

Efecto de la administración previa de ozono-médico sobre mortalidad aguda inducida por de la digoxina en ratones

Héctor Pérez-Saad

Dr. en Ciencias Médicas, PhD, Especialista de I y II Grado en Farmacología Clínica. Departamento de Neurología Experimental, Instituto de Neurología y Neurocirugía.

Vivian Borroto

Especialista en Medicina General Integral, Máster en Medicina Natural y Bioenergética. Área de Medicina Natural del Departamento de Medicina Física y Rehabilitación. Instituto de Neurología y Neurocirugía.

Alfredo Cuba

Asistente Técnico de Investigaciones, Departamento de Neurología Experimental, Instituto de Neurología y Neurocirugía.

Luisa Batilde

Especialista en Nutrición Humana, Máster en Medicina Natural y Bioenergética, Centro Nacional de Rehabilitación Hospital "Julio Díaz"

Palabras clave

ozono
contracción cardíaca
digoxina
cardio-toxicidad

Resumen

Varios reportes de estudios básicos y clínicos han sugerido un efecto beneficioso de la administración de ozono en la contractibilidad cardíaca, a partir de experimentos en corazón aislado y en investigaciones clínicas. Sin embargo, no existen estudios sobre la interacción del ozono médico con otros agentes farmacológicos empleados crónicamente en el tratamiento de dicha condición clínica. El objetivo del presente trabajo fue estudiar la interacción del ozono médico con la digoxina, a través de la acción cardiotoxica de esta última. En los experimentos se emplearon ratones C-57 machos de 20 g a 24 g de peso corporal. Se conformaron 4 grupos divididos a su vez en 6 subgrupos de 6 animales cada uno. Dos de los grupos recibieron oxígeno (control) u ozono-oxígeno (1,2 mg/kg), respectivamente, por vía rectal, en volúmenes de 0,5 mL, 30 min antes de la administración de digoxina por vía intraperitoneal, en dosis de 2,0; 2,5; 3,0; 3,5; 4,0 y 4,5 mg/kg correspondientes a los diferentes subgrupos. Los otros dos grupos recibieron oxígeno u ozono-oxígeno durante 6 días consecutivos y digoxina 24 h después, empleando la vía y dosis referidas. Se empleó el método de Lichtfield y Wilcoxon para el cálculo de las DL₁₀, DL₅₀ y DL₉₀, así como para el análisis del paralelismo y desplazamiento de las curvas dosis-respuesta. Los resultados mostraron un incremento en la toxicidad de la digoxina en los animales tratados con ozono cuando se compararon con el grupo que recibió oxígeno.

Sugerencia sobre cómo citar este artículo:

Perez-Saad, H.; Borroto, V.; Cuba, A.; Batilde, L. (2014). Efecto de la administración previa de ozono-médico sobre mortalidad aguda inducida por de la digoxina en ratones. *Revista Española de Ozonoterapia*. Vol. 4, nº 1, pp. 17-25.

Effect of the previous administration of medical ozone on acute mortality induced by the digoxine in mice

Keywords

ozone
heart contraction
digoxin
cardiotoxicity

Abstract

Several reports of basic and clinical studies have suggested a beneficial effect of the administration of ozone in the heart contraction, starting from experiments in isolated heart, and in clinical investigations. However, studies don't exist on the interaction of the medical ozone with other pharmacological agents used chronically in the treatment of heart failure. The objective of the present work was to study the interaction of the medical ozone with digoxin, through the cardiotoxic action of the latter. In the experiments male mice C-57 from 20 g to 24 g of corporal weight were used. Four groups divided in 6 subgroups of 6 animals each, were used. Two of the groups received oxygen (control) or ozone-oxygen (1.2 mg/kg), correspondingly, in volumes of 0.5 mL, 30 min before intraperitoneal administration digoxine was performed, in doses of 2, 2.5, 3.0, 3.5, 4.0 and 4.5 mg / kg respectively. The other two groups received oxygen or ozone-oxygen during 6 serial days and digoxine 24 h later, using the referred route and dose. For the calculation of DL10, DL50 and DL90, as well as for the analysis of the parallelism and displacement of the dose-response curves, the method of Lichtfield and Wilcoxon (computerized) was used. The results showed increase in digoxina toxicity in the group treated with ozone, when compare to oxygen treated group

INTRODUCCIÓN

El ozono fue empleado por primera vez en medicina para la limpieza y desinfección de heridas. En las últimas décadas la aplicación del ozono médico se ha extendido considerablemente debido a sus propiedades como antiinflamatorio, antiséptico y modulador del estrés oxidativo, así como a sus efectos beneficiosos sobre la circulación periférica y la oxigenación tisular. Su empleo en medicina ha sido favorecido tanto por las pocas contraindicaciones que presenta así como por su inocuidad y seguridad. Actualmente, el espectro de aplicación terapéutica del ozono cubre una amplia gama de enfermedades y desórdenes de salud, en los que ha mostrado una reconocida eficacia como medicina complementaria.¹⁻⁵

Informes preclínicos recientes han demostrado un potencial efecto cardioprotector del ozono médico en modelos de isquemia y daño por reperfusión, en corazón aislado extraído de animales normales, así como en estudios realizados en corazones de animales con diabetes experimental por estreptozotocina. Se ha informado que aumenta la función contráctil del corazón debido a que, por un lado, mejora el metabolismo del músculo cardíaco, y por otro, aumenta la serotonina circulante, a lo que se une un mayor aporte de ácidos grasos. Su aplicación en pacientes con aurícula fibrilante y refractarios al tratamiento farmacológico convencional mejora la probabilidad de restauración del ritmo sinusoidal.⁴⁻⁷ Estos antecedentes, entre otros, han estimulado el interés por la aplicación de ozono médico en desórdenes cardíacos, particularmente en la insuficiencia cardíaca.

Tomando en cuenta que la digoxina es uno de los glucósidos cardiotónicos más frecuentemente empleados en la insuficiencia cardíaca, que en determinadas condiciones clínicas pudiera coexistir con la ozonoterapia en el mismo paciente, es preciso conocer cuál sería la posible influencia del ozono sobre los efectos de dicho fármaco, sobre lo cual no existen reportes en la literatura médica. Por tanto, el objetivo del presente trabajo fue realizar una exploración inicial en esta dirección, tomando como base la caracterización de la toxicidad aguda de la digoxina y la posible influencia sobre ésta del tratamiento previo con una dosis única ozono-médico.

MATERIALES Y MÉTODOS.

Animales: Se emplearon ratones machos, C57, obtenidos en CENPALAB, con un peso corporal entre 20 g y 24 g, los que fueron adaptados a las condiciones del bioterio y del laboratorio del departamento, durante un mínimo de una semana. Los mismos fueron almacenados en jaulas plásticas, en número de 10 ratones por jaula, con acceso libre al alimento y al agua, a temperatura entre 20 oC y 22 oC, humedad relativa entre 65 % y 75 % y un ciclo de luz/oscuridad 12x12. El cuidado y manipulación de los animales se basó en el cumplimiento de las normas establecidas por el CENPALAB, sobre los aspectos éticos en el manejo de los animales de laboratorio.

Administración de ozono y digoxina. El ozono médico se obtuvo mediante el empleo del equipo OZOMED-MINI (Centro de Investigaciones del Ozono de Cuba) y se administró por vía rectal empleando una cánula especialmente preparada a partir de una aguja hipodérmica (20G),

dotada de un extremo terminal en forma de balón (1,5 mm de diámetro), con el objetivo de facilitar una penetración no traumática. Se administró un volumen de 0,5 ml de ozono médico a la concentración requerida para alcanzar una dosis de 1,2 mg/kg. En los animales controles se administró sólo oxígeno, en igual volumen. Con base en experimentos previos, la digoxina se administró por vía intraperitoneal, a concentración de 0,3 mg/ml y en volúmenes variables (0,2 - 0,55 ml), en dependencia de las dosis requeridas dentro del rango de dosis letales (entre la máxima DL0 y la mínima DL100) y del peso particular de cada animal.

Se realizaron dos series experimentales: la serie 1, basada en la realización de curvas dosis-respuesta de letalidad de digoxina, y la serie 2, donde se utilizaron dosis únicas del cardiotónico.

Serie 1: Determinación del efecto del ozono sobre la relación dosis-letalidad de la digoxina. Se obtuvo la curva dosis/respuesta (dosis letales) empleando dosis de 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5 y 5 mg/kg de digoxina, considerando 2,5 mg/kg como la máxima dosis no letal (DL0) y 5 mg/kg la mínima dosis letal para todos los animales (DL100). Fueron empleados 2 grupos de 48 animales cada uno, divididos a su vez en 6 subgrupos de 8 animales, correspondientes a las seis dosis de digoxina mencionadas. Un grupo control recibió primero la administración rectal de oxígeno y 1 minuto después la administración de digoxina, de igual forma el otro grupo recibió ozono médico en lugar de oxígeno. A partir de la inyección de digoxina se esperó hasta 8 horas para observar las muertes en cada subgrupo. Se realizó la estimación de la DL10, la DL50 y la DL90, así como la comparación estadística entre ambos grupos, empleando una variante computarizada del clásico método de Litchfield y Wilcoxon.⁸

Serie 2. Se emplearon 4 grupos de 12 animales cada uno, seleccionando animales de igual peso corporal (22 g). Dos grupos de animales recibieron administración rectal de oxígeno u ozono médico, en la forma ya descrita, y 1 minuto después estos grupos recibieron 2,5 y 4 mg/kg i.p., correspondientemente. Dichas dosis se corresponden con las DL0 y DL50, respectivamente, obtenidas a partir de la curva dosis-respuesta del grupo control). El tiempo de sobrevida y la mortalidad se compararon empleando la prueba U de Mann Whitney de dos colas y la Probabilidad Exacta de Fischer, respectivamente.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Serie 1. En los animales pretratados con ozono médico se observó un incremento en la toxicidad de la digoxina, expresada en la reducción de la DL50 y la DL90, calculadas a partir de la curva dosis-respuesta, lo que podría sugerir que bajo el efecto del ozono son necesarias dosis menores del cardiotónico para lograr el 50 % y el 90 % de muertes. Sin embargo, la comparación por separado de estos dos niveles de dosis letales no mostró diferencias estadísticamente significativas en comparación con el control, lo que además se evidenció por el entrecruzamiento de los límites de confianza (Fig.1).

Serie 2. Esta serie se realizó tomando en cuenta las tendencias observadas en la Serie 1, considerando la variabilidad experimental del efecto de la digoxina y las características de su curva dosis-respuesta, donde pequeños cambios en las dosis significan cambios marcados

en los efectos. En este caso se tomaron animales de igual peso. Se estudió el efecto de la DL0 y la DL50 en 2 grupos controles pretratados con oxígeno y en otros 2 grupos pretratados con ozono médico. Los resultados mostraron que tras la administración de la DL0 de digoxina, en el grupo de animales pretratados con oxígeno no hubo mortalidad y en el grupo pretratado con ozono médico la mortalidad fue de un 33,3%. Por otra parte, con la administración de la DL50 hubo una sobrevivencia de un 50% en el grupo control pretratado con oxígeno, con diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$) respecto al grupo pretratado con ozono, donde la sobrevivencia fue de un 8,4 %. (Fig. 2). Cuando se comparó el tiempo de sobrevivencia en los grupos de la DL50, éste fue menor en el grupo pretratado con ozono, con una significación estadística ($p < 0,01$). El grupo de la DL0 pretratado con ozono no se diferenció estadísticamente del grupo control de la DL50, lo que indica que la administración previa de ozono hace que la DL0 se comporte como DL50. (Fig. 3).

Debido al estrecho margen de seguridad de la digoxina y a su propio mecanismo de acción, una característica importante de la misma es que tanto sus efectos terapéuticos como tóxicos, tienen una especial susceptibilidad de ser afectados por la acción de otros fármacos, de tal forma, que en el sitio <http://www.drugs.com/drug-interactions/digoxin.html> se han descrito más de 700 fármacos comunes que modifican la acción del cardiotónico. Entre estos se describen efectos aditivos depresores de los nodos senoauricular y atrioventricular (adenosina); disminución de la secreción del túbulo renal mediada por P-glicoproteínas (amiodarona, carvedilol, esmolol); desplazamiento de la unión de la digoxina a las proteínas plasmáticas (amiodarona, benzodiacepinas); efecto de inotropismo positivo e hipercalcemia (serotonina, preparados de calcio); efectos sobre la prolongación del intervalo PR (dolasetron, bloqueadores beta adrenérgicos; bloqueadores de canales de calcio; inhibidores de proteasas tales como el atazanavir y el lopinavir), y del segmento QRS (flecainida, moricizina; quinidina, lacosamida; mefloquina; moricizina); disminución de la secreción del túbulo renal (inhibidores de la ACE, dronedarona, carvedilol y esmolol); inducción de hipopotasemia e hipomagnesemia (corticoesteroides, hidroclorotiazida); e incremento de actividad ectópica del marcapaso (agentes simpaticomiméticos).

Los efectos farmacológicos inmediatos del ozono están relacionados con un incremento en las especies reactivas del oxígeno (ROS, del inglés), las que actúan como mensajeros químicos para los receptores de membrana y varias funciones biológicas en el organismo, ocasionando un estrés oxidativo agudo transitorio que afecta prácticamente todos los órganos y sistemas. La acción oxidante del ozono lleva a la formación de peróxido de hidrógeno, el cual entra a todas las células y produce una diversidad de efectos que van a depender de las funciones específicas de los grupos celulares de los diferentes órganos, determinantes en el metabolismo y en las acciones de la mayoría de los fármacos (ej.: cambios en las enzimas y sistemas metabólicos del hígado, efectos de oxidación sobre las proteínas plasmáticas, cambios en las funciones renales, etc.).¹⁻⁵

Se conoce que la función metabólica del hígado juega un papel decisivo en los niveles sanguíneos de digoxina y sus metabolitos activos, lo cual incide tanto en sus efectos terapéuticos como en sus efectos tóxicos.⁹ Por tanto, posibles cambios en la función metabólica del hígado durante la administración aguda de ozono médico pudiera afectar la acción de la digoxina. Estudios realizados con propranolol, empleado como modelo experimental indican

que la administración de ozono médico hace más eficiente las funciones oxidativas del hígado y reduce las concentraciones sanguíneas de dicho fármaco, ¹⁰ por lo que podría esperarse un efecto similar en el caso de digoxina.

Se ha informado que la ozonoterapia mejora la función renal ¹¹ lo cual contribuiría a una disminución de los niveles sanguíneos de la digoxina, por tanto, a una reducción en lugar de un incremento de sus efectos.

Estudios hemodinámicos y microcirculatorios en pacientes con enfermedad isquémica del corazón tratados con ozonoterapia han demostrado un incremento en la función contráctil del miocardio, tomando como indicador la fracción de expulsión del ventrículo izquierdo, lo que podría interpretarse como un efecto inotrópico positivo, quizás como resultado de una mejoría en el metabolismo del músculo cardíaco. ⁴

Parece razonable inferir que el incremento en la toxicidad de la digoxina en los animales pretratados con ozono médico pudiera estar relacionado con un incremento en el calcio citosólico, ya que se ha reportado que el ozono moviliza un grupo de los mediadores que favorecen un mayor influjo de calcio hacia el interior de la célula, ^{12, 13} lo que, además de explicar el incremento de la contractilidad cardíaca, sugiere una acción sinérgica del ozono con la digoxina. Se ha informado que la ouabaína, otro cardiotónico, induce un incremento en las especies reactivas de oxígeno en el músculo cardíaco y que su efecto inotrópico positivo se debe parcialmente a esta acción, por lo que parece razonable suponer que este mecanismo es compartido con el ozono. ¹⁴

En conclusión, los resultados tomados de conjunto indican que la administración de una dosis única de ozono médico incrementa la toxicidad aguda de la digoxina, lo que se manifiesta en tres evidencias experimentales: 1) Tendencia hacia la reducción de las DL₅₀ y DL₉₀, 2) incremento en la mortalidad producida por la DL₀ y la DL₅₀, y 3) reducción del tiempo de supervivencia tras la administración de la DL₅₀ del cardiotónico. La dilucidación del mecanismo de acción mediante el cual la administración aguda del ozono médico incrementa la toxicidad de la digoxina requiere de nuevos diseños experimentales y otros resultados serán necesarios para un empleo más racional del ozono en pacientes tratados con digoxina.

Es preciso aclarar que el incremento en la toxicidad aguda de la digoxina por una dosis única de ozono médico, resultado descrito por primera vez en el presente trabajo, no necesariamente descarta la posibilidad del empleo simultáneo de ambos agentes en determinadas condiciones clínicas, pero es un factor que de no tenerse en cuenta, podría poner en peligro la vida de los pacientes sometidos a este tipo de terapia combinada.

GRÁFICA DE FIGURA 1

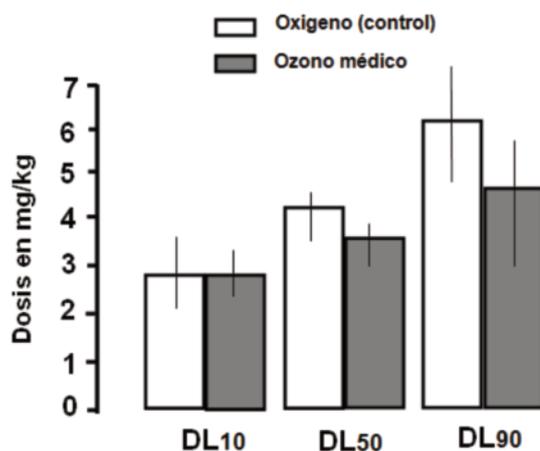


Fig. 1. Efecto de la administración previa de ozono médico sobre las DL10, DL50 y DL90 de la digoxina. La ordenada representa los valores de dichos niveles de dosis letales. Las líneas verticales representan los límites de confianza superiores e inferiores, obtenidos por el método de Litchfield y Wilcoxon. Se observa una tendencia hacia la disminución de la DL50 y la DL90, Pero se observa entrecruzamiento de los límites de confianza, lo que sugiere diferencia estadísticamente no significativa.

GRÁFICA DE FIGURA 2

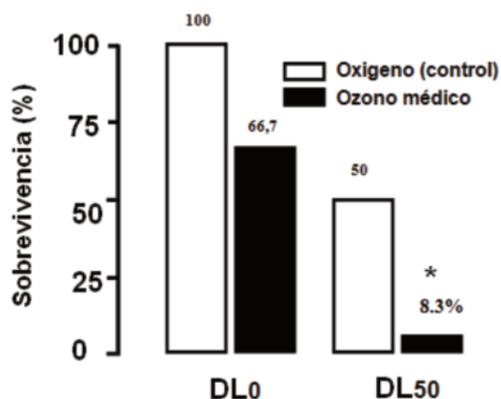


Fig. 2. Efecto de la administración previa de ozono médico sobre la sobrevivencia en animales tratados con las DL0 y DL50 de la digoxina. El asterisco indica diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$) cuando se compara con el control correspondiente, según la prueba de la Probabilidad Exacta de Fisher.

GRÁFICA DE FIGURA 3

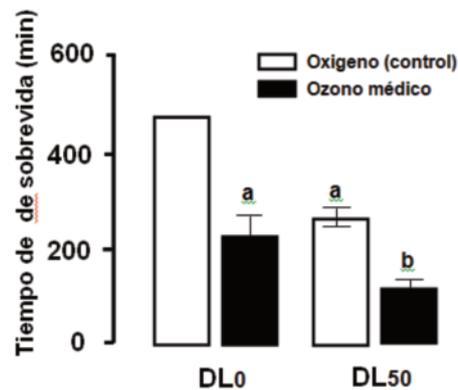


Fig. 3. Tiempo de supervivencia de animales muertos tras la administración de las DL0 y DL50 de digoxina, en grupos pretratados con oxígeno (control) y ozono médico. La columna en blanco de la DL0 control (sin muertes) representa el tiempo máximo de observación de las muertes (8 horas). Las letras desiguales indican diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,01$) cuando se comparó con el grupo control de la DL50, según la prueba U de Mann-Whitney de dos colas.

REFERENCIAS

1. Menéndez S, González R, Ledea OE, Hernández F, León OS, Díaz M. Ozono. Aspectos básicos y aplicaciones clínicas. La Habana, Cuba: Editorial CENIC; 2008.
2. Ajamieh HH, Berlanga J., Merino N., Martínez Sánchez G., Candelario-Jalil E., Menéndez S., Giuliani A., León OS. Role of protein synthesis in the protection conferred by ozone oxidative preconditioning in hepatic ischemia/reperfusion. *Transpl Int* 2005; 18:604-612.
3. Peralta C, León OS., Xaus C, Prats N, Jalil EC, Sala-Planell E et al. Protective effect of ozone treatment on the injury associated with hepatic ischemia-reperfusion: antioxidant-prooxidant balance. *Free Radical Res* 1999; 31:191-6.
4. Masik AA, Kamisheva EP, Peretiagin SP, Kuliakova EP. Experiencias en la aplicación de la ozonoterapia en el tratamiento de la enfermedad isquémica del corazón. // Ozono y métodos de terapia eferente en medicina. Resúmenes de la 3ra Conferencia científico-práctica de toda Rusia.- N. Nóvgorod.- 1998. p. 101.
5. Artemenko AV. Ozonoterapia en el tratamiento de enfermos con fibrilación auricular persistente. Conferencia científico-práctica Ruso-Ucraniana. Sebastopol. 2006; p. 13-14.
6. Merin O, Attias E, Elstein D, Schwalb H, Bitran D, Zimran A, and Silberman S. Ozone administration reduces reperfusion injury in an isolated rat heart model. *J Card Surg* 2007; 22:339-342.

7. Barackat SAE, Saleh NKM, Thabet SS, Salej HA, Fayez MA. Effect of medical ozone therapy on diabetes-induced cardiac dysfunction. *JASMR* 2008; 3: 167-175.
8. Litchfield JT and Wilcoxon FA. A simple method of evaluating dose-effect experiments. *J. Pharmacol Exp Ther* 1949; 96:99-113.
9. Salphati L. Metabolism of digoxin and digoxigenin digitoxosides in rat liver microsomes: involvement of cytochrome P4503A. *Amer J of Physiol* 1999; 29:171-185.
10. Zaky S, Fouad EA, Kotb HI. The effect of rectal ozone on the portal vein oxygenation and pharmacokinetics of propranolol in liver cirrhosis (a preliminary human study). *Brit J Clin Pharmacol* 2011; 71:411-5.
11. Calunga JL ,Trujillo Y, Menéndez S, Zamora Z, Alonso Y, Merino N and Montero T. Ozone oxidative postconditioning in acute renal failure. *J Pharm Pharmacol* 2009; 61:1-7.
12. García J. La exposición a ozono disminuye la adherencia y aumenta la permeabilidad de membrana de macrófagos alveolares de rata. *Rev Costarric Cienc Méd* 2001; v.22 n.1-2 San José jun. . versión impresa ISSN 0253-2948.
13. Fernández A. "Influencia del preconditionamiento oxidativo con ozono sobre los niveles de calcio", *Revista CENIC Ciencias Biológicas*, 1998; 29:134-136.
14. Tian J, Liu J, Garlid KD, Shapiro JI, Xie Z. Involvement of mitogen-activated protein kinases and reactive oxygen species in the inotropic action of ouabain on cardiac myocytes. A potential role for mitochondrial K(ATP) channels. *Mol Cell Biochem* 2003; 242:181-7.