

Departamento de Fisiología. Escuela de Medicina de La Habana.

OZONO COMO PROMOTOR DE LA REHABILITACIÓN INTESTINAL DE RATAS SUJETAS A ENTERECTOMÍAS MASIVAS.

Jenny López Miranda.¹

RESUMEN

La capacidad del ozono como promotor de la rehabilitación intestinal después de enterectomías masivas fue estudiada mediante un modelo de Síndrome de Intestino corto (SIC) desarrollado después de resección del 75% del intestino delgado de ratas Wistar adultas. Se preservó el yeyuno proximal. Las ratas enterectomizadas recibieron 15 sesiones de ozono a razón de 0.5 mg/Kg del peso corporal (Grupo III: ICO3). Otro grupo de ratas igualmente enterectomizadas recibieron 1 mL de oxígeno por cada 100 gramos de peso corporal del animal (Grupo IV: ICO2). El tratamiento experimental se administró por vía rectal mediante cánula. Estos grupos fueron contrastados con otros 2 más en los que el intestino delgado fue seccionado transversalmente a nivel del ileon, 10 cm por delante de la válvula ileocecal, y reanastomosado (Grupos V: EQO3 – VI: EQO2). Se incluyó un quinto grupo de ratas enterectomizadas que no fueron tratadas en lo absoluto (Grupo II: ICO0). Un sexto grupo de ratas no intervenidas/no tratadas sirvieron de controles (Grupo I). El efecto del tratamiento con ozono se evaluó mediante la curva de evolución del peso post-operatorio, la ocurrencia y duración de las diarreas, determinaciones hematológicas y bioquímicas, indicadores de la actividad intestinal, y el análisis histopatológico de la mucosa yeyunal remanente. El ozono promovió una rápida cicatrización en los Grupos V – VI, lo que se tradujo en una pronta recuperación del peso del animal. La excreción urinaria de Creatinina fue máxima en el Grupo V, coincidiendo con la mayor ganancia de peso. El ozono falló en acortar el período de insuficiencia intestinal que sigue a la enterectomía masiva: las ratas enterectomizadas y tratadas con ozono fueron las que perdieron mayor cantidad de peso durante un mayor número de días. El tratamiento con ozono provocó también una disminución del número de leucocitos y linfocitos en las ratas enterectomizadas y tratadas con ozono. El tratamiento con uno u otro gas no trajo consigo aumento del número/tamaño de las vellosidades intestinales en la mucosa del segmento remanente. En el intestino remanente después de enterectomías ocurren procesos simultáneos de cicatrización y rehabilitación que tienen como fin último suplir las funciones perdidas y sostener el estado nutricional del animal. Es probable que el ozono pueda influir en los procesos de cicatrización tisular, pero ello no conlleva una adaptación más rápida del intestino remanente después de enterectomías masivas. **López Miranda J.** *Ozono como promotor de la rehabilitación intestinal de ratas sujetas a enterectomías masivas. RCAN Rev Cubana Aliment Nutr 2007;17(2):109-128. RNPS: 2221. ISSN: 1561-2929.*

Descriptor DeCS: Enterectomías, Resección intestinal, Intestino corto, Ozono, Cicatrización, Rehabilitación intestinal.

¹ Médico. Especialista de Primer Grado en Fisiología.

Recibido: 22 de Octubre del 2006. Aceptado: 14 de Marzo del 2007.

Jenny López Miranda. Departamento de Fisiología. Escuela de Medicina de La Habana.

Playa. Ciudad Habana.

Correo electrónico: jenny@infomed.sld.cu

INTRODUCCION

Con el nombre de Síndrome de Intestino Corto (SIC) se denomina un conjunto de síntomas y signos causados por importantes alteraciones de la anatomía y fisiología del tracto gastrointestinal (TGI), y que conlleva a numerosas complicaciones nutricionales, infecciosas y metabólicas.^{1,2}

Múltiples entidades clínico-quirúrgicas pueden desembocar en un SIC. Si bien la afectación de hasta un 50% de la función intestinal no es suficiente para establecer la presencia del SIC, debido a la capacidad adaptativa que puede desarrollar el intestino remanente, los trastornos asociados al mal funcionamiento intestinal son inmediatos cuando se pierde más del 50% de la actividad del tracto.^{2,3}

La longitud del segmento intestinal no determina por sí solo la gravedad de la insuficiencia intestinal. Otros factores como la edad, la pérdida del ileon, la longitud del tracto remanente, la preservación de la válvula ileocecal, y la ausencia del colon también deben considerarse en el momento de la elaboración de juicios pronósticos.^{3,4} Sin embargo, y a pesar de lo anterior, siempre cabe esperar la ocurrencia de mecanismos adaptativos del segmento intestinal remanente tendientes a compensar las funciones absorptivas del tracto perdido. La adaptación intestinal está estrechamente ligada a la presencia de los factores mencionados previamente, y puede tardarse entre 18 y 24 meses desde la instalación de la causa de la insuficiencia.⁴

No se tienen registros actualizados sobre la frecuencia del SIC en Cuba. Sí se puede decir que su ocurrencia es cada vez más frecuente, debido a la capacidad tecnológica existente en las unidades asistenciales que permite la supervivencia de enfermos con grados moderados de insuficiencia orgánica. De acuerdo con el Sistema de Documentación y Registros de la actividad del Grupo de

Apoyo Nutricional del Hospital Clínico quirúrgico "Hermanos Ameijeiras", organización rectora del tratamiento de este tipo de pacientes en el país, se han reportado 24 casos de SIC entre Diciembre de 1997 y Junio del 2004 (datos inéditos).

La actuación terapéutica debe estar orientada al logro de la adaptación del segmento intestinal remanente en el menor tiempo posible, a fin de que sea suficiente para satisfacer las necesidades nutrimentales diarias del paciente, y con ello, restablecer la autonomía y el validismo, y reinsertarlo en el seno de la familia y la comunidad.⁵⁻¹¹

El alargamiento quirúrgico del segmento remanente ha sido siempre la opción considerada inmediatamente, a fin de aumentar la superficie absorptiva, o incrementar el tiempo del tránsito intestinal, y con ello, una máxima interacción del alimento presente en la luz con la mucosa del segmento.⁹⁻¹¹

El trasplante de intestino delgado es una opción quirúrgica de la que se ha dispuesto solo recientemente, pero es una acción tecnológicamente compleja y demandante, y se practica únicamente en contados centros del mundo.^{12,13} Después del entusiasmo inicial, y las expectativas creadas, se ha comprobado que la supervivencia del intestino trasplantado al año es de un 50%, y muchos pacientes vuelven a presentar signos de insuficiencia intestinal, agravados por los trastornos acarreados por el esquema de inmunosupresión, la sepsis y el rechazo al órgano ajeno.^{13,14} El trasplante de intestino delgado ha quedado reservado entonces para los enfermos con malabsorción extrema, dependientes obligados de Nutrición parenteral, y con pérdida de los accesos venosos.^{14,15}

La elongación funcional del intestino remanente mediante tratamientos hormonales inductivos de hiperplasia e hipertrofia de las vellosidades supervivientes podría ser un paradigma radicalmente diferente de

tratamiento del SIC. Entre los promotores de la adaptación intestinal se pueden citar la hormona de crecimiento, el factor de crecimiento epidérmico de acción similar a la insulina, la secretina, la pentagastrina y la glutamina.¹⁶⁻²¹ Si bien se han documentado mejoras funcionales de la función del segmento remanente en tiempos más cortos, no es menos cierto que estos tratamientos implican contraindicaciones y efectos secundarios adversos que deben considerarse antes de la tomar de decisión.

El empleo de Ozono como promotor de la adaptación intestinal en el SIC podría representar una modalidad de tratamiento de uso general, inocuo, de fácil acceso, y económico, en vista de los resultados obtenidos en otras entidades.

El Ozono (O₃), una variedad alotrópica del oxígeno reportada primeramente en 1785, y sintetizada químicamente en 1840, ha sido empleado en numerosas tareas: desinfección de las heridas en la era pre-antibiótica,²²⁻²³ potabilización del agua,²²⁻²³ tratamiento de las inmunodeficiencias secundarias a infecciones,²²⁻²³ restauración neurológica después de la neuropatía periférica epidémica,²⁴ inducción de la cicatrización de úlceras varicosas crónicas,²⁵⁻²⁶ alivio sintomático en casos de claudicación intermitente con evolución desfavorable,²⁷⁻²⁸ rehabilitación del glaucoma crónico simple,²⁹ y el tratamiento de la epidermofitosis,³⁰ osteoartritis,³¹ estomatitis secundarias al uso de prótesis dentarias,³² e incluso alveolitis.³³

Entre las propiedades adjudicadas al Ozono se tienen: inhibidor de la agregación plaquetaria,²⁷ mejorador de las propiedades reológicas de la sangre a su paso a través de los vasos capilares, estimulador de la captación del oxígeno por el eritrocito, así como de su transferencia a los tejidos periféricos, promotor de los procesos de utilización periférica del oxígeno, activador de procesos enzimáticos protectores contra el efecto degenerativo de las especies reactivas de oxígeno (ERO), modulador de la respuesta

inmune y el estrés oxidativo, capacidad de actuar como bactericida, virucida y fungicida, y poder analgésico y anti-inflamatorio.³⁴⁻³⁶

El Ozono se puede aplicar tanto localmente, mediante aceites y cremas, o inyecciones intraarticulares; como sistémicamente, por vía intramuscular, intravenosa, subcutánea, e incluso insuflación rectal. La inocuidad de estas vías ha sido demostrada,²²⁻²³ así como la ausencia de genotoxicidad, mutagenicidad y teratogenicidad.²⁴⁻³³

Se espera que la administración de Ozono traiga consigo un aumento del transporte plasmático de oxígeno a la periferia, y con ello, una mejora de la circulación local, para así influir en la adaptación intestinal después de enterectomías masivas. Otros beneficios esperados de la utilización como promotor de la rehabilitación intestinal tendrían que ver con la evolución postquirúrgica, esto es, las capacidades bactericida, anti-inflamatoria, y estimulante de la regeneración tisular de este gas, lo que propiciaría una recuperación rápida y satisfactoria del paciente tratado. Es por ello que se emprendió este trabajo con los objetivos de conocer los efectos de la Ozonoterapia sobre la estructura y función del intestino delgado remanente en un modelo murino de SIC.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestra de estudio: En este trabajo se utilizaron 56 ratas albinas machos adultas, de la raza Wistar, provistas por el Bioterio de la Escuela de Medicina. El peso promedio fue de 328.0 ± 46.1 gramos ($\bar{x} \pm DE$). Las ratas Wistar han sido usadas previamente en modelos experimentales de intestino corto.³⁷ La adaptación del segmento remanente (estimada del momento en la evolución del animal en que se detiene la pérdida de peso) ocurre 12 días después de enterectomías del 75% de la longitud intestinal. Por otro lado, las ratas tienen un ciclo de reproducción

corto, y su manipulación técnica y manutención son sencillas. Se seleccionaron ratas machos para eliminar el posible efecto modificador que pudieran tener las variaciones hormonales que normalmente ocurren en el ciclo de vida de las ratas hembras.

Diseño experimental: Las 56 ratas se distribuyeron en 6 grupos experimentales: *Grupo I:* Control: Ratas aparentemente sanas: 10; *Grupo II:* ICO0: Ratas enterectomizadas sin tratamiento: 10; *Grupo III:* ICO3: Ratas enterectomizadas con ozonoterapia: 9; *Grupo IV:* ICO2: Ratas enterectomizadas a las que se les administró oxígeno: 9; *Grupo V:* EQO3: Ratas laparotomizadas con ozonoterapia: 10; y *Grupo VI:* EQO2: Ratas laparotomizadas a las que se les administró oxígeno: 8; respectivamente.

Si se quiere demostrar la capacidad del ozono como promotor de la rehabilitación intestinal remanente, es imprescindible demostrar que es precisamente el ozono, y no su vehículo: el oxígeno, el factor protagonista de estos cambios. Esta fue la razón para incluir en el protocolo experimental los grupos IV (ICO2) y VI (EQO2), respectivamente. Adicionalmente, se incluyeron los grupos V (EQO3) y VI (EQO2), para controlar los efectos del acto quirúrgico en sí, de los propios de la enterectomía como tal.

El flujo de trabajo seguido, y los tratamientos realizados, se exponen en la Figura 1. En el día 0 del cronograma de trabajo, se practicó una enterectomía distal masiva, o una sección del ileon, según fuera el grupo experimental. La continuidad del tracto intestinal se restableció mediante una anastomosis termino-terminal.

Las ratas operadas se colocaron en jaulas individuales, en ayunas, durante las primeras 12 horas posteriores a la intervención quirúrgica. Transcurrido el ayuno post-operatorio, se permitió que los animales se alimentaran *ad-libitum* con pienso granulado y agua corriente hasta 24 horas

antes del sacrificio. El contenido del pienso granulado servido a los animales es como sigue: harina de maíz, harina de trigo, salvados integrales, y miel como aglutinador.

Veinticuatro horas después de la intervención quirúrgica, se inició el tratamiento experimental correspondiente. Las ratas operadas recibieron oxígeno u ozono por vía rectal, según las indicaciones del protocolo de trabajo.

Las ratas se evolucionaron hasta completar los 24 días después de la intervención quirúrgica.

En el día 24 del seguimiento, las ratas fueron sacrificadas. Se retiraron muestras de 7 – 8 mL de sangre por punción cardíaca, y de órganos para la realización de estudios metabólicos y nutricionales.

Se incluyó en el protocolo de trabajo un grupo control (Grupo I) de ratas adultas aparentemente sanas, en las que no se condujo proceder quirúrgico alguno, para la obtención de los valores basales de los indicadores bioquímicos y nutricionales. También se incluyó otro grupo control con ratas enterectomizadas (Grupo II ICO0) que no recibieron tratamiento experimental alguno.

Procederes quirúrgicos realizados: El animal se anestesió con Pentobarbital sódico a dosis de 50 mg/Kg de peso por vía intraperitoneal, como paso previo del proceder quirúrgico. Acto seguido, la rata se inmovilizó sobre un plano rígido, y la zona quirúrgica se preparó por rasurado del abdomen y esterilización con una solución yodada. El abdomen se incidió en la línea media abdominal, y se abrió por planos hasta llegar a la cavidad peritoneal. Se colocaron retractores para mantener la cavidad abierta durante el tiempo quirúrgico. Se midió el tamaño del intestino delgado desde el ángulo de Treitz (límite anatómico entre duodeno y yeyuno) hasta la válvula ileocecal (límite anatómico entre ileon y colon).

La enterectomía distal masiva se realizó según se ha descrito previamente.³⁷ Se preservó el 25% de la longitud estimada,

correspondiente esencialmente a yeyuno proximal y primeras asas del yeyuno medio. Se ligaron los vasos mesentéricos del segmento a resecar con hilo de seda 4-0 hasta 2 centímetros antes de la válvula ileocecal. Una vez hecho esto, se resecaron las últimas asas del yeyuno medio, todo el yeyuno distal, y casi todo el ileon, con la excepción de los 2 centímetros antes de la válvula ileocecal. En el caso de la simulación del estrés quirúrgico, el intestino delgado se seccionó transversalmente, a 10 centímetros de la válvula ileocecal, sin que se afectara la longitud del mismo.

La continuidad del tracto intestinal se restableció mediante una anastomosis termino-terminal hecha con sutura de poliéster 5-0. Antes de cerrar la cavidad abdominal con catgut cromado 3-0, se revisó la impermeabilidad de la sutura intestinal, y la hemostasia, y se lavó la cavidad con NaCl al 0.9%. La incisión de la piel del abdomen se reparó con hilo de seda 3-0. La herida quirúrgica se limpió con antisépticos. La rata operada se colocó en una jaula individual durante las siguientes 12 horas.

Mientras estuvo abierta, la cavidad abdominal fue cubierta por torundas de gasa embebidas en NaCl al 0.9%. Los líquidos perdidos por evaporación fueron repuestos mediante instilación en la cavidad abdominal de pequeñas cantidades de solución salina, para evitar la desecación de los tejidos intraabdominales.

Tratamientos experimentales administrados: Las ratas seleccionadas recibieron 15 sesiones de oxígeno u ozono, según fuera el caso del protocolo, a partir de las 24 horas transcurridas después de la intervención quirúrgica. La dosis de ozono administrada fue de 0.5 mg/Kg del peso corporal. La dosis administrada de oxígeno fue de 1 mL del gas por cada 100 gramos de peso corporal del animal. Uno u otro gas se instiló diariamente, por vía rectal, mediante una cánula, hasta completar las 15 sesiones

programadas. El tratamiento experimental se interrumpió durante los fines de semana.

El ozono se obtuvo mediante un equipo OZOMED 400-M (Centro de Investigaciones sobre el Ozono, La Habana). El principio básico del OZOMED es la provocación de descargas eléctricas dentro de una cámara llena de oxígeno purificado.²² El ozono de uso médico, tal y como se obtiene con este equipo, es una mezcla 5:95 de ozono:oxígeno (v:v).²²

Determinación del peso corporal: El peso del animal fue registrado en el día [-1] del cronograma de trabajo, y en las mañanas de los días Lunes, Miércoles y Viernes. El peso se registró en gramos con una exactitud del 10%.

Determinaciones bioquímicas: De cada animal se obtuvieron las determinaciones siguientes: Hemoglobina, Conteo Total de Leucocitos, Conteo Total de Linfocitos, Creatinina sérica, Proteínas totales, Albúmina y Colesterol. Las determinaciones se hicieron en las muestras de sangre obtenidas del animal en los días [-1] y [+24] del cronograma de trabajo, mediante los procedimientos analíticos existentes en el Laboratorio de Fisiología.

Adicionalmente se recolectaron muestras de orina de 24 horas, después de colocación del animal en una jaula metabólica, en los días [-1] y [+24] del cronograma de trabajo. El contenido de creatinina en las muestras de orina se determinó mediante la reacción de Jaffé.

Monitoreo del hábito defecatorio: Se registró diariamente el hábito defecatorio del animal. Se anotó la ocurrencia, aspecto y volumen de las diarreas.

Determinación *in vitro* de la absorción intestinal: Mediante esta técnica se mide el paso de la glucosa presente en una solución de 12.5 mmol/L contenida en un tubo de yeyuno evertido, hacia una cámara llena de glucosa 25.0 mmol/L.³⁸ Brevemente, se retiró de cada animal un segmento de yeyuno de 5 centímetros de largo, situado

unos 3 centímetros después del ángulo de Treitz. Después de lavado con suero fisiológico, dicho segmento se evertió, de forma tal que la mucosa quedó orientada hacia fuera, y la serosa hacia dentro. Los extremos del segmento evertido se ataron con hilo de seda 3-0. El yeyuno evertido se rellenó con 1 mL de una solución 12.5 mmol/L de glucosa, y se incubó en un beaker que contenía 50 mililitros de otra solución 25 mmol/L de glucosa, a 37°C, durante una hora. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, se recuperó el volumen de la solución de glucosa 12.5 mmol/L remanente en el interior del tubo intestinal, y el interior se lavó con 2 mL de agua destilada, que se añadieron al volumen residual de la solución de glucosa. Hecho esto, la mucosa intestinal se raspó, y 110 miligramos obtenidos de esta forma se homogenizaron en 2 mL de NaCl al 0.9%. El homogenato se centrifugó a 3000 rpm durante 10 minutos. La glucosa presente tanto en el volumen recuperado, como en el sobrenadante obtenido, se ensayó mediante la reacción de la glucosa-oxidasa.³⁹

La absorción neta de glucosa ocurrida *in vitro* representó la suma de las concentraciones (miligramos) del analito medidas en 40 microlitos del volumen recuperado del interior del tubo de intestino evertido y del homogenato del raspado de mucosa intestinal (y que representa la glucosa contenida en el espesor de la mucosa del tubo intestinal), después de corregida para una dilución con agua destilada 1:20 de la solución 25 mmol/L del analito empleada en la cámara de incubación.

Determinación de la actividad lactásica intestinal: Este test permite evaluar la actividad enzimática disacaridásica del intestino delgado.⁴⁰ Brevemente, se retiró un segmento de yeyuno de 5 centímetros de longitud, a 10 centímetros aproximadamente del ángulo de Treitz. Se obtuvieron 110 mg del tejido mucosal por raspado, que se homogenizaron en 2 mililitros de NaCl al 0.9% y se centrifugaron a 3000 rpm durante

10 minutos. Doscientos microlitros del sobrenadante se incubaron con 100 microlitros de lactosa (20 mg/2 mL de agua destilada), en baño de María, a 37°C, con agitación constante, durante una hora. Transcurrido este tiempo, se ensayó el contenido de glucosa (miligramos) en 20 microlitros de la mezcla de incubación mediante la reacción de la glucosa-oxidasa.³⁹ La glucosa medida representó la liberada tras la acción de la enzima lactasa contenida en el segmento intestinal, sobre la lactosa añadida.

Estudios histológicos: En el acto del sacrificio del animal, una vez extraída la sangre para las determinaciones bioquímicas, se abrió la cavidad torácica, y se realizó una pequeña incisión en la aurícula derecha. A través del ventrículo izquierdo se infundieron lentamente 50 mililitros de NaCl 0.9%, que se drenaron por la incisión auricular. Una vez perfundido el cuerpo del animal, se resecaron 3 centímetros de la primera porción del yeyuno remanente, que se sumergieron en un beaker que contenía Atropina 10^{-7} M, para lograr la adecuada distensión del segmento. Los extremos del segmento distendido se ataron con hilo de seda 3-0, y en el interior se instiló formalina al 12%. El segmento preparado de esta manera se colocó en un frasco con tapa que contenía formalina al 12%, y se dejó en reposo durante 24 horas. Al término de este tiempo, la muestra fue enviada al Departamento de Histología para inclusión en parafina, corte, fijación y coloración con Hematoxilina/Eosina. Las láminas histológicas obtenidas se digitalizaron y analizaron mediante el programa de análisis morfométrico UTHSCSA IMAGE TOOL (Olympus, Japón), a fin de evaluar y registrar las características de la mucosa del segmento intestinal remanente.

Análisis estadístico-matemático de los resultados: El procesamiento estadístico-matemático de los resultados recogidos se realizó con el paquete estadístico SPSS (Jaendel Scientific, Estados Unidos).⁴¹ Los resultados de las variables de interés se

agregaron y describieron mediante estadígrafos de locación y dispersión. Las diferencias entre grupos de tratamiento se evaluaron mediante técnicas de análisis de varianza.⁴² Se controló el efecto confusor de oscilaciones extremas del peso pre-tratamiento del animal, y de la interacción entre el tipo de daño quirúrgico (Ninguno/Sección transversal/Resección intestinal) y el tratamiento experimental (Ninguno/Oxigenoterapia/Ozonoterapia).⁴² Se denotó toda diferencia entre-grupos menor del 5% como estadísticamente significativa.⁴²

rehabilitación del intestino remanente después de enterectomías masivas, a través de la observación de 4 dimensiones del estado de salud del animal: el comportamiento del peso post-operatorio, la ocurrencia de diarreas, las posibles alteraciones de indicadores bioquímicos del medio interno y el estado nutricional, y el estado de la función intestinal.

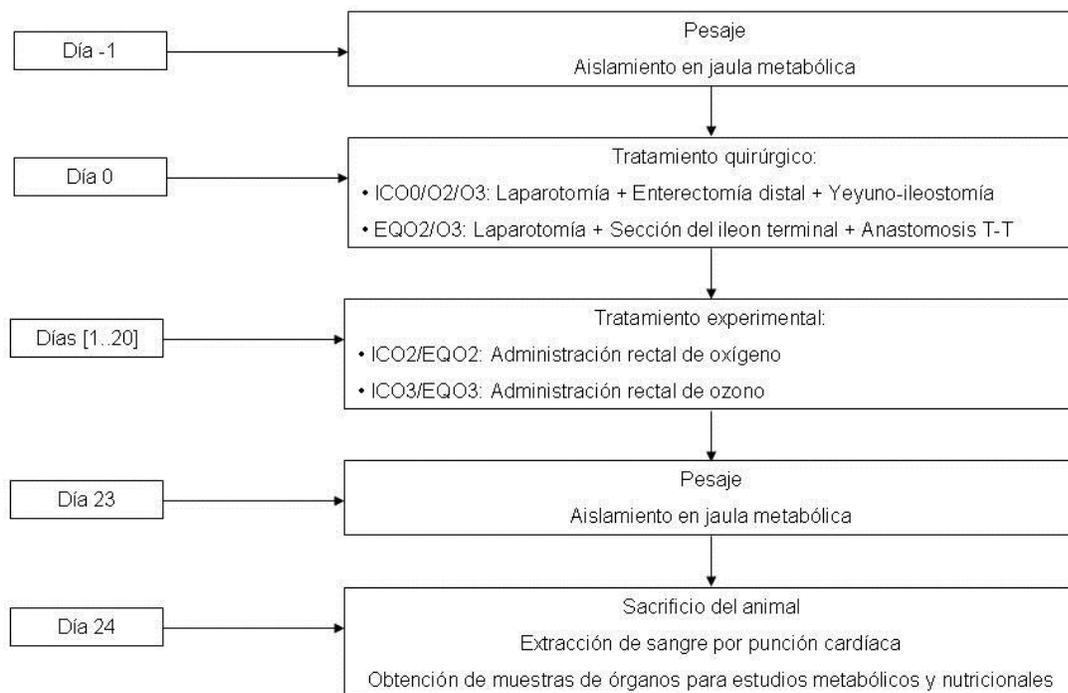


Figura 1. Flujo de trabajo seguido durante el estudio. Para más detalles: Consulte la Sección MATERIALES y MÉTODOS de este artículo.

Siglas empleadas: ICO0: Grupo II del protocolo experimental; ICO3: Grupo III; ICO2: Grupo IV; EQO3: Grupo V; EQO2: Grupo VI.

RESULTADOS

Con este trabajo se evaluó la capacidad del ozono para promover la

En la Figura 2 se muestra la evolución del peso del animal una vez operado. No importa la intensidad del estrés quirúrgico, o el tratamiento posterior, los animales

exhibieron el mismo patrón de curva bifásica: una fase inicial negativa, durante la que ocurre una caída rápida del peso, seguida de otra fase positiva, caracterizada por una tendencia gradual hacia la recuperación del peso perdido. La pérdida de peso fue más pronunciada en las ratas enterectomizadas, sin tratamiento. Por el contrario, el déficit ponderal fue menor en los animales sujetos a laparotomía, seguida de sección intestinal y anastomosis termino-terminal, y tratadas con ozono. La pérdida de peso de las ratas de los otros 3 grupos experimentales fue intermedia entre estos comportamientos extremos.

La evolución del peso post-operatorio fue descrita ulteriormente mediante 4 indicadores: la pérdida máxima de peso, el día en que ocurre la misma, la ganancia de peso observada al final del período de observación, y el número de animales que al final de este período terminan con un peso superior al anotado antes del tratamiento. La Tabla 1 muestra los resultados de estos indicadores.

La pérdida de peso fue máxima entre las ratas enterectomizadas, no tratadas (Grupo II), y llegó a ser (casi) del 20.0%. Por el contrario, el déficit ponderal fue mínimo, para un valor del 7.0% entre las ratas sujetas a

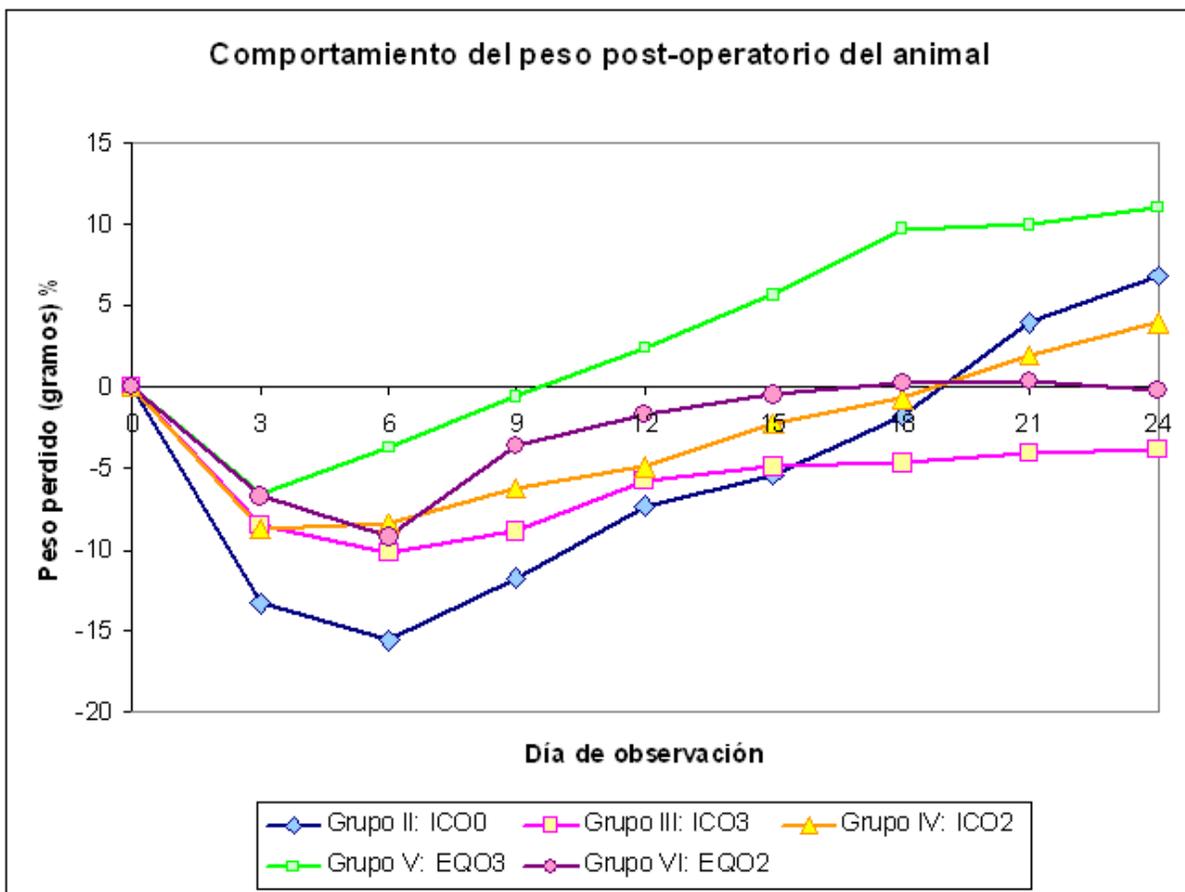


Figura 1. Evolución del peso post-operatorio del animal. Siglas empleadas: ICO0: Grupo II del protocolo experimental; ICO3: Grupo III; ICO2: Grupo IV; EQO3: Grupo V; EQO2: Grupo VI.

La pendiente de la fase de recuperación fue más inclinada para los grupos II-IV-V, pero menos pronunciada para los otros 2 grupos III-VI.

estrés quirúrgico, y tratadas con ozono (Grupo V). Los valores de las pérdidas de peso de los otros 3 grupos fueron intermedios. Las diferencias entre-grupos para los valores

promedio de la pérdida de peso fueron estadísticamente significativas ($p = 0.0121$; Análisis de varianza simple).

Los grupos experimentales también difirieron entre sí respecto del día en que ocurrió la pérdida máxima de peso. Las ratas del Grupo V experimentaron la pérdida máxima de peso en el tercer día de evolución post-operatoria. Por el contrario, los animales del Grupo VI sufrieron el mayor déficit ponderal en el décimo día de seguimiento. Los otros 3 grupos mostraron valores intermedios. Las diferencias entre-grupos respecto del día en que ocurrió la pérdida máxima de peso fueron estadísticamente significativas ($p = 0.0423$; Análisis de varianza simple).

intermedios para los otros 3 grupos experimentales. Sin embargo, las diferencias entre-grupos para los valores promedio de ganancia final de peso fueron marginalmente significativas ($p = 0.0525$; Análisis de varianza simple).

De forma similar a lo anotado anteriormente, el 90.0% de las ratas del Grupo V logró recuperar el peso pre-tratamiento. Sin embargo, esta proporción fue solo del 20.0% para las ratas del Grupo III. En los otros 3 grupos, el 60.0% de los animales logró superar el peso inicial. Las diferencias entre-grupo respecto de las proporciones de ratas que lograron recuperar el peso pre-tratamiento fueron estadísticamente significativas ($p < 0.05$; test de comparación de proporciones múltiples).

Tabla 1. Indicadores de la evolución del peso post-operatorio de las ratas.

Indicador	Grupos experimentales				
	Grupo II ICO0	Grupo III ICO3	Grupo IV ICO2	Grupo V EQO3	Grupo VI EQO2
Número	10	10	10	10	8
Pérdida máxima de peso [¶]	-19.86 ± 10.52	-14.06 ± 9.03	-11.13 ± 3.57	-7.35 ± 4.33	-12.88 ± 8.05 ^b
Día en que ocurre la pérdida máxima de peso	5.40 ± 3.69	7.8 ± 6.96	5.40 ± 3.10	3.60 ± 1.26	10.50 ± 6.99 ^b
Ganancia (gramos) de peso [¶]	6.87 ± 12.47	-3.79 ± 13.27	3.96 ± 8.09	11.10 ± 11.60	-0.22 ± 0.90 ^a
Ganancia de peso [‡]	60.0%	20.0%	60.0%	90.0%	62.5% ^b
Ocurrencia de diarreas [‡]	100.0%	100.0%	100.0%	50.0%	62.5%
Duración de las diarreas (días)	3.8 ± 1.55	3.0 ± 1.63	2.8 ± 1.40	1.6 ± 1.96	1.5 ± 1.69 ^b

[¶]Expresada como porcentaje del peso inicial (preoperatorio) del animal.

[‡]Expresada como porcentaje del tamaño del grupo correspondiente.

^a $p = 0.0525$.

^b $p < 0.05$.

Fuente: Registros del estudio.
Tamaño de la serie: 58.

Las ratas del Grupo V también se caracterizaron por mostrar la mayor ganancia de peso al final del período de observación, que fue del 11.10%. La menor ganancia de peso, que fue del -3.79% del peso inicial, se observó entre las ratas del Grupo III. Los valores de ganancia final de peso fueron

La ocurrencia de diarreas fue casi universal entre los grupos experimentales, y afectó a más de la mitad de los animales operados. De forma significativa, este signo estuvo presente en todos los integrantes de los Grupos II-III-IV.

Igualmente, la duración de las diarreas fue máxima entre los Grupos II-III-IV, y se extendió durante 3 días, como promedio. En los otros 2 grupos las diarreas se mantuvieron durante 1 día solamente. Los grupos experimentales difirieron entre sí respecto de los días de duración de las diarreas ($p = 0.0192$; Análisis de varianza simple).

delgado, como la enterectomía, causaron incrementos de los conteos totales de leucocitos, cuando se compararon con las ratas no operadas (Grupo I). El conteo de leucocitos se incrementó en un 6 – 8% en los Grupos V – VI que sufrieron sección del intestino delgado, independientemente del tratamiento experimental. En el caso de las

Tabla 2. Indicadores del medio interno, el estado nutricional, y la función absortiva intestinal de las ratas tratadas.

Indicador	Grupos experimentales					
	Grupo I Control	Grupo II ICO0	Grupo III ICO3	Grupo IV ICO2	Grupo V EQO3	Grupo VI EQO2
Número	10	10	10	10	10	8
Hemoglobina, g.L ⁻¹	143.0 ± 38.5	145.9 ± 10.2	144.1 ± 14.2	136.8 ± 17.7	144 ± 86	136 ± 61
Hematocrito, fracción.volumen	42.0 ± 11.0	47.0 ± 3.0	44.0 ± 3.0	43.0 ± 4.0	46.0 ± 3.0	45.0 ± 2.0
Conteo de Leucocitos, células.L ⁻⁹	7,400 ± 1,580	9,500 ± 1,800	6,920 ± 1,170	7,990 ± 640	8,000 ± 1,680	7,900 ± 380 ^b
Conteo de Polimorfonucleares, células.mL ⁻³	2,489 ± 939	4,415 ± 1,341	3,825 ± 1,415	4,384 ± 836	4,514 ± 1,343	3,067 ± 190 ^b
Conteo de Linfocitos, células.mL ⁻³	4,873 ± 1,134	5,061 ± 1,754	3,081 ± 766	3,574 ± 869	2,836 ± 945	2,929 ± 516 ^b
Albúmina sérica, g.L ⁻¹	33.9 ± 2.7	33.7 ± 5.6	33.7 ± 3.3	30.8 ± 5.1	31.6 ± 5.8	28.3 ± 0.6
Colesterol sérico, mmol.L ⁻¹	1.6 ± 0.3	1.3 ± 0.3	1.3 ± 0.3	1.1 ± 0.3	1.3 ± 0.5	1.4 ± 0.1
Creatinina sérica, μmol.L ⁻¹	77.0 ± 14.4	56.5 ± 8.8	62.3 ± 10.7	68.0 ± 30.6	56.0 ± 6.7	59.7 ± 12.5
Creatinina urinaria, mg.24 horas ⁻¹	9.8 ± 4.7	6.4 ± 2.6	8.1 ± 4.6	7.8 ± 4.4	18.4 ± 6.6	5.9 ± 2.4 ^b
Creatinina urinaria, μg.g peso.24 horas ⁻¹	30.3 ± 14.6	20.0 ± 7.6	21.5 ± 11.0	23.1 ± 13.0	49.7 ± 43.2	20.9 ± 4.9 ^a
Absorción <i>in vitro</i> de glucosa, mg.mL ⁻¹	0.98 ± 0.53	0.89 ± 0.66	0.55 ± 0.44	0.46 ± 0.32	0.57 ± 0.49	0.78 ± 0.31
Actividad lactásica, mg.mL ⁻¹	0.09 ± 0.02	0.05 ± 0.03	0.05 ± 0.05	0.05 ± 0.02	0.05 ± 0.03	0.05 ± 0.02 ^b

^a $p = 0.053$.

^b $p < 0.05$.

Fuente: Registros del estudio.

Tamaño de la serie: 58.

El estado final de las variables hematológicas se presenta en la Tabla 2. Los grupos experimentales difirieron entre sí respecto de los conteos totales de leucocitos, así como en el tamaño de las subpoblaciones de células polimorfonucleares y linfocitos. Tanto la sección transversal del intestino

enterectomías, el conteo de leucocitos se incrementó en un 28% en ausencia del tratamiento experimental (Grupo II), pero solo en un 8% cuando las ratas se trataron con O₂ (Grupo IV). Hay que destacar que el comportamiento del Grupo III fue la excepción al comportamiento general

observado: el tratamiento con O₃ resultó en una reducción del 7% del conteo de leucocitos.

En el caso de las células polimorfonucleares, no importa la intervención quirúrgica o el tratamiento experimental, se observó un incremento del 20 – 70% del número de las mismas en los grupos de observación. El menor incremento se registró en el Grupo VI, mientras que el aumento mayor ocurrió en el Grupo V.

El comportamiento contrario se registró para el caso de los linfocitos. Si bien en el Grupo II, constituido por las ratas enterectomizadas sin tratamiento posterior, ocurrió un aumento leve (de apenas el 2%) del conteo de linfocitos, en los restantes grupos experimentales se observó una reducción del 42% del número de estas células.

No se pudo demostrar influencia del protocolo quirúrgico, o del tratamiento experimental administrado en el post-operatorio, sobre el comportamiento de la Albúmina sérica, el Colesterol sérico, o la Creatinina sérica. Las diferencias de los valores promedio de estos analitos en las ratas tratadas respecto de los controles fueron de entre 12 – 28%, sin alcanzar significación estadística ($p > 0.05$; tests de análisis de varianza simple).

Se observaron diferencias entre-grupos respecto de los valores de la excreción urinaria de Creatinina: las diferencias de los valores promedio de esta determinación en las ratas tratadas (comparadas con los animales controles) fue de entre 67 – 165% ($p < 0.05$; test de análisis de varianza simple). Las diferencias entre-grupos fueron significativas tanto para los valores absolutos de excreción urinaria de Creatinina ($p = 0.035$), como corregidos para el peso del animal ($p = 0.053$). La fuente de la variabilidad entre-grupos de la excreción urinaria de Creatinina se localizó en el Grupo V: las ratas sujetas a estrés quirúrgico y tratadas con ozono exhibieron los valores mayores de esta determinación.

La excreción urinaria de Creatinina fue independiente del tratamiento experimental en las ratas enterectomizadas: no hubo diferencias entre los grupos II – IV respecto del tratamiento con uno u otro gas, como de la no aplicación del mismo.

La Tabla 2 también muestra el estado de la función intestinal al final del período de observación. Ni el proceder quirúrgico, ni el tratamiento experimental, provocaron cambios profundos en la absorción *in vitro* de glucosa. Para cualquier grupo, se observó una reducción de entre un 12% (Grupo II) y un 53% (Grupo IV) de la absorción *in vitro* de glucosa, respecto de los controles, sin alcanzar tampoco significación estadística ($p > 0.05$; tests de análisis de varianza simple).

La actividad lactásica mostró también un comportamiento similar, y fue esencialmente independiente y constante para cualquier proceder quirúrgico o tratamiento experimental. Los valores de la actividad lactásica fueron inferiores al observado en el Grupo I (Control) ($p < 0.05$; test de análisis de varianza simple).

No se pudo demostrar que el peso pre-tratamiento del animal influyera en los resultados observados ($p > 0.05$; tests de análisis de la covarianza). Tampoco se pudo demostrar interacciones significativas entre el daño quirúrgico inflingido al animal y el tratamiento experimental en cada prueba de hipótesis que se evaluó ($p > 0.05$; análisis de varianza para 2 factores).

Finalmente, en la Figura 3 se muestran las microfotografías de las preparaciones histopatológicas de la mucosa del segmento intestinal remanente recuperado al final del período de observación de los animales estudiados. En contraste con una mucosa plena, succulenta, con vellosidades eutróficas, y una capa muscular preservada en su espesor, tal y como se observó en las ratas-testigos, no sujetas a tratamiento alguno, se constataron cambios importantes en la distribución del número de vellosidades por unidad de superficie de la mucosa, modificaciones del

tamaño y la forma de la vellosidad, afinamiento de la capa muscular, y un aumento del infiltrado inflamatorio en la submucosa.

DISCUSIÓN

La dilucidación de los efectos del tratamiento con ozono de ratas sujetas a grados variables de agresión intestinal reveló

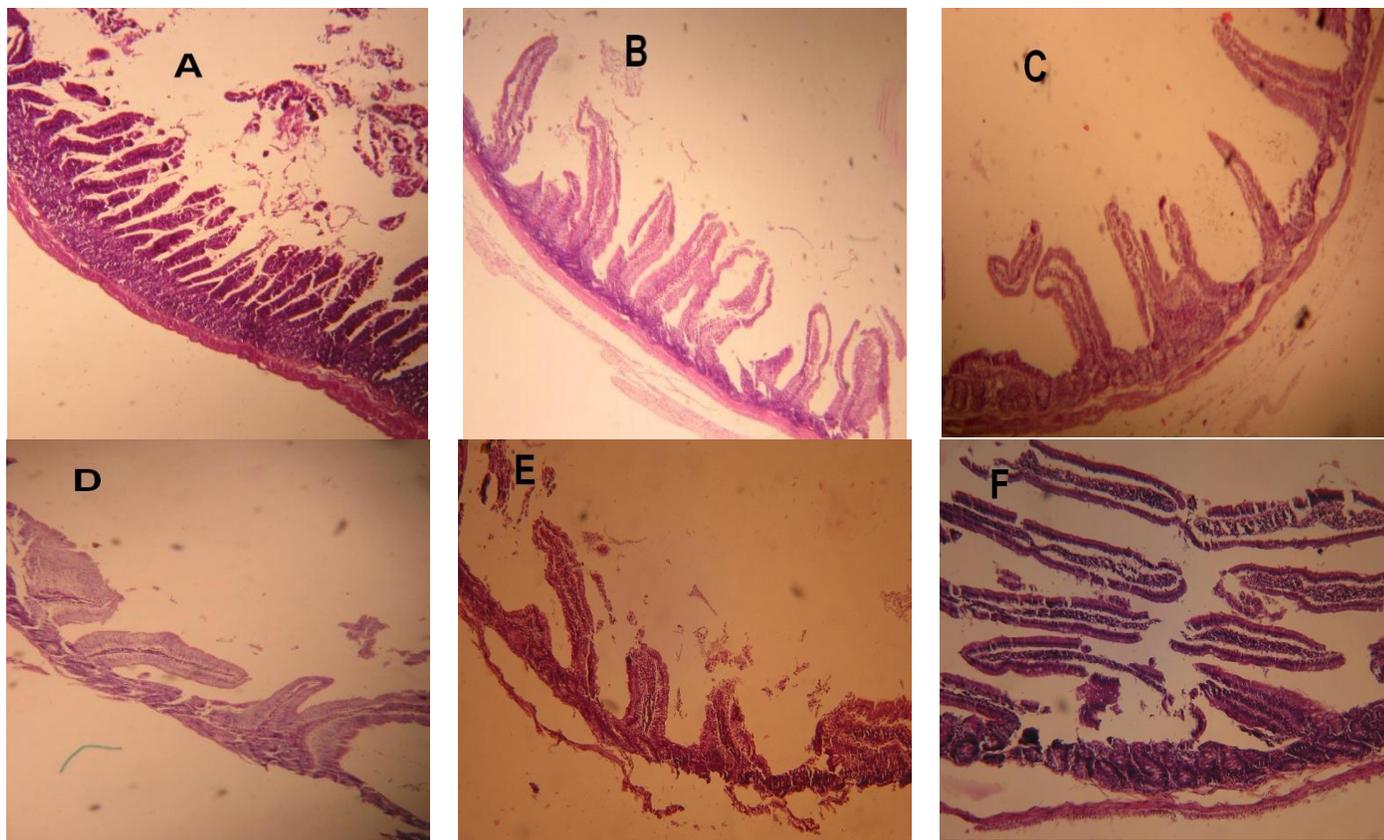


Figura 3. Microfotografías de las láminas histopatológicas con las preparaciones de mucosa del segmento intestinal remanente recuperado al final del período de observación. Los tejidos fueron preparados tras el sacrificio del animal tal y como se describe en la sección “Material y Método” de este artículo, incluidas en parafina, cortadas con micrótopo, y teñidas con Hematoxilina/Eosina. **A.** Mucosa recuperada de la porción proximal del intestino delgado de las ratas no enterectomizadas, no tratadas (Grupo I). Se observa la mucosa plena, succulenta, y una gran densidad de vellosidades por unidad de superficie. Se observan vellosidades eutróficas. **B.** Mucosa recuperada del yeyuno de las ratas enterectomizadas, no tratadas (Grupo II: ICO0). Se observa una capa muscular afinada, debido tal vez a una presión intraluminal aumentada. Las vellosidades son escasas, ralas, adelgazadas. **C.** Mucosa recuperada del yeyuno de las ratas enterectomizadas, tratadas con ozono (Grupo III: ICO3). Hay un mayor número de vellosidades por unidad de superficie. Las vellosidades son anchas y alargadas. **D.** Mucosa recuperada del yeyuno de las ratas enterectomizadas, tratadas con oxígeno (Grupo IV: ICO2). Se observan las vellosidades gruesas, alargadas. **E.** Mucosa recuperada de la porción proximal del intestino delgado de las ratas seccionadas, tratadas con ozono (Grupo V: EQO3). La distribución de las vellosidades, y la forma, son similares a las observadas en los grupos anteriores. **F.** Mucosa recuperada de la porción proximal del intestino delgado de las ratas seccionadas, tratadas con oxígeno (Grupo VI: EQO2). Se observan vellosidades alargadas y aguzadas. Se destaca el infiltrado inflamatorio en el espesor de las vellosidades y la submucosa.

Los cambios observados en la mucosa intestinal fueron independientes del tipo de agresión quirúrgica inflingida al animal, o del tratamiento empleado (no tratamiento/ozonoterapia/oxigenoterapia).

que la respuesta del segmento remanente ocurre en 2 fases: la cicatrización tisular, que permite la restauración del tránsito intestinal y la recuperación de la homeostasis interna; y la adaptación intestinal, que hace posible que el

segmento remanente exprese actividades y funciones necesarias para suplir el tramo perdido y/o dañado.

En ausencia de tratamiento orientado, la adaptación intestinal se hace evidente en la rata en el duodécimo día después de la exéresis del 75% de la longitud distal del tracto.³⁷ Se ha descrito que la adaptación concluye cuando han transcurrido 30 días después del insulto original.⁴³⁻⁴⁵ Este trabajo evaluó entonces si el ozono promovía la adaptación intestinal en ratas enterectomizadas en un plazo menor de 12 días. Se esperaba que, si este gas era beneficioso, la adaptación intestinal sería completa antes de los 15 días después de la resección.

No importa el tipo de insulto quirúrgico administrado a la rata (sección transversal/ enterectomía distal), en todos los grupos se observó el mismo patrón bifásico de la curva de evolución del peso post-quirúrgico. La caída inicial aguda del peso puede ocurrir como consecuencia de la hipercatabolia producida por mediadores pro-inflamatorios liberados durante la agresión quirúrgica, los trastornos de las funciones digestivas y absorptivas de la mucosa causada por edema local, y la liberación de hormonas relacionadas con el estrés, como el cortisol y la adrenalina, quienes, a su vez, son capaces de movilizar ácidos grasos y proteínas para cubrir los requerimientos energéticos aumentados.^{43,44} A todo lo anteriormente expuesto se suma la reducción importante de la superficie absorptiva, con disminución concomitante de la absorción de nutrientes.^{44,45} También ocurre una menor reabsorción de ácidos biliares a nivel de la porción terminal del ileon, lo que produce irritación de la mucosa colónica, y con ello, diarreas que traen consigo pérdida de agua y electrolitos.⁴⁵⁻⁴⁷

La recuperación del peso comenzó después del 6to día de la enterectomía, momento en que ocurrió la pérdida máxima de peso. El tratamiento con ozono, sin

embargo, falló en acelerar el momento en que debería hacerse iniciado la recuperación del peso. El comportamiento del peso post-operatorio fue esencialmente idéntico entre las ratas enterectomizadas no tratadas, o tratadas con ozono u oxígeno. La ausencia de efecto del ozono entre los animales enterectomizados podría explicarse, en parte, porque, a pesar de la magnitud del insulto inflingido, la rata conserva un tramo intestinal suficientemente desarrollado, que puede desencadenar por sí mismo los mecanismos propios de la adaptación intestinal, sin necesidad de agentes promotores externos.^{37,43-47}

Llamó la atención que el beneficio del tratamiento con ozono fue máximo entre las ratas sujetas a estrés quirúrgico. En este grupo, el tratamiento con ozono resultó en la menor pérdida de peso, el menor número de días en que el animal pierde peso, la mayor ganancia observada de peso, el mayor porcentaje de ratas que logran recuperar el peso inicial, el menor número de casos de diarreas, y el menor número de días con diarreas. Los efectos observados en este grupo podrían indicar hacia un efecto protector del ozono de la acción deletérea de las especies reactivas de oxígeno que se generan como consecuencia del insulto quirúrgico, y una aceleración del proceso de cicatrización tisular, tal y como se ha postulado para otros modelos experimentales.^{36,48}

El ozono podría ejercer sus efectos beneficiosos a través de productos secundarios generados durante la reacción de este gas con los dobles enlaces de las moléculas lipídicas, y los enlaces bisulfuros y los grupos sulfhidrilos de las proteínas presentes en las membranas celulares, y que pueden activar rutas bioquímicas de remoción de especies reactivas de oxígeno, e inducir la expresión de genes especificados.^{49,50} El ozono podría entonces modificar el flujo sanguíneo local, aumentar la velocidad de la ruta glucolítica en el eritrocito, promover la degradación de peróxidos y radicales libres de oxígeno, y activar la cadena respiratoria

mitocondrial.^{48,51} También este compuesto podría mejorar la reología de los eritrocitos, lo que favorecería el flujo sanguíneo intestinal, y reduciría la congestión tisular por atrapamiento de eritrocitos.⁴⁸ Por otro lado, el ozono puede estimular el sistema enzimático de la Glutación-peroxidasa, que elimina los lipoperóxidos circulantes.⁵¹

El tratamiento con ozono provocó en la rata enterectomizada una disminución significativa del número de las células de la serie blanca, incluyendo las subpoblaciones constituyentes, cuando este hallazgo se comparó con lo observado entre las ratas sujetas a similar insulto quirúrgico, y tratadas (o no) con oxígeno.

Como resultado de la resección intestinal, cabe esperar el inicio y perpetuación de una respuesta inflamatoria local y sistémica, de las que las células blancas juegan un rol central en la producción de factores quimiotácticos, la fagocitosis de restos celulares y microorganismos patógenos, la presentación de antígenos, la producción de anticuerpos, y el reclutamiento de clones celulares que después de sucesivas divisiones resultarán en células inmunocompetentes, altamente especializadas.⁵² La leucocitosis, revertida en incrementos de los neutrófilos y los linfocitos, podría ser la expresión de todas estas actividades en la sangre periférica del animal. Luego, la disminución del tamaño de las subpoblaciones leucocitarias observada en las ratas enterectomizadas tratadas con ozono puede representar la capacidad de este gas de influir en la respuesta inflamatoria a través de la modulación de la proliferación de los macrófagos peritoneales, y la actividad fagocitaria.^{49,50} No debe desecharse del todo la capacidad del ozono de intervenir en las reacciones metabólicas vinculadas con la generación y utilización de la energía. El ozono también puede modular el alcance y magnitud de la respuesta inmune mediante la inhibición de la síntesis y liberación de TNF α , responsable a su vez de la producción y puesta en circulación de múltiples linfoquinas

involucradas en los estados inflamatorios.^{49,50,52}

El daño quirúrgico, o el tratamiento experimental, no trajeron consigo cambios en las concentraciones séricas de analitos y proteínas tenidas tradicionalmente como indicadores del estado nutricional. El comportamiento de la Albúmina sérica refleja la preservación de la síntesis de proteínas plasmáticas, y el logro de la constancia del medio interno, que se ha logrado independientemente de la administración de uno u otro tratamiento.⁵³ El comportamiento del Colesterol sérico también apunta hacia la estabilidad de las funciones orgánicas de síntesis metabólica, y la homeostasis interna.⁵⁴

La constancia de las cifras séricas de Creatinina permite afirmar que existe un buen funcionamiento renal, por un lado, y que la pérdida de masa muscular esquelética no fue significativa al final del período de observación, por el otro.⁵⁵ Cualquier patrón que pudiera ser aparente de la inspección de los resultados finales falló en alcanzar una significación estadística, como para atribuirla al daño quirúrgico, o el tratamiento experimental.

La Creatinina urinaria se ha propuesto como un indicador proporcional (aunque indirecto) de la masa muscular esquelética.^{56,57} Resultó llamativo que la excreción urinaria de Creatinina fuera máxima entre las ratas sujetas a estrés quirúrgico y tratadas con ozono. Coincidentemente, estas ratas exhibieron la mayor ganancia de peso al final del período de observación, y los valores máximos del peso corporal. Estos hallazgos indican que, de alguna manera, el tratamiento con ozono protegió al animal de la acción deletérea del insulto quirúrgico, y contribuyó a preservar la integridad de la masa muscular esquelética, e incluso, incrementar el tamaño de este vital compartimiento corporal. Sin embargo, el efecto protector del ozono no se pudo observar en las ratas enterectomizadas: la insuficiencia intestinal post-quirúrgica se coaligó al daño quirúrgico infligido para

resultar en una depleción importante de la masa muscular esquelética, equivalente al 67% del valor observado en las ratas controles. La pérdida de masa muscular esquelética pudiera explicarse por la imposibilidad de del intestino remanente de absorber nutrientes esenciales para la reposición tisular y/o la hipercatabolia secundaria a la conducta quirúrgica practicada.^{43,52-53} Tal parece que la intensidad y extensión del insulto quirúrgico sobrepasó el supuesto efecto protector del ozono.

Ahora bien, si el Ozono fuera capaz de promover la rehabilitación funcional de un intestino extremadamente acortado, se podrían ver los efectos en indicadores de la función intestinal como la absorción *in vitro* de glucosa, y la actividad lactásica. Ello no pudo demostrarse en este trabajo: la absorción de glucosa a través del epitelio intestinal estaba disminuida para todos los grupos experimentales, y el tratamiento con un gas u otro no se tradujo por una variación significativa del comportamiento de este indicador. La actividad lactásica también se observó disminuida en todos los grupos experimentales, sin que el tratamiento administrado introdujera alguna diferencia significativa. Debe hacerse notar que las disacaridasas intestinales (que incluyen la lactasa) se encuentran en la superficie del borde en cepillo de la microvellosidad intestinal, embebidas en el glicocálix.⁵⁸ Durante la ocurrencia de diarreas, el glicocálix puede ser arrastrado, y expulsado con las heces, lo que se traduce en pérdida de la capacidad intestinal de digerir y absorber monosacáridos importantes para la homeostasis metabólica.⁵⁹ La duración de las diarreas en los grupos experimentales representó aproximadamente el 10% del período de observación, y la ausencia de efecto del tratamiento con ozono sobre la actividad lactásica podría indicar que el glicocálix perdido durante las diarreas aún no se ha recuperado lo suficientemente como para responder maximalmente a la supuesta

capacidad del gas de promover una mayor suficiencia del intestino remanente.

El examen de las preparaciones histopatológicas de la mucosa intestinal remanente arrojó más luces sobre la supuesta capacidad del ozono como promotor de la rehabilitación intestinal. El ozono falló en inducir una respuesta hiperplásica/hipertrófica de las vellosidades intestinales en la mucosa de las ratas enterectomizadas tratadas con este gas. En todos los grupos experimentales, sin importar el tipo de agresión o el tratamiento aplicado, se observó el mismo patrón histológico, consistente en un afinamiento de la capa muscular (expresión tal vez de una presión intraluminal aumentada), y una reducción de la densidad de vellosidades por unidad de superficie, junto con cambios de la forma de la propia vellosidad. Las características de la mucosa intestinal permitieron corroborar los cambios ponderales, bioquímicos y funcionales registrados, y así elucidar el verdadero papel del ozono en la rehabilitación intestinal.

CONCLUSIONES

El ozono tuvo un efecto promotor máximo de la cicatrización tisular en las ratas en las que el intestino delgado fue seccionado transversalmente, y después anastomosado, dado por una menor pérdida de peso, una recuperación rápida del peso perdido, un mayor número de animales que igualaron (e incluso) sobrepasaron el peso inicial, una menor duración del período de diarreas, y una ganancia mayor de peso al final del período de observación. No se pudieron revelar los mecanismos por los cuales el ozono promovió la cicatrización en este subgrupo de ratas: los cambios observados en las variables hematológicas, bioquímicas, y funcionales no fueron lo suficientemente llamativos para establecer asociaciones válidas, como tampoco lo fueron los hallazgos en la mucosa del segmento intestinal remanente.

Por otro lado, el ozono falló en acelerar la recuperación de la función intestinal en las ratas enterectomizadas. Sin embargo, el tratamiento con el gas pudo haber influido en la magnitud, alcance y duración de la respuesta inflamatoria a la agresión quirúrgica que se les inflige a estos animales, por cuanto se observaron valores significativamente disminuidos de los leucocitos y linfocitos sanguíneos, pero no así de los polimorfonucleares.

El estudio de los mecanismos de adaptación intestinal en las ratas enterectomizadas demanda entonces de la identificación e introducción de indicadores útiles de la ocurrencia de tales procesos. En este sentido, sería recomendable introducir en el perfil bioquímicos proteínas hepáticas específicas como la prealbúmina, evaluar la respuesta de las subpoblaciones leucocitarias a mitógenos conocidos, y estudiar la dinámica de los cambios que ocurren a nivel de la mucosa intestinal con marcadores radioactivos/inmunofluorescentes.

Hay que hacer notar que las enterectomías fueron distales, y el segmento preservado se correspondió con el yeyuno proximal: un sector altamente especializado en las funciones intestinales que debe desempeñar. Es posible que este segmento no sea capaz de diferenciarse más allá de un límite biológico impuesto por el desarrollo del tejido, el órgano como tal, e incluso la especie. Sería entonces interesante evaluar la respuesta al tratamiento con ozono de los animales en los que se realizan enterectomías proximales, cuando el segmento remanente se corresponde a las porciones medias y finales del ileon. El ileon se diferencia tanto histológicamente como funcionalmente del yeyuno. En un trabajo anterior se comprobó que la curva de evolución del peso post-operatorio era diferente si el ileon constituía el segmento remanente después de enterectomías proximales.³⁷ Es posible que en este modelo experimental se observe una

significativa respuesta adaptativa después del tratamiento con el ozono.

Finalmente, debe hacerse notar que los modelos murinos de adaptación intestinal son una opción popular para el estudio de los cambios bioquímicos e histológicos que ocurren en la mucosa del segmento remanente después de resecciones masivas, pero no se ha podido establecer que los cambios observados en las ratas enterectomizadas sean similares a los observados en seres humanos con intestinos acortados quirúrgicamente.⁶⁰

AGRADECIMIENTOS

Dr. Pedro Rodríguez Sosa, Director del Centro de Cirugía Experimental del Instituto Superior de Ciencias Médicas de la Habana, por el apoyo y la colaboración prestada en la realización de este trabajo.

Dr. Carlos Domínguez Alvarez, Departamento de Anatomía Patológica del Hospital Clínico quirúrgico "Hermanos Ameijeiras", por el análisis de las preparaciones histopatológicas de la mucosa del segmento intestinal, y la documentación de los resultados mediante las correspondientes microfotografías.

Dr. Sergio Santana Porbén, Profesor Instructor de Bioquímica, Escuela de Medicina de La Habana, por la ayuda brindada en el procesamiento, análisis e interpretación de los datos, y la redacción de este artículo.

SUMMARY

The capability of ozone to promote intestinal rehabilitation after massive enterectomies was studied by means of a Short Bowel Syndrome (SBS) model developed in adult Wistar rats after resection of 75% of bowel length. Proximal jejunum was preserved. Bowel-resected rats received 15 doses of ozone at 0.5 mg/Kg body weight rate (Group III: ICO3). A second group of rats with their bowels resected in a similar way received equal number of doses of oxygen at 1 mL per each 100 grams of animal body weight rate

(Group IV: ICO2). The experimental treatment was administered through the rectum by means of a cannule. The results observed in these two groups were contrasted against those of two other more in which the small bowel was transversally cut at the level of ileum, 10 cm before the ileocecal valve, and resutured (Groups V: EQO3 – VI: EQO2). A fifth group was included with bowel-resected rats that did not receive treatment at all (Group II: ICO0). There was also a group of non-operated/non-treated rats that served as controls (Group I). The ozone promoting capability was assessed through the evolution of post-surgical weight, occurrence and duration of diarrheas, hematological and biochemical measurements, indicators of the bowel activity, and histopathological analysis of gut mucosa villi samples. Ozone promoted a rapid healing in Groups V – VI, which resulted in a prompt recovery of animal weight. Urinary Creatinine excretion was maximal in Group V, coincidental with highest weight gains. Ozone failed in shortening the bowel insufficiency period following massive resection: bowel-resected, ozone-treated rats were the ones that lost most grams of weight during more days. Ozone treatment also caused a reduction in the counts of leukocytes and lymphocytes in gut-resected, ozone-treated rats. Treatment with either gas did not brought about an increase on neither the number nor the size of villi in the mucose of the remaining bowel. In the bowel remaining after massive resection healing and rehabilitation processes can occur simultaneously, both ultimately aimed to compensate for lost functions and sustain the nutritional status of the animal. Ozone might influence upon tissue healing, but that does not imply a faster adaptation of bowel remaining after massive enterectomies. **López Miranda J.** Ozone as promotor of intestinal rehabilitation in rats subjected to massive enterectomies. RCAN Rev Cubana Aliment Nutr 2007;17(2):109-128. RNPS: 2221. ISSN: 1561-2929.

Subject headings: Bowel resection, Short bowel syndrome, Ozone, Healing, Intestinal rehabilitation.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1- Booth IW, Lander AD. Short bowel syndrome. Short bowel syndrome. Baillieres Clin Gastroenterol 1998;12:739-73.
- 2- Síndrome de intestino corto. Actas de un Simposio. Facultad de Medicina de la Universidad de Riberáo Preto. Brasil: 1997.
- 3- Landazábal G. Síndrome del intestino corto. Rev Colomb Gastroenterol 1993;8:25-32.
- 4- Rasslan S, Fava J, Mandía Neto J, Chaves AF. Efectos secundarios de resecciones intestinales extensas. An Paul Med Cir 1984;111:13-21.
- 5- Rached de Paoli I. Soporte nutricional en el niño con síndrome de intestino corto.
- 6- Caligraphy CA. Caracas: 1999. pp. 225-36.
- 7- Varela Fasciento G, Greenawalt SR, Villegas Alvarez F. Short bowel syndrome in patients studied at the National Institute of Pediatrics in Mexico. Arch Med Res 1998;29:337-40.
- 8- Castillo Durán C, Guardía S, Young T, Herskovic Lax P, Fuentes A, Harúm A y cols. Experiencia nacional en el manejo del síndrome de intestino corto en niños. Rev Chil Pediatría 1996;67:121-4.
- 9- Sánchez Fernández P, Córdova Amurrio C, Blanco Benavides R, Niño Solis J. Síndrome de intestino corto. Opciones quirúrgicas. Rev Med IMSS (México) 1998;36:7-12.
- 10- Tapia Jurado J, Murguía Corral R, García Correa G, Villazón Salud S, Arriaga Díaz G, Ramírez Arellano AL y cols. Intestino corto. Experiencia y tratamiento médico quirúrgico actual. Cirugía General (México) 1997;19:20-6.
- 11- Iglesias ACRG, de Castro Silva Jr. O, Ceneviva R. Alternativas quirúrgicas de tratamiento del síndrome de intestino corto. Medicina (Ribeirão Preto) 1994;27:320.

- 12-Rodríguez Montes JA, García Sancho Téllez L. Opciones terapéuticas en el paciente con intestino corto [Editorial]. *Nutr Hosp (España)* 1998;13:207-9.
- 13-Bonofiglio FC. Trasplante de intestino delgado: estado actual. *Rev Argent Anesthesiol* 2000;58:158-62.
- 14-Villegas Alvarez F, Varela Fascinetto G, Jiménez Bravo MA, Viguera Villaseñor RM, Vences Mejía A. Comparación de dos tipos de trasplante experimental en el tratamiento del intestino corto letal. *Rev Invest Clin* 1997;49:197-204.
- 15-Paper H, Fagundes DJ, Goldeberg S, Novo Ferreira Neil, Juliano Y, Bekhor D. Glucose absorption by a segment of distal colon interposed between two segments of small bowel after 80% resection. *Acta Cir Bras* 1990;5:154-9.
- 16-Argibay P, Cavadas D, San Miguel R, Bradi C, Sivori E, Puidgdeval JC y cols. Trasplante de intestino: resultados de modelos experimentales como paso previo a un programa clínico. *Rev Argent Cir* 1999;7:77-83.
- 17-Almeida Karkow FJ, Birilini C, Ferreira Lisboa LA, dos Santos JE, Rasslan S. Influencia de diferentes fuentes nitrogenadas en la adaptación intestinal después de una extensa enterectomía en ratas. *Rev Col Bras Cir* 1991;18:33-41.
- 18-Byrne TA, Morrissey TB, Natttakom TV, Ziegler TR, Wilmore DW. Growth hormone, glutamine and a modified diet enhance nutrient absorption in patients with severe short bowel syndrome. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 1995;19:296-302.
- 19-Cagigas Reig AL, Blanco Anesto J. Prebióticos y probióticos, una relación beneficiosa. *Revista Cubana Aliment Nutr* 2002;16:63-8.
- 20-González MI. Hormona de crecimiento: su uso en la asistencia nutricional del paciente crítico. *Bol Hosp San Juan de Dios (Chile)* 1996;43:19-24.
- 21-Cukier C, Waitzberg DL, Chaer Borges V, Silva MLT, Gama Rodríguez J, Pinotti HW. Clinical use of growth hormone and glutamine in short bowel syndrome. *Rev Hosp Clin Fac Med Univ Sao Paulo* 1999; 54:29-34.
- 22-Calzadilla Camps E. Uso del factor de crecimiento epidérmico como acelerador de la adaptación intestinal en un modelo animal de intestino corto. Trabajo de Terminación de Residencia en Fisiología Médica. Escuela de Medicina de La Habana. La Habana: 2003.
- 23-Llanes CC. Ozono: diversidad terapéutica. *Avances Médicos de Cuba* 1995;3:30.
- 24-Antoszewski Z, Kulej J, Wygledowski M, Kozakiewicz J, Antoszewski L, Moxzkowics T y cols. Some aspects of ozone therapy. *Przegl Lek* 1997;54:561-5.
- 25-Recio Del Pino E, Arias Serrano M, Rodríguez del Río M, Garrido MA. Aspectos de la ozonoterapia en pacientes con neuropatía epidémica. *Rev Cubana Enferm* 1999;15:114-8.
- 26-Díaz Hernández O, Castellanos González R. Ozonoterapia en úlceras flebotáticas. *Rev Cubana Cir* 2001;40:123-9.
- 27-Quiñones M, Menéndez S. Ozonoterapia en el tratamiento de las úlceras de miembros inferiores causadas por insuficiencia venosa crónica. *Rev CENIC Cienc Biol* 1989;20:76-80.
- 28-Díaz Batista A, García Mesa M, Piña Manresa C, Menéndez Cerero S. Efecto del ozono sobre la activación plaquetaria en pacientes con enfermedades vasculares periféricas: Informe preliminar. *Rev Cubana Invest Biomed* 2001;20:42-4.
- 29-Romero A, Menéndez S. La ozonoterapia en la aterosclerosis ocliterante. *Rev CENIC Cienc Biol* 1989;20:70-6.
- 30-Ferrer Mahojo LA, Santos Díaz D, Menéndez Cerero S, Pérez Rodríguez Z. Ozonoterapia y magnetoterapia: nuevos métodos en la rehabilitación del paciente con glaucoma crónico simple. *Rev Cubana Oftalmol* 1996;9:12-8.
- 31-Falcón Lincheta L, Simón RD, Menéndez Cerero S, Landa Díaz N, Moya Duque S.

- Solución para la epidermofitosis de los pies en integrantes de las Fuerzas Armadas Revolucionarias. *Rev Cubana Med Milit* 2000;29:98-102.
- 32- Escarpanter Bullés JC, Valdés Díaz O, Sánchez Raudal R, López Valdés Y, López García C. Resultados terapéuticos en la osteoartritis de la rodilla con infiltraciones de ozono. *Rev Cubana Invest Biomed* 1997;16:124-32.
- 33- Carreiro Piloto V, Almagro Urrutia ZE. Efectividad del oleozón en el tratamiento de la estomatitis subprótesis. *Rev Cubana Estomatol* 2000;37:140-5.
- 34- Cruz Guerra O, Menéndez Cerero S, Martínez Jordán ME, Clavera Vázquez T. Aplicación de la ozonoterapia en el tratamiento de la alveolitis. *Rev Cubana Estomatol* 1997;34:21-4.
- 35- Remigio Montero A, González Carvajal Y, Zamora Rodríguez Z, Fonseca López G. ¿Influye la ozonoterapia sobre la médula ósea de ratones tratados? *Rev Cubana Invest Biomed* 1999;18:24-6.
- 36- Lean OS, Menéndez S, Merino N, Castillo R, Sam S, Pérez L y cols. Ozone oxidative preconditioning: a protection against cellular damage by free radicals. *Mediators Inflamm* 1998;7:289-94.
- 37- Santana Porbén S. Resección de intestino delgado en la rata. *Boletín de Cirugía Experimental. Centro de Cirugía Experimental. Escuela de Medicina de La Habana.* 1987;1:19-29.
- 38- Newey H, Smyth DH, Whaler BC. The absorption of glucose by the *in vitro* intestinal preparation. *J Physiol* 1955; 129:1-11.
- 39- Trinder P. Determination of glucose in blood using glucose oxidase with an alternative oxygen acceptor. *Ann Clin Biochem* 1969;6:24-5.
- 40- Dalqvist A. Method for assay of intestinal disaccharidases. *Anal Biochem* 1964;7:18-25.
- 41- SPSS Statistical Product and Service Solutions. Versión 10.5 para Windows. Jandel Scientific. Estados Unidos.
- 42- Martínez Canalejo H, Santana Porbén S. Manual de Procedimientos Bioestadísticos. Editorial Ciencias Médicas. La Habana: 1990.
- 43- Dowling RH, Booth CC. Structural and functional changes following small intestinal resection in the rat. *Clin Sci* 1967; 32:139-49.
- 44- Gleeson MH, Cullen J, Dowling RH. Intestinal structure and function after small bowel by-pass in the rat. *Clin Sci* 1972; 43:731-42.
- 45- Sitren HS, Bryant M, Ellis LM. Species differences in TPN-induced intestinal villus atrophy. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 1992;16(Suppl):30S (Abstract).
- 46- Johnson LR, Copeland EM, Dudrick SJ, Lichtenberger LM, Castro GA. Structural and hormonal alterations in the gastrointestinal tract of parenterally fed rats. *Gastroenterology* 1975;68:1177-83.
- 47- Hosoda N, Nishi M, Nakagawa M, Hiramatsu Y, Hioki K, Yamamoto M. Structural and functional alterations in the gut of parenterally or enterally fed rats. *J Surg Res* 1989; 47:129-33.
- 48- Merin O, Attias E, Elstein D, Schwalb H, Bitran D, Zimran A y cols. Ozone administration reduces reperfusion injury in an isolated rat heart model. *J Card Surg* 2007;22:339-42.
- 49- Madej P, Plewka A, Madej JA, Nowak M, Plewka D, Franik G y cols. Ozonotherapy in an induced septic shock. I. Effect of ozonotherapy on rat organs in evaluation of free radical reactions and selected enzymatic systems. *Inflammation* 2007; 30:52-8.
- 50- Madej P, Plewka A, Madej JA, Nowak M, Plewka D, Mroczka W y cols. Ozone therapy in induced endotoxemic shock. II. The effect of ozone therapy upon selected histochemical reactions in organs of rats

- in endotoxemic shock. *Inflammation* 2007;30:69-86.
- 51- Peralta C, Xaus C, Bartrons R, Leon OS, Gelpi E, Roselló Catafau J. Effect of ozone treatment on reactive oxygen species and adenosine production during hepatic ischemia-reperfusion. *Free Radic Res* 2000;33:595-605.
- 52- Aggarwal BB, Shishodia S, Ashikawa K, Bharti AC. The role of TNF and its family members in inflammation and cancer: lessons from gene deletion. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy* 2002;1:327-41.
- 53- Clark MA, Hentzen BT, Plank LD, Hill GL. Sequential changes in insulin-like growth factor 1, plasma proteins, and total body protein in severe sepsis and multiple injuries. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 1996;20:363-70.
- 54- Capponi AM. Regulation of cholesterol supply for mineralocorticoid biosynthesis. *Trends Endocrinol Metab* 2002;13:118-21.
- 55- Crim MC, Calloway DH, Margen S. Creatine metabolism in men: Creatine pool size and turnover in relation to creatine intake. *J Nutr* 1976;106:371-81.
- 56- Forbes GB, Bruining GJ. Urinary creatinine excretion and lean body mass. *Am J Clin Nutr* 1976;29:1359-66.
- 57- Bleiler RE, Schedl HP. Creatinine excretion: variability and relationships to diet and body size. *J Lab Clin Med* 1972;59:945-55.
- 58- Ferraris RP, Diamond J. Regulation of intestinal sugar transport. *Physiol Rev* 1997;77:257-302.
- 59- Keelan M, Walker K, Thomson AB. Intestinal brush border membrane marker enzymes, lipid composition and villus morphology: effect of fasting and diabetes mellitus in rats. *Comp Biochem Physiol A* 1985;82:83-89.
- 60- Drozdowski L, Thomson ABR. Intestinal mucosal adaptation. *World J Gastroenterol* 2006;12:4614-27.