

Instituto de Farmacia y Alimentos

## **ESTUDIO DE PACIENTES SOMETIDOS A OZONOTERAPIA MEDIANTE EL ENSAYO DE ELECTROFORESIS ALCALINA DE CÉLULAS INDIVIDUALES**

*Dra. Silvia Díaz Llera,<sup>1</sup> Lic. Jorge E. González Mesa,<sup>2</sup> Msc. Yanela González Hernández,<sup>3</sup> y Dr. Rolando Wong<sup>4</sup>*

**RESUMEN:** El ozono es un poderoso agente oxidante. Sin embargo, en determinadas condiciones y concentraciones es aplicado en enfermedades que cursan con un déficit en las defensas antioxidantes con el objetivo de estimularlas. Para el estudio del efecto genotóxico del ozono gaseoso utilizado en la autohemoterapia se estableció un diseño experimental el cual fue el realizado en 3 pacientes tratados con 200 mL de O<sub>3</sub>O<sub>2</sub> (50 µg/mL) vía autohemoterapia y 1 paciente tratado vía rectal con la misma dosis y concentración. Se tomaron 0,5 mL de sangre antes y después del tratamiento en los días 1, 7 y 14 y se manifestó un incremento del daño en los días 1 y 14 de la terapia después del tratamiento, no ocurriendo así en el día 7, donde se reflejó un posible período de adaptación. En ambos casos el análisis de las muestras se llevó a cabo utilizando el ensayo alcalino de electroforesis de células individuales o ensayo cometa que evalúa las rupturas de simple cadena y los sitios lábiles al álcali en el ADN.

**DeCS:** OZONO/uso terapéutico; TESTS DE MUTAGENICIDAD/métodos; ENSAYO COMETA/método; ADN.

El estudio del potencial genotóxico de compuestos usados como fármacos y también liberados al ambiente ocupacional de los trabajadores encargados de manipularlos y administrarlos, constituye una vía para la administración de riesgo de daño genético así como un camino para la toma de decisiones en relación con las medidas de protección, imprescindibles para el mantenimiento de la salud humana. En este trabajo se evalúa el efecto genotóxico del ozono (O<sub>3</sub>) terapéutico en pacientes y en trabajadores expuestos duran-

te la aplicación de la terapia o durante la preparación de fármacos derivados del O<sub>3</sub> y la actividad investigativa relacionada.

La determinación de daño se realizó mediante el ensayo Cometa que es una técnica apropiada como marcador de efecto para el monitoreo de sujetos expuestos a cualquier agente.<sup>1</sup> Este ensayo permite determinar el daño originado en el ADN por rupturas de cadenas (principalmente de simple cadena) y sitios lábiles a álcali.<sup>1</sup> Este trabajo se enmarca dentro del estudio de la

---

<sup>1</sup> Dra. en Ciencias Farmacéuticas

genotoxicidad del  $O_3$  y de sus intermedios reactivos (IRO). Reviste una gran importancia ya a que es la primera vez que se analiza el impacto de la exposición al  $O_3$  gaseoso en las instalaciones de salud y que se obtiene información del efecto de la exposición de este agente en el tiempo. Acorde con lo expuesto anteriormente se propone demostrar la posible inducción de daño al ADN como consecuencia de la ozonoterapia.

## **Métodos**

### **GENERACIÓN DE LA MEZCLA $O_3/O_2$**

El  $O_3$  utilizado se obtuvo mediante un ozonizador terapéutico (OZOMED, CNIC). Las concentraciones de  $O_3$  generados por el equipo fueron determinadas mediante la relación voltaje-flujo. Los tratamientos con  $O_3$  fueron realizados por volumen controlado.

### **TRATAMIENTO DE AUTOHEMOTERAPIA**

En una bolsa para transfusión se mezclan 200 mL de sangre del paciente con 200 mL de la mezcla  $O_3/O_2$  (50  $\mu\text{g/mL}$ ), se eliminó el gas sobrante y se transfundió la sangre tratada al paciente. El tratamiento se realizó diariamente.

### **TRATAMIENTO VÍA RECTAL**

Se aplicaron 200 mL de la mezcla  $O_3/O_2$  con una concentración de 50  $\mu\text{g/mL}$  y se empleó una sonda, 5 veces por semana.

### **MUESTREO**

#### **Pacientes**

Se tomaron muestras de sangre periférica (0,5 mL) de pacientes antes y a

los 5 min después de los tratamientos. El muestreo se realizó el primer, el séptimo y a los 14 días de haber comenzado el tratamiento. La sangre obtenida fue analizada mediante el ensayo de electroferosis alcalina de células individuales (EACI).

### **ENSAYO ALCALINO DE ELECTROFORESIS DE CÉLULAS AISLADAS**

Se suspenden 10  $\mu\text{L}$  de sangre en 150  $\mu\text{L}$  de agarosa de bajo punto de fusión al 0,5 % y añaden 75  $\mu\text{L}$  a 2 láminas de microscopio previamente preparadas con agarosa de punto de fusión normal al 0,5 %. Después las láminas se sumergieron en la solución de lisis (NaCl 2,5M, EDTA 100 mM y tris 10 mM, 1 % tritón, 10 % DMSO, PH 10) por 1 h a 4°C y posteriormente fueron sometidas a 20 min de desenrollamiento en tampón de electroforesis (3 % NaOH 10 N, 0,5 % EDTA 200 mM). Pasado este tiempo se efectúa la corrida a 300 mA y 25 V durante 20 min, después las láminas son lavadas con tampón de neutralización (TRIS 0.4M, PH 7,5). Por último son aclaradas con agua destilada y teñidas con bromuro de etidio (2 $\mu\text{g/mL}$ ) para ser analizadas con un microscopio de fluorescencia (OLYMPUS A2). En la evaluación del daño al ADN se registraron 50 células por muestra y se evaluaron las siguientes variables: porcentaje de células dañadas (% CD) y longitud total de migración del ADN (LT). En el procesamiento estadístico se estimaron parámetros descriptivos como media y desviación estándar. En los pacientes con respecto a la variable LT se utilizaron las pruebas *T-Student* simple y la pareada. En el estudio de los trabajadores expuestos se estimaron los mismos parámetros respecto a las variables LT y % CD al utilizar las pruebas *T-Student* simple y pareada.

## Resultados

Los resultados obtenidos de los pacientes se observan en las tablas 1 y 2. Inmediatamente después del tratamiento del primer día se aprecia un incremento significativo en la migración del ADN en todos los pacientes. A los 7 días los valores de migración de ADN no se diferencian significativamente de los valores basales, es decir de aquellos encontrados antes de iniciarse el tratamiento, por tanto, se detecta

una recuperación del daño (tablas 1 y 2). Sin embargo a los 14 días, la inducción del daño como consecuencia del tratamiento es significativamente diferente de los valores del mismo día antes de la terapia. Este incremento también se aprecia en el porcentaje de células dañadas el primer día, aunque no para el día 14. No existen diferencias en la respuesta respecto a la vía de administración, aunque es necesario destacar que es un sólo paciente el analizado.

TABLA 1. Valores de los porcentajes de células dañadas en pacientes expuestos al tratamiento de autohemoterapia y al tratamiento rectal

	Pacientes	Día 1		Día 7		Día 14	
		Antes	Después	Antes	Después	Antes	Después
Tratamiento de autohemoterapia	1	56	80	62	56	74	88
	2	50	80	40	52	76	84
	3	52	76	42	52	72	72
media± S.D		52,67±3,05	78,67*±2,31	48,0±12,1	53,33±2,31	73,33*±3,06	81,33*±8,33
Tratamiento rectal	1	42	92	66	74	88	98

TABLA 2. Valores de migración del ADN (longitud del cometa en mm ± D.S.) en pacientes expuestos al tratamiento de autohemoterapia y al tratamiento rectal

	Pacientes	Edad	Sexo	Fuma	Día 1		Día 7		Día 14	
					Antes	Después	Antes	Después	Antes	Después
Tratamiento de autohemoterapia	1	47	M	-	21,87 ±6,91	26,18* ±6,61	23,32 ±7,30	21,56 ±7,37	24,26* ±5,81	29,87* ±5,98
	2	46	F	<10	20,93 ±7,07	25,24* ±7,18	19,52 ±6,53	20,81 ±6,99	23,04* ±4,29	27,98* ±6,72
	3	39	F	-	23,08 ±10,19	41,98* ±18,43	21,70 ±6,70	24,63 ±10,22	41,58* ±20,05	46,45* ±20,18
Media±DS					21,95 ±1,09	31,13* ±9,41	21,51 ±1,91	22,33 ±2,02	29,62* ±10,36	34,76* ±10,16
Tratamiento rectal	1	69	F	-	24,31 ±12,07	46,05* ±19,41	27,20 ±11,61	34,01* ±16,08	52,58* ±19,42	84,03* ±24,72

\* Diferencia significativa con respecto a los valores del día 1 antes de iniciar la terapia, p<0,05

## Discusión

El hecho de no haberse detectado genotoxicidad al nivel cromosómico por incremento de la frecuencia de MN<sup>2</sup> o por incremento de la frecuencia de ICH<sup>3</sup>, no significa que no pueda existir daño oxidativo a nivel del ADN, ni que los IRO no puedan inducir mutaciones. Antes del tratamiento los valores de migración del ADN de los pacientes se correspondieron con los valores normales observados para los controles históricos no expuestos en estas condiciones experimentales.<sup>4</sup> Estos valores coinciden también con los reportados por otros investigadores.<sup>5,6</sup>

El incremento del daño después de los tratamientos de los días 1 y 14 d evidencia un efecto inmediato del tratamiento. Se manifiesta también un efecto acumulativo de daño en el porcentaje de células dañadas el día 14 antes de la aplicación de la terapia (tabla 1).

Hasta donde se conoce no se han reportado estudios sobre la inducción de rupturas de simple cadena y sitios lábiles al álcali en el ADN de pacientes expuestos al ozono terapéutico, solo reportes de la aparición de este tipo de daño en células epiteliales de pulmón humano expuestas *in vitro* al O<sub>3</sub><sup>7</sup> y en células de mucosa bucal y nasal de sujetos expuestos por inhalación a niveles elevados de O<sub>3</sub> en Ciudad México<sup>6</sup>

La recuperación observada a la semana de tratamiento, tanto en el porcentaje de células dañadas como en la longitud de

migración, puede deberse a la estimulación de los sistemas antioxidantes enzimáticos<sup>8</sup> así como a una posible activación de los mecanismos de reparación del daño oxidativo al ADN. Hasta donde se conoce, no existen reportes en la literatura de la inducción de rupturas de simple cadena y sitios lábiles al álcali, en pacientes expuestos al ozono terapéutico.

A partir de estos resultados es posible deducir que siempre y cuando los mecanismos de defensa antioxidante no estén estimulados, como ocurre alrededor del noveno día de la terapia para el caso de la GSHx<sup>7</sup>, se produce un efecto inmediato de daño al ADN.

La aplicación del ensayo de EACI en el estudio de pacientes tratados con ozonoterapia a las dosis y concentraciones estudiadas, ha permitido demostrar que se induce daño oxidativo al ADN por rupturas de simple cadena y sitios lábiles al álcali inmediato y mediato (a las 2 sem) después del tratamiento en los pacientes y se produce una respuesta adaptativa de los pacientes, ante la terapia a los 7 días de tratamiento que se manifiesta en la recuperación de los niveles de migración del ADN antes de la terapia (basales).

## Agradecimientos

Los autores quieren agradecer la colaboración de las enfermeras de la Clínica del Ozono del CIMEQ por su colaboración en la toma de muestras a los pacientes.

**SUMMARY:** Ozone is a powerful oxidizing agent; however, in predetermined conditions and concentrations it is used in diseases presenting a deficit in the antioxidizing defenses in order to stimulate them. For studying the genotoxic effect of the gaseous Ozone used in autohemotherapy, an experimental design was established and applied to 3 patients treated with 200 mL of O<sub>3</sub>/O<sub>2</sub> (50 g/mL) via autohemotherapy. 1 patient was treated by rectal route with the same dose and concentration. 0.5 ml of blood were taken before and after the treatment on the 1st, 7th and 14th and last day. It was observed an increase of damage on the 1st and 14th day following the treatment. It was not so on the 7th day, which shows a possible period of adaptation. In both cases, the analysis of the samples was made by conducting the alkaline assay of electrophoresis of individual cells or comet assay that evaluates the single strand breaks and the sites labile to alkali in DNA.

Subject headings: OZONE/therapeutic use; MUTAGENICITY TESTS/methods; COMET ASSAY/methods; DNA.

## **Referencias bibliográficas**

1. Tice RR. The single cell gel/comet assay: a microgel electrophoretic technique for the detection of DNA damage and repair individual cells, in: DH. Phillips, S. Venitt (Eds.), Environmental Mutagenesis 1995; Bios Scientific Publishers LTD, Oxford, UK, 315-39.
2. González Y, Díaz, S. Y Carballo AL. Evaluación genotóxica del ozono con fines terapéuticos, Revista CENIC 1995;26,104.
3. Prieto E, Montejo L, Méndez D, Menéndez S, Bello D, Jonson J, Y Carvajal E. Evaluation of ozone genotoxicity by cytogenetic techniques. International Ozone Association. Proceedings Ozone in Medicine, 11<sup>th</sup> World Congress of the international Ozone Association 1993; M-3-44-M-3-52.
4. Díaz-Llera S, González Y, Prieto E, Azoy A. Efecto genotóxico y reparación del ADN del tratamiento *in vitro* con ozono mediante el ensayo de electroforesis alcalina de células individuales, Primer Taller Latinoamericano sobre Mutagénesis, Teratogénesis y Carcinogénesis. X Congreso Latinoamericano de Toxicología 1998; Ed. CENIC, Ciudad de La Habana, Cuba, 28.
5. Calderón-Garcidueñas L, Hosannilla-Brizuela N, Ramírez-Martínez L. y Villareal- Calderón A. DNA strand breaks in human nasal respiratory epithelium are induced upon exposure to urban pollution, Environ. Hlth. Persp.1996; 104, 160-8.
6. Valverde M, López MC, López I, Sánchez I Fortoul, TI, Ostrosky-Wegman P, y Rojas E. DNA damage in leukocytes and bucal and nasal epillelial cells of individuals exposed to air pollution in México City, Environ. Mol. Mutag. 1997; 30, 147-52.
7. Lee JG, Madden MC, Reed W, Adler K, Devlin R. The use of single cell gel electrophoresis assay in detecting DNA single strand breaks in lung cells *in vitro*, Toxicol. Appl. Pharmacol. 1996; 141,195-204.
8. Hernández F, Menéndez S, y Wong R. Decrease of blood cholesterol and stimulation of antioxidative response of cardipathy patients treated with endovenous ozone therapy, Free Radic. Biol. Med. 1995; 19, 115-9.

Recibido: 29 de mayo del 2001. Aprobado: 30 de junio del 2001.

*Dra. Silvia Díaz Llera.* Instituto de Farmacia y Alimentos. Calle 222 y Ave. 23, La coronela, Playa, Ciudad de La Habana, Cuba.