidrataron en cuatro disoluciones de concentración creciente de acetona y finalmente en acetona pura. La inclusión se realizó en resina Spurr. Se obtuvieron cortes semifinos en un ultramicrotomo LKB Ultratome III, que se tiñeron con Azul de Stevenel y se analizaron por Microscopia Óptica de Alta Resolución en un microscopio Olympus CX 31 con cámara digital Olympus modelo NO D-540 con una resolución de 3,2 Megapixel (Rasband, 2008).

En cada sección se determinó:

- Área y perímetro de 2 túbulos proximales cortados transversalmente (relación diámetro mayor/diámetro menor igual a 1 ± 0.2). (Fig.2)

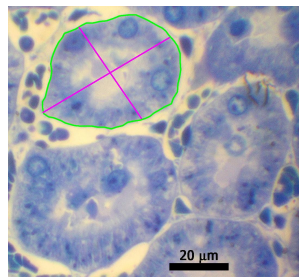


Fig.2. Túbulos proximales de la corteza renal. Análisis cuantitativo: área tubular y perímetro (trazo verde), diámetros mayor y menor (líneas rosadas).

- Cantidad de núcleos en la luz tubular en 1-4 túbulos proximales cortados transversalmente, a un aumento de 40 X.

2.6. Análisis Estadístico de los Resultados.

Los datos experimentados fueron procesados estadísticamente como siguen:

- Se hizo un análisis descriptivo en el cual se calcularon la media y la desviación estándar para cada grupo experimental y variables.
- Se realizó un ensayo de homogeneidad de varianza de Leven.
- Se empleo además el ANOVA de clasificación simple y el ensayo de comparación múltiple de medias de Student-Newman-Keuls, para determinar diferencias entre grupos.
- El nivel de significación estadística empleados en todos los casos fue $p < 0.05$. Los datos fueron procesados utilizando el paquete estadístico STATISTIC versión 4.5 para WINDOWS.
- Para analizar valores de actividad de las enzimas CAT, SOD, GSH-Px, FLA₂, se aplicó el test no paramétrico de Mann-Whitney, de igual forma se utilizó el mismo para procesar los resultados de niveles tisulares de fructosamina y las SRATB.

- Se realizó un estudio descriptivo para evaluar el efecto del PreOzo sobre la expresión de la interleucina 6 en tejido renal.
- Para la cantidad de núcleos en la luz tubular las diferencias significativas se determinaron mediante la prueba Kruskal Wallis.
- Para el área y el perímetro tubulares las diferencias significativas se detectaron utilizando el análisis de varianza (ANOVA) de clasificación simple. Las medias se compararon utilizando la prueba de comparaciones múltiples de medias Turkey-Kramer.

3. RESULTADOS.

3.1. Efecto del acondicionamiento oxidativo con ozono (PreOzo) sobre pruebas de función renal: Flujo Plasmático Renal (FPR), Intensidad de filtración Glomerular (I.F.G), Fracción de Filtración (FF), niveles plasmáticos de creatinina y estructura de riñones sanos.

En la tabla número 1 se muestran los valores del flujo plasmático renal en animales sanos sin ningún acondicionamiento y en animales a los cuales se les acondicionó con ozono a diferentes dosis (0,3; 0,5 y 1,1 mg/kg). Desde el punto de vista estadístico la ozonoterapia, a los niveles de dosis empleada por la vía rectal, no modificó este parámetro fisiológico, manteniendo niveles de flujo plasmático renal similares a los animales sanos no acondicionados. Con respecto a la intensidad de filtración glomerular, variable flujo dependiente en gran medida, mostró comportamiento similar entre los grupos pretratados con ozono a diferentes dosis y el grupo control sano, observándose igual comportamiento entre los diferentes grupos en la variable fracción de filtración. En cuanto a los niveles plasmáticos de creatinina, los mismos no sufrieron variación con la aplicación de la ozonoterapia durante 10 días, mostrando que la ozonoterapia por la vía rectal, a estos tres niveles de dosis, no mostró efectos sobre los niveles plasmáticos de creatinina (**Tabla1**).

Tabla 1. Efecto del preconditionamiento oxidativo con ozono (PreOzo) sobre pruebas de función renal, utilizando tres niveles de dosis, durante 10 sesiones, en riñones de animales sanos.

Grupos (n = 10)	F.P.R ml/min/100g	I.F.G ml/min/100g	Fracción de Filtración	Creatinina (μ mol /L)
Control sano	3,07 \pm 0,59 ^a	0,60 \pm 0,17 ^a	0.195 \pm 0.013 ^a	94 \pm 15 ^a
PreOzo (0,3 mg/kg)	2,55 \pm 0,62 ^a	0,51 \pm 0,15 ^a	0.200 \pm 0.015 ^a	98 \pm 18 ^a
PreOzo (0,5 mg/kg)	2,68 \pm 0,52 ^a	0,53 \pm 0,18 ^a	0.197 \pm 0.012 ^a	97 \pm 19 ^a
PreOzo (1,1 mg/kg)	3,05 \pm 0,72 ^a	0,59 \pm 0,16 ^a	0.193 \pm 0.014 ^a	95 \pm 16 ^a

Se representa la media \pm D.E de n = 10 ratas, para cada grupo experimental. Letras diferentes significan diferencias significativas para p<0.01.

En la **Figura 3** (A y B), se muestran cortes de cortezas renales del grupo control sano (A) y el grupo sano tratado con ozono a la dosis de 1,1 mg/kg. Desde el punto de vista de la Microscopía Óptica, no se reportaron alteraciones estructurales en los riñones tratados con esta dosis. Los grupos sanos tratados con ozono durante 10 días a los niveles de dosis (0,3; 0,5 mg/kg), tampoco mostraron alteraciones estructurales.

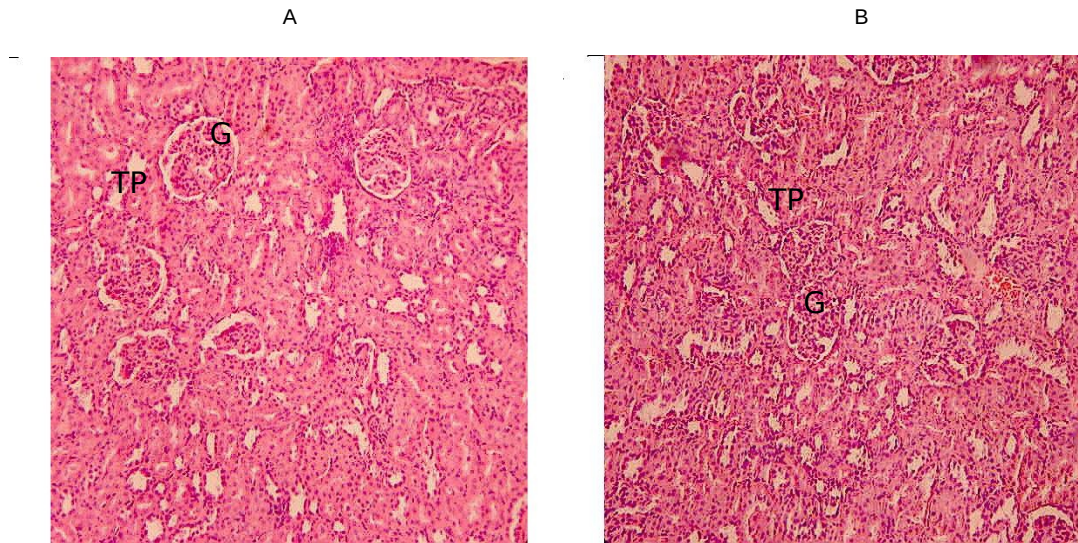


Figura 3. Microscopia Óptica. Coloración Hematoxilina Eosina (H.E 400X). Cortes de Corteza Renal. Figura A pertenece a animal sano: No alteraciones histopatológicas. B: muestra de riñones sanos tratados con ozono por vía rectal a la dosis de 1,1 mg/kg durante 10 sesiones: Aspecto normal de corteza renal. G: Glomerulo, TP: Túbulo Proximal.

3.2. Efecto del preconditionamiento oxidativo con ozono (PreOzo), sobre parámetros bioquímicos, indicadores del estrés oxidativo.

En la **Tabla 2** se muestra el comportamiento de la actividad de la enzima glutathion peroxidasa (GSH-Px). El grupo control positivo reflejó una disminución de la actividad de esta enzima protectora contra el estrés oxidativo, con respecto a los demás grupos. En cambio el PreOzo, a los tres niveles de dosis, mostró una estimulación significativamente estadística en la actividad de esta enzima a nivel renal, con respecto a los demás grupos. La enzima SOD, la cual confiere protección contra el efecto deletéreo del radical anión superóxido, mostró una reducción significativa de su actividad tisular en el control positivo, con respecto a

los demás grupos. Sin embargo, el PreOzo a los tres niveles de dosis, indujo un incremento significativo de la actividad de esta enzima en el tejido renal

postisquémico. La actividad de la Catalasa, enzima secuestradora de H₂O₂, reflejó una estimulación a nivel de tejido renal en los grupos pretratados con ozono, a los niveles más alto de actividad enzimática. Es bueno destacar que el grupo pretratado con oxígeno mantuvo niveles de actividad de la catalasa similares al control sano. No existieron diferencias significativas entre los grupos pretratados con ozono en cuanto a los niveles tisulares de actividad de catalasa (**Tabla 2**).

Tabla 2. Actividad tisular de GSH-Px, SOD y Catalasa en los diferentes grupos.

Grupos (n = 10)	GSH-Px (UI/g prot)	SOD (UI/g prot)	Cat (UI/g prot)
Control Sano	174 ± 73 ^a	187 ± 82 ^a	1973,8 ± 107,8 ^a
Oxígeno + IR	172 ± 47,4 ^a	179,4 ± 81,7 ^a	1898,8 ± 165,7 ^a
Control Positivo	85,9 ± 24,7 ^b	63,4 ± 19,5 ^b	996,9 ± 99,8 ^b
PreOzo (0,3 mg/kg)+IR	381,6 ± 88,4 ^c	836,8 ± 138,5 ^c	7195,2 ± 300,7 ^c
PreOzo (0,5 mg/kg)+IR	412,4 ± 89,6 ^c	798,5 ± 97,7 ^c	6973,5 ± 293,4 ^c
PreOzo (1,1 mg/kg)+IR	397,5 ± 98,6 ^c	812,8 ± 99,8 ^c	6899,7 ± 303,4 ^c

GPx - glutatión peroxidasa, SOD - superóxido dismutasa y CAT – catalasa.

Nota: Cada valor representa la Media ± D.E para n= 10 ratas. Letras diferentes significan diferencias significativas de p<0,05.

En la **Tabla 3**, se aprecian los valores renales de glutatión reducido (GSH). El tratamiento con ozono (PreOzo), a los tres niveles de dosis empleado en nuestro

estudio, mantuvo los niveles de GSH en tejido renal similar estadísticamente al control sano, evidenciándose que el PreOzo evitó el descenso de este parámetro antioxidante no enzimático a nivel del tejido renal postisquémico. Vale destacar que se reflejó un agotamiento del GSH renal en los grupos control positivo y pretratado con oxígeno por la vía rectal a la dosis de 26 mg/kg. La sustancia reactiva al ácido tiobarbitúrico (SRATB) es una medida del grado de peroxidación lipídica, la cual se encuentra elevada en los fenómenos de I/R. Se aprecia un incremento significativo de la peroxidación lipídica en los grupos control positivo y el pretratado con oxígeno con respecto a los grupos control sano y grupos pretratados con ozono a la dosis de 0,3 y 0,5 mg/kg. Es preciso destacar que el grupo pretratado con ozono a la dosis de 1,1 mg/kg reflejó un incremento de la SRATB, mostrando comportamiento similar estadísticamente a los grupos control positivo y precondicionado con oxígeno.

Tabla 3. Determinaciones bioquímicas de glutatión reducido (GSH) y de las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (SRATB).

Grupos (n = 10)	GSH (µmol / g prot)	SRATB (µmol / g prot)
Control Sano	3,38 ± 0,77 ^a	0,140 ± 0,052 ^a
Control positivo	1,15 ± 0,22 ^b	0,670 ± 0,037 ^b
Oxígeno + IR	1,18 ± 0,32 ^b	0,590 ± 0,041 ^b
PreOzo (0,3 mg/kg)+IR	4,2 ± 0,91 ^a	0,170 ± 0,061 ^a
PreOzo (0,5 mg/kg)+IR	3,4 ± 0,81 ^a	0,130 ± 0,054 ^a
PreOzo (1,1 mg/kg)+IR	3,7 ± 0,89 ^a	0,620 ± 0,038 ^b

GSH - glutatión reducido y SRATB - sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico

Nota: Cada valor representa la Media ± D.E para n= 10 ratas. Letras diferentes significan diferencias significativas para $p < 0,05$.

3.3. Papel del pretratamiento con ozono (PreOzo) sobre la actividad tisular de la Fosfolipasa A₂ (FLA₂) y los niveles renales de fructosamina.

Con respecto a la actividad en el tejido renal de la enzima fosfolipasa A₂, se evidenció que la misma se incrementó significativamente en el grupo control positivo y el grupo tratado con oxígeno, con respecto a todos los grupos. Sin embargo, al analizar el comportamiento en los grupos pretratados con ozono por vía rectal a diferentes niveles de dosis, los mismos mostraron valores de la

actividad de la FLA₂ superiores al control sano, pero significativamente inferiores al control positivo y al grupo pretratado con oxígeno a la dosis de 26 mg/kg.

Se observaron diferencias significativas en la actividad de la FLA₂ a nivel renal entre el grupo pretratado con ozono a la dosis de 0,3 mg/kg y los grupos pretratado a las dosis de 0,5 y 1,1 mg/kg. Aunque los niveles de actividad de la FLA₂ en el grupo con la dosis de ozono de 0,3 mg/kg fueron significativamente menores con respecto al control positivo y el grupo pretratado con oxígeno, estos fueron superiores significativamente con respecto a los otros niveles de dosis (0,5 y 1,1 mg/kg). Esto refleja que la dosis de 0,3 mg/kg mostró una menor protección de la enzima con respecto a las dosis de 0,5 y 1,1 mg/kg, estas dos últimas dosis reflejaron mejor efecto sobre la actividad tisular de la FLA₂ (**Tabla 4**).

En cuanto a los niveles renales de fructosamina, el grupo control positivo y el grupo pretratado con oxígeno, mostraron de forma significativa los valores más altos de fructosamina a nivel del tejido renal, con respecto a los demás grupos. En cambio los grupos experimentales pretratados con ozono a las dosis de 0,5 y 1,1 mg/kg mostraron niveles de fructosamina similares desde el punto de vista estadístico al control sano. Es bueno destacar que el grupo pretratado con ozono a la dosis de 0,3 mg/kg mostró valores de fructosamina renal inferiores al control positivo y al grupo pretratado con oxígeno, pero si superiores a los grupos pretratados a las dosis de 0,5 y 1,1 mg/kg.

El preconditionamiento oxidativo con ozono a los 3 niveles de dosis mostró un efecto positivo en cuanto a la reducción de los niveles renales de fructosamina.

Las dosis óptimas fueron las de 0,5 y 1,1 mg/kg, las cuales mantuvieron niveles de fructosamina similares estadísticamente al control sano. (**Tabla 4**)

Tabla 4. Actividad de la FLA₂ (U/g proteínas) y niveles de fructosamina (ΔD.O) en tejido renal.

Grupos (n = 10)	Fosfolipasa A2	Fructosamina
Control Sano	23,4 ± 7,8 ^a	0,013 ± 0,005 ^a
Control Positivo	204,84 ± 31,7 ^b	0,037 ± 0,005 ^b
Oxígeno + IR	193,89 ± 42,6 ^b	0,043 ± 0,017 ^b
PreOzo (0,3 mg/kg) + IR	92,55 ± 23,6 ^c	0,021 ± 0,007 ^c
PreOzo (0,5 mg/kg) + IR	47,73 ± 8,7 ^d	0,014 ± 0,002 ^a
PreOzo (1,1 mg/kg) + IR	45,60 ± 7,8 ^d	0,015 ± 0,002 ^a

Se representa la Media ± D.E. para cada grupo experimental (n= 10). Las letras diferentes significan diferencias significativas para, p< 0.05. (ΔD.O): variación de densidad óptica.

3.4. Efecto del PreOzo en la disminución de la interleucina proinflamatoria (IL-6) en riñones sometidos a isquemia de 60 min seguida de 180 min de reperfusión.

En cuanto a la inmunoreactividad de la interleucina 6 en tejido renal, medida a través de la inmunohistoquímica, se observó que en los cortes de corteza renal pertenecientes al grupo control sano, esta fue negativa a nivel de glomérulos y túbulos. Con respecto al PreOzo, a la dosis de 0,5 mg/kg, esta mostró inmunoreactividad escasa y difusa en la mayoría de los túbulos. Cuando la dosis del PreOzo fue el doble (1,1 mg/kg), el teñido fue más concentrado, pero a nivel de túbulos contorneados, siendo negativo en glomérulos. El grupo control positivo que sufrió el daño sin tratamiento previo mostró inmunoreactividad en túbulos, glomérulos, intersticio renal, reflejado por el fuerte teñido para la IL-6 en todas las estructuras renales de dicho grupo [Figura 4 (A, B, C y D)].

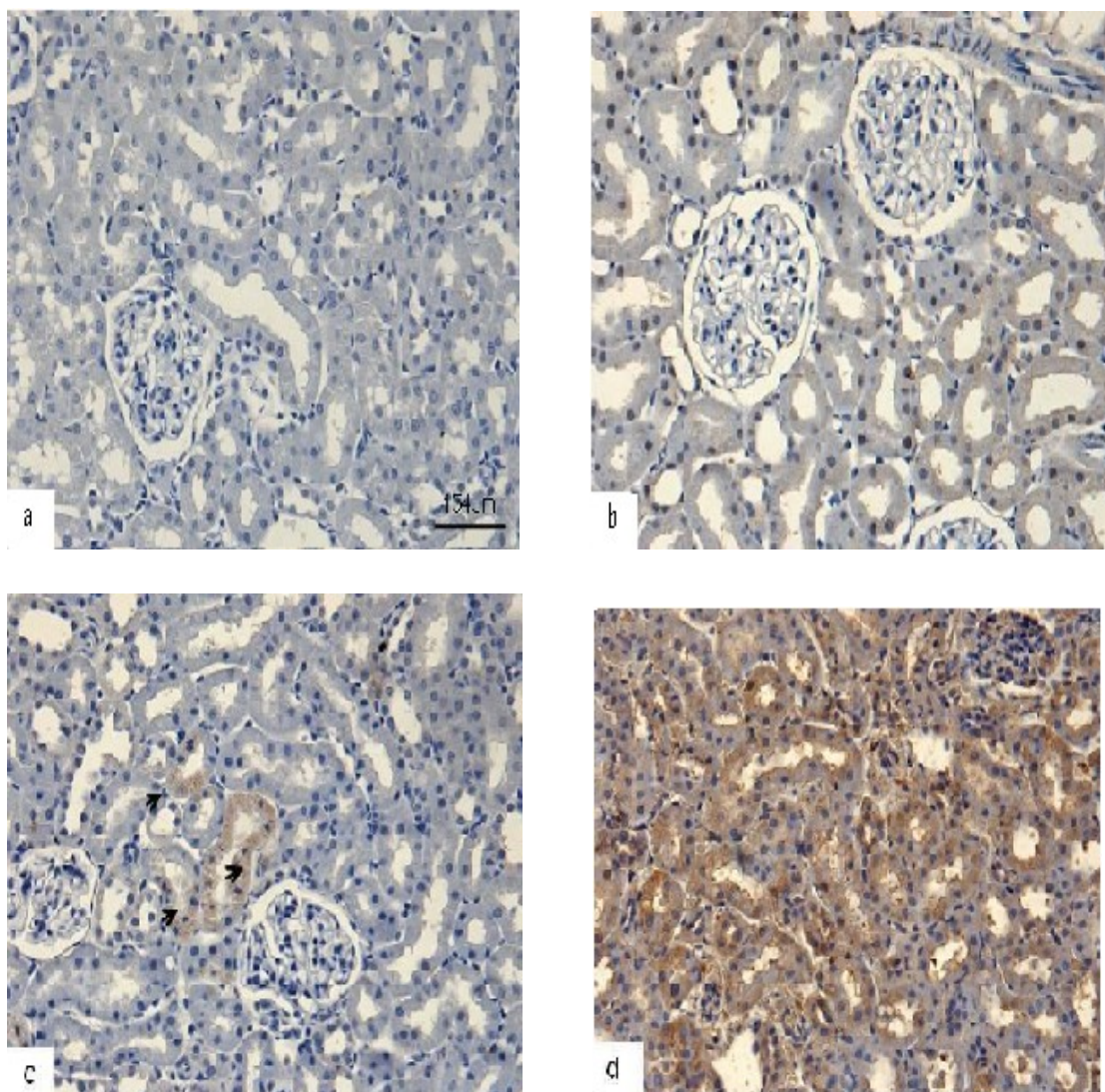


Figura 4. Estudio inmunohistoquímico de IL-6 en tejido renal.

A. Ratones controles, el estudio inmunohistoquímico de IL-6 en glomérulo y túbulo fue negativo. **B.** Ratones tratados con ozono a la dosis de 0,5 mg/kg mostraron un tinte escaso y difuso en la mayoría de los túbulo. **C.** Ratones tratados con ozono a la dosis de 1,1 mg/kg mostraron un tinte positivo en algunos túbulo contorneado proximal (flechas negras). En el resto del tejido, incluyendo el glomérulo, fue negativo. **D.** Los riñones que no recibieron tratamiento previo con ozono mostraron un fuerte tinte para IL-6 en todas las estructuras.

3.5. Eficacia del PreOzo sobre las pruebas de función renal: F.P.R., I. F. G., F.F., niveles plasmáticos de creatinina y estructura de riñones sometidos a I/R.

Los periodos prolongados de isquemia renal incrementan el daño, primero de forma reversible y pasado un punto crítico de manera irreversible. Por otra parte la reperfusión posterior a la isquemia, induce daño adicional a las diferentes partes de la nefrona, dando como resultado el fracaso de la nefrona como unidad estructural y funcional del riñón, produciéndose una alteración en las variables que miden la función renal.

En la **Tabla 5**, se muestran los valores de flujo plasmático renal (aclaramiento plasmático de PAH) en todos los grupos que conforman nuestro universo de estudio. Se aprecia una disminución de los valores de flujo plasmático renal en los grupos control positivo y el pretratado con oxígeno a la dosis de 26 mg/kg, con respecto a los demás grupos.

El grupo tratado previamente con ozono a la dosis de 0,3 mg/kg, mostró un valor de flujo plasmático renal inferior al control sano, pero superior al control positivo. Sin embargo, los grupos preconditionados con ozono a los niveles de dosis de 0,5 y 1,1 mg/kg, mostraron valores de flujo plasmático renal similares al control sano, sin diferencia significativa entre ellos. Con respecto a la intensidad de

filtración glomerular (aclaramiento de inulina), la misma se comportó de igual forma que el flujo plasmático renal en los diferentes grupos estudiados. Se observó que los grupos previamente tratados con ozono antes del daño reflejaron valores de intensidad de filtración glomerular significativamente superiores al control positivo y al grupo pretratado con oxígeno, siendo los grupos pretratados con ozono a las dosis de 0,5 y 1,1 mg/kg los de mejores valores de intensidad de filtración glomerular alcanzados. En cuanto al comportamiento de la fracción de filtración, tenemos que el control positivo mostró valores significativamente superiores al control sano y a los grupos pretratados con ozono a diferentes dosis, no siendo así con respecto al grupo pretratado con oxígeno que se comportó desde el punto de vista estadístico similar al control positivo. El grupo pretratado con ozono a la dosis de 0,3 mg/kg mostró valores superiores de fracción de filtración con respecto a los otros 2 grupos de PreOzo (0,5 y 1,1 mg/kg). Los valores plasmáticos de creatinina mostraron un comportamiento similar a los del flujo plasmático renal e intensidad de filtración glomerular en los diferentes grupos. El grupo control positivo y el grupo pretratado con oxígeno reflejaron los valores más altos de creatinina plasmática, en cambio los grupos pretratados con ozono a los dos niveles de dosis (0,5 y 1,1 mg/kg) mostraron niveles de creatinina similares, desde el punto de vista estadístico, al control sano. El grupo pretratado con ozono a la dosis más baja (0,3 mg/kg) mostró niveles de creatinina plasmática significativamente inferiores al control positivo y al grupo pretratado con oxígeno, pero con diferencias significativas con respecto a los grupos pretratados con ozono a las dosis de 0,5 y 1,1 mg/kg.

Tabla 5. Efecto del PreOzo sobre pruebas de función renal. Flujo Plasmático Renal (F.P.R), Intensidad de Filtración Glomerular (I.F.G), Fracción de Filtración (F.F) y niveles plasmáticos de creatinina.

Grupos (n = 10)	F.P.R ml/min/100g	I.F.G ml/min/100g	Fracción de Filtración	Creatinina mol /L)
Control sano	3,07 ± 0,59 ^a	0,60 ± 0,17 ^a	0.195 ± 0.015 ^a	94 ± 15 ^a
Control positivo	1,15 ± 0,37 ^b	0,31 ± 0,13 ^b	0.275 ± 0.013 ^b	185 ± 43 ^b
Oxígeno + IR	1,37 ± 0,38 ^b	0,29 ± 0,12 ^b	0.245 ± 0.012 ^b	193 ± 75 ^b
PreOzo (0,3 mg/kg)+ IR	1,98 ± 0,54 ^c	0,43 ± 0,11 ^c	0.217 ± 0.014 ^c	122 ± 48 ^c
PreOzo (0,5 mg/kg) + IR	2,78 ± 0,77 ^a	0,57 ± 0,14 ^a	0.205 ± 0.013 ^a	97 ± 18 ^a
PreOzo (1,1 mg/kg) + IR	2,67 ± 0,79 ^a	0,55 ± 0,19 ^a	0.205 ± 0.015 ^a	98 ± 19 ^a

Se representa la media ± la D.E, para cada grupo experimental (de 10 ratas cada uno). Letras diferentes significan diferencias significativas para al menos, p<0.05.

3.6. Efecto del PreOzo sobre la estructura de riñones sometidos a I/R.

(Análisis cualitativo).

Los resultados histopatológicos se correspondieron con el comportamiento de las variables de función renal. En el grupo control positivo, (**Fig 5 B**) sometido a isquemia de 60 min seguidos de 180 min de reperfusión, se evidenció marcadores morfológicos de daño por I/R a nivel de la corteza renal, en cuanto a: pérdida del borde en cepillo de los túbulos proximales, dilatación tubular, necrosis de las células de los túbulos proximales, formación de cilindros en la luz tubular, interrupción y/o borramiento de las membranas basales tubulares, así como borramiento del espacio de Bowman de los glomérulos renales. Se apreció recuperación de la morfología renal en las muestras de animales tratados con ozono previo a la inducción del daño (**Fig 5 C y 5D**), encontrándose un efecto dosis dependiente, ya que el grupo pretratado a la dosis de 1.1mg/kg, cualitativamente mostró, una mejor preservación de las estructuras en comparación con las restantes dosis (0.3 y 0.5 mg/kg). [**Figura 5 (D)**]. El grupo pretratado con ozono a la dosis de 0,3 mg/kg tuvo un comportamiento similar desde el punto de vista histológico con respecto al grupo que recibió la dosis de 0,5 mg/kg. Es importante señalar que el grupo pretratado con oxígeno a la dosis de 26 mg/kg no mostró ningún efecto protector sobre la arquitectura a nivel de corteza renal, mostrando las mismas lesiones que el grupo control positivo las cuales indican daño renal inducido por I/R.

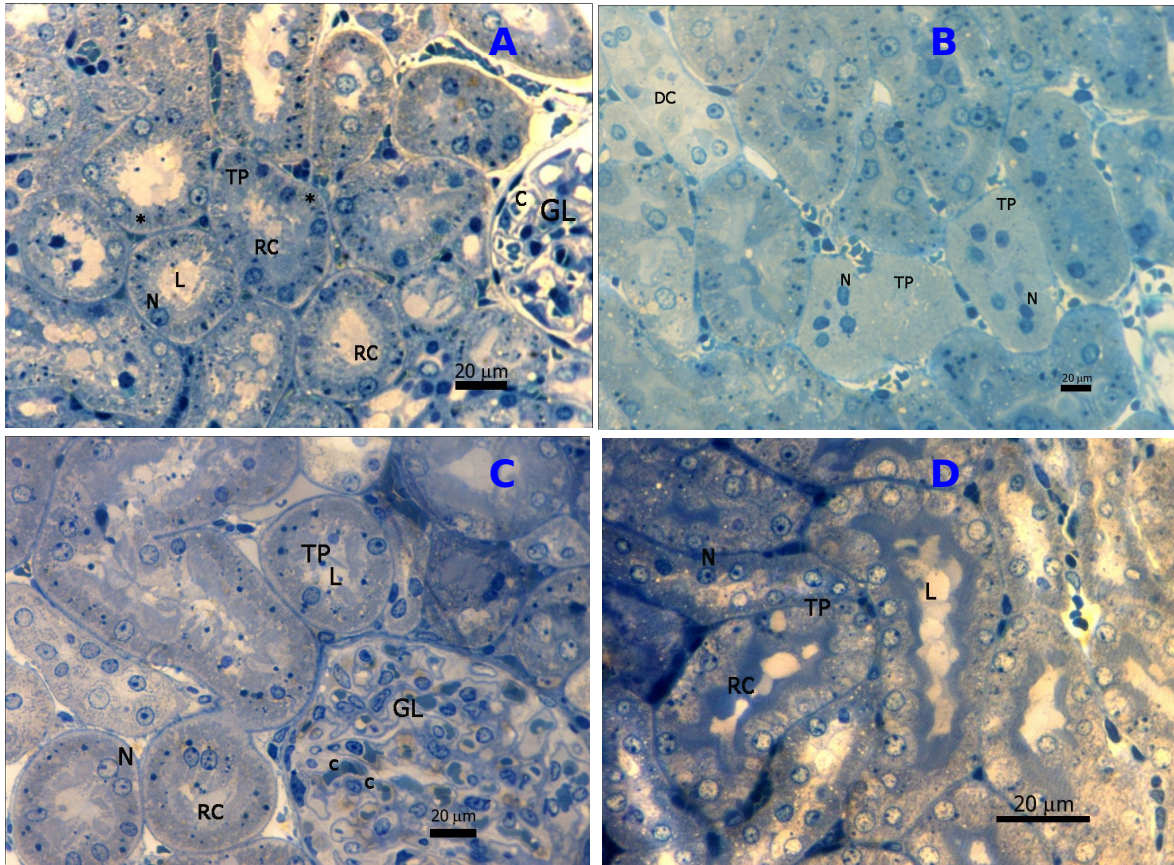


Fig. 5. Cortes semifinos de la corteza renal por Microscopía Óptica de Alta Resolución. A) Control negativo. Estructura normal del tejido renal cortical. B) Control positivo (daño por IR). Pérdida de la arquitectura normal del tejido con daños severos en las células de los túbulos proximales: núcleos de cromatina condensada, células descamadas, oclusión de la luz tubular y pérdida del ribete en cepillo. C) Grupo de ozono 0,5 mg/Kg de + IR. Glomérulo con capilares congestionados y ribete en cepillo conservado en zonas de algunos túbulos proximales. D) Grupo ozono 1,1 mg/Kg de + IR. Conservación del ribete en cepillo, dilatación de la luz tubular. 280 X.

Leyenda: Glomérulo (GL), Capilares (c), Túbulos proximales (TP), Ribete en cepillo (RC), Núcleo celular (N), Estriaciones basales epiteliales (*), Descamación celular (DC).

3.6.a. Estudio Morfométrico. (Análisis cuantitativo).

Para este estudio se seleccionaron los grupos más representativos (control sano, control positivo y PreOzo a la dosis de 1,1mg/kg).

Área de los túbulos proximales.

En el grupo Control positivo se produjo un aumento significativo del área tubular, respecto al Control sano. Esto indica dilatación tubular relacionada con la extrusión de núcleos celulares y la formación de cilindros que obstruyen la luz tubular.

En el grupo PreOzo 1,1 mg/kg, el área de los túbulos mantuvo un valor cercano a la del grupo Control sano, que difirió significativamente del Control positivo (**Fig 6**).

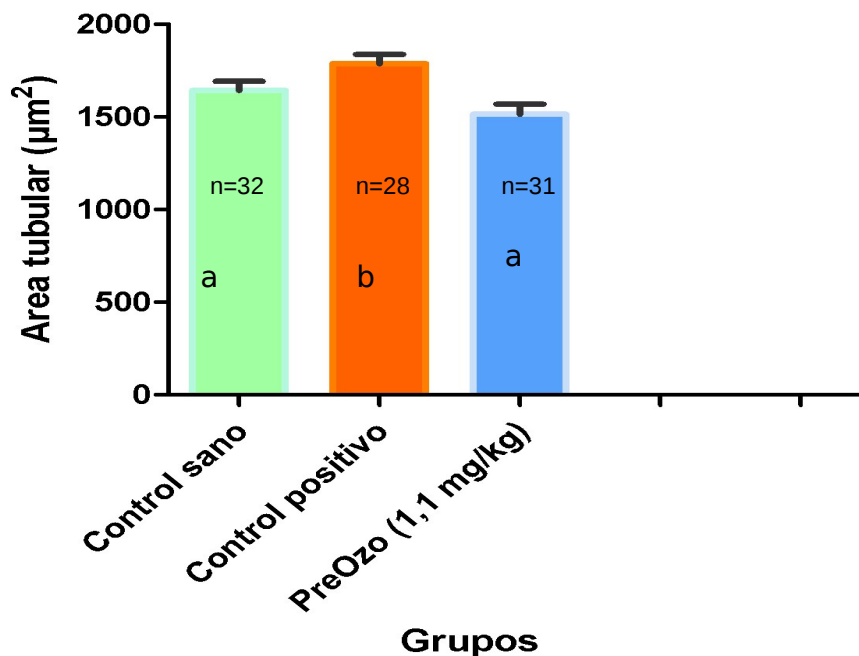


Fig. 6 Área de los túbulos proximales.

Media ± desviación estándar. Letras diferentes significan diferencias significativas ($p < 0,05$).

Perímetro de los túbulos proximales

En el grupo Control positivo se produjo un aumento significativo del perímetro tubular, respecto al Control sano. Esto indica una mayor irregularidad del contorno tubular.

En el grupo PreOzo 1,1 mg/kg, el perímetro de los túbulos fue significativamente menor que el del grupo Control positivo, siendo similar estadísticamente al control sano (Fig.7).

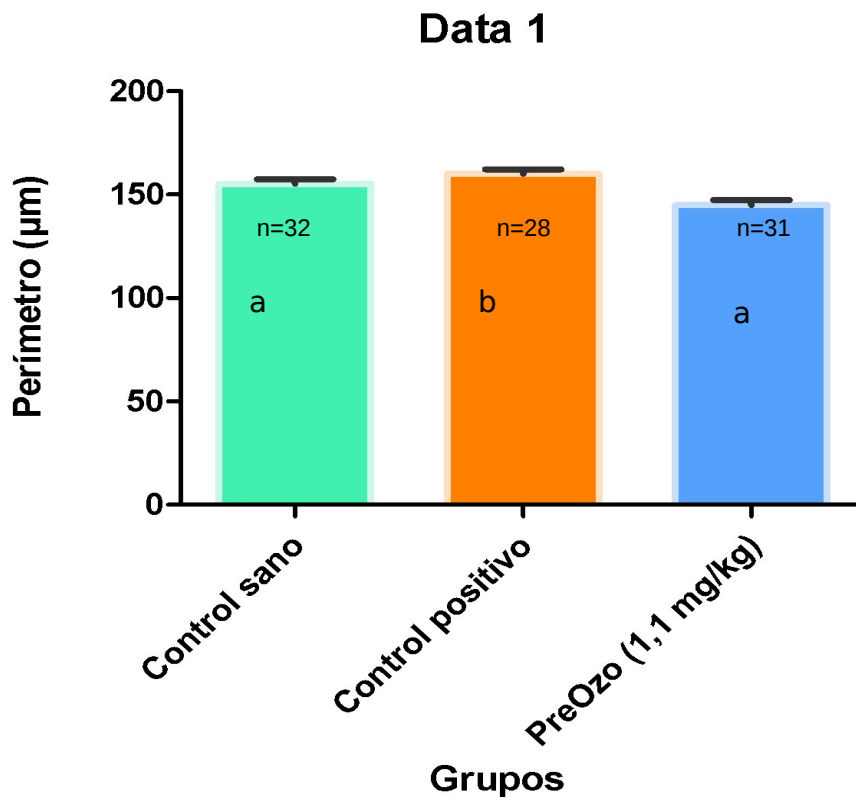


Fig. 7. Perímetro de los túbulos proximales. Media y desviación estándar. Letras diferentes significan diferencias significativas $p < 0,05$.

Cantidad de núcleos celulares en la luz de los túbulos proximales

En el grupo Control positivo se observó un aumento significativo del número de núcleos en la luz tubular respecto al Control sano (**Fig. 8**). En el grupo PreOzo 1,1 mg/kg, el número de núcleos en la luz tubular no tuvo diferencias significativas respecto al Control sano y sí fue significativamente menor que en el grupo Control positivo (**Fig 8**). Esto se corresponde con los hallazgos cualitativos donde se observaron túbulos en los que su luz presentaba características cercanas a la normalidad.

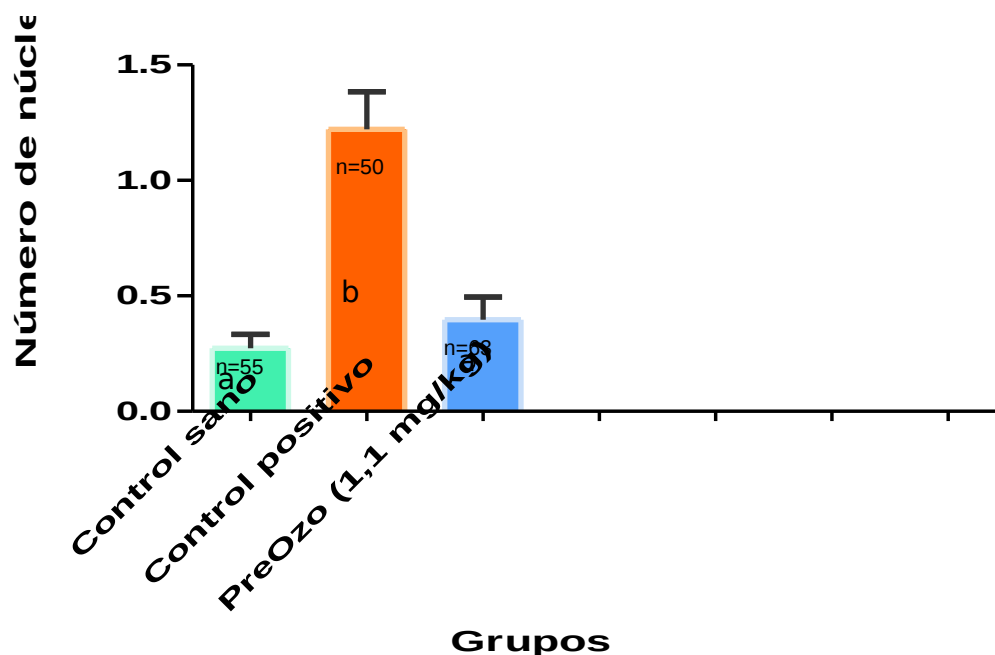


Fig 8. Cantidad de núcleos celulares en la luz de los túbulos proximales. Media y desviación estándar. La n se refiere al número de túbulos en que se contaron los núcleos. Letras diferentes significan diferencias significativas $p < 0,05$.

4. DISCUSIÓN.

Existen situaciones clínicas en la práctica médica diaria como: el trasplante renal, las nefrotomías renales para el tratamiento de la litiasis renal y la cirugía conservadora de los tumores renales entre otras, en las cuales es necesario realizar isquemia renal temporal, donde se produce una lesión morfológica y funcional la cual depende del tiempo e isquemia (Novic *et al.*, 1997). A esto se le suma un número de entidades nosológicas en las cuales se produce isquemia renal temporal como: la vasodilatación periférica en el curso de una bacteriemia, la hipovolemia en el curso de una hemorragia, la obstrucción vascular renal en el curso de un embolismo a nivel de la arteria renal, el taponamiento cardiaco, la cardiopatía congestiva y el infarto agudo del miocardio. (Molitoris *et al.*, 1986; Hepstintall *et al.*, 1980; Ouriel *et al.*, 1985)

Referente a los parámetros medidores del estrés oxidativo, este estudio reveló lo ya reportado por otros autores (Peralta *et al.*, 2000; Candelario *et al.*, 1998; Hui Chen *et al.*, 2008), que el PreOzo es capaz de estimular a nivel del tejido lesionado la actividad de enzimas antioxidantes. Sin embargo, en el grupo control positivo se observó un agotamiento de la capacidad antioxidante reflejado por la disminución de la actividad tisular de las enzimas antioxidantes (SOD, CAT y GSH-Px), así como por el agotamiento del GSH y el incremento de la peroxidación lipídica (medida a través de las SRATB).

La glutatión peroxidasa (GSH-Px), es una enzima dependiente de selenio, la cual constituye uno de los sistemas antioxidantes más importante de la célula (Mates *et al.*, **1999**; Martínez *et al.*, **2004**). Esta enzima utiliza al glutatión reducido (GSH) como cofactor y es altamente específica por el mismo. La GSH-Px tiene mucha mayor afinidad por el H₂O₂, sobre todo cuando esta ERO se encuentra a bajas concentraciones dentro de la célula. El comportamiento de la actividad de la GSH-Px a nivel del tejido renal sometido a I/R sin tratamiento previo, concuerda con lo ya reportado por otros autores (Castillo *et al.*, **2003**), una disminución de la actividad de esta enzima antioxidante durante la fase isquémica y también en la fase de reoxigenación. Sin embargo, el PreOzo a los tres niveles de dosis, reflejó un incremento de la actividad de esta enzima en tejido renal postisquémico, hecho que sin duda contribuye a la defensa antioxidante celular contra el H₂O₂ (**Tabla 2**). Se reporta, en un estudio en ratones transgénicos sometidos a I/R, una sobreproducción de GSH-Px (intra y extracelular) y como resultado se observó una disminución de la expresión de quimocinas (KC), de proteína inflamatoria de macrófago (MIP-2), de infiltración de neutrófilos y de un menor deterioro en la función renal después de la isquemia (Ishibashi *et al.*, **1999**). Estos resultados mostraron la importancia de la activación de esta enzima antioxidante en la disminución de la inflamación, durante la I/R. Se piensa que el PreOzo, al estimular la actividad de la GSH-Px, puede estar ejerciendo un efecto retardador

en el incremento del H_2O_2 (**Anexo 3**), existiendo la posibilidad de un retardo en la amplificación del proceso inflamatorio, efecto que puede estar influyendo en la conservación del riñón sometido a I/R, bajo nuestras condiciones experimentales.

Con respecto a la SOD, única enzima que actúa sobre un radical (cataliza la dismutación del $O_2^{\cdot-}$ a H_2O_2), juega un papel en la protección del riñón contra los radicales libres liberados durante la I/R (Brenner, **2000**; Castillo *et al.*, **2003**). En esta investigación el PreOzo produjo una estimulación de la actividad de la SOD (**Tabla 2**), en el propio tejido renal lesionado, hecho que concuerda con lo ya reportado por autores acerca de la estimulación tisular de la actividad de la SOD en órganos sometidos a I/R (Barber, **1999**; Ajamieh *et al.*, **2002**; Hui Chen *et al.*, **2008**). En nuestras condiciones, los riñones del grupo control positivo mostraron agotamiento de la actividad renal de SOD, aspecto que habla a favor del empeoramiento de la función y estructura renal mediado por la no protección contra el estrés oxidativo. El PreOzo, al estimular la actividad tisular de la SOD, produjo una protección contra el daño mediado por el $O_2^{\cdot-}$ sobre la estructura y función de riñones sometidos a I/R. Además en la literatura se reporta que la formación de peroxinitrito es controlada por la SOD, vía dismutación del $O_2^{\cdot-}$ (Squadrito *et al.*, **1998**). Se piensa que el PreOzo al estimular la SOD, a los niveles de dosis empleados en nuestra investigación, protege al tejido renal en diferentes formas: al estimularse la SOD en el tejido lesionado por la I/R, disminuye el radical $O_2^{\cdot-}$; por lo que disminuye el ataque que este hace a los lípidos de membrana, disminuyendo por esta vía la peroxidación lipídica y con la consecuente reducción del daño tisular. El $O_2^{\cdot-}$ es un radical que se comporta

como agente quimiotáctico de células inflamatorias como los neutrófilos, que al llegar estos al tejido postisquémico, liberan altas cantidades de ERO e interleucinas proinflamatorias, amplificándose de esta forma el daño al tejido ya lesionado. Al estimularse la actividad de la SOD en el tejido sometido al daño por I/R, este efecto, disminuye la posibilidad de unión del $O_2^{\cdot-}$ con el ON^{\cdot} , por lo que retrasaría la formación del peroxinitrito (potente radical y agente quimiotáctico de células inflamatorias), aumentando de esta forma la biodisponibilidad del ON^{\cdot} , por supuesto esto garantiza el aporte del flujo sanguíneo al tejido renal postisquémico protegiéndolo del fenómeno de la hipoperfusión retardada que ocurre en órganos sometidos a I/R (**Anexo 3**).

La SOD es una de las pocas enzimas antioxidantes que se filtra por el glomérulo, protegiendo tanto al glomérulo como a los túbulos del ataque del radical $O_2^{\cdot-}$ (Castillo *et al.*, 2003). En la I/R se reporta que la administración de la SOD prolonga la acción relajante muscular del ON^{\cdot} , hecho que corrobora el papel protector de esta enzima sobre la hemodinámica intrarrenal, cuando los riñones son sometidos a I/R. Dentro de los eventos moleculares que caracterizan a la I/R está el consumo del ON^{\cdot} por el ataque radicalico del $O_2^{\cdot-}$. Esto desplaza el equilibrio entre los agentes vasodilatadores y vasoconstrictores hacia estos últimos, potenciándose de esta forma la vasoconstricción y la hipoperfusión al órgano sometido a I/R (Murphy *et al.*, 1991). Otros autores plantean que la administración de la SOD, durante la reoxigenación, protege la función y estructura de órganos sometidos a este evento (Castillo *et al.*, 2003).

En estudios realizados en riñón, la reperfusión que siguió al daño isquémico provocó una pérdida de proteínas de la matriz de los peroxisomas, con drástico compromiso de sus funciones, así como un descenso significativo de la actividad de la CAT (Céspedes *et al.*, **1996**). La disminución de la actividad de la CAT durante la isquemia se debe a la formación de un complejo inactivo, mientras que durante la reperfusión hay inactivación, proteólisis o disminución de la síntesis de la enzima (Céspedes *et al.*, **1996**). En nuestro estudio, el PreOzo estimuló la actividad tisular de la CAT, mostrando los niveles más altos de actividad con respecto a los demás grupos, inclusive con el control positivo, el cual mostró un agotamiento de su actividad (**Tabla 2**). Se piensa que esta activación de la CAT por el PreOzo, disminuye los niveles de H₂O₂ en todo el tejido renal (glomérulo, célula epitelial de los túbulos, célula endotelial), comparado con el tejido renal sometido a I/R sin PreOzo (control positivo). Este efecto puede tener una repercusión favorable sobre el tejido renal postisquémico, ya que todas las vías de daño renal provocadas por incremento patológico del H₂O₂ (peroxidación lipídica a nivel de membrana basal glomerular y epitelial, activación de factores de transcripción nuclear para la síntesis de interleucinas proinflamatorias, reclutamiento de células proinflamatorias) estarían inhibidas o al menos retardadas, proporcionando esto un efecto protector sobre la viabilidad del riñón postisquémico (**Anexo 3**).

Los resultados de este trabajo concuerdan con lo ya reportado acerca de la estimulación de la CAT en la protección del riñón sometido a eventos patológicos agudos y crónicos (Duralk *et al.*, **1994**). El glutathion reducido (GSH), miembro importante del sistema antioxidante, es muy abundante en el líquido intracelular y participa en importantes funciones intracelulares. Este tripéptido es mantenido primariamente en la forma reducida tiol, a través de la enzima GSH-Reductasa. El GSH participa en la reducción enzimática de hidroperóxidos, incluyendo el H_2O_2 y puede conjugarse con compuestos electrofílicos, espontáneamente y enzimáticamente, por una clase de enzimas detoxificadoras multifuncionales, denominadas GSH-S-Transferasas. Estas enzimas poseen un papel fundamental en el metabolismo de xenobióticos, tales como la detoxificación de productos de la peroxidación lipídica, de los 4-hidroxi-alquenos y en la producción de leucotrieno C_4 . Como el GSH participa en reacciones de reducción y conjugación, posee una importancia vital en la protección de la célula contra el estrés oxidativo (Dale *et al.*, **2000**; Schauer *et al.*, **2004**). En el control positivo y en el grupo pretratado con oxígeno se obtuvo una disminución significativa del GSH a nivel del tejido renal lesionado. En cambio, el PreOzo preservó los niveles de GSH con valores similares estadísticamente al control sano, aspecto beneficioso para el tejido sometido a isquemia. Esto pudiera ser por el incremento de la actividad de enzimas antioxidantes, lo cual evita el consumo del GSH (**Tabla 3**). Se podría plantear la posibilidad de un mecanismo estimulador que promueva la resíntesis de este tripéptido a partir de sus mecanismos enzimáticos localizados en el citosol.

Hay que recordar que el proceso de síntesis de GSH ocurre en dos pasos en los cuales se requiere ATP. El PreOzo mejora el metabolismo del oxígeno y el aporte de ATP a la célula (Bocci, **2002**; Bocci, **2004**). Este efecto pudiera explicar también entre otros, el no consumo del GSH en los riñones postisquémicos pretratados con ozono. Estudios previos han demostrado que uno de los metabolitos que se produce en la ozonoterapia, el 4-hidroxiálquenal (Ajamieh *et al.*, **2002**), estimula a la glutatión sintasa para la síntesis del tripéptido (Ishii *et al.*, **2001**). Por otra parte, este metabolito también induce la expresión de proteínas antioxidantes del estrés oxidativo, mediante la activación del factor de transcripción Nrf2 en cultivos de macrófagos y células de la musculatura vascular (Ishii *et al.*, **2001**). Por lo que pudiéramos pensar que el PreOzo a diferentes dosis, produce niveles transitorios de 4-hidroxiálquenal, los cuales bajo nuestras condiciones pudieran preservar la síntesis del GSH y evitar su consumo durante la I/R.

Con respecto a la peroxidación lipídica, medida a través de las SRATB (Vasankavi *et al.*, **1995**), en el control positivo se detectó un aumento de las mismas, ya que a este grupo se le provocó un daño renal por I/R lo cual ocasiona un aumento de las ERO, repercutiendo este aumento en el daño de la integridad de la membrana lipídica celular. Este efecto se potencia por el incremento del metabolismo del ácido araquidónico, que a la hora de la reoxigenación y con la entrada de oxígeno a la mitocondria disfuncional, libera más radicales tóxicos que se convierten en agentes quimiotácticos de neutrófilos, cerrándose cada vez más un círculo vicioso cuya resultante es la liberación mantenida de ERO (Gobé *et al.*, **1999**). En los

grupos pretratados con ozono, a las dosis de 0,3 y 0,5 mg/kg, hay una disminución de la peroxidación lipídica con respecto al control positivo y al grupo pretratado con oxígeno, lo que demuestra una vez más el papel del PreOzo en mantener el equilibrio REDOX en órganos sometidos a I/R (Ajamieh *et al.*, **2005**), en este caso sobre riñones sometidos a isquemia de una hora seguida de 3 de reoxigenación (**Anexo 3**). Sin embargo, el PreOzo a la dosis mayor de 1,1 mg/kg mostró un incremento de la SRATB, bajo nuestras condiciones experimentales (**Tabla 3**). Esto pudiera explicarse debido a que el ozono al reaccionar con las biomoléculas crea un pequeño estrés oxidativo (Bocci, **2004**), que quizás a este nivel de dosis el tejido renal sometido a nuestras condiciones de daño por I/R no esté preparado totalmente para activar a tiempo todas las señalizaciones que se requieren para el óptimo balance REDOX celular. Es de destacar que el grupo pretratado con oxígeno mostró un aumento de la peroxidación lipídica similar al control positivo, hecho que pudiera estar relacionado con la no activación de la actividad endógena de enzimas antioxidantes por el pretratamiento con oxígeno bajo nuestras condiciones.

El ácido araquidónico representa un punto de convergencia en el mecanismo de daño renal por I/R. Es bien documentado que durante la I/R se produce, por el aumento del Ca⁺⁺ citosólico y otros factores, la activación de fosfolipasas. De ellas, la fosfolipasa A₂ (FLA₂) ((Brenner, **2000**), juega un papel fundamental en el deterioro de las funciones celulares, mediado por la degradación de fosfolípidos de membrana.

Analizando los resultados de la actividad tisular de la FLA₂, se obtuvo un incremento de ella en el control positivo, animales sometidos a daño isquémico sin tratamiento previo. En cambio el PreOzo, a los tres niveles de dosis empleados, disminuyó la actividad de la FLA₂ en el tejido renal sometido a I/R (**Tabla 4**), hecho importante que refleja el efecto del PreOzo en la preservación de la integridad de estructuras renales (membranas celulares, epitelio tubular, etc.). Estos resultados concuerdan con los descritos por otros autores, los cuales han utilizado inhibidores de FLA₂, logrando un efecto protector contra el daño isquémico en corazón, cultivos de células renales y túbulo proximal. (Brenner, **2000**).

Es de destacar que el hecho de estimular la actividad antioxidante a nivel del propio tejido lesionado, contribuye de alguna forma a la regulación de la activación de la FLA₂. Un órgano sometido a I/R, tratado previamente con una sustancia protectora contra las ERO, es de esperar que se preserve más la integridad de las membranas con respecto a este mismo órgano sometido a I/R, pero sin tratamiento previo. En el órgano protegido contra las ERO, la liberación de ácidos grasos libres va ser menor y esto sugeriría una menor activación de la FLA₂. Nuestros resultados concuerdan con otro estudio, en el cual se realizó trasplante de páncreas en ratas, sometiendo a este órgano a I/R. En este estudio se encontró un aumento significativo en tejido pancreático de la actividad de la fosfolipasa A₂ y de la concentración de lipoperóxidos, concomitante con

aumentos de tromboxano A_2 y de prostaglandina $F_{1\alpha}$. En esta investigación se aplicó una sustancia antioxidante antes de la revascularización y se observó una disminución de la actividad de la fosfolipasa A_2 y la concentración de lipoperóxidos y tromboxano A_2 , concluyéndose en este estudio que las ERO median la acción de la fosfolipasa A_2 y la subsecuente formación de derivados del ácido araquidónico en el tejido trasplantado (Campanioni *et al.*, **1995**). Si se comparan estos resultados ya reportados, con nuestros resultados, soportamos la idea de que el efecto del PreOzo sobre la actividad de enzimas antioxidantes en el propio tejido renal, produjo la regulación de la actividad tisular de la FLA $_2$, bajo nuestras condiciones, reflejándose en una disminución significativa de la actividad tisular de esta enzima en los animales que recibieron PreOzo, con respecto a los animales sometidos a I/R sin PreOzo (**Anexo 4**).

Durante la I/R se elevan, en los tejidos lesionados, los productos avanzados de la glicosilación de proteínas (PAG). Estos productos son compuestos estables y su formación es irreversible como lo es la fructosamina. Nuestro trabajo reflejó, una vez más, lo ya reportado sobre el efecto del PreOzo en la reducción de productos avanzados de la glicosilación en el riñón postisquémico (Barber *et al.*, **1999**), ahora lográndose a tres niveles de dosis y a un tiempo mayor de isquemia. Los dos niveles de dosis más efectivos fueron 0,5 y 1,1 mg/kg, con niveles renales de fructosamina similares a los animales sin daño renal e inferiores a los animales que sufrieron la isquemia de 60 min (**Tabla 4**).

En la I/R, los PAG se van depositando en las paredes de los vasos sanguíneos afectando lipoproteínas, factores de la coagulación, actividad de enzimas, siendo también capaces de activar mecanismos productores de interleucinas proinflamatorias (IL-1, IL-6 y TNF α) (Díaz *et al.*, **2004**). Todo ello conlleva a un empeoramiento de la estructura y función del órgano sometido a I/R. Estos efectos del PreOzo preservando los niveles de furctosamina, nos habla a favor de la protección de la estructura y función renal. Se piensa que con este efecto del PreOzo sobre los PAG, no se producirá; el daño a proteínas, la activación de interleucinas pro inflamatorias, la activación de factores de crecimientos, la generación de ERO (Díaz *et al.*, **2004**).

Se reporta que dentro de las interleucinas proinflamatorias, la IL-6, amplifica la inflamación, así como el número y tamaño de plaquetas durante lesiones inflamatorias sistémicas durante la I/R (Hirano, **1994**). En nuestra investigación, el control positivo mostró una amplia expresión de IL-6 a nivel de tejido renal postisquémico, con respecto a todos los grupos. Esto está dado porque la I/R se comporta como un proceso inflamatorio (Boventre and Weinberg, **2003**), donde son reclutadas células inflamatorias (neutrófilos, monocitos, macrófagos), las cuales se activan y comienzan a liberar interleucinas proinflamatorias (IL-1, IL-6 y TNF α), produciendo un deterioro ulterior del riñón postisquémico. En este estudio,

el PreOzo atenuó la expresión de IL-6 en riñones sometidos a isquemia de 60 min y 180 min de reoxigenación, hecho más evidente a la dosis de 0,5 mg/kg (**Fig. 4 B**). Pensamos que este efecto del PreOzo, sobre la expresión de IL-6 en tejido renal postisquémico, también es mediado por el papel del PreOzo sobre la estimulación endógena de enzimas antioxidantes. También se ha demostrado que durante la respuesta inflamatoria sistémica en su fase tardía existe un incremento de niveles de Interleucina 6, los cuales contribuyen al deterioro de otros órganos como los pulmones (Lespron *et al.*, **2006**; Garcia *et al.*, **2002**).

En el tejido renal lesionado, las ERO se comportan como agentes quimiotácticos, reclutando neutrófilos y macrófagos, los cuales liberan amplias cantidades de interleucinas proinflamatorias. También se ha reportado que las ERO inducen la expresión de genes de interleucinas proinflamatorias a nivel del epitelio tubular (Vielhauer *et al.*, **2001**) inflamado. Se ha documentado que el radical superóxido participa en la apoptosis de las células glomerulares inducida por el factor de necrosis tumoral alfa (TNF α) (Ozaki *et al.*, **1999**; Moreno *et al.*, **2000**). Por lo anterior expuesto cabe pensar que el PreOzo, al estimular la actividad antioxidante enzimática en el tejido renal sometido a I/R, disminuye el efecto del aumento de las ERO sobre la liberación de la interleucina proinflamatoria, en este caso la IL-6, contribuyendo el PreOzo a una menor expresión a nivel renal (glomérulo, túbulo proximal) de esta interleucina proinflamatoria (**Anexo 3**).

Se reporta que agentes que disminuyen los niveles de interleucinas proinflamatorias, como el TNF α y la IL-6, protegen al riñón contra el daño isquémico (Gould *et al.*, **2002**).

Al analizar los resultados de las pruebas de función renal, el grupo control positivo alcanzó una disminución significativa en relación al control negativo, tanto en los valores de flujo plasmático renal como los de intensidad de filtración glomerular, debido a que la isquemia ocasiona por si misma daño a las células endoteliales, entre otros aspectos ya descritos en sesiones anteriores. Además, al disminuir el flujo sanguíneo durante la isquemia y aumentarlo en la fase de la reoxigenación, se crea un flujo turbulento que entre otros aspectos aumenta las fuerzas de cizallamiento, lo que daña aún más al endotelio, creando una disfunción endotelial ya comentada anteriormente (Ramzi *et al.*, **2000**; Ichicawa *et al.*, **1994**). En relación a los grupos preconditionados con ozono a los tres niveles de dosis, estos mostraron una preservación de la función renal, con valores significativamente similares a los valores de flujo plasmático renal e intensidad de filtración glomerular de los animales sanos (**Tabla 5**). Este efecto pudiera estar dado por la influencia directa ya descrita de la ozonoterapia sobre la oxigenación de los tejidos, mejorando el metabolismo del oxígeno, incrementando los niveles del 2.3 DPG y aumentando la flexibilidad de los eritrocitos (Bocci, **2002**), con la consecuente disminución de la agregación eritrocitaria, con una menor resistencia

vascular que permite un adecuado flujo al riñón sometido a isquemia (Friman *et al.*, **1989**; Bocci *et al.*, **2006**; Bocci *et al.*, **1996**).

La fracción de filtración se define por el cociente I.F.G/F.P.R, la cual puede aumentar, bien al aumentar la I.F.G o bien al disminuir el flujo plasmático renal. Por ejemplo una disminución del F.P.R, sin cambio inicial de la I.F.G, produciría una tendencia a aumentar la fracción de filtración, lo cual elevaría la presión coloidosmótica de los capilares glomerulares y esto disminuye la I.F.G (Brenner, **2000**). En nuestros resultados, el PreOzo a diferentes niveles mantuvo valores de fracción de filtración similares a los animales sanos (**Tabla 5**), o sea el PreOzo preservó el flujo plasmático renal. Este flujo no disminuyó y por tanto se filtró una menor fracción de plasma en los capilares glomerulares, en comparación con los animales que no recibieron PreOzo. Este efecto causa una menor elevación de la presión coloidosmótica del plasma de los capilares glomerulares y por tanto un menor efecto inhibitor sobre la intensidad de filtración glomerular.

En cuanto al comportamiento de la concentración plasmática de creatinina, el grupo control positivo fue el que alcanzó valores significativamente más altos. Esto es debido al daño renal presente en estos animales. Como la creatinina es una sustancia que depende en gran medida para su excreción del filtrado glomerular, ya que no se reabsorbe y se secreta poco, cuando la I.F.G disminuye, también lo hace el de la excreción de la creatinina. Esto provoca su acumulación en los líquidos orgánicos y el ascenso de su concentración plasmática. Se observó que no hubo diferencias significativas entre el control positivo y el grupo con oxígeno,

por lo que se demuestra que el pretratamiento con oxígeno no ayudó a la recuperación de la función del órgano. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por otros autores acerca del PreOzo en la isquemia renal, pero a un tiempo inferior de 60 min (Barber *et al.*, **1999**; Hui Chen *et al.*, **2008**). En nuestras condiciones experimentales el PreOzo evitó el incremento de los niveles plasmáticos de creatinina, lo que explica que tuvo efecto positivo en la recuperación de la función renal, por los efectos anteriormente mencionados (**Tabla 5**).

No obstante pensamos también que los efectos beneficiosos del PreOzo sobre la preservación de la función renal, bajo nuestras condiciones experimentales, están mediados fundamentalmente por la estimulación de enzimas antioxidantes en el tejido renal. Por ejemplo, el ON^{*} es un derivado del endotelio que regula el tono vascular (Boventre, **2003**). Este durante la isquemia se consume por diferentes razones, una de estas es por que existe una alta liberación de O₂⁻, el cual tiene una gran afinidad por el ON^{*} (Evelson *et al.*, **2001**) removiéndolo del medio al formarse el radical peroxinitrito y empeorando la hemodinámica intrarrenal, efecto que sin duda empeora la función del riñón isquémico (Jaimes, **1998**). En nuestro estudio no se midió el ON^{*}, aunque se reporta en diferentes trabajos que el PreOzo ejerce una modulación sobre niveles tisulares del mismo, efecto estudiado en modelos de I/R hepática (Ajamieh *et al.*, **2005**; Ajamieh *et al.*, **2002**) y en un modelo de Diabetes Mellitus experimental (Al-Dalain *et al.*, **2001**). En nuestra investigación se observó, en los animales sometidos al PreOzo, una estimulación de la actividad de la SOD que conllevó a una disminución del anión superóxido y

por tanto a una menor reacción de este con el ON[•] en comparación con los animales sometidos a I/R sin PreOzo. De esta forma se preserva los niveles de ON[•] (**Anexo 3**).

Si el PreOzo, en nuestra investigación, fue capaz de estimular la actividad endógena de la SOD, sin duda este efecto contribuyó a la preservación de la función renal. Por una parte se reducen los niveles del radical anión superóxido (considerado en estos momentos como un vasoconstrictor) en comparación a los animales sometidos a I/R sin PreOzo y por otra aumentaría la biodisponibilidad del ON[•] en el tejido renal postisquémico (López-Espada *et al.*, **2005**).

De las ERO, las más implicadas en el daño renal isquémico son el O₂^{•-}, el H₂O₂ y el radical HO[•] (Ichikawa *et al.*, **1994**), por lo que se deduce que en la I/R renal, las enzimas SOD, CAT y GSH-Px son las que protegen al riñón del insulto isquémico. En nuestro estudio el PreOzo fue capaz de activar la respuesta antioxidante, efecto que repercutió favorablemente en la preservación de la función renal. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por otros investigadores, los cuales administraron allopurinol (bloqueador de la XOD y secuestrador de radical hidroxilo) y deferoxamina (inhibidor de la reacción de Fenton), logrando disminución de las ERO y preservación de la función renal de riñones sometidos a isquemia. (McCord *et al.*, **1985**).

En cuanto a los resultados histológicos, los nuestros concuerdan con los ya enunciado en la literatura, sobre el efecto del PreOzo en órganos sometidos a I/R (Barber, **1999**; Hui Chen, **2008**; Peralta, **2000**; Ajamieh, **2005**). En nuestro trabajo

los riñones fueron sometidos a un tiempo mayor de isquemia (60 min) a lo ya reportado anteriormente. Los riñones pertenecientes al control positivo y al grupo pretratado con oxígeno mostraron daño severo de su estructura, evidenciándose marcadores de daño renal inducidos por I/R como: pérdida del borde en cepillo de los túbulos proximales, dilatación tubular, necrosis de las células de los túbulos proximales, formación de cilindros en la luz tubular, interrupción y/o borramiento de las membranas basales tubulares, así como borramiento del espacio de Bowman de los glomérulos renales. El PreOzo fue capaz de atenuar estos cambios estructurales observándose una recuperación de la morfología renal en la muestras de animales tratados con ozono previo a la inducción del daño, con un efecto dosis dependiente, es decir desde el punto de cualitativo la dosis de 1.1mg/kg, preserv [Figura 5 (A, B, C y D)]. A nuestro criterio es válido plantear que el borde en cepillo a nivel de las células de los tubulos proximales fue preservado en gran medida en los animales que llevaron PreOzo, esto tiene una repercusión en los resultados funcionales ya que como se planteó en párrafos anteriores durante la I/R renal se produce una serie de eventos que van desde el daño al citoesqueleto, pérdida de la polaridad celular, daño a microvellosidades, alteraciones de los diferentes transportes a nivel de las membranas apical y basolaterales de células tubulares hasta la descamación celular con obstrucción de la luz tubular, podemos pensar que el efecto del PreOzo sobre la integridad de la estructura de la celula tubular, se traduciría en un mejor funcionamiento de la misma, contribuyendo de esta forma a mantener el equilibrio de la función entre

las diferentes partes de la nefrona (tubulo-glomérulo) después del daño causado por I/R.

Es de destacar en el estudio morfométrico (cuantitativo), que los animales que llevaron PreOzo, mostraron de forma significativa una menor presencia en la cantidad de núcleos en la luz tubular, una menor área, así como un menor perímetro tubular en comparación a los animales dañados sin preconditionamiento (**Fig 6,7, 8 y Anexo 6**). Este aspecto también se correlaciona con el comportamiento de la I.F.G en los animales sometidos al PreOzo, ya que la presencia de núcleos en la luz tubular, incrementa la presión hidrostática de la capsula de Bowman disminuyendo de esta forma la I.F.G (**Tabla 5**).

El PreOzo mediante sus efectos de estimular la actividad de las enzimas antioxidantes, preservar los niveles tisulares de productos avanzados de la glicosilación, su efecto estabilizador de la fosfolipasa A₂ a nivel tisular y de disminuir la expresión de IL-6 a nivel del riñón postisquémico, conllevó a una mejor preparación del tejido renal para soportar el evento de I/R, bajo nuestras condiciones experimentales. Pensamos que la dosis de 0,5 mg/kg es la óptima ya que no incrementó la peroxidación lipídica (SRATB) y desde el punto de vista de la inmunohistoquímica, mostró un mejor efecto sobre la expresión de interleucina 6 a nivel de tejido renal postisquémico en comparación con la dosis de 1,1 mg/kg.

5. CONCLUSIONES.

1. El PreOzo a los niveles de dosis empleados, no ejerció ningún efecto sobre pruebas de función renal y estructura de riñones sanos, reflejando la no toxicidad de los 3 niveles de dosis empleados.
2. El PreOzo mostró un efecto protector en la preservación de pruebas de función renal en riñones postisquémicos, evitando la caída de los niveles de flujo plasmático renal e intensidad de filtración glomerular presente en los procesos de isquemia reperfusión.
3. El PreOzo ejerció un efecto modulador en la actividad a nivel renal de variables indicadoras del estrés oxidativo en riñones postisquémicos, evidenciando que gran parte de su efecto nefroprotector se debe a la hemostasis redox alcanzado con esta terapéutica.
4. El PreOzo atenuó la expresión renal de interleucina 6 en riñones postisquémicos, aspecto novedoso que refleja el alcance de esta terapéutica en la regulación de esta interleucina proinflamatoria presente en los fenómenos de isquemia reperfusión, así como en los procesos inflamatorios sistémicos.
5. El nivel de dosis de PreOzo más efectiva fue la de 0,5 mg/kg, aunque las 3 dosis reflejaron un efecto beneficioso en la prevención del daño morfofuncional de riñones sometidos a isquemia reperfusión.

5.1. RECOMENDACIONES.

1. Estudiar en este modelo el efecto del PreOzo sobre otras interleucinas proinflamatorias como la IL-1, TNF α e IL-8.
2. Evaluar la duración del efecto protector inducido por el PreOzo en la I/R renal en un modelo de trasplante renal donde se puedan valorar además el efecto del PreOzo sobre la apoptosis a nivel renal.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.

Agarwal A, Balla J, Balla G, Croatt A, Vercellotti G, Nath K **(2001)**. Renal Tubular epithelial cells mimic endothelial cells upon exposure to oxidised LDL. **Am J Physiol** 271:F814-F823.

Ajamieh HH, Berlanga J, Merino N, Sánchez G, Carmona A, Menéndez-Cepero S, Giuliani A, Re L, León OS **(2005)**. Role of protein synthesis in the protection conferred by ozone-oxidative-preconditioning in hepatic ischaemia/reperfusion. **Transpl Int** 18 (5):604-612.

Ajamieh HH, Merino N, Candelario-Jalil E, Menéndez S, Martínez-Sánchez G, Re L, Giuliani A, León OS **(2002)**. Similar protective effects of ischaemic and ozone oxidative preconditioning in liver ischaemia/reperfusion injury. **Pharmacol Res** 45(4):333-339.

Al-Dalain SM, Martínez G, Candelario-Jalil E, Menéndez S, Re L, Giuliani A, León OS **(2001)**. Ozone treatment reduces markers of oxidative and endothelial damage in an experimental diabetes model in rats. **Pharmacol Res** 44:391-396.

Annuk M, Fellstrom B, Akerblom O, Zilmer K, Vihalemm T, Zilmer M **(2001)**. Oxidative stress markers in pre-uremic patients. **Clin Nephrol** 56(4):308-314.

Arruzazabala ML, Noa M, Menéndez S, Gómez M **(1989)**. Efecto del ozono sobre

los metabolitos del ácido araquidónico en pulmón aislado de curiel. **Rev CENIC Ciencias Biológicas** 20 (1-2-3):8-10.

Barber E, Menéndez S, León OS, Barber MO, Merino N, Calunga JL, Cruz E, Bocci V (1999). Prevention of renal injury after induction of ozone tolerance in rats submitted to warm ischaemia. **Mediat Inflamm** 8:37-41.

Barrouillet M, Moiret A, Cambar J (1999). Protective effects of polyphenols against cadmium-induced glomerular mesangial cell myocontracture. **Arch Toxicol** 73:485-488.

Basabe E, Menéndez S, Segarra F, Ponce de León M (1995). Ozone therapy like a favoring element in the rehabilitation of children with hearing loss. Proceedings 12th World Congress of the Int Ozone Association. **Ozone in Medicine, Lille, France**, 275-278.

Basile DP, Donohoe D (2001). Renal ischemic injury results in permanent damage to peritubular capillaries and influences long-term function. **Am J Physiol Renal Physiol** 281:F887-F889.

Berry C, Hamilton C, Brosnan M, Magill F, Berg G, McMurray J, Diminiczak A (2000). Investigation into the sources of superoxide in human blood vessels: angiotensin II increases superoxide production in human internal mammary arteries. **Circulation** 101:2206-2212.

Berry C, Hamilton C, Brosnan M, Magill F, Berg G, McMurray J, Diminiczak A (2000). Investigation into the sources of superoxide in human blood vessels:

angiotensin II increases superoxide production in human internal mammary arteries. **Circulation** 101:2206-2212.

Berté F, Vairetti M, Richelmi P (1990). Ozono: Problemi tossicologici con particolare riguardo alla formazione di radicali liberi. Cong. Naz. Soc. **Ossigeno-Ozono Terapia, Punta Ala** (Gr), p 1-6.

Beutler E, Duron O, Mikus B (2004). Improved method for the determination of blood glutathione. **J Lab Clin Med** 16:882-888.

Bocci V (1994). A reasonable approach for the treatment of HIV infection in the early phase with ozonotherapy (autohemotherapy). How "inflammatory" cytokins may have a therapeutic role? **Mediat Inflamm** 3, 315-321.

Bocci V (1994a). Autohemotherapy after treatment of blood with ozone. A Reappraisal. **J Intern Med Res** 22 131-144.

Bocci V (1997). Ozone as a biorregulator: Pharmacology and toxicology of ozonotherapy today. **J Biol Regul Homeost Agents** 10:31-53.

Bocci V (2002). Oxygen–Ozone Therapy. A critical evaluation. **Kluwer Academic Publishers**. AH Dordrecht. The Netherlands.

Bocci V (2006). Scientific and medical aspects of ozone therapy. State of the art. **Arch Med Res** 37:425-435.

Bolli R (2000). The late phase of preconditioning. **Circ Res** 87:972–983.

Borrego A, Zamora ZB, González R, Romay Ch, Menéndez S, Hernández F,

Montero T, Rojas E (2004). Protection by ozone preconditioning is mediated by the antioxidant system in cisplatin-induced nephrotoxicity in rats. **Mediat Inflamm** 13(1):13-19.

Boventre JV, Weinberg J (2003). Recent Advances in the pathophysiology of Ischemic Acute Renal Failure. **J Am Soc Nephrol** 14: 2199-2210.

Brady HR (1994). Leukocyte adhesion molecules and kidney diseases. **Kidney Int** 45:1285-1295.

Bratton AC, Marshall EK (1939). A new coupling component for sulfanilamide determination. **J Biol Chem** 128:537-544.

Brawn MK, Fridovich I (1985). Increased superoxide radical formation evokes inducible DNA repair in Escherichia coli. **J Biol Chem** 260:922-925.

Brenner BM (2000). The Kidney. EU. Ed **WE Saunders Company**, 6^{ta} Ed T1, 1201-1215.

Brot J (1948). The renal clearance endogenous creatinine in man. **J Clin Invest** 27:645-654.

Caballero ME, Calunga JL, Barber E, Cruz E, López Saura P, Boux E (2000). Epidermal growth factor- mediated prevencion of renal ischemia/reperfusion injury. **Biotec AP** 17:161-165.

Calunga JL, Bello M, Chaple M, Barber E, Menéndez S, Merino N. Ozonoterapia en la glomerulonefritis tóxica experimental por adriamicina. **Rev Cub Invest Biomed** 23(3):139-143.

Campanioni M (1995). Acido araquidónico y radicales libres: Su relación con el proceso inflamatorio. **Rev Cub Invest Biomed** 14(1):66-74.

Candelario-Jalil E, Mohammed-Al-Dalain S, Fernández OS, Menéndez S, Pérez-Davison G, Merino N, Sam S, Ajamieh HH (2001). Oxidative preconditioning affords protection against carbon tetrachloride-induced glycogen depletion and oxidative stress in rats. **J Appl Toxicol** 21:297-301.

Carini R, Albano E (2003). Recent insights on the mechanisms of liver preconditioning. **Gastroenterology** 125:1480–1491.

Carpendale MT, Freeberg J, Griffiss JM (1993). Does ozone alleviate AIDS diarrhea? **J Clinic Gastroenterol** 17:142-145.

Carpendale MT, Griffins J (1993a). Is there a role for medical ozone in the treatment of HIV and associated infections. Proceeding Eleventh Ozone World Congress. **Ozone in Medicine. San Francisco, USA**, p. M-1-32 to M-1-46.

Castillo R, Huerta P, Rodrigo R (2003). Estrés oxidativo y daño renal. **CIMEL**; 8(1): 43–52.

Céspedes ME, Rodríguez JC, Campanioni M (1996). Enzimas que participan como barreras fisiológicas para eliminar los radicales libres: Catalasa. **Rev Cubana Invest Biomed** 15:39-47.

Cochrane J, Williams BT, Banerjee A, Harken AH, Burke TJ, Cairns CB, Chapiro JI (1999). Ischemic preconditioning attenuates functional, metabolic and morphologic injury from ischemic renal failure in the rat. **Renal Failure** 21:135-145.

Cohen MV, Baines CP, Downey JM (2000). Ischemic preconditioning from adenosine receptor to KATP channel. **Ann Rev Physiol** 62:79–109.

Cross CE, Reznick AZ, Packer L, Davis PA, Suzuki YJ, Halliwell B (1992). Oxidative damage to human plasma proteins by ozone. **Free Rad Res Commun** 15:347-352.

Cuttle L, Zhang XY, Endre Z, Winterford C, Gobé G (2001). Bcl-X1 translocation in renal tubular epithelial cells *in vitro* protects distal cells from oxidative stress. **Kidney Int** 59:1779-1784.

Dale A, Dickinson, Rui-Miang L, Karen EI, Henry JF (2000). Signalling for the synthesis of glutathione. In: Free Radical in **Chem Biol and Med**; 33:67-74.

Denton MD, Chertow GM, Brady HR (1996). "Renal-dose" dopamine for the treatment of acute renal failure: scientific rationale, experimental studies and clinical trials. **Kidney Int** 50: 4-14.

Díaz F (2004). Aspectos moleculares del daño tisular inducido por la hiperglicemia crónica: **Gac Med Mex** 140(4).

Dirnagl U, Iadecola C, Moskowitz MA (1999). Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. **Trends Neurosci** 22:391-397.

Doberenz DT (2005). Prevención y Manejo del Fallo Renal Agudo en Cuidados Críticos, Emergencias, Riñón, Sangre y Hemoderivados. Curso de Formación Continuada en Anestesiología, Reanimación y Terapéutica del Dolor, de la Fundación Europea de Enseñanza en Anestesiología. Editado por Ramón Peyró García, **Comp Hosp. Univ de Albacete, España** p. 119-154.

Durak I, Akyol D, Basesme E (1994). Reduced erythrocytes defense mechanism against free radical toxicity in patients with chronical renal failure. **Nephron** 66:76-80.

Evelson P, Travacio M, Repetto M, Escobar J, Lesuy S, Lissi E (2001). Evaluation of total reactive antioxidant potential (TRAP) of tissue homogenates and their cytosols. **Arch Biochem Biophys** 388:261-266.

Faraji B (1997). Methods compared for determining glutathione peroxidase activity in blood. **Clin Chem** 33:539-543.

Fernández Alvarez E, Hernández Fernández C, Del Cañizo López JF **(2008)**.
Precondicionamiento farmacológico con sildenafil del riñón con isquemia
normotérmica. **Actas Urol Esp** 32(1):67-74.

Frank RS, Frank ST, Zelenok GB, D'Alecy LG (1993). Ischemia with intermittent reperfusion reduces functional and morphologic damage following renal ischemia in the rat. **Ann Vasc Surg** 7:1505-1511.

Friman M, Walter D, Eng L, Menéndez S, Gómez M. (1989). Efecto del ozono en las células endoteliales circulante en ratas. **Rev CENIC Ciencias Biol** 20(1-2-3):25-28.

Gabrielson EW, Yu XY, Spannhake WE (1994). Comparison of the toxic effects of hydrogen peroxide and O₃ on cultured human bronchial epithelial cells. **Env Health Perspective** 102:972-974.

Galle J, Heermeier K, Wanner C (1999). Atherogenic lipoproteins, oxidative stress and cell death. **Kidney Int** 56(Suppl 71):S62-S65.

Gerschman R, Gilbert D, Nye SW, Dwyer P, Fenn WO (1954). Oxygen poisoning and X-irradiation: a mechanism in common. **Science** 19:623-926.

Giamalva D; Church DF; Pryor WA (1985). A comparison of the rates of ozonation of biological antioxidants and oleate and linoleate esters. **Biochem Biophys Res Commun** 133:773–779.

Gobé G, Willgoss D, Hogg N, Schoch E, Endre Z (1999). Cell survival or death after ischemia-reperfusion injury. **Kidney Int** 56:1299-1308.

Goul SE, Day M, Jones SS (2002). BMP-7 regulates chemokine, cytokine, and hemodynamic gene expression in proximal tubule cell. **Kidney Int** .61:51-60.

Grace PA (1994). Ischaemia- Reperfusion injury. **British Journal of Surgery** 81:637-647.

Gwinner W, Deters-Evers U, Brandes RP, Kubat B, Koch KM, Pape M, Olbricht CJ (1998). Antioxidant-oxidant balance in the glomerulus and proximal tubule of the rat kidney. **J Physiol** 509:599-606.

Hahn S, Krieg RJ, Hisano S, Kuemmerle NB, Saborio P, Chan JC (1998). Vitamin E suppresses oxidative stress and glomerulosclerosis in rat remnant kidney. **Pediatr Nephrol** 13:195-198.

Halliwell B, Cross CE (1994). Oxygen Derived Species: Their relation to human disease and environmental stress. **Environ Health Perspect** 102(Suppl 10):5-12.

Hamer I, Wattiaux R, Wattiaux-De Coninck S (1995). Deleterious effects of xanthine oxidase on rat liver endothelial cells after ischemia/reperfusion. **Biochim Biophys Acta** 1269:145-152.

Hammerman MR, Safirstein R, Harris RC, Toback G, Humes D (2000). Acute renal failure. The role of growth factors in the process of renal regeneration and repair. **Am J Physiol** 279:3- 11.

Hannken T, Schroeder R, Stahl R, Wolf G (1998). Angiotensin II-mediated

expression of p27Kip1 and induction of cellular hypertrophy in renal tubular cells depend on the generation of oxygen radicals. **Kidney Int** 54:1923-1933.

Hepstintall RH (1980). Anatomía. En Hebstintall RH, ed. Patología del Riñón. 2 ed. Barcelona: Salvat Editores. p. 171.

Hernandez F, Menéndez S, Gómez M, Eng L. (1989). Efecto de la ozonoterapia intravascular sobre el sistema de la glutatión peroxidasa. **Rev CENIC Ciencias Biol** 20:37-41.

Hernández F (1993). La ozonoterapia y la peroxidación de lípidos. Relaciones y efectos en la aterosclerosis. **Rev CENIC Ciencias Biol** 24(3):25.

Hirano T (1994). Interleukin 6 in the Citokine Handbook, 2nd ed. **Academic Press, New York, USA**. p.145.

Hirashima Y, Mills JS, Yates AJ, and Horrocks LA: (1990). Phospholipase A₂ activities with a plasmalogen substrate in brain and in neural tumor cells: A sensitive and specific assay using pyrenesulfonyl-labeled plasmenylethanolamine. **Biochim Biophys Acta** 1047:35.

Hui Chen, Bianzhi X, Xiuheng L, Jiangqiao (2008). Ozone oxidative preconditioning inhibits inflammation and apoptosis in a rat model of renal ischemia/reperfusion injury. **Eur J Pharmacol** 581:306-314.

Ichicawa I, Kiyama S, Yoshioka T (1994). Renal antioxidant enzymes: Their regulation and function. **Kidney Int** 45(1):1-9.

Ishibashi N, Weisbrot- Lef Kowitz M **(1999)**. Modulation of chemokine expression during ischemia/reperfusion in transgenic mice over producing human glutathione peroxidases. **J Immunol** 163:5666-5677.

Ishibashi N, Weisbrot-Lefkowitz M, Reuhl K, Inouye M **(1999)**. Modulation of chemokine expression during ischemia/reperfusion in transgenic mice overproducing human glutathione peroxidases. **J Immunol** 163:5666-5677.

Jaimes E, Galceran J, Rajj L **(1998)**. Angiotensin II induces superoxide anion production by mesangial cells. **Kidney Int** 54:775-784.

Jounberg J (1999). Mechanisms of ischemic preconditioning and clinical implications for multiorgan ischemic-reperfusion injury. **J Cardithor Vasc An** 13:78-91.

Kinter M, Wolstenholme J, Thornhill B, Newton E, McCormick M, Chevalier R **(1999)**. Unilateral ureteral obstruction impairs renal antioxidant enzyme activation during sodium depletion. **Kidney Int** 55:1327-1334.

Kirton O (1999). Ischemia-reperfusion injury in the critically ill: A progenitor of multiple organ failure. **New Horizons** 7 (1):87-94.

Klahr S (1997). Oxygen radicals and renal diseases. **Miner Electrolyte Metab.** 23:140-143. 8

Klausner JM, Patterson IS, Goldman G, Kobzik L, Rodzen C, Lawrence JM

(1989). Postischemic renal injury is mediated by neutrophils and leukotrienes. **Am J Physiol** 256:794-802.

Ladefoget S, Andersen C (1994). Calcium channel blockers in kidney transplantation. **Clin Transplant** 8:128-133.

Lee HS, Kim YS (1998). Identification of oxidized low density lipoprotein in human renal biopsy. **Kidney Int** 54:848-856.

León OS, Menéndez S, Merino N, Castillo R, Sam S, Pérez L, Cruz E, Bocci V (1998). Ozone oxidative preconditioning: a protection against cellular damage by free radicals. **Med Inflamm** 7:289-294.

León OS, Menéndez S, Merino N, López R, Castillo R, Sam S, Pérez L, Cruz E, Joseph F, Fernández A (1998) Influencia del preconditionamiento oxidativo con ozono sobre los niveles de calcio. **Rev CENIC Ciencias Biol** 29(3):134-136.

Lettieri B, Chiefari M, Vicario C (1991). Cardiopatie ischemiche ed ozono terapia. **Giornate Meridionali di Ossigeno-Ozonoterapia**. p .6-11.

Lespron MC (2006). Respuesta Inflamatoria Sistémica en Cirugía Cardíaca Pediátrica. **Arch Cardiol México** 76(Spl 2):92-99.

Lipton P (1999). Ischemic cell death in brain neurons. **Physiol Rev** 79:1431–1568.

Lledó GE, Rodríguez Martínez D, Cabello Benavente R, Dulín Elena, García Bordas J (2008). Modificaciones de los mediadores inflamatorios en la isquemia –

reperfusión intestinal en un modelo de Diabetes Mellitus tipo II. **Cirugía Española** 71(6):67-74.

Lowry OH, Rocebrogh NI, Farr AL, Randall RI (1951). Protein measurement with the folin fenol reagent. **J Biol Chem** 193:165-175.

Luongo C, Sammartino A, Vicario C, Portolano F, Coppola L (1991). L'ozono nelle arteriopatie croniche ostruttive. **Giornate Meridionali di Ossigeno-Ozonoterapia**. p. 4-6.

Martínez G, García I, León OS, Bilbao T, Ledesma L, Gil L Pérez G (2004). Balance Antioxidante/Prooxidante: Salud Enfermedad. 1ra Edición. **Palcograf. Palacio de las Convenciones: La Habana, Cuba**.

McCord JM (1985). Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury. **N Engl J Med** 312:159-165.

McCord JM, Fridovich I (1969). Superoxide dismutase. An enzymatic function for rythrocuprein (hemocuprein). **J Biol Chem** 25: 6049-6055.

McKinney WJ, Jaskot R H, Richards JH, Costa DL, Dreher KL (1998). Cytokine mediation of ozone-induced pulmonary adaptation. **Am J Respir Cell Mol Biol** 18:696–705.

Menéndez S, Iglesias O, Bidot C, Puga A, Carballo A (1995). Application of ozone therapy in children with humoral immunity deficiency. Proceedings 12th World Congress of the Internathional Ozone Association. **Ozone in Medicine. Lille, France**, 221-274.

Miller S., Martin D., Kissani J., Hammernan M (1992). Insulin-like growth factor I accelerates recovery from ischemic acute tubular necrosis in the rat. **Proc Natl Acad Sci USA** 89:11876-11880.

Minami M, Yoshikawa H (1979). A simplified assay method of superoxide dismutase activity for clinical use. **Clin Chim Acta** 92:337.

Molitoris B., Finn W (2001). Acute Renal Failure. A companion to Brenner & Rectors. **The Kidney, USA**, Ed Saunders.

Molitoris BA (1993). Cellular basis of ischemic acute renal failure. In Lazarus JM, Brenner BM (Eds): Acute Renal Failure, 3rd ed. **Churchill-Livingstone, New York**, p 1-7.

Molitoris BA, Schrier RW (1986). Etiología, patogenia y tratamiento de la insuficiencia renal. In Wash PC, Gittes JE, Perlmutter BJ, Stamey CA, eds. Campbell Urología. 5 ed. Philadelphia: **Editorial Médica Panamericana**; 251:128-135.

Molitoris BA (1991). Ischemia-induced loss of epithelial polarity: Potential role of the actin cytoskeleton. **Am J Physiol** 260:F 769-F 775.

Moreno-Manzano V, Ishikawa Y, Lucio-Czana J, Kitamura M (2000). Selective involvement of superoxide anion, but not downstream compounds hydrogen peroxide and peroxynitrite, in tumor necrosis factor-induced apoptosis of rat

mesangial cells. **J Biol Chem** 275:12684-12691.

Mubagwa K, Flameng W (2001). Adenosine, adenosine receptors and myocardial protection: an updated overview. **Cardiovasc Res** 52:25–39.

Murphy ME, Sies H (1991). Reversible conversión of nitroxy anion to nitric oxide by superoxide dismutase. **Biochemistry** 88:10860-10864.

Murry CE, Richard VJ, Reimer KA, Jennings RB (1990). Ischemic preconditioning slows energy metabolism and delays ultrastructural damage during a sustaines ischemic episode. **Circ Res** 66:913-931.

Murry CE, Tennings RB, Reimer KA (1986). Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. **Circulation** 74:1124-1136.

Myles P., Buckland M., Schenk N (1993). Effect of "renal dose" dopamine on renal function following cardiac sugery. **Anaesth Intensive Care** 21:56-61.

Nakhoul F, Better O (1995). Acute Renal Failure following massive mannitol infusion and enalapril treatment. **Clinical Nephrology** 44:118-124.

Novic AC, Stroom SB (1997). Surgery of the kidney.In Walsh PC, Retik AB, Vaughan ED, Wein AJ. Eds. Campbell's. Urology. 7 ed. **Philadelphia: WB Saunders.** p. 301-732

O'Neill CA, Van der Vliet A, Hu ML, Kaur H, Cross CE, Lovie S, Halliwell (1993). Oxidation of biologic molecules by ozone: The effect of pH. **J Lab Clin Med** 122:497-505

Ohkawa H, Orichi N, Yagi K (1979). Assay for lipid peroxidation animal an tissues by thiobarbituric acid reaction. **Anal Biochem** 95:351-358.

Oser BL (1965). Biuret test for protein determination. In: Hawks ed. Physiological Chemistry. **New York, USA:MacGraw-Hill**. p 179-184.

Ou Z, Notiri Y, Natori Y (1999). Gene expression of CC chemokines in experimental acute tubulointerstitial nephritis. **J Lab Clin Med** 133:41-47.

Ouriel K, Smedine NG, Ricotta JJ (1985). Protection of the kidney after temporary ischemia: free radical scavengers. **J Vasc Surg** 2: 4953-4959.

Ozaki M, Yamada Y, Matoba K, Otani H, Mune M, Yukawa S, Sakamoto W. (1999). Phospholipase A₂ activity in ox-LDL-stimulated mesangial cells and modulation by alpha- tocopherol. **Kidney Int** 56(Suppl 71):S171-S173.

Paller MS (1993). Effect of neutrophil depletion on ischemia renal injury in the rat. **J Lab Clin Med** 11(3):379-386.

Peralta C, León OS, Xaus C, Bartrons R Gelpi E, Roselló-Catafau J (2000). Effect ozone treatment on reactive oxygen species and adenosine production during hepatic ischemica-reperfusion. **Free Rad Res** 33:595-605.

Peralta C, León OS, Xaus C, Prats N, Jalil EC, Sala-Planell E, Puig-Parellada P, Gelpi E, Roselló-Catafau J (1999). Protective effect of ozone treatment on the injury associated with hepatic ischemia-reperfusion: Antioxidant-Proxidant balance. **Free Rad Res** 31:191-196.

Pollock D, Opgenorth T **(1992)**. Beneficial effect of the ANP analog on recovery from ischemic acute renal failure. **Renal Fail** 14:141-146.

Portilla D, Shah SV, Lehman PA, Creer MH **(1994)**. Role of cytosolic calcium-independent phospholipase A₂ in hypoxic injury to rabbit proximal tubules. **J Clin Invest** 93:1609-1618.

Prior WA, Uppu RM. **(1993)**. A kinetic model for competitive reactions of ozone with amino acid residues in proteins in reverse micelles. **J Biol Chem** 268:3120-3127.

Pryor WA (1994). Mechanisms of radical formation from reaction of ozone with target molecules in the lung. **Free Rad Biol Med** 17:451-465.

Quiñones M, Menéndez S, Gómez M, Díaz W, Eng L, Vecino C **(1989)**. Ozonoterapia en el tratamiento de las úlceras de miembros inferiores causadas por insuficiencia venosa crónica. **Rev CENIC Ciencias Biol** 20(1-2-3):76-80.

Raduany F, Lobo de Araujo A **(1987)**. Determination of phospholipase A₂ activity by colorimetric assay using pH indicator. **Toxicol** 25(11):1181-1188.

Ramzi S, Vinay F, Tucker C **(2000)**. Patología estructural y funcional. **Ed. Mac Graw-Hill Interamericana: España**. p. 1011-1012.

Rasband W (2008). Image: A public domain Java image processing program. National Institute of Mental Health, Bethesda, Maryland, USA.

<http://rsb.info.nih.gov/ij/>.

Rice EC, Diplock AT (1991). Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology. In: Burtin RH, Knippenberg PH, editors. Techniques in free radical research. **Amsterdam:Elsevier.** p. 199-201.

Rodríguez Puyol D, Lucio J, Ruiz P, López Ongil S, Iglesias MC, Ruiz Ginés JA, Torrecilla G, Rodríguez Puyol M (1996). Radicales libres y daño glomerular. **Nefrología XVI (S3):29-34.**

Romero A, Blanco R, Menéndez S, Gómez M, Ley J (1993). Atherosclerosis obliterans and ozone therapy. Its administration by different routes. **Angiologia 45:177-179.**

Romero A, Menéndez S, Gómez M, Ley J (1993a). Ozone therapy in the advanced stages of arteriosclerosis obliterans. **Angiologia 45:146-148.**

Rossi F (1986). The superoxide forming NADPH oxidase of phagocytes: nature, mechanisms of activation and function. **Biochem Biophys 853:65-89.**

Sandau K, Pfeilschifter J, Brüne B. (1997). Nitric oxide and superoxide induced p53 and Bax accumulation during mesangial cell apoptosis. **Kidney Int 52:378-386.**

Schauer RJ, Kalmuk S, Gerbes AL, Leiderer E, Meissner, Schildberg FW, Messmer K, Schneeberger H, Illner WD, Abendroth D (1968). First clinical experiences with superoxide dismutase in kidney transplantation. Results of a double-blind randomized study. **Transplant Proc 21:1245-1251.**

Schreiner G (1950). Determination of inulin by means resorcinol. **Proc Soc Exp Biol Med** 74(1):117-120.

Schulz R, Cohen MV, Behrends M, Downey JM, Heusch G (2001). Signal transduction of ischemic preconditioning. **Cardiovasc Res** 52:181-198.

Selzner N, Rudiger H, Graf R; Clavien PA (2003). Protective strategies against ischemic injury of the Liver. **Gastroenterology** 125:917-936.

Sharma R, Khanna A, Sharma M, Savin V (2000). Transforming growth factor- β 1 increases albumin permeability of isolated rat glomeruli via hydroxyl radicals. **Kidney Int** 58:131-136.

Smith HW, Tinkelstin N (1945). The renal clearance of substitute hipuric acid derivative and other aromatics acids in dog and man. **J Clin Invest** 24:380-88.

Solomon R, Werner C, Mann D, D'Elia J, Silva P (1994). Effects of saline, mannitol and furosemide on acute decrease in renal function induced by radiocontrast agents. **N Engl J Med** 331:1416-1420.

Squadrito GL, Pryor WA (1998). Oxidative chemistry of nitric oxide: the roles of superoxide, peroxynitrite and carbon dioxide. **Free Rad Biol Med** 25:392-403.

Stitt A, Gardiner TA (2002). The AGE inhibitor pyridoxamine inhibits development of retinopathy in experimental diabetes. **Diabetes** 51(9):2826-2832.

Thadhani R, Pasqual M, Bonventre JV (1996). Medical progress-acute renal failure. **N Engl J Med** 334:1448-1460.

Thome J, Munch G, Miller R (1996). Advanced glycation end products-associated parameters in the peripheral TAU blood of patients with Alzheimer's disease. **LJ/t Sd** 59:679-685.

Thornalley P (1998). Cell activation by glycated protein AGE receptors, receptor recognition factors and functional classification of AGES. **Cell Mol Biol** 44:1013-1023.

Torres A, Conde C, Martín M, González J.A (2001). Prevención del daño renal tras isquemia aguda mediante la administración de PGE₁. Estudio morfométrico. **ANGIOLOGÍA** 53(6):381-392.

Van Der Zee J, Tijssen C (1987). The influence of the ozone in human red cell. Comparison with other mechanism of oxidative stress. **Biochem Biophys Acta** 924:11-18.

Vasankavi T (1995). Measurement of serum lipid peroxidation during exercise using three methods: diene conjugation, thiobarbituric acid reactive material and fluorescent chromolipids. **Clin Chem Acta** 234:63-69.

Viebahn R (1994). The use of ozone in medicine. **2nd Rev. Haugh Pub ed; Germany** p. 22, 24, 71.

Vielhauer V, Anders H, Mack M, Cihak J, Strutz F et al (2001). Obstructive nephropathy in the mouse: progressive fibrosis correlates with tubule interstitial chemokine expression and accumulation of CC chemokine receptor 2- and 5-positive leukocytes. **J Am Soc Nephrol** 2:1173-1187.

Weinberg JM (1991). The cell biology of ischemic renal injury. **Kidney Int** 39:476-482.

Yamamoto M, Mann GE, Ishii T, Itoh K, Ruíz E, Bannai S (2001). Hidroxynonenal induces expresión of antioxidant stress proteins via the transcription factor Nrf2 in cultured murine macrophages and vascular smooth muscle cell: lack of heme oxygenase-1, peroxiredoxin 1 and A 170 induction in nrf2-knockout mice. **J Physiol** 531:9-16.

Yellon DM, Dana A (2000). The preconditioning phenomenon. A tool for the scientist or a clinical reality? **Circ Res** 87:543-550.

Yoshikawa T, Toyokuni S, Yamamoto Y, Naito Y (2000). Free radical in chemistry, biology and medicine. **OICA International (UK) Limited, London, England. First edition.**

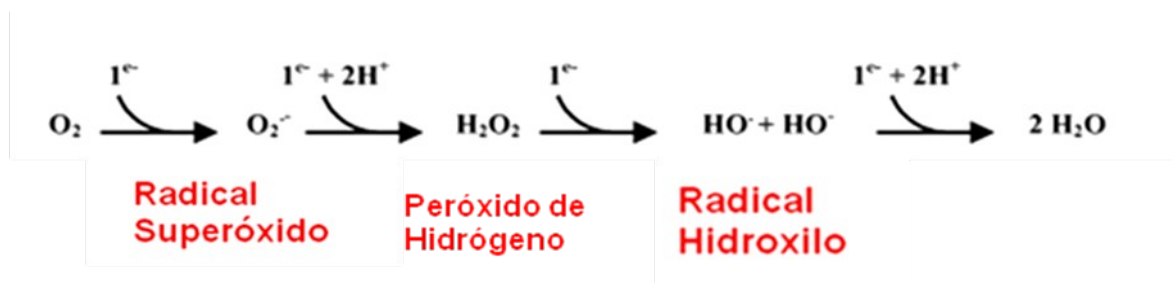
Zamora Z, Borrego A, Orlay Y, Delgado R, González R (2005). Effects of ozone oxidative preconditioning on TNFalfa release and antioxidant prooxidant intracellular balance in mice during endotoxic shock. **Mediat Inflamm** 1:16–22.

ANEXOS

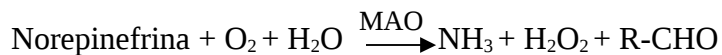
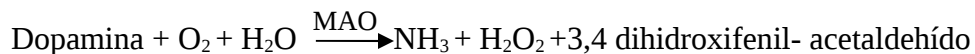
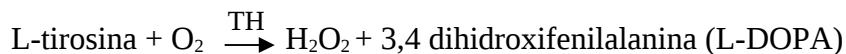
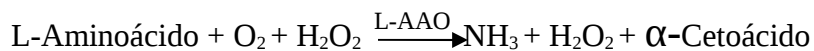
Anexo 1

Procesos generadores de especies reactivas del oxígeno (ERO)

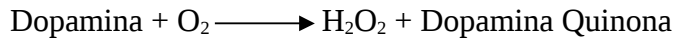
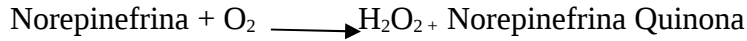
1-Reducción de O₂ molecular hasta H₂O durante el transporte electrónico mitocondrial.



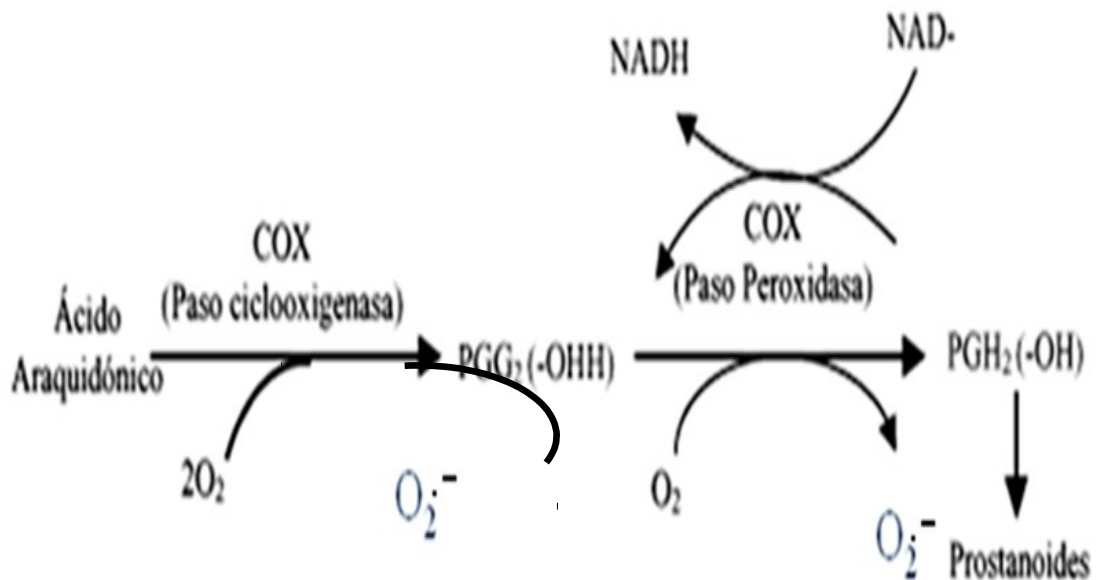
2-Reacciones catalizadas por la hidroxilasa (TH) y la L-aminoácido oxidasa (L-AAO) productora de H₂O₂



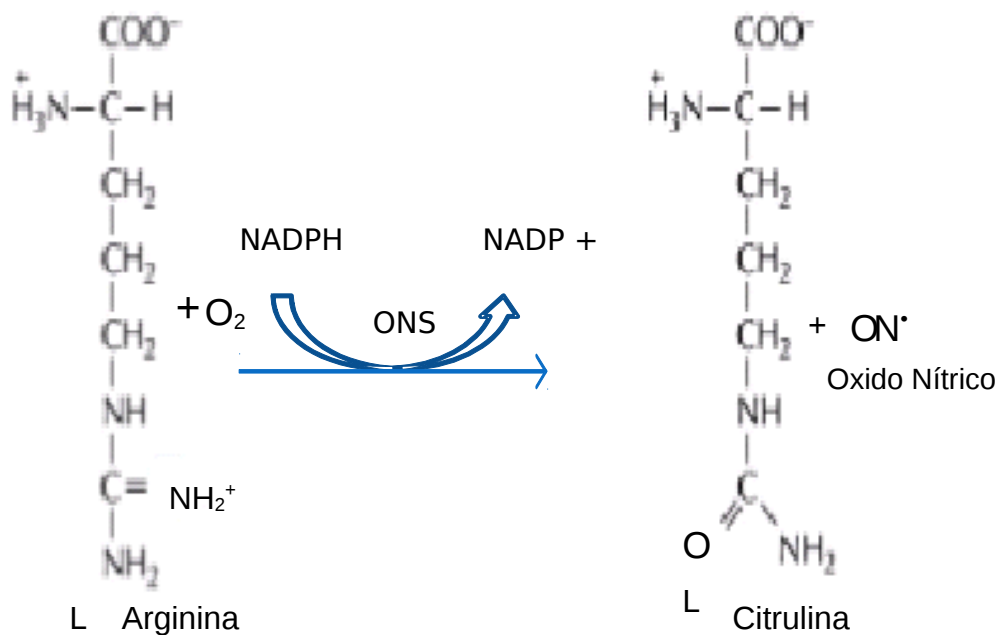
3-Autooxidación de catecolaminas (proceso no enzimático)



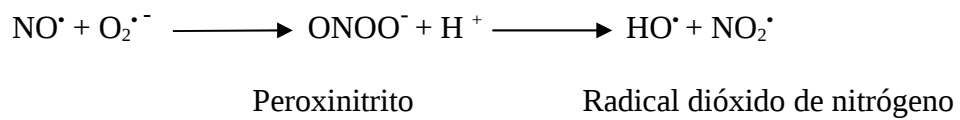
4-Metabolismo del AA como proceso generador de ERO. Además de la vía de la ciclooxigenasa (representada) pueden generarse ERO por la acción sobre el AA de la lipooxigenasa , el sistema P450 y XO (Simonian y col., 1996)



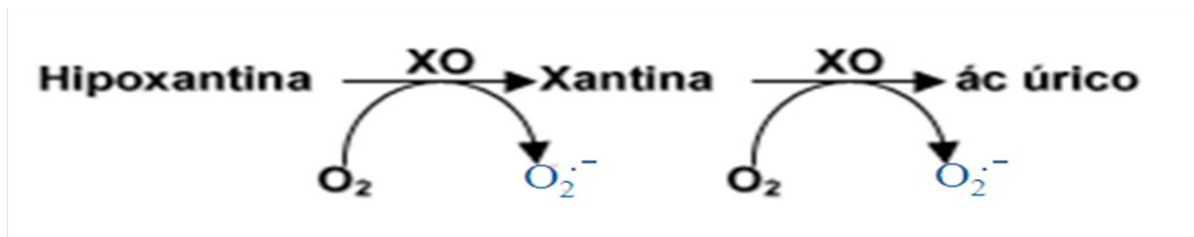
5- Reacción catalizada por el óxido nítrico sintasa (ONS)



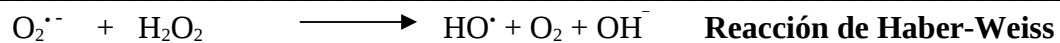
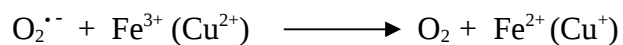
6-Formación y descomposición del peroxinitrito



7- Producción de ERO por acción de la xantina oxidasa (XO)

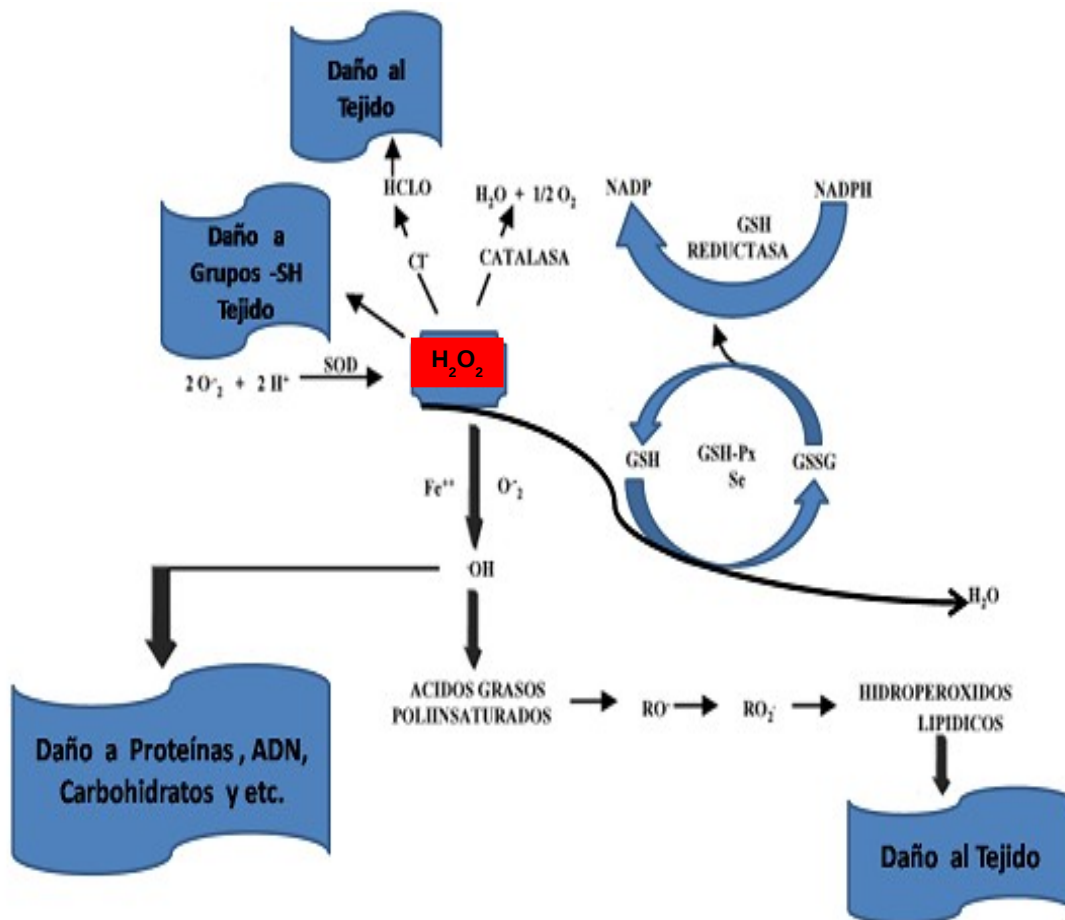


8- Reacciones catalizadas por metales. Reacción de Fenton y de Haber–Weiss



Tomado de Castillo *et al.*, 2003

Anexo.2

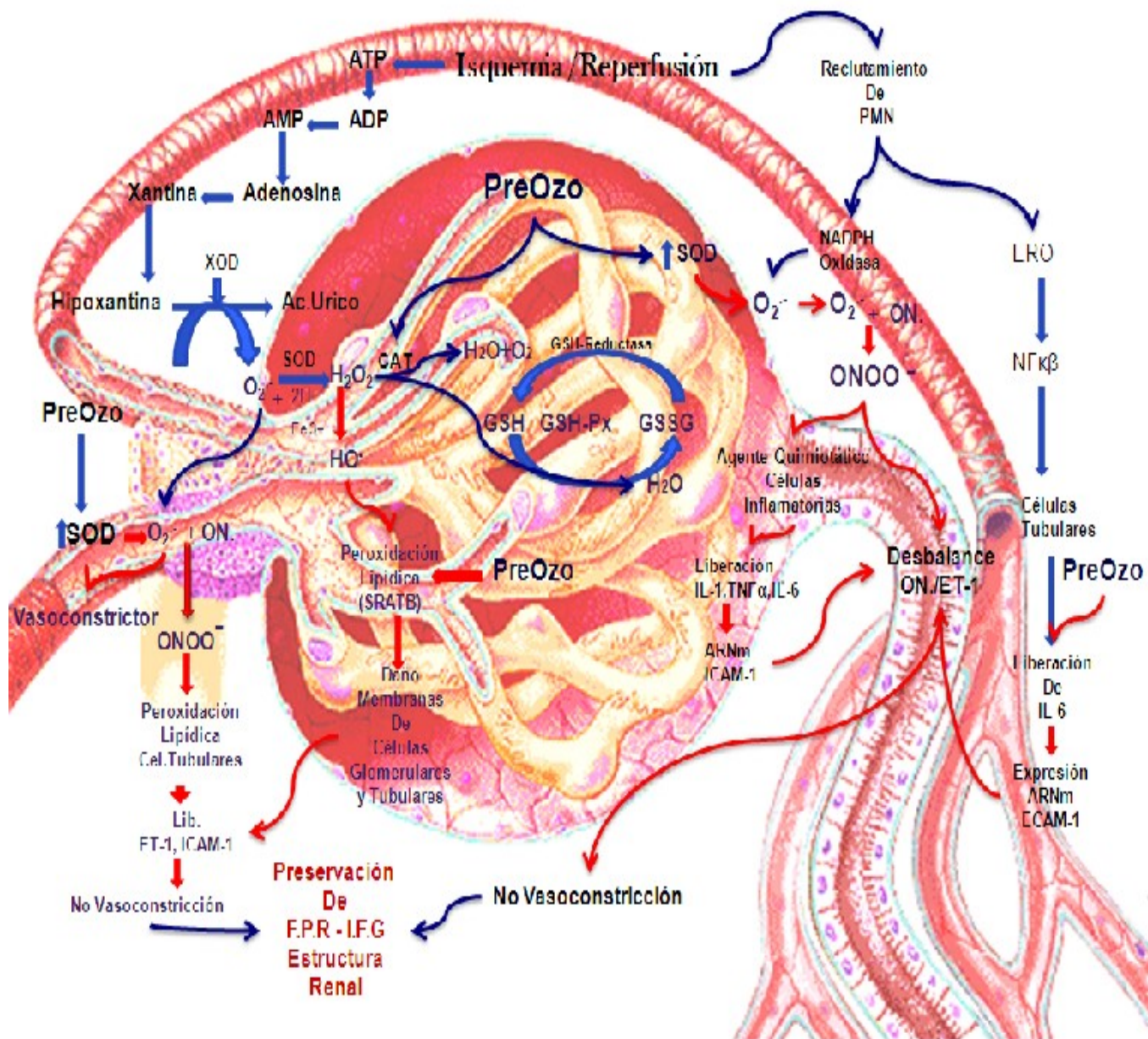


Interacciones fundamentales entre los principales sistemas GENERADORES y SECUESTRADORES de ERO

Tomado de León *et al*.,200

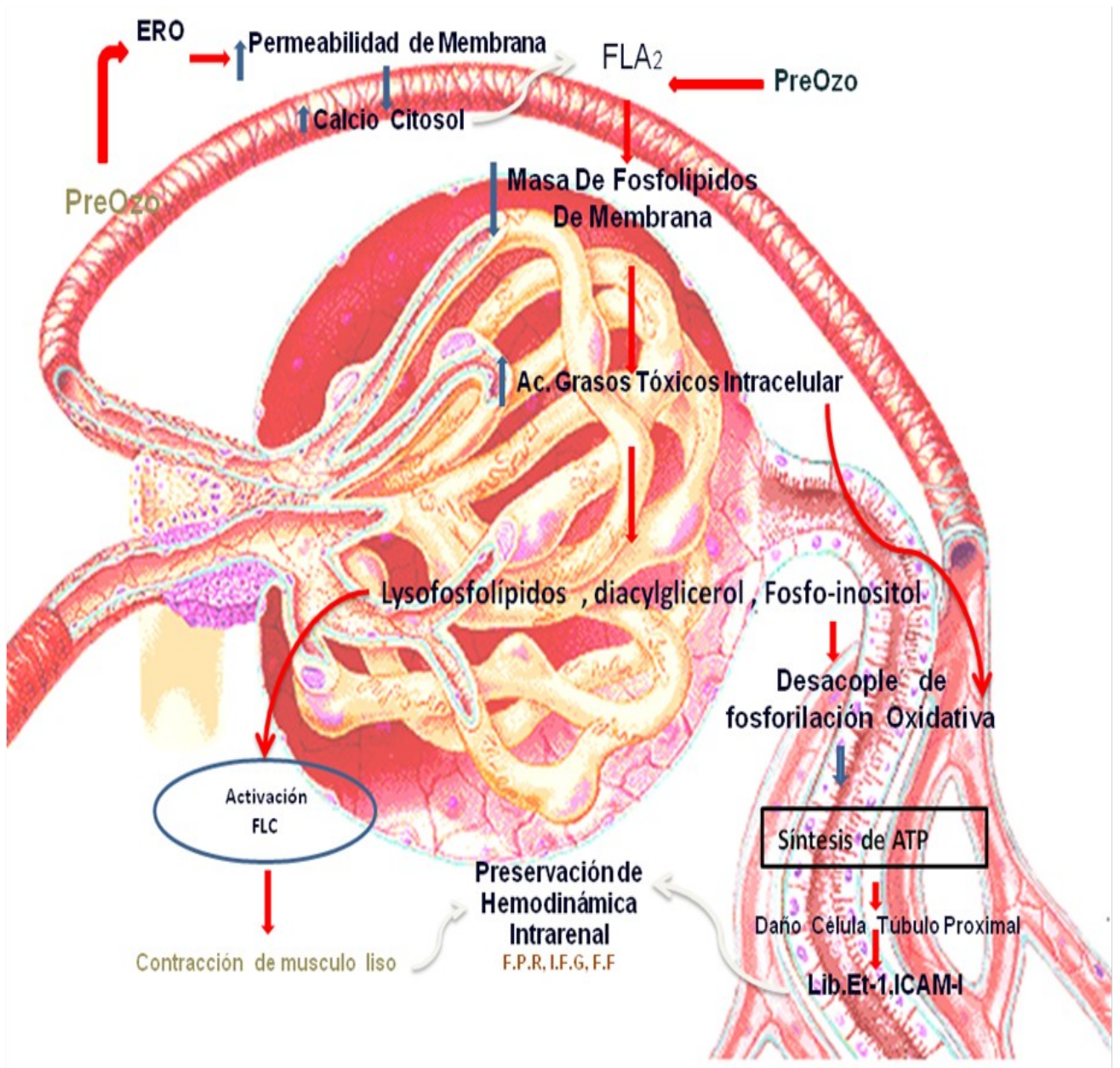
ANEXO. 3. Mecanismos propuestos del PreOzo en la I/R renal.

Legenda: Flechas de color rojo significa efecto inhibitorio, la flecha de color azul, significa efecto activador de las vías.



ANEXO.4. Mecanismos propuestos del PreOzo en la I/R renal.

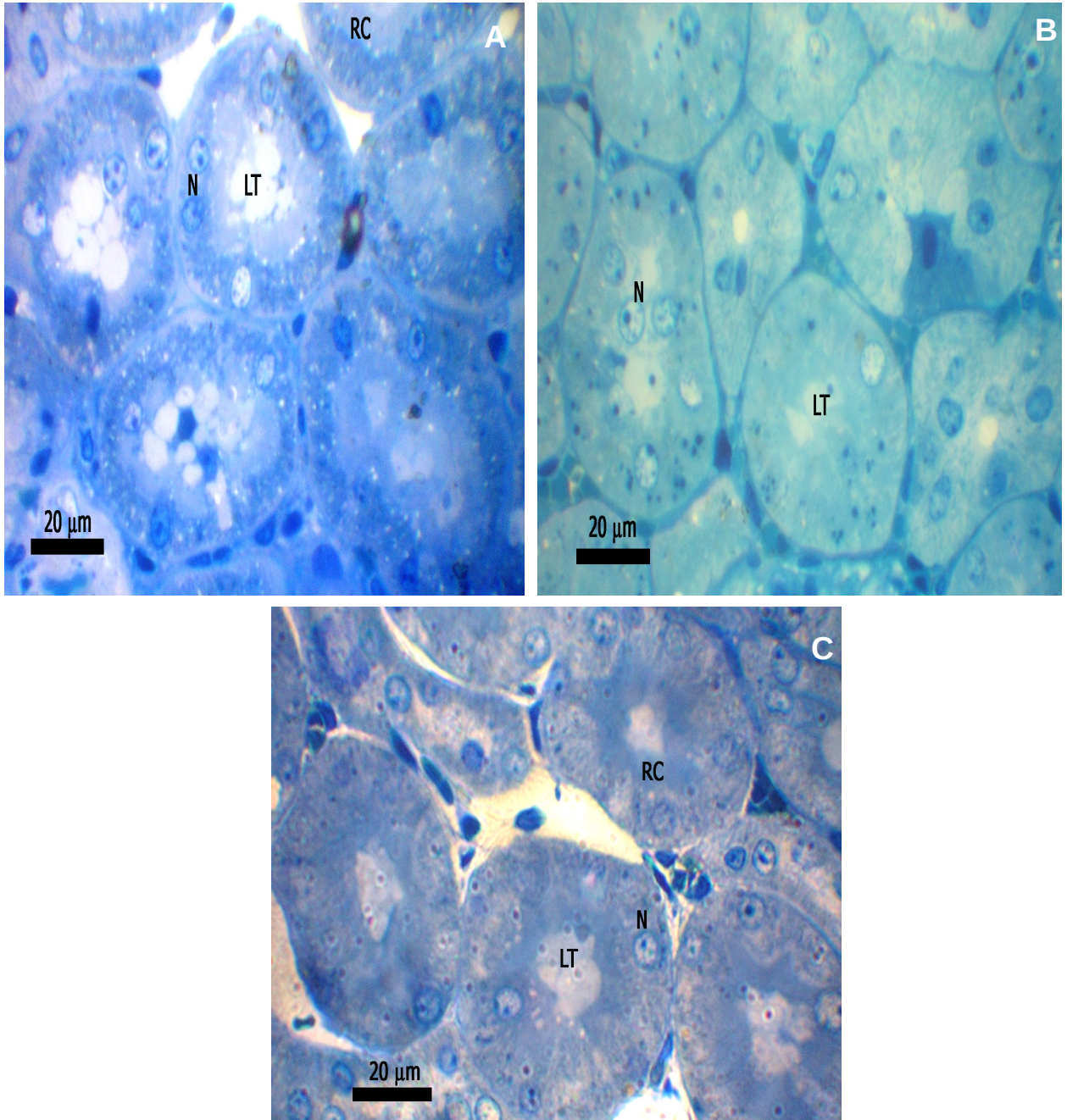
Leyenda: Flechas de colores rojos significan efecto inhibitor sobre la cascada, flechas de color azul significan efecto activador sobre la cascada.



Drogas	Efectos Nefroprotectores	Limitantes en su uso
-Dopamina	- Vasodilatación renal.	Aumenta el consumo de O ₂ por el miocardio. Promueve arritmia.
- Furosemida	- Promueve el flujo urinario. - Reduce el consumo de O ₂ por los túbulos renales.	No tiene efecto sobre la retención nitrogenada cuando la IRA se establece.
- Manitol	- Recomendado en el trasplante renal y la rabiomiolisis masiva, previene la necrosis tubular aguda, antes del cierre de las arterias.	No mejora función renal en el postoperatorio. Aumenta el consumo de O ₂ a nivel tubular.
- Calcio-antagonistas	- Vasodilatación renal. -Incremento del flujo sanguíneo renal. - Incremento de la IFG. - Efecto antioxidante y citoprotector.	Pierden efectividad en periodos postisquémicos.
- Péptido natriurético atrial	- Vasodilatador renal. - Natriuresis.	Hipotensión arterial.
Moduladores de la cascada del complemento	Regulan los depósitos de complemento (Cg-Cq) en los túbulos renales en enfermedades como el LES, púrpura de Schoenlein-Henoch.	Se encuentran en fase de experimento.
Amino esteroides	Inhiben la peroxidación lipídica, por los radicales libres, cuando se dan antes y/o después de la isquemia-reperfusión.	Se han ensayado en voluntarios sanos, hasta ahora no hay nada publicado.
Hormona estimulante de melanocitos	Tiene efectos antiinflamatorios e inhiben la síntesis de óxido nítrico (vía ON ⁻ sintetasa inducible).	Se encuentra en fase inicial de experimento.
E.G.F: Factor de crecimiento epidérmico	Acelera reparación celular y el reemplazo después de la lesión isquémica. Promueve defensa antioxidante en tejido renal.	Puede provocar fibrosis intestinal y renal.

Anexo.5 Tabla de Drogas utilizadas en la Insuficiencia Renal Aguda por I/R. Tomado de Davison A.M. Guideline for the Management of Acute Renal Failure (2001)

ANEXO.6.Estudio Morfométrico. (Cuantitativo).



Anexo 6.Fig. Cortes semifinos de la corteza renal por Microscopia Óptica de Alta Resolución. A) Control sano. Estructura normal de los túbulos proximales. B) Control positivo. Daño severo en las células de los túbulos proximales: pérdida del ribete en cepillo, dilatación tubular, extrusión nuclear de las células epiteliales y taponamiento de la luz tubular, C) Grupo PreOzo 1,1 mg/kg, Conservación del ribete en cepillo. Ribete en cepillo (RC), Núcleo celular (N), Luz tubular (LT).