

Efecto mutagénico del ozono administrado por insuflación rectal en roedores

Antonia C. Remigio Montero, Gladys Pérez Arnáez, Nidia Fernández Esperón, Yesenia Rivero Salgado, María Elena Arteaga, Zuliyt Zamora Rodríguez*, Yousy González Carvajal* y Jesús Molerio Mirabal.*

Dpto. de Genética, Centro de Toxicología Experimental, Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio, Cuba. Finca "Tirabeque" km 2½, Carretera del Cacahual, Bejucal, La Habana. *Dpto. de Investigaciones Biológicas, Centro de Investigaciones del Ozono, Centro Nacional de Investigaciones Científicas, Ciudad de La Habana, Cuba.

Recibido: 17 de enero del 2000. Aceptado: 25 de agosto del 2000.

Palabras clave: ozono, mutagénesis, micronúcleos, aberraciones cromosómicas.

Key words: ozone, mutagenetic, micronucleous, chromosomal aberrations.

RESUMEN. El ozono hoy día es un gas muy empleado con fines medicinales. Es extremadamente reactivo, oxidante e inestable, ha sido postulado que los mecanismos de acción de este agente están relacionados con la generación de productos secundarios en su reacción con los lípidos que se encuentran en el plasma y en las membranas celulares. La reacción del ozono con los lípidos ocurre exclusivamente a nivel de los dobles enlaces carbono-carbono presentes en los ácidos grasos poliinsaturados, generándose peróxidos orgánicos y ozonidos, que en cantidades adecuadas y controladas ejercen diferentes acciones biológicas, las cuales le confieren al ozono un conjunto de propiedades terapéuticas. En este trabajo se evaluó la actividad citotóxica y clastogénica en roedores tratados con ozono por insuflación rectal a través del análisis citogenético de su médula ósea. Se empleó el análisis de médula ósea de ratones C57BL/6J mediante el ensayo de micronúcleos y en ratas C57BL/6J mediante el ensayo de aberraciones cromosómicas. Fueron utilizadas dos concentraciones de ozono (50 y 75 mg/mL). Como controles negativo y positivo se utilizaron oxígeno y ciclofosfamida (40 mg/kg) respectivamente. Se realizó una administración cada 24 h durante 10 d consecutivos. Al final del tratamiento, los animales fueron sacrificados y la médula ósea fue procesada para obtener las preparaciones. Los resultados demostraron la no evidencia de efectos citotóxicos, ni clastogénicos (inductor de aberraciones cromosómicas) sobre la médula ósea de los roedores tratados y no causó cambios en la hematopoyesis como resultado de este tratamiento.

ABSTRACT. Nowadays ozone is a gas very employed in medical treatment. It is recognized as extremely reactive, oxidant and unstable agent. Besides that it has postulated that ozone action mechanisms are related to the secondary product generation from its reaction with present lipids in serum and cell membranes. Ozone reaction with lipids exclusively occurs at the level of carbon-carbon double linked in polyunsaturated fat acids producing organic peroxides and ozonides. It develops at appropriate and controlled quantities, some biological actions that confer its therapeutic properties. In this work was evaluated the cytotoxic and clastogenic activities in rodents treated with ozone by rectal insufflation through cytogenetic analysis on their bone marrow. The probable mutagenic effect of the ozone applied by rectal route is studied, using two assays: micronucleus assay for the analysis of bone marrow in mice C57BL/6J and chromosomal aberrations assay in rats C57BL/6J. Two ozone concentrations (50 and 75 mg/mL) were used. As positive and negative controls were used oxygen and cyclophosphamide (40 mg/kg) respectively. The administration was carried out 24 h each, during ten consecutive days. The animals were put to sleep and marrows processed to obtain the preparations. The results demonstrated no evidence of cytotoxic effects, and negative evidences in clastogenicity induction (chromosome aberration inducement) on the bone marrow of treated rodents and did not cause any changes in the hematopoiesis as result of this treatment.

INTRODUCCION

El ozono que es empleado con fines medicinales es un gas constituido por una mezcla ozono-oxígeno y se obtiene al hacer pasar un flujo de oxígeno puro a través de una descarga eléctrica silente. Químicamente es una molécula triatómica, variedad alotrópica del oxígeno.¹ Como el ozono es un gas extremadamente reactivo, oxidante e inestable, ha sido postulado que los mecanismos de acción de este agente están relacionados con la generación de productos secundarios² en su reacción con los lípidos que se encuentran en el plasma y en las membranas celulares. La reacción del ozono con los lípidos ocurre exclusivamente a nivel de los dobles enlaces carbono-carbono presentes en los ácidos grasos poliinsaturados, generándose peróxidos orgánicos y ozonidos³ que en cantidades adecuadas y controladas ejercen diferentes acciones biológicas, las cuales le confieren al ozono un conjunto de propiedades terapéuticas. Como la utilidad del ozono en medicina cobra importancia, se hace necesario realizar estudios toxicológicos para conocer la actividad genotóxica⁴ de este compuesto cuando es administrado por otras vías terapéuticas. La insuflación rectal es una vía muy utilizada en el humano, debido a que la irrigación vascular extraordinariamente rica de la pared del recto le hace muy adecuado para la absorción, lo que permite por el curso de sus venas el

ingreso rápido del fármaco en el organismo, evitando el primer paso del metabolismo hepato-gastrointestinal. De esta forma se elimina el contacto de enzimas digestivas y la pérdida de dosis por defecación.⁵ Los estudios toxicológicos no deben limitarse solamente a la realización de pruebas de toxicidad (aguda, subcrónica o crónica) en animales, sino que en dependencia de sus resultados deben incluirse pruebas de genotoxicidad, con vistas a detectar posibles riesgos de daños genéticos para el hombre de daños genéticos.⁶ Con el objetivo de determinar el potencial genotóxico del ozono se evaluó la actividad citotóxica y clastogénica en roedores tratados por insuflación rectal a través del análisis citogenético de la médula ósea de ratas y la inducción de micronúcleos en eritrocitos policromáticos de ratones.

MATERIALES Y METODOS

Animales

En el ensayo de micronúcleos en médula ósea se utilizaron 40 ratones de la línea C57BL/6J que tenían entre 8 y 12 semanas de edad, mientras que en el ensayo de aberraciones cromosómicas fueron utilizadas 40 ratas C57BL/6J de ambos sexos con un peso corporal comprendido entre 180 y 220 g, todos suministrados por la División de Roedores Gnotobióticos del Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB).

Los animales fueron mantenidos en condiciones normalizadas para la especie, con temperatura de $(22 \pm 2)^\circ\text{C}$, humedad relativa entre 50 y 65 % y fotoperíodo de 12 h de luz y 12 h de oscuridad.

Diseño experimental

Las pruebas se ejecutaron siguiendo las líneas directrices de la OECD para los ensayos de genotoxicidad y según el Proyecto de Código de Buenas Prácticas de Laboratorio del Centro de Toxicología Experimental. Para cada ensayo (micronúcleos y aberraciones cromosómicas) se conformaron cuatro grupos experimentales constituidos por cinco hembras y cinco machos cada uno. El primer grupo se clasificó como control y se le aplicó tratamiento con oxígeno rectal. Al segundo grupo se le administró ciclofosfamida (40 mg/kg p.c.) por vía intraperitoneal, mientras que los grupos tres y cuatro recibieron ozono (50 mg/mL y 75 mg/mL respectivamente) por vía rectal. En ambos ensayos, los grupos ex-

perimentales que poseían igual número de animales recibieron el mismo tratamiento a iguales dosis.

Ensayo de micronúcleos

Se administraron 2 mL de ozono u oxígeno por vía rectal cada 24 h durante 10 d consecutivos. Al final del tratamiento, los ratones fueron sacrificados y la médula fue procesada, mediante el procedimiento descrito por originalmente por Schmid 1976⁷ que continúa utilizándose de igual modo.⁸ Con este procedimiento se obtiene una tinción diferencial entre los eritrocitos policromáticos (PCE) y los eritrocitos normocromáticos (NCE), a partir de la cual se determina el número de PCE portadores de micronúcleos (PCE/ MN), el que se expresó en por ciento con respecto al total de PCE observados (que fueron 1 000 por animal);⁹ a esto se le denominó índice de genotoxicidad.

Se evaluó la proporción PCE/ NCE como estimador de toxicidad sobre la hematopoyesis. Para ello, se cuantificaron los NCE presentes hasta el conteo de 250 PCE en cada lámina. A esto se le denominó índice de toxicidad. Se determinaron las medias y desviaciones estándar de cada variable.

En el procesamiento estadístico de los datos se empleó una prueba ANOVA, con un nivel de significación de $(p < 0,05)$.

Ensayo de aberraciones cromosómicas

Se administraron 2 mL de ozono u oxígeno a los animales por vía rectal cada 24 h durante 10 d consecutivos. A las 24 h del último tratamiento se sacrificaron por dislocación cervical. Dos horas antes del sacrificio a los animales se les administró por vía intraperitoneal colchicina en una dosis de 4 mg/kg p.c. El procedimiento empleado para la obtención de las preparaciones de la médula ósea fue el descrito por Krishna en 1991¹⁰ que continúa utilizándose de igual modo.¹¹

Se prepararon las láminas y se tiñeron con Giemsa al 10 % durante 8 min y se analizaron 50 metafases por animal para cuantificar la frecuencia de gaps, (lagunas o regiones no teñidas en la cromatina), rompimientos cromosómicos y reordenamientos en un microscopio Olympus con objetivo de 100x. Para el procesamiento estadístico de los datos se empleó la prueba no paramétrica Kruskal Wallis para la comparación entre grupos.

RESULTADOS Y DISCUSION

Cuando se analizó el índice de toxicidad (PCE/NCE) de ambas dosis de ozono no se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas entre las medias de este índice con respecto a las medias del control negativo, resultados que indicaron que el tratamiento con ozono no indujo toxicidad sobre las células de la médula ósea bajo este tratamiento (Tabla 1). De la misma forma, no se encontraron incrementos significativos de los eritrocitos jóvenes micronucleados (PCE- MN %) para ambas dosis y sexos. En el análisis estadístico del porcentaje de eritrocitos jóvenes micronucleados (índice de genotoxicidad) mediante la prueba de ANOVA, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos tratados con ozono y oxígeno.

No se observaron diferencias estadísticas al comparar las medias para las diferentes concentraciones de ozono con respecto al grupo tratado con oxígeno en el ensayo de aberraciones cromosómicas (Tabla 2), mientras que la comparación de las medias de los grupos tratados con ozono y oxígeno con respecto al control con ciclofosfamida, arrojó diferencias estadísticamente significativas, lo que demuestra que no existían afectaciones citotóxicas en la médula ósea de las ratas tratadas. De la misma forma, no se observaron incrementos significativos de las medias de las aberraciones por célula para los niveles de dosis evaluados en ambos sexos.

En este trabajo se incluyeron ambos sexos en todas las evaluaciones realizadas utilizando igual número de animales en cada uno tal y como sugirió Mavournin en 1990.¹²

CONCLUSIONES

El tratamiento con ozono aplicado por insuflación rectal no provoca daño citotóxico sobre la médula ósea de los roedores tratados con él, ni se evidencian en la hematopoyesis como resultado de este tratamiento.

BIBLIOGRAFIA

1. Viebahn R. The use of ozone in Medicine. 2nd. Rev., Haugh Pub Ed., Germany, 7,100, 1994.
2. Gabrielson E.W., Yu X. Y., Spannhake W. E. Comparison of toxic effects of hydrogen peroxide and ozone on cultured human bronchial epithelial cells. *Env. Health Persp.*, 102, 972, 1994.
3. Pryor W.A., Uppu R. M. A kinetic model for the competitive reactions of ozone with amino acid residues in proteins

Tabla 1. Valores medios de los índices de toxicidad y genotoxicidad en el ensayo de micronúcleos en ratones tratados con ozono por vía rectal.

Grupos	Sexo	(PCE -MN)	(PCE/NCE)
			(%)
Oxígeno	f	0,40 ± 0,89	1,63 ± 0,21
	m	0,40 ± 0,55	1,48 ± 0,21
Ciclofosfamida (40 mg/kg)	f	7,00 ± 1,58*	1,17 ± 0,09*
	m	6,60 ± 3,78*	1,19 ± 0,26*
Ozono (50 µg/mL)	f	0,40 ± 0,55	1,54 ± 0,13
	m	0,40 ± 0,55	1,33 ± 0,10
Ozono (75 µg/mL)	f	0,60 ± 0,89	1,41 ± 0,08
	m	0,80 ± 0,84	1,39 ± 0,11

Los resultados fueron expresados como $\bar{X} \pm DE$.

PCE Eritrocitos policromáticos. NCE Eritrocitos normocromáticos.

MN Micronúcleos. Número de animales: 5. * Altamente significativo para ($p < 0,05$).

Tabla 2. Resultados de la prueba de aberraciones cromosómicas en la médula ósea de ratas de ambos sexos tratados con ozono por vía rectal.

Grupos	Total de aberraciones	Aberraciones/célula	$\bar{X} \pm DE$ (total de aberraciones)
Oxígeno	6	0,012	0,60 ± 0,70
Ciclofosfamida (40 mg/kg)	158*	0,316*	15,80 ± 3,77*
Ozono (50 µg/mL)	6	0,012	0,60 ± 0,70
Ozono (75 µg/mL)	8	0,016	0,80 ± 0,79

Los resultados fueron expresados como $\bar{X} \pm DE$.

Número de animales: 10. Total de células: 500. * Significativamente diferente para los grupos restantes ($p < 0,05$).

in reserve micelles. *The J. of Biol. Chem.*, **268**, 3120, 1993

4. Remigio A., González Y., Zamora Z., Fonseca G., Molerio J. Evaluación genotóxica del OLEOZON mediante los ensayos de micronúcleos en

médula ósea y sangre periférica de ratón. *Revista CENIC Ciencias Biológicas*, **29**, 3, 1998.

5. Victorin K. Review of genotoxicity of ozone. *Mutation Research*, **277**, 221, 1992.

6. Hoffmann G. Genetic Toxicology. Toxicology: The basic science of poison Cassarett and Doulls, 9, 269, 1996.

7. Schmid W.4 micronucleous test for cytogenetic analysis. *Chemical Mutagens*, **4**, 31, 1976.

8. Hedge M., Sujstha T. *In vivo* genotoxicity of alkaloid drug pilocarpine nitrate in bone marrow cells and male germ cells in mice. *Mutation Research*, **344**, 103, 1995.

9. Hayashi M., Tice R., Mac Gregor J., Romagna E., Pacchierotti F. *In vivo* rodent erythrocyte micronucleous assay. *Mutation Research*, **312**, 293, 1994.

10. ICH. Genotoxicity Guidance on specific aspects of regulatory genotoxicity test for pharmaceuticals, 4, Final, July, 1995.

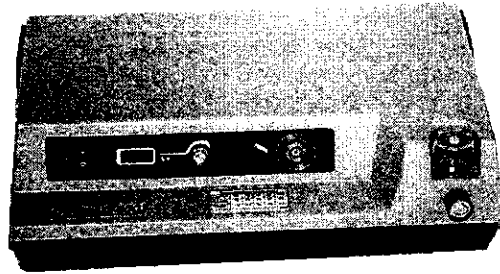
11. Krishna G. The assessment simultaneous micronucleous and chromosome in rat. *Mutation Research*, **261**, 1991.

12. Mavournin K., Cimono N., Salamone, Heddle J. The *in vivo* micronucleous assay in mammalian bone marrow and peripheral blood. *Mutation Research*, **239**, 29, 1990.

13. Nakano E., Nazareth R., Braganca C. Evaluation of the genotoxic potential of flumethin in mouse bone marrow by chromosomal analysis and micronucleous test. *Teratogenesis, Carcinogenesis and Mutagenesis*, **16**, 37, 1996.

14. Organización Económica de Cooperación y Desarrollo. Guidelines for Testing of Chemicals # 475: Genetic Toxicology. Micro-nucleous test. Publication service, 2 rue Andre-Pascal, 75775, Paris Cedex 16, France, 1993.

OZOMED 400



OZOMED 400 es un equipo que produce concentraciones de ozono variables de forma continua y reproducible en todo el intervalo requerido para uso médico. Se puede emplear en todas las aplicaciones terapéuticas del ozono conocidas hasta el presente, dentro de las que se pueden mencionar:

- Neuropatías ópticas
- Glaucoma crónico
- Síndrome cócleo-vestibular
- Retinosis pigmentaria
- Demencia senil
- Anemia drepanocítica
- Prevención de sepsis
- Artrosis
- Arteriosclerosis obliterante
- Pie diabético neuroinfeccioso
- Ulceras de miembros inferiores
- Medio de contraste en angiografías intradiafragmáticas.

Además, puede ser empleado en las especialidades de Oftalmología, Geriatria, Ortopedia, Angiología y Medicina Interna.

Este equipo se encuentra en el Registro de Equipos Médicos del Ministerio de Salud Pública de la República de Cuba con el expediente No. I 0160130001100 desde el 11 de diciembre de 1996.

PRINCIPALES CARACTERISTICAS TECNICAS

Concentración de ozono:	hasta 80 mg/L $\pm$ 10 %
Dimensiones:	(510 X 150 X 370) mm
Peso:	10 kg
Consumo aproximado:	0,1 kW/h
Alimentación:	110/220 V; 50/60 Hz

OZOMED 400 is a piece of equipment that produces different ozone concentrations in a continuous and reproducible way in all the ozone therapeutical range. It can be used in all the ozone medical applications known at present, as for example:

- Optic neuropathy
- Chronic glaucoma
- Cocleovestibular syndrome
- Retinitis pigmentosa
- Senile dementia
- Drepanocytic anemia
- Sepsis prevention
- Arthrosis
- Obliterant arteriopathy
- Diabetic foot
- Ulcers of the lower limbs
- Radiological contrast in diaphragmatic angiography.

In the specialities of Ophthalmology, Geriatrics, Orthopedics, Angiology and Internal Medicine.

This piece of equipment is already licensed in the Medical Equipment Registration of the Health Minister of the Republic of Cuba with the number I 0160130001100 with date December 11th, 1996.

TECHNICAL CHARACTERISTICS

Ozone concentration:	up to 80 mg per L $\pm$ 10 %
Dimensions:	(510 X 150 X 370) mm
Weight:	10 kg
Aproximately consumption:	0,1 kW/h
Supply:	110/220 V; 50/60 Hz

Este equipo tiene una garantía de 1 año.

This piece of equipment has 1 year of guaranty.

Si desea mayor información, puede dirigirse a:
For further information contact:



Centro de Investigaciones del Ozono, Avenida 15 y Calle 230, Siboney, Playa, Ciudad de La Habana,
Apartado Postal 6412, Código Postal 10600, Cuba. Teléfonos: (537)21 0588; (537)21 2089. Fax: (537)21 0233; (537)28 0497.
Correo electrónico: ozono@informed.sld.cu <http://www.ozono.cubaweb.cu>