

Ensayo de toxicidad aguda del ozono aplicada por autohemoterapia en ratas.

Dennys Gómez¹, Zullyt Zamora Rodríguez², María Elena Arteaga¹, Mayelin Pupo¹, Axel Mancebo Rodríguez¹, Yaima Alonso².

1. Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB), Centro de Toxicología Experimental (CETEX), Finca Tirabeque, carretera El Cacahual Km 2½, Bejucal, AP3, La Habana, Cuba, teléfono: 6837225
2. Centro de Investigaciones del Ozono, Departamento de Biomedicina. Calle 230 y 15, Siboney, Playa, Ciudad de La Habana, Cuba. Tel: 2712324, Email: zullyt.zamora@cnic.edu.cu

Resumen

El Ozono con su gran poder oxidante es capaz de reaccionar con moléculas biológicas importantes que se encuentran en el torrente sanguíneo, de los de las que se encuentran los fosfolípidos de membranas, de esta forma se producen sustancias oxidadas tales como lípidos oxidados capaces de ejercer efectos terapéuticos importantes, dentro de los que se encuentra el restablecimiento del balance antioxidante /prooxidante y de esta forma modular la respuesta inflamatoria. Con el objetivo de evaluar el posible efecto tóxico que puede producir el ozono aplicado por la vía autohemo, se emplearon en el estudio ratas hembras y macho de la línea SD, los que fueron divididos en cuatro grupos experimentales de 16 animales cada uno (8 animales de cada sexo). Grupo I, recibe tratamiento con oxígeno; grupo II, tratado con ozono (21,12 µg/mL), dosis 168 µg/kg; grupo 3, tratado con ozono (47,04 µg/mL, dosis 376 µg/kg; grupo 4, tratado con ozono (64,16 µg/mL, dosis 512 µg/kg. Para la aplicación del ozono se le extraen a cada animal 2 mL de sangre la cual es mezclada con 2 mL de ozono a la concentración anteriormente descrita para cada uno de los grupos, esta mezcla es inyectada por la vena de la cola, este tratamiento se realizó una sola vez. Posteriormente los animales fueron observados durante 14 días, donde se registrados sus signos clínicos, peso corporal. Al final del estudio se les practica la eutanasia y se realizó la inspección anatomopatológica de los órganos. Se obtuvo como resultado el comportamiento normal de los animales y la no evidencia de signos de toxicidad, por lo que se concluye que las dosis de ozono aplicadas por vía autohemo, no fueron tóxicas.

Palabras claves: ozono, ratas, autohemoterapia, toxicidad.

Abstract

Assay of Ozone Acute Toxicity Applied by Autohemotherapy to Rats.

Ozone (O₃) with its great oxidant power is able to react with biological molecules which are available in the blood such as membrane phospholipids and in this way are produced oxidized substances which are able to produce therapeutic effects, such as to restore the antioxidant/prooxidant balance and in this way modulate the inflammatory response. With the aim in order to evaluate the potential toxic effect of O₃ applied by autohemotherapy, male and female SD rats were used, which were divided in four experimental groups of 16 rats (8 per each sex). Group 1 received treatment with Oxygen, group 2 treated with O₃ (21.12 µg/mL, doses 168 µg/kg); group 3, treated with O₃ (47.04 µg/mL, doses 376 µg/kg); group 4, treated with O₃ (64.16 µg/mL, doses 512 µg/kg). For O₃ application, 2 mL of blood which are mixed with 2 mL of O₃ to the concentration before described for each group. This mixture is injected by the tail vein only once. Thereafter the rats were observed during 14 days and were registered the clinical signs and body weight of the rats. Thereafter, the rats were killed and the state of the organs was evaluated. The rats showed a normal behavior and no signs of toxicity were found. In conclusion, we found that applied O₃ does by autohemotherapy were non toxic.

Key words: ozone, rats, autohemotherapy, toxicity.

Introducción

El ozono es un gas contaminante de la atmosfera que posee entre sus propiedades fundamentales la de ser un agente oxidante potente ⁽¹⁾, con gran capacidad para reaccionar con las biomoléculas, principalmente con los lípidos, proteínas y ácidos nucleídos ⁽²⁾. Numerosos estudios han demostrado claramente que la toxicidad del ozono puede explicarse a través de sus reacciones con los dobles enlaces de las cadenas carbonadas ⁽³⁾.

El ozono (O₃) posee propiedades radio miméticas y aunque el no es un radical, induce la generación de especies reactivas de oxígeno y el nitrógeno, a través de los cuales causa inflamación, daño celular, genotoxicidad y lesiones diversas en el aparato respiratorio cuando el gas es inhalado de forma frecuente y prolongado ^(4,5).

Desde la década pasada también se han acumulado numerosas evidencias de que la mezcla Ozono/oxígeno (MOO) aplicada por otras vías de administración, diferentes a la inhalatoria, tales como la intravenosa (autohemoterapia con MOO), la intrarectal, intraarticular y la intramuscular entre otras ejercen efectos terapéuticos beneficiosos en enfermedades tales como el SIDA ⁽⁸⁾ y otras enfermedades infecciosas incluyendo aquellas que son resistentes a los antibióticos convencionales, lo cual se le adjudica a l gran poder germicida del O₃ ⁽⁷⁾. También existen evidencias de su efectividad terapéutica en paciente con trastornos cerebro – vasculares agudos, cardiopatías ⁽⁸⁾ e insuficiencia vascular de etiología isquémica en miembros inferiores ⁽⁹⁾, incluyendo aquellas vinculadas con la diabetes mellitus. Otros resultados positivos han sido alcanzados en pacientes con hernias discales, cuando el ozono es inyectado en los músculos paravertebrales ⁽⁷⁾.

Teniendo en cuenta el gran poder oxidante del O₃ y su toxicidad referida anteriormente por vía inhalatoria y con el objetivo de establecer una relación riesgo/beneficio que justifique o no el uso de la MOO terapéuticamente se decidió realizar el ensayo de toxicidad aguda usando la vía intravenosa mediante autohemo.

Materiales y Métodos

Se utilizaron 80 ratas Censp:SPRD (40 de cada sexo procedentes de de la División de Animales Gnotobióticos del CENPALAB, con una edad entre 45 y 49 días y un peso corporal entre 151y 200 gramos.

Condiciones de mantenimiento

El ensayo se llevó a cabo en al sala No 2 del Centro de Toxicología Experimental (CETEX) del CENPALAB. Los animales fueron alojados en cajas plásticas de Policarbonato sin encamado, con fondos y tapas de rejilla de acero inoxidable recambiables y bandejas plásticas para la recolección de desechos. Los animales se agruparon en cuatro grupos experimentales de 8 animales cada uno (cuatro hembras y cuatro machos). El alimento fue recibido con el Certificado de Calidad Bromatológica y se empleo la Formula EMO: 1002 peletizado (Alyco, CENPALAB). El agua al igual que le alimento fue esterilizado en autoclave y se ofertó *ad libitum*. Los animales fueron alojados en un ambiente controlado de temperatura entre 22 ±3 °C, humedad relativa entre 50-70 % y el fotoperiodo fue de 12 horas luz, 12 oscuridad ⁽¹⁰⁾.

La conducción del ensayo se rigió por lo establecido en los Principios de Buenas Practicas de Laboratorio no Clínico, de Seguridad Sanitaria y Medioambiental ⁽¹¹⁾, la Guía para el cuidado, uso y reproducción de los Animales para la Experimentación del CENPALAB ⁽⁵⁾, así como los Procedimientos Operacionales de Trabajo ⁽¹²⁾ establecidos apara el desarrollo de todos loas actividades en el CETEX.

Diseño experimental

Los animales fueron divididos en cuatro grupos experimentales, el Grupo uno se le aplico el oxigeno como sustancia control, al grupo dos se le administro la MOO a la concentración de 21, 1 mg/L para una dosis de 168 µg/kg; el grupo tres fue tratado con una concentración de 47,04 µg/mL, para una dosis de 376 µg/kg; mientras que el grupo cuatro recibió la concentración de la MOO (64,16 µg/mL, para una dosis de 512 µg/kg).

Procedimiento para la aplicación de la MOO por vía autohemo

A cada animal se le extrajeron 2 mL de sangre por el seno orbital, empleando una pipeta Pasteur previamente impregnada en su interior de solución anticoagulante de citrato de sodio al 3, 8 %.

La sangre recolectada fue vertida en un frasco estéril. Posteriormente se extraen 2 mL del gas MOO del equipo y se vierten lentamente en el interior del volumen de sangre, permitiendo que burbujeara en el interior. Después se mezcló suavemente mediante movimientos ondulatorios para evitar la formación de espuma, se dejó reposar durante algunos minutos y se le administro a cada animal un volumen de 2 mL de la sangre ozonizada mediante la vena de la cola previamente dilatada. De esta forma se realizó la aplicación del producto en ensayo a cada una de las dosis estudiadas.

Observaciones clínicas

Los animales fueron observados durante un periodo de 14 días, se evaluó diariamente el estado general de los animales, el sitio de inyección teniendo en cuenta inflamación o necrosis así como otros signos de irritación local. La observaciones incluyeron además, cambios en la pile, el pelaje, ojos y membranas mucosa, sistema respiratorio, circulatorio, autónomo y sistema nervioso central, así como la actividad somatomotora y patrones de comportamiento, diarrea, temblores convulsiones, letargia, salivación, sueño y coma. El peso corporal se determinó individualmente utilizando una balanza Sartorius y los animales se pesaron los días 0, 7 y 14 del ensayo.

Examen anatomopatológico

Al culminar el ensayo, a los 14 días, los animales fueron anestesiados bajo atmosfera de éter dietílico y se les practicó la eutanasia mediante dislocación atlanto axoidea y se realizó la necropsia y observación macroscópica de los órganos; examinándose la superficie del cuerpo, todos los orificios y las cavidades craneal, torácica y abdominal así como sus contenidos.

Análisis estadístico

Se realizó con el paquete estadístico SPSS 10.0.5 de Windows y la literatura especializada, tomando como nivel de probabilidad de $p < 0,05$ para la aceptación e intervención de los resultados. Todos los datos obtenidos (peso corporal, condiciones ambientales). Se realizó el análisis de varianza (ANOVA) factorial simple de peso corporal teniendo en cuenta las variables de grupo y tiempo. LA normalidad se determino por el test de

kolmogorov-Smirnov. La homogeneidad de varianzas se determinó por el test de Bartlett. Las diferencias se determinaron por el test de LSD.

Resultados

Al concluir el ensayo, a los 14 días, se obtuvo una supervivencia del 100 %. En las inspecciones clínicas realizadas a la totalidad de los animales durante todo el tiempo que duró el estudio, donde se hizo énfasis en la zona de administración de las sustancias de ensayo, no se observaron lesiones. En los gráficos 1 y 2, se muestran el incremento del peso corporal de los animales de los animales que recibieron el tratamiento, solamente se observa que a la dosis baja de MOO, hubo una disminución del peso de los animales macho a los 14 días, con respecto a los 7 días, aunque hay que destacar que con respecto al peso del día 0 si se observó un incremento del peso. Clínicamente, estos animales no presentaron ningún signo que pudiera estar relacionado con esta disminución. En general el comportamiento en cuanto a la ganancia de peso fue normal, pues se encontró entre el 4 y 8 gramos diarios por animal.

Por las razones antes expuestas y dado que no se observaron peso de los animales de las dosis media y dosis alta, inferimos que la disminución en el peso corporal no fue atribuible a un efecto tóxico de la sustancia en ensayo.

En cuanto al examen anatomopatológico, no se detectaron alteraciones macroscópicas de los órganos parenquimatosos observados.

Discusión

Existen un amplio conocimiento sobre los efectos tóxicos del ozono aplicado por vía respiratoria. Sin embargo los efectos beneficiosos del ozono desde el punto de vista farmacológico se han reportado y continúan siendo investigados tanto desde el punto de vista preclínico como clínico, igualmente se han reportado la no toxicidad del ozono aplicado por otras vías como la rectal, donde se evaluó la irritabilidad a dosis repetida del ozono (0,2 mg/kg) en conejos, resultando no irritante ⁽¹³⁾, también se confirmó la no evidencia de toxicidad sistémica en otro ensayo de toxicidad a dosis repetida (28 días) en ratas, donde se

evaluaron diferentes niveles de dosis de ozono (0,16; 0,4; y 1mg /kg) igualmente aplicado por vía rectal.¹⁴

Finalmente se concluyo la no toxicidad del ozono aplicado por vía rectal en conejos en un ensayo subcrónico de 90 días ⁽¹⁵⁾. En correspondencia con estos hallazgos los ensayos mutagénicos del ozono aplicado por esta misma vía también estuvieron acorde con los resultado anteriores donde no se evidenció efecto mutagénica alguno a los concentraciones empleadas dosis empleadas (40 y 75 mg/L) donde la máxima se encuentra 1,5 veces por encima de la concentración máxima de ozono aplicada en humanos por la vía rectal ⁽¹⁶⁾. Igualmente nuestros resultados demostraron por primera vez la inocuidad de diferentes dosis de ozono aplicadas por vía autohemo a las ratas en dosis única. Dentro del análisis de las dosis aplicadas en este ensayo, podemos decir que las dosis aplicadas se encontraron 2,9; 6,59; 8,98 veces por encima de la dosis mínimo del rango máxima aplicada en humanos que es de 125 µg/kg de peso corporal para la vía autohemoterapia mayor. Por tanto, podemos confirmar que el ensayo nos aporta información toxicológica confiable a pesar de las limitaciones existentes con el modelo experimental para el empleo de esta vía de aplicación, la cual pudiera ser sustituida en otros estudios toxicológicos por la vía intraperitoneal.

Conclusiones

No se presentaron signos clínicos de toxicidad, alteraciones en el peso corporal, ni alteraciones anatomopatológicas atribuibles al producto en ensayo, por lo que se concluye que el ozono administrado por esta vía no produce toxicidad en las ratas Cenp:SPRD.

Comportamiento del Peso Corporal hembras

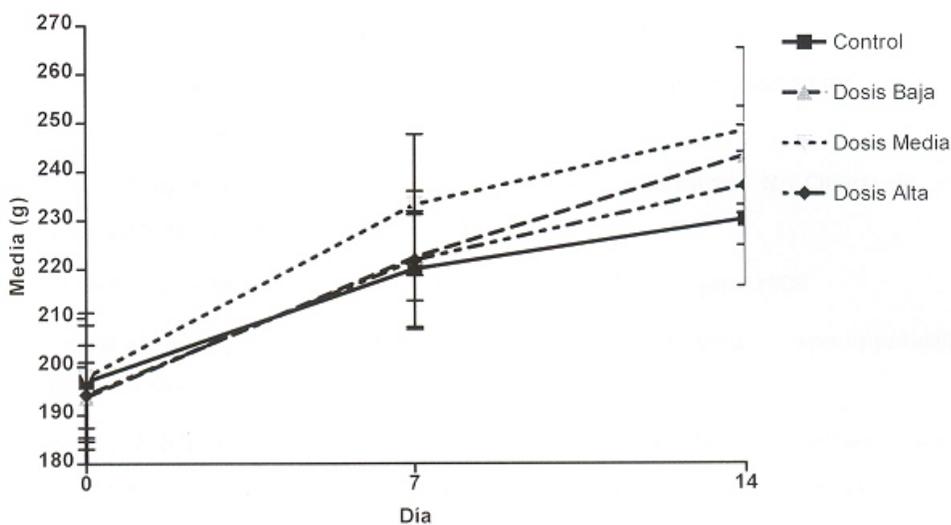


Gráfico 1. Comportamiento del peso corporal de las hembras durante el ensayo.

Comportamiento del Peso Corporal machos

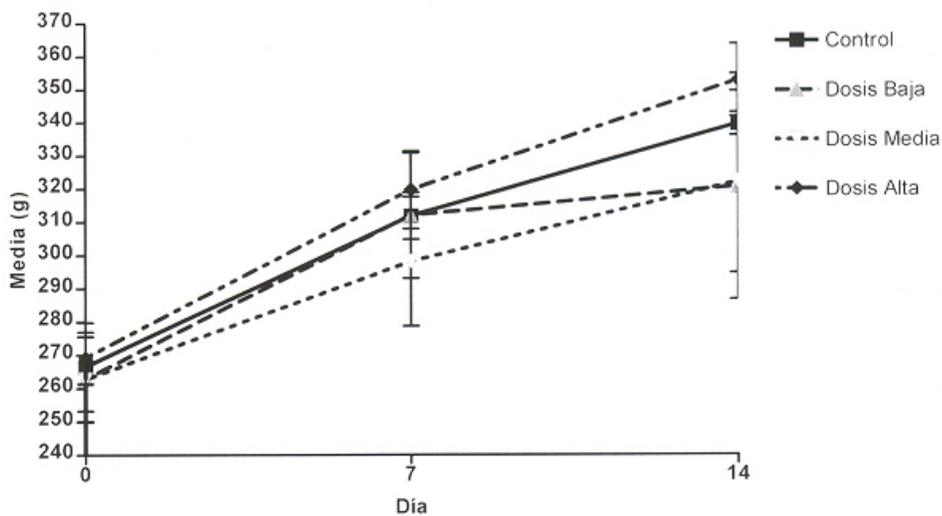


Gráfico 2. Comportamiento del peso corporal de los machos durante el ensayo.

Bibliografía

1. Horvarth M, Bilitzky L y Hunter J. Ozone. Budapest: Akadémiai Kiadó, 1985:13.
2. Sundell J, Zuber A. 1996. Ozone and other photochemical oxidants in ambient and indoor air properties, sources and concentrations. Scand J Work, Environ Hlth; 22: (3): 5-14
3. Cotgreave I. 1996. Absorption and metabolic fate of ozone the molecular basis of ozone induced toxicity. Scand J Work, Environ Hlth; 22: (3): 15-26.
4. Devlin RB, Folinsbee I, biscardi F, Hatch G, Becker S. 1997. Inflammation and cell damage induced by repeated exposures of human to ozone. Inhal Toxicol; 9: 211-235.
5. Victorin k. 1992. Review of the genotoxicity of ozone. Mutat Res; 277: 221-38.
6. Garber GE, Cameron DW, Hawley- Foss N, Greenway D, Shonnan ME. 1992. The use of ozon4 treated blood in the therapy of HIV infection and immune disease: A study of safety and efficacy, AIDS; 5:981-984.
7. Bocci V, Aldinucci C, Borrelli E, Corradeshi F, Diodori A, Fanetti G, Valacchi G, 2001. Ozone Sci . Engeneering; 23:207-217.
8. Hernández F, Menéndez S, Wong R. 1995. Decrease of blood cholesterol and stimulation of antioxidative response in cardiopathy patients treated with endovenous ozonotherapy. Free Radical Biol Med; 19: 115-119.
9. Giunta R, Coppola C, Luongo C. 2001. Ozonized autohemotransfusion improve hemorheological parameters and oxygen delivery to tissues in patients with peripheral occlusive arterial disease. Ann. Hematol; 80:745-748.
10. Guía para el cuidado, Uso y Reproducción de Animales para la Experimentación en el CENPALAB. Edición 01/00, 2000.
11. MINSAP. Principios de la Buenas Práctica de Laboratorio No clínico de Seguridad Sanitaria y Medio Ambiental, Regulación 39/2004.
12. CETEX. 2006. Procedimientos Operacionales de Trabajo. CENPALAB, Cuba.
13. Unidad de toxicología experimental, Instituto de ciencias medicas de Villa Clara. 2003. Estudio de irritabilidad del ozono aplicado rectalmente en conejos.
14. Unidad de toxicología experimental, Instituto de ciencias medicas de Villa Clara. 2003. Informe final. Estudio de toxicidad del ozono a dosis repetidas (28 días) en ratas.

- 15.**Centro Nacional para la producción de animales de Laboratorio (CENPALAB), Centro de Toxicología Experimental (CETEX). 2009. Informe de ensayo subcrónico del ozono por vía rectal en conejos.
- 16.**Remigio A, Pérez G, Fernández N, Rivero Y, Arteaga ME, Zamora Z, González Y, Molerio J.2001. Efecto mutagénico del ozono administrado por insuflación rectal en roedores. Revista CENIC Ciencias Biológicas; 32 (1): 59-61.

Recibido: 19/05/10

Aceptado: 27/05/10