

La mezcla gaseosa ozono-oxígeno incrementa la respuesta humoral contra el antígeno recombinante de superficie del virus de la hepatitis B en ratones

Zullyt Zamora Rodríguez y Aluet Borrego Alvarez.

Departamento de Aplicaciones Biomédicas, Centro de Investigaciones del Ozono, Avenida 15, No.1313, Siboney, Playa, Apartado Postal 6414, Ciudad de La Habana, Cuba.

Recibido: 4 de octubre de 2001. Aceptado: 18 de junio de 2002.

Palabras clave: mezcla ozono-oxígeno, ozonoterapia, respuesta de anticuerpos, vacuna cubana anti hepatitis B.
Key words: ozone-oxygen mixture, ozonotherapy, antibody response, cuban vaccine against B hepatitis.

RESUMEN. La ozonoterapia ha resultado eficaz en el tratamiento de diversos procesos patológicos entre los que se incluyen las hepatitis, lo que pudiera deberse a que los peróxidos generados destruyen los receptores celulares del virus, haciendo imposible su unión a las células hepáticas y previniendo a su vez, su penetración en la célula hospedera. Considerando los efectos inmunomoduladores de este tipo de terapia, así como los reportes de recuperación de esta enfermedad mediante este tipo de tratamiento, se propuso estudiar su efecto sobre la respuesta humoral a un antígeno relacionado con estas afecciones. Se evaluó el efecto de la mezcla gaseosa ozono-oxígeno sobre la respuesta inmune humoral específica al antígeno recombinante de superficie del virus productor de la hepatitis B, presentado en la forma de la vacuna cubana anti hepatitis B. Se aplicaron 20 sesiones de insuflación rectal a ratones Balb/C a dosis de 5 μg /animal. El inmunógeno se administró intraperitonealmente según un esquema de 2, 9 y 16 d y se realizaron las extracciones los días 0, 9, 16, 23 y 37. La concentración de anticuerpos se determinó a través de un inmunoensayo enzimático directo *Sandwich* de doble antígeno, que no discrimina isotipo y permite medir la respuesta específica total a un antígeno determinado utilizando antígeno recombinante en su detección. Se observaron diferencias estadísticamente significativas entre el grupo tratado y control ($p < 0,05$), en el día 23 del esquema. Se evidenció un efecto estimulador de la mezcla gaseosa ozono-oxígeno sobre la respuesta humoral al antígeno de superficie del virus productor de la hepatitis B en este modelo animal. Se corroboró el criterio de que esta terapia puede ser útil en el tratamiento de la hepatitis B.

ABSTRACT. Ozonotherapy has become a useful therapy for the treatment of many pathological processes such as hepatitis, probably due to the effect of generated peroxides which destroy the receptor of the virus, avoiding its linking to the cellular membrane of the host cell. Taking into account the immunomodulatory effects of this therapy and the previous reports of its beneficial effects, the authors decided to study the effects of the ozone-oxygen gas mixture on the humoral response to hepatitis related antigen. The effect of ozone-oxygen gas mixture on specific immune humoral response to recombinant surface antigen of B hepatitis virus, presented as the Cuban vaccine against B hepatitis was evaluated. Balb/C mice received 20 applications of ozone-oxygen mixture by rectal insufflation, at a dose of 5 μg /animal. The immunogen was managed by intraperitoneal applications by a 2-9-16-d-scheme at a dose of 2 μg /animal 2 d after the first ozone-oxygen gas mixture application. Extractions were performed at 0-9-16-23-37-d by retroorbital puncture. A Sandwich direct enzyme linked immune sorbent assay of double antigen was performed in order to measure the specific antibody response. This immuneassay does not make any isotopic discrimination and uses a recombinant antigen for detection. Significant statistical differences between treated group and the control one, at day 23 of the scheme were observed in this animal model ($p < 0.05$). Stimulant effect of ozone-oxygen gas mixture on specific humoral immune response to recombinant surface antigen of hepatitis B virus was demonstrated. It was corroborated that ozone-oxygen gas mixture can be useful on the treatment of B hepatitis.

INTRODUCCION

La ozonoterapia ha resultado eficaz en el tratamiento de diversos procesos patológicos¹ y se ha postulado que el posible mecanismo de acción del ozono está relacionado con la generación de productos secundarios durante la reacción del mismo con los dobles enlaces de fosfolípidos presentes en biomembranas.² Se plantea que los compuestos formados tales como peróxidos orgánicos y ozónidos,^{3,4} son los que en cantidades adecuadas y controladas ejercen diferentes acciones biológicas, que le brindan al ozono un conjunto de propiedades terapéuticas.⁵

Concentraciones de ozono comprendidas entre 10 y 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ son capaces de modular la liberación de citoquinas *in vitro* en células sanguíneas humanas, tales como interferón γ y β (IFN γ y β), factor de necrosis tumoral α (TNF α), interleucinas (I) 1 β , 2, 4, 6, 8 y 10, factor estimulador de colonia granulocito-macrófago (GM-CSF) y factor transformador de crecimiento $-\beta$ 1 (TGF- β 1).⁶⁻⁹

Se señala a la ozonoterapia como útil en el tratamiento de diversas formas de hepatitis virales, siendo la insuflación rectal una de las formas más aplicadas, debido a su extrema simplicidad y seguridad manual, así como su bajo precio, además, puede ser aplicable en niños.^{10,11} Este efecto puede deberse a que los peróxidos generados destruyen los receptores celulares del vi-

rus, haciendo imposible su unión a las células hepáticas, previniendo la penetración del virus a la célula hospedera. Además, las células hepáticas infectadas son más susceptibles a la acción de los peróxidos generados por el ozono, por lo que resultan destruidas y con ello, los virus que las infectan.¹²

Se hace referencia a que, dado que el colon y el recto son zonas muy vascularizadas, pueden estar presentes la activación de la fagocitosis y de la actividad bactericida de los leucocitos, con una potenciación de la producción de inmunoglobulinas y regulación de la respuesta inmune.¹³ También puede existir un proceso lento de activación de células sanguíneas mononucleares con una suave inducción de citoquinas, acompañado de un mejoramiento de la oxigenación y el metabolismo.¹³

Dado el efecto inmunoestimulador de la ozonoterapia intrarectal¹³ y su contribución a la recuperación de enfermedades virales agudas como la hepatitis B,¹² se propuso determinar si dicha terapia produce un incremento en la respuesta humoral al antígeno recombinante de superficie del virus productor de la hepatitis B, administrado en la forma de la vacuna cubana anti hepatitis B a ratones Balb/C.

MATERIALES Y METODOS

Parte experimental

Se utilizaron 20 ratones (*Mus musculus*) Balb/C macho (20 a 22 g, Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio, Ciudad de La Habana), los cuales se mantuvieron en condiciones de bioterio, con temperatura y humedad controladas y alimentados con una dieta y agua *ad libitum* durante todo el estudio. Antes de comenzar los experimentos, se dejaron una semana para su aclimatación.

Los animales se dividieron en dos grupos experimentales, grupo I (Control), que fue inmunizado, pero no tratado con la mezcla ozono-oxígeno y un grupo II, que recibió el inmunógeno y las aplicaciones de mezcla ozono-oxígeno. Se tomó como punto de partida la dosis reportada en humanos de 114 µg/kg y se aplicó por vía rectal el doble del equivalente a la dosis anterior, correspondiente a 5 µg/20 g de peso corporal a los animales. Se aplicaron 20 sesiones de mezcla gaseosa ozono-oxígeno.

El inmunógeno Heberbiovac HB (lote 804301, Heberbiotec SA),¹⁴ se

administró intraperitonealmente a una dosis de 2 µg/animal, según un esquema de 2, 9 y 16 d. Las aplicaciones del inmunógeno comenzaron dos días después de la primera sesión de aplicación de mezcla ozono/oxígeno. Este inmunógeno expresa el fenotipo adw2 del antígeno de superficie del virus productor de la hepatitis B, obtenido por vía recombinante, que constituye el ingrediente antigénico de la vacuna cubana contra la hepatitis B.¹⁴

Las extracciones se realizaron los días 0, 9, 16, 23 y 37 (Fig. 1), a través del plexo ocular mediante capilares heparinizados que fueron centrifugados a 500 g para separar el plasma. Este se analizó mediante un método inmunoenzimático cuantitativo directo *Sandwich* de doble antígeno para detección de anticuerpos anti antígeno de superficie del virus productor de la hepatitis B.¹⁵ Este método, que permite una semicuantificación de la respuesta de anticuerpos, no discrimina isotipo y solo brinda información acerca de la respuesta total de anticuerpos presente en un momento dado contra un inmunógeno determinado, en este caso un antígeno de superficie del virus de la hepatitis B. El analito es atrapado en el pocillo por el antígeno de recubrimiento, que no es más que el mismo inmunógeno, obtenido también por vía recombinante, su detección a través de del sistema antígeno conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP, tipo VI, 268 u/mg sólido, RZ: 3,1, Sigma), peróxido de hidrógeno 30 % (BDH, calidad reactivo), el sustrato de la enzima, y ortofenilendiamina (BDH), el cromóforo, en proporciones descritas previamente.¹⁵

Evaluación estadística

Los resultados se compararon a través de la prueba no paramétrica de Wilcoxon-Mann-Whitney para comparación de muestras no pareadas. La región de rechazo se definió como el 5 % del área comprendida bajo la curva de la distribución

muestral, lo que implica un 95 % de confiabilidad de los resultados.

RESULTADOS Y DISCUSION

Se define como seroconversión al cambio cualitativo de ausencia a presencia de anticuerpos en el suero.

Al analizar la respuesta total de anticuerpos específicos no se apreció expresión de los marcadores buscados en el día 9, sin embargo, a partir del día 16, se observó un 100 % de seroconversión (Tabla 1). Los valores obtenidos son similares a los reportados en trabajos previos con el mismo inmunógeno y esquema de inmunización.¹⁵⁻¹⁶ La ausencia de señal en el plasma durante el día 9 puede deberse a que una única inmunización genera una respuesta tan débil que la sensibilidad del método es incapaz de detectar.

Se apreció que durante la extracción correspondiente al día 23 del esquema hubo un aumento estadísticamente significativo de la respuesta de anticuerpos del grupo tratado con respecto al control ($p < 0,05$, Tabla 2). Se pudiera pensar en un efecto acumulativo de los productos secundarios de reacción del ozono, ya que no se apreciaron diferencias significativas hasta el día 23. Sin embargo, estas diferencias estadísticas no se mantuvieron en el día 37, aunque biológicamente se observó una tendencia al incremento de la respuesta de anticuerpos del grupo tratado (Tabla 3).

Es necesario señalar que el tratamiento terminó el día 20, de manera que el día 37 se alejó 17 d de la última aplicación. Puede ser que el efecto estimulador de la mezcla haya desaparecido entonces, aunque la probabilidad se encontró muy cercana a la significación estadística.

A partir de este resultado es posible deducir, dado que el componente antigénico de la vacuna es el antígeno de superficie del virus productor de la hepatitis B, que la mezcla gaseosa ozono-oxígeno aplicada por vía rectal incrementa los anticuerpos generados en ratones Balb/

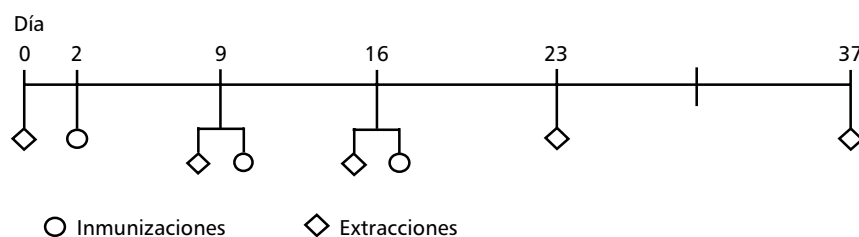


Fig. 1. Esquema de inmunización y extracciones.

Tabla 1. Actividad de seroconversión durante el día 16 del experimento.

Grupo	Concentración de anticuerpos (UI/L)	Coefficiente de variación (%)
I	1 605,5 ± 873,8	54,4
II	1 690,9 ± 730,6	43,2
p	0,575 1	

UI Cantidad de anticuerpo necesaria para neutralizar un microgramo de antígeno. Los resultados se expresan como (X ± DE) (X Valor medio de la concentración de anticuerpos correspondiente. DE Desviación estándar).

Tabla 2. Actividad de seroconversión durante el día 23 del experimento.

Grupo	Concentración de anticuerpos (UI/L)	Coefficiente de variación (%)
I	3 866,2 ± 1 614,9	41,8
II	8 411,4 ± 3 791,9	45,1
p	0,015 2*	

UI Cantidad de anticuerpo necesaria para neutralizar un microgramo de antígeno. Los resultados se expresan como (X ± DE) (X Valor medio de la concentración de anticuerpos correspondiente. DE Desviación estándar). * Diferencias estadísticas significativas, p < 0,05.

Tabla 3. Actividad de seroconversión durante el día 37 del experimento.

Grupo	Concentración de anticuerpos (UI/L)	Coefficiente de variación (%)
I	7 780,6 ± 1 919,3	24,7
II	9 888,8 ± 2 261,9	22,9
p	0,066 3	

UI Cantidad de anticuerpo necesaria para neutralizar un microgramo de antígeno. Los resultados se expresan como (X ± DE) (X valor medio de la concentración de anticuerpos correspondiente. DE Desviación estándar).

C en respuesta a dicho inmunógeno, lo que contribuye a la inactivación del virus y favorece su eliminación por mecanismos celulares dependientes de la respuesta de anticuerpos, como puede ser estimulación de la fagocitosis por monocitos, citotoxicidad mediada por anticuerpos o citólisis mediada por el complemento. Este aumento producido por la ozonoterapia en la respuesta de anticuerpos específicos, pudiera estar relacionado con la estimulación diferencial de la secreción de citoquinas que intervienen en dicho proceso.^{5,9}

CONCLUSIONES

La mezcla ozono-oxígeno aplicada mediante insuflación rectal a una dosis de 5 µg/20 g de peso corporal provoca un incremento en la respuesta humoral en ratones Balb/Cj inmunizados con el antígeno de superficie del virus productor de la hepatitis B después de 20 sesiones. Este efecto no se mantiene una semana después. Este resultado constituye una evidencia del efecto inmunomodulador de la ozonoterapia,

que pudiera contribuir a la recuperación de enfermedades crónicas como las hepatitis.

AGRADECIMIENTOS

A Lic. Lien López Matilla del Departamento de Inmunología del Instituto de Ciencias Básicas y Preclínicas "Victoria de Girón" por haber proporcionado las vacunas empleadas en este estudio, así como al personal del laboratorio respectivo por la colaboración brindada. A los Doctores Silvia Menéndez y Frank Hernández por su desinteresada colaboración en la revisión de este documento.

BIBLIOGRAFIA

1. Bocci V. Ozonotherapy today, Proceedings 12th Ozone World Congress, Lille, France, 3 - 28, 1995.
2. Pryor W.A. and Church D.F. Aldehydes, hydrogen peroxide and organic radicals as mediators of ozone toxicity. **Free Rad. Biol. & Med.**, **11**, 41, 1991.
3. Gabrielson E.W., Yu X.Y. and Spannhake W.E. Comparison of the toxic effects of hydrogen peroxide and ozone on cultured human bronchial epithelial cells. **Env. Health Persp.**, **102**, 972, 1994.

4. Pryor W.A. and Uppu R.M. A kinetic model for the competitive reactions of ozone with amino acid residues in proteins in reverse micelles. **J. Biol. Chem.**, **268**, 3120, 1993.
5. Bocci V. Autohemotherapy after treatment of blood with ozone. A reappraisal. **J. Intern. Med. Res.**, **22**, 131, 1994.
6. Bocci V. and Paulesu L. Studies on the biological effects of ozone: 1 Induction of interferon gamma on human leukocytes. **Haematologica**, **75**, 510, 1990.
7. Bocci V., Luzzi E., Corradeschi F., Paulesu L. and Di Stefano A. Studies on the biological effects of ozone: 3. An attempt to define conditions for optimal induction of cytokines. **Lymphokine and Cytokine Research**, **12**, 121, 1993.
8. Bocci V., Luzzi L., Corradeschi F., Paulesu L., Rossi R., Cardaioli E. and Di Simplicio, P. Studies on the biological effects of ozone: 4. Cytokine production and glutathione levels in human erythrocytes. **J. Biol. Regul. Homeost. Agents**, **7**, 133, 1993.
9. Bocci V., Luzzi L., Corradeschi F. and Silvestri S. Studies on the biological effects of ozone: 6. Production of transforming growth factor by human blood after ozone treatment. **J Biol. Regul. Homeost. Agents**, **8**, 108, 1994.
10. Dorstewitz H. Application forms for ozone-oxygen mixtures in viral diseases such as Hepatitis and Herpes. Proceedings Ninth Ozone World Congress, New York, United States, 3, 17-27, 1989.
11. Betancourt Y., Piña J.C., Toledo J.M., Gómez A., Mapolón Y. y Betancourt M. Ozonoterapia. Experiencia como método terapéutico en la Hepatitis viral aguda. III Simposio Internacional de Aplicaciones del Ozono, Ciudad La Habana, Cuba, 2000.
12. Balkany A. The interaction between ozonotherapy and oxygen free radicals and their importance in practice. Proceedings Ninth Ozone World Congress, New York, United States, 3, 22-27, 1989.
13. Menéndez S., Iglesia O., Bidot C., Puga A. and Carballo A. Application of ozone therapy in children with humoral immunity deficiency. Proceedings 12th World Congress, Lille, France 271-74, 1995.
14. Galban E. Ensayo de campo de la vacuna recombinante cubana contra la hepatitis B (Heberbiovac HB). Estudio en recién nacidos hijos de madres Ags HB positivos. **Rev. Cubana Med. Tropical**, **44**, 149, 1992.
15. Borrego A., González V.E., García E., González A., Alerm A., Santiesteban A. y López L. Inmunomodulación de la norfloxacin en la respuesta de anticuerpos específicos a Heberbiovac HB en ratones Balb/Cbj. **Revista CENIC Ciencias Biológicas**, **32**, 67, 2001.
16. González A. Estudio de la inmunogenicidad de la vacuna Heberbiovac HB en modelos experimentales y aplicados al humano. Tesis en opción del título de Especialista de Primer Grado en Inmunología, Instituto de Ciencias Básicas y Preclínicas "Victoria de Girón", septiembre, 1995.