

OLEOZON® oral, tratamiento efectivo en la giardiasis experimental

Zullyt Zamora Rodríguez, Dinorah Torres Idavoy,* Marta Bouza Suárez,* Damián Hernández** y Frank Hernández Rosales.

Departamento de Investigaciones Biomédicas, Centro de Investigaciones del Ozono, Apartado Postal 6412, *Instituto "Pedro Kourí", **Instituto Superior de Ciencias Básicas y Preclínicas "Victoria de Girón", Ciudad de La Habana, Cuba.

Recibido: 30 de septiembre de 2004. Aceptado: 6 de mayo de 2005.

Palabras clave: *Giardia lamblia*, giardiasis, Gerbils de Mongolia, OLEOZON® (oral), tratamiento.
Key words: *Giardia lamblia*, giardiasis, Gerbils de Mongolia, OLEOZON® (oral), treatment.

RESUMEN. Con el objetivo de evaluar el efecto anti-giardiasis del OLEOZON oral, fueron empleados Gerbils machos de 10 semanas de nacidos, los cuales se dividieron en siete grupos experimentales. 1: control negativo, no infectados; 2: control positivo, infectados con trofozoitos de *Giardia lamblia*; 3: animales infectados y tratados con el vehículo, aceite virgen; 4: animales infectados y tratados con OLEOZON® (0,3 mL/animal); 5: animales sin infectar y tratados con OLEOZON®; 6: infectado, no tratados y sacrificados a los 28 d después de la infección; 7: animales infectados y tratados con metronidazol. Los animales fueron infectados mediante la inoculación de 450 000 células (trofozoitos) de *Giardia lamblia*. A los 10 d de la infección, los animales fueron sacrificados progresivamente después de la tercera, sexta y décima aplicación de los tratamientos, el OLEOZON® indujo una disminución significativa de los trofozoitos en el duodeno (98,5 y 97,2 %) respectivamente. Por otra parte, el tratamiento con OLEOZON® demostró tener un marcado efecto parasiticida sobre los trofozoitos *Giardia lamblia*, lo cual constituye una importante evidencia para apoyar el tratamiento a pacientes infectados con este parásito.

ABSTRACT. Male Gerbils, 10 weeks old, were divided into seven groups, to evaluate the anti-giardia effect of OLEOZON® which was administered orally. 1: negative control, uninfected; 2: control, infected with trophozoites from *Giardia lamblia*; 3: animals were infected and treated with the vehicle, virgin sunflower oil; 4: animals were infected and treated with OLEOZON® (0.3 mL/animal); 5: non infected animals treated with OLEOZON®; 6: untreated infected animals and put to sleep 28 d after infection; 7: infected animals treated with metronidazole as reference drug. The infection was made by the inoculation of 450 000 cells (trophozoites) of *Giardia lamblia*. The treatment of the animals began 10 d after infection. The animals progressively were put to sleep after third, sixth and tenth application of the treatment. OLEOZON® induced a significant decrease of trophozoite in the duodenum (98.5 and 97.2 %) respectively. Therefore treatment with oral OLEOZON® showed remarkable parasiticide effect on trophozoites from *Giardia lamblia*, which constitute an important evidence to support the treatment of patients infected with giardia.

INTRODUCCION

El parasitismo intestinal continúa siendo un problema de Salud, sobre todo, en los países subdesarrollados aunque también los industrializados se ven afectados, principalmente en sus regiones más atrasadas y con más bajos niveles socioeconómicos.¹ La giardiasis se encuentra dentro de las

parasitosis con mayor tasas de incidencia, y se observa un incremento alarmante a escala mundial. Reportes recientes de la Organización Mundial de la Salud refieren que el 2 % aproximadamente de la población europea se encuentra afectada por esta infección.^{2,3}

La *Giardia Lamblia* es un protozoo intestinal que afecta al hom-

bre y a otros vertebrados.⁴ Se plantea que es un parásito cosmopolita, que aparece con mayor frecuencia en niños que en adultos y es más común en los climas cálidos que en los fríos. Actualmente, constituye el protozoo de mayor incidencia en Cuba.⁵

En el momento actual, los medicamentos disponibles para el tratamiento de la infección por *Giardia lamblia* incluyen los compuestos derivados de nitroimidazol, entre los que se utilizan con mayor frecuencia el tinidazol, metronidazol, ornidazol, y cednidazol, así como otros como la quinacrina y furazolidona. La efectividad de estos tratamientos varía dependiendo de la respuesta inmunológica del paciente, aunque se reportan fallas crecientes con esta acción terapéutica debido a la resistencia de los parásitos y la aparición cada vez mayor de intolerancia a este tipo de productos, por lo que se ha hecho necesario el desarrollo de nuevas alternativas terapéuticas que sean eficaces para esta parasitosis.

La interacción del ozono con los aceites de origen vegetal genera la formación de un conjunto de compuestos químicos, los cuales poseen efecto germicida. Específicamente, el aceite de girasol ozonizado (OLEOZON®), al cual se le ha encontrado un potente efecto germicida, se le utiliza con éxito en el tratamiento de heridas infectadas, fístulas y otros procesos sépticos locales.⁶

El OLEOZON® es un producto que ha pasado satisfactoriamente las pruebas preclínicas de irritabilidad dérmica y oftálmica,⁷ los estudios histológicos,⁸ y de toxicidad aguda y subcrónica,⁹ de cicatrización¹⁰ los ensayos de mutagenicidad y teratogenicidad,¹¹⁻¹³ los cuales garantizan su inocuidad por las vías empleadas para su utilización en humanos. Recientemente fue demostrada la efectividad del OLEOZON® oral en el tratamiento de la giardiasis recidivante en humanos.¹⁴

Estudios *in vitro*, han demostrado que el ozono disuelto en agua es capaz de inactivar la *G. muris*.^{15,16} Otras investigaciones han demostrado la efectividad del aceite ozonizado (OLEOZON® oral) como tratamiento en la giardiasis experimental.¹⁷

Muchos modelos experimentales se utilizan para describir la biología y(o) inmunología de la giardiasis. Entre ellos, el gerbil de Mongolia (*Meriones unguiculatus*) es uno de los más utilizados, puesto que posee una gran susceptibilidad a la infección por quistes de *Giardia lamblia* comparado con la rata y el perro. La liberación de quistes y el desarrollo de la infección en estos modelos experimentales es similar a la infección en humanos.^{4,18-22} Estos estudios permitieron disponer de un modelo experimental para la obtención de suficiente material biológico, necesario para trabajos de caracterización fisiológica, los cuales pueden llevar a nuevas formas terapéuticas contra dicho parásito.

El objetivo de este estudio fue profundizar y corroborar el efecto del OLEOZON® oral como posible terapia para la giardiasis experimental.

MATERIALES Y METODOS

Animales

La infección experimental se realizó en gerbils de Mongolia machos de seis a diez semanas de nacidos, provenientes del Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio, Ciudad de La Habana. Estos animales, una vez incorporados a las áreas del bioterio del Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí" (IPK) Ciudad de La Habana, se les realizó análisis coproparasitológico y se les aplicó un tratamiento preventivo con 20 mg de metronidazol por animal, durante tres días consecutivos. Posteriormente, se colocaron en cajuelas previamente esterilizadas en auto-

clave y recibieron comida y agua estéril. El encamado también fue esterilizado. La limpieza de las jaulas fue realizada dos veces por semana.

Método de aislamiento

El aislamiento C5 (cepa de *Giardia lamblia* clasificada en el IPK) utilizado en este experimento se encontraba conservadas a -70 °C con dimetilsulfoxido (DMSO) 10 % en tanque de nitrógeno líquido, en el Departamento de Parasitología del IPK.

Preparación del inóculo

Para preparar el inóculo, el aislamiento C5 se descongeló y cultivó en medio TYI-S33, con suplemento de bilis durante 48 h a 37 °C, hasta la formación de la monocapa. Los parásitos se colectaron por inmersión de los frascos en baño de hielo durante cinco minutos y posterior centrifugación a 514 g por diez minutos. Con el objetivo de eliminar los restos de medio de cultivo se realizaron tres lavados de la masa celular, la cual fue resuspendida en dilución salina con adición de estabilizador de fosfato (SSTF) (0,1 mol/L, pH 7,2 a 7,4) y se centrifugó a 514 g por diez minutos. Las células obtenidas del sedimento se contaron en cámara de Neubauer.

Inoculación de los trofozoitos

Los gerbils se infectaron tres días después de realizada la última desparasitación con metronidazol, como se describe anteriormente. La inoculación de los trofozoitos se realizó a través de una cánula intragástrica similar a la usada en la desparasitación. Por intubación duodenal se administraron 300 µL de una suspensión con 450 000 trofozoitos de *Giardia lamblia*. Se esperó un período de (7 a 10 d) para que se instalara la infección. La presencia de quistes fue confirmada en las heces fecales de los animales mediante su seguimiento. Los animales positivos fueron identificados y se procedió a la conformación de los grupos experimentales (Tabla 1).

Tratamiento con OLEOZON o aceite de girasol virgen

A los animales de los grupos 3, 4 y 5, se les administró aceite de girasol sin ozonizar (virgen) 300 µL y OLEOZON® (oral) 300 µL, según refiere la tabla anterior. Se realizaron 10 aplicaciones, una diaria, de los productos evaluados mencionados anteriormente. Los tratamientos se realizaron intragástricamente mediante una cánula # 16.

Sacrificio para examen de la mucosa duodenal y toma de muestra de tejido

Fueron planificados tres sacrificios, en el tercer, sexto y décimo tratamiento. Para cada uno de ellos fueron seleccionados cinco animales de los grupos 2, 3, 4, los del 7 fueron sacrificados al tercer día. Los sacrificios se realizaron bajo atmósfera de éter utilizando para ello una campana de cristal herméticamente cerrada. Se les realizó una incisión abdominal para extraer el duodeno y se procedió al examen de sus primeros 10 cm, el cual, se cortó longitudinalmente en dos porciones iguales para su análisis. Uno de estos segmentos se usó para el conteo de los trofozoitos y el otro, se destinó al estudio de anatomía patológica, para lo cual, fue conservado en una disolución de formol 5 %.

La porción destinada al conteo de trofozoitos se colocó en placas de Petri con 5 mL de una disolución de SSTF. Se realizó raspado de la mucosa duodenal y todos los trofozoitos que aparecieron en 1 mL fueron contados en la cámara de Neubauer.

Anatomía Patológica

Al segmento de duodeno destinado para histología, se le practicaron técnicas convencionales de procesamiento histológico para microscopía óptica por inclusión en parafina y coloración con hematoxilina y eosina. Posteriormente, se realizaron cortes de aproximadamente 4 mm de grosor para lo cual, se utilizó un micrótopo de corte vertical (Leitz) Las láminas fueron observadas al microscopio. Este estudio histopatológico se realizó a ciegas.

Las observaciones realizadas en las láminas fueron catalogadas según los indicadores establecidos por Segal.²³

a) Intensidad de la infección (presencia del agente biológico), calificado mediante la escala de valoración siguiente: ninguno = 0, escasos (5 a 10) = +, moderado (> 10 < 100) = ++, abundante (> 100) = +++; b) atrofia de las vellosidades y c) inflamación epitelial.

Análisis estadístico

Los resultados de los conteos de trofozoitos en el duodeno fueron procesados estadísticamente mediante la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis, para la comparación entre grupos, mientras que a los del examen histológico se les realizó la de Fisher.

RESULTADOS Y DISCUSION

En el grupo tratado con OLEOZON® (4) se produjo una disminución muy significativa en el conteo de trofozoitos después del tercer y sexto día de tratamiento y se observó una efectividad del 98,5 y 97,2 % respectivamente. No se comportó de la misma forma durante la décima aplicación (40,6 %), para la cual, no se encontraron diferencias significativas entre los grupos 2, 3 y 4. Esta aparente contradicción al aumentar los días de tratamiento tiene como causa fundamental, las características propias del modelo experimental. Se conoce ampliamente que este modelo tiene una gran susceptibilidad a la infección por *Giardia l*, un patrón de liberación de quistes y du-

ración de la infección similar a la infección en humanos, con un período que va desde los 13 hasta los 86 d, pero tiene la desventaja que la autodesinfección es más rápida que en el humano.^{14,22} Por tanto, al calcular el porcentaje de desinfección, tomando como base el número de trofozoitos, que apareció en el raspado duodenal del control, al tercer día de tratamiento que correspondió al día 13 de la infección, etapa en la cual estos animales comienzan a autodesinfectarse, el número de trofozoitos disminuye, lo cual fue comprobado por los resultados obtenidos en el grupo 6, en el que al ser observados los duodenos a los 28 d, no hubo presencia de trofozoitos (Tabla 2), lo que trajo apare-

jado una disminución del porcentaje de desinfección producido por el OLEOZON® (oral).

El examen anatómico patológico demostró una disminución de la intensidad de la infección muy significativa para el grupo 4 con respecto a los grupos 2 y 3, durante la tercera y sexta aplicación, mientras que en la décima aplicación no hubo diferencias significativas entre estos tres grupos.

No fueron encontradas diferencias estadísticamente significativas en cuanto a la atrofia de las vellosidades e inflamación epitelial, a pesar de las diferencias existentes en cuanto a la presencia de trofozoitos (Tabla 3).

A partir del tercer día de tratamiento, los resultados del estudio comparativo de la efectividad del OLEOZON® respecto al metronidazol demuestran que ambos poseen similar efectividad en el modelo animal utilizado. Este resultado brinda la posibilidad de valorar al OLEOZON® como terapia alternativa para el tratamiento de la giardiasis, teniendo en cuenta además, la resistencia desarrollada por los parásitos a esos compuestos derivados del imidazol.

Estudios recientes demostraron la efectividad del OLEOZON® oral como tratamiento en la giardiasis

Tabla 1. Descripción de los grupos de trabajo.

| Grupos | Animales | Descripción de los grupos |
|--------|----------|--|
| 1 | 5 | Sin infectar-sin tratamiento. |
| 2 | 15 | Infectado-sin tratamiento. |
| 3 | 15 | Infectado-tratado con aceite de girasol sin ozonizar (300 mL/animal. |
| 4 | 15 | Infectado-tratado con OLEOZON oral (300 µL/animal. |
| 5 | 5 | Sin infectar-tratado con OLEOZON oral (300 µL/animal). |
| 6 | 5 | Infectado-sin tratamiento, hasta 28 d . |
| 7 | 5 | Infectado-tratado con metronidazol (20 mg por animal/d). |

Tabla 2. Valores medios de los conteos de trofozoitos en un mililitro para cada uno de los tiempos de sacrificio por grupo experimental.

| Grupo | Días de tratamiento | n | Casos | | X ± DE (células/mL) | Efectividad (%) |
|-------|---------------------|---|-------|----------|--------------------------------|-----------------|
| | | | (+) | (-) | | |
| 1 | 3 | 5 | 0 | 5 | 0 | |
| 2 | 3 | 6 | 6 | 0 | 215 · 10 ³ ± 150 | |
| | 6 | 4 | 4 | 0 | 168 · 10 ³ ± 114 | |
| | 10 | 5 | 4 | 1 | 4,75 · 10 ³ ± 5,89 | |
| 3 | 3 | 3 | 3 | 0 | 171 · 10 ³ ± 51 | |
| | 6 | 5 | 5 | 0 | 165 · 10 ³ ± 73 | |
| | 10 | 5 | 5 | 0 | 6 · 10 ³ ± 3 | |
| 4 | 3 | 5 | 4 | 1 (20 %) | 2,5 · 10 ³ ± 2*** | 98,5 |
| | 6 | 5 | 3 | 2 (40 %) | 4,5 · 10 ³ ± 6,2*** | 97,2 |
| | 10 | 4 | 3 | 1 (25 %) | 3,4 · 10 ³ ± 2,4 | 40,6 |
| 5 | 3 | 5 | 0 | 5 | 0 | |
| | 6 | 5 | 0 | 5 | 0 | |
| | 10 | 5 | 0 | 5 | 0 | |
| 6 | 28 | 5 | 0 | 5 | 0 | |
| 7 | 3 | 5 | 0 | 5 | 0 | 100 |

p < 0,05. n Número de animales. X ± DE Media ± la desviación estándar.

Tabla 3. Resultados anatómo patológicos sobre atrofia de las vellosidades e inflamación epitelial de los duodenos (muestras tomadas después del tercer tratamiento).

| Grupo | Atrofia de las vellosidades (n/afectados) | Inflamación epitelial (n/afectados) |
|-------|---|-------------------------------------|
| 1 | 5/0 | 5/0 |
| 2 | 5/2 | 5/1 |
| 3 | 5/3 | 5/2 |
| 4 | 5/0 | 5/2 |
| 5 | 5/0 | 5/0 |
| 6 | 5/2 | 5/1 |
| 7 | 5/0 | 5/2 |

Prueba de Fisher $p < 0,05$. n Total de muestras.

experimental en gerbils,¹⁷ ya que con tres aplicaciones del producto estudiado se obtuvo un 100 % de curación de los animales, no coincidiendo estos resultados con los del presente trabajo. La diferencia en estos resultados evidentemente fue debido a que en el caso del trabajo de Gell y col utilizaron una densidad celular de $12 \cdot 10^4$, la cual es aproximadamente cuatro veces menor a la utilizada en este estudio.

Tomando en consideración estas diferencias en los diseños del modelo experimental, se puede decir que la efectividad del tratamiento con OLEOZON® oral depende de las características del inóculo, ya sean quistes o trofozoitos y de la carga celular inoculada inicialmente de la cual dependería el volumen del producto OLEOZON® oral para lograr una buena efectividad del tratamiento.

Un aspecto muy importante vinculado con estos resultados, es el hecho de que aunque los porcentajes de efectividad para el tratamiento con OLEOZON® oral son elevados, la parasitosis no es eliminada en su totalidad, evidenciando que las diez aplicaciones realizadas no fueron suficientes. Sin embargo, el modelo experimental utilizado no permite prolongar el tratamiento a causa de la desparasitación espontánea que se produce durante su desarrollo.

CONCLUSIONES

Los resultados de este estudio experimental permiten plantear que el OLEOZON® oral puede considerarse como una nueva alternativa terapéutica para el tratamiento de la giardiasis experimental, lo cual sienta las bases fundamentales para la introducción de este producto como anti-giardiasis en la práctica clínica.

AGRADECIMIENTOS

A los doctores Ricardo González y Silvia Menéndez Cepero por la desinteresada revisión del manuscrito.

BIBLIOGRAFIA

- Velázquez A.A., Gómez M.J., Cruz C.F., López J.L. y Cabrera C.P. Estudio clínico-epidemiológico del parasitismo intestinal en el niño. **Medicentro**, **6**, 70, 1990.
- OMS. Infecciones intestinales por protozoos y helmintos. Serie de informes técnicos No. 666. Ginebra, 1981.
- Wilson A. Giardia. *Salud Mundial*. OMS. Marzo, 22, 1984.
- Lujan H.D., Marotta A., Mowatt M.R., Sciaky N., Lippincott S.J., Nash T.E. Development induction of Golgi structure and function in the primitive eukaryote *Giardia lamblia*. **J. Biol. Chem.**, **270**, 4612, 1995.
- Beaver P. *Clinical Parasitology*. 2da edición. Salvat, 52-55, 1987.
- Viebahn R. The biochemical processes underlying ozone therapy. **OzoNachrichten**, **4**, 1-2, 1985.
- Laboratorio de Control Biológico, Centro de Investigaciones y Desarrollo de Medicamentos, Cuba, Irritabilidad dérmica (1990), oftálmica (1990) y vaginal (1993).
- Martínez G., Merino N., Sam S., P Cenarega. Efecto histológico y bioquímico del OLEOZON® en el modelo de la cola de ratón. **Revista CENIC Ciencias Biológicas**, **28**, 31, 1997.
- Martínez G., León O.S., Rodríguez C., Merino N., Sam S., Sedeño M., Acebedo A. Estudio de toxicidad aguda dérmica del aceite ozonizado OLEOZON® en ratas. **Revista CENIC Ciencias Biológicas**, **28**, 35, 1997.
- Sánchez A., Díaz P., Rodríguez G., Leyva E., Díaz E., Borrego L. Acción del aceite ozonizado sobre la cicatrización de heridas de piel de animales de experimentación. **Revista CENIC Ciencias Biológicas**, **29**, 181, 1998.
- Fernández I., Menéndez S., Gómez M. Evaluación mutagénica del aceite ozonizado administrado intragástricamente. **Revista CENIC Ciencias Biológicas**, **20**, 14, 1989.

- Remigio A., González Y., Zamora Z., Fonseca G. y Molerio J. Evaluación genotóxica del OLEOZON® mediante el ensayo de micronúcleos en médula ósea y sangre periférica de ratón. **Revista CENIC Ciencias Biológicas**, **29**, 200, 1998.
- Rodríguez M.D., Menéndez S., Gómez M., García H., Eng L. Estudio teratogénico del aceite ozonizado. Primer Congreso Iberoamericano de Aplicaciones del Ozono, Centro Nacional de Investigaciones Científicas-Centro de Investigaciones Médico Quirúrgicas, 1990.
- Amoroto R.M., Fernández C.M., Rodríguez Y.M., Calcagno E., Robaine M.G., González M.E., Fernández C., Obrera G., Sayú P., Moran I.M., Escobedo A.A., Palomino A., Acosta M., Pantaleón B., Fernández J., Dueñas L., Menéndez S., Calunga J.L. Eficacia del aceite ozonizado (OLEOZON® oral) en el tratamiento de la giardiasis. Ensayo clínico fase III, Aleatorizado, abierto y controlado. **Revista Cubana de Farmacia**, **42** (Especial), 173, 2002.
- Finch G.R., Black E.K., Labatiuk C.W., Gyurek L. and Belosevic M. Comparison of *Giardia lamblia* and *Giardia muris* Inactivation by Ozone. **App. and Environ. Microbiol.**, **59**, 11, 3674, 1993.
- James H.O., Richard J.M., Frank W., Schaefer I. and Eugen W.R. Pilot-Scaler Ozone Inactivation of *Cryptosporidium* and *Giardia*. American Water Works Assn. WQTC, 1994.
- Gell A., Menéndez S., Gómez M., Ruiz A., Pérez O., Lastre M., Eng L. Evaluation of ozone therapy in humans and in animals infected with *Giardia lamblia*. 10. Ozone World Congress, Monaco, 1991.
- Byrd G.L., Conrad J.T. and Nash T.E. *Giardia lamblia* infections in Adult Mice. **Infect. Immun.**, **62**, 3583, 1994.
- Belosevic M., Faubert G.M., Croll N.A., and MacLean J.D. *Giardia lamblia* infections in Mongolian gerbils: an animal model. **J. Infect. Dis.**, **147**, 222, 1982.
- Belosevic M., Faubert M.G., Guy R. and Mac Lean D.J. Observations on Natural and Experimental Infections with *Giardia* Isolated from Cats. **Can. J. Comp. Med.**, **48**, 241, 1994.
- Gasser B.R., Exkert J. and Rohrer L. Infection of Swiss *Giardia* isolates to birds and mice, and *in vitro* cultivation of trophozoites originating from sheep. **Parasitol. Res.**, **74**, 103, 1987.
- Wallis M.P., and Walli M.H. Excystation and culturing of human and animal *Giardia* spp. by using gerbils and TYI-S33 medium. **Appl. Env. Microbiol.**, **51**, 647, 1986.
- Segal G.H., and Petris R.E. Small Intestine in Histology for Pathologist, edited by Stephen S. Sternberg, Chapter 28, Raven Press Ltd., New York, 547, 1992.