

Actividad antitumoral del ozono

Yumilda Rodríguez, Silvia Menéndez,* José Luis Bello, Elaine Matos, Adria Espinosa, José Turrent,* Lisbett Pimienta, Sonia Ramos y Ciro Otero.**

Instituto Nacional de Oncología y Radiobiología, Calle 29 y E, Vedado, Plaza de la Revolución, *Centro de Investigaciones del Ozono, **Instituto de Farmacia y Alimentos, Ciudad de La Habana, Cuba.

Recibido: 25 de noviembre de 1997. Aceptado: 20 de diciembre de 1997.

Palabras clave: tumor ascítico de Ehrlich, tumor pulmonar RL-67, leucemia, células tumorales, ozono.
Key words: Ehrlich ascitic tumor, pulmonar tumor RL-67, leukemia, tumoral cells, ozone.

RESUMEN. Se estudió la posible actividad antitumoral del ozono. Se utilizaron ratones de las líneas B6D2F1 y NMRI, con un peso aproximado entre 18 y 20 g, los cuales fueron inyectados diariamente con ozono por vía rectal o intratumoral, en dosis de 6, 12 y 49 mg. Estos animales, divididos en grupos de acuerdo con las dosis recibidas, fueron inoculados intramuscular, intraperitoneal y endovenosamente con $1 \cdot 10^6$ y/o $2 \cdot 10^6$ células de diferentes tumores murinos: tumor ascítico de Ehrlich (TAE), tumor pulmonar RL-67, leucemia L1210 y leucemia L-P388. Los resultados mostraron que la ozonoterapia no producía ninguna evidencia de crecimiento tumoral, ni tampoco su inhibición significativa, con el modelo de tratamiento aplicado. Con respecto al efecto antimetastático, el ozono fue capaz de inhibir significativamente la colonización de células tumorales en el TAE, cuando éstas fueron inoculadas por vía endovenosa.

ABSTRACT. A study about the influence that ozone can exert on tumor growth was carried out. Laboratory mice B6D2F1 and NMRI of 18-20 g weight, were injected daily with ozone by rectal or intratumoral way, at doses of 6, 12 and 49 mg, with different. These animals, divided into groups according to the doses they would receive, were inoculated with $1 \cdot 10^6$ and (or) $2 \cdot 10^6$ murine tumor cells of: Ehrlich ascitic tumor (TAE), pulmonar tumor RL-67, leukemia L1210 and leukemia L-P388 by intramuscular, intraperitoneal or endovenous way. Results showed that ozone therapy didn't produce any evidence of tumor growth hastening and also any significant inhibition of the tumor, with the treatment models applied. With regards to the antimetastatic effect, ozone was capable to inhibit significantly the colonization of tumor cells in TAE, when these cells were inoculated endovenously way.

INTRODUCCION

El incremento a nivel mundial de la incidencia del cáncer es un hecho reconocido. A pesar de los múltiples esfuerzos que se realizan para combatir esta enfermedad no se ha encontrado una modalidad terapéutica con la cual se obtengan resultados significativos en las localizaciones más frecuentes, de ahí que constantemente se ensayen nuevos métodos y combinaciones terapéuticas que mejoren los resultados del tratamiento.

El desarrollo de las enfermedades malignas se acompaña de una notable alteración del organismo de

los pacientes y de su depauperación inmunológica, lo que se agudiza por la agresividad de algunos métodos de tratamiento del cáncer.

La ozonoterapia ha sido relacionada con el tratamiento de inmunodeficiencias^{1,2} y como estimulador de la respuesta antioxidante,³ cuando se emplea por vías de administración no inhalatorias. Por ello, es necesario evaluar su efecto sobre el crecimiento tumoral, ya que los datos experimentales en este sentido no son abundantes,^{4,5} a pesar de que existen reportes de la ozonoterapia combinada con otros tratamientos oncospecíficos.⁶⁻⁸

El objetivo del presente trabajo fue evaluar la influencia del ozono, por vía no inhalatoria, sobre algunos índices que caracterizan la enfermedad neoplásica.

MATERIALES Y METODOS

En los estudios se emplearon ratones de las líneas B6D2F1 y NMRI, machos y hembras (Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio, Ciudad de La Habana), cuyo peso oscilaba entre los 18 y 20 g, separados en grupos de 10 animales/caja, que fueron mantenidos en condiciones habituales y alimentados con pienso convencional (Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio, Ciudad de La Habana).

Fueron desarrolladas cinco series experimentales:

1. A 20 ratones NMRI hembras les fueron trasplantadas, por la vía intraperitoneal, $1 \cdot 10^6$ células del tumor ascítico de Ehrlich (TAE). A 10 animales se les administró 1 mL de ozono por vía rectal, a una concentración de $6 \mu\text{g/mL}$, durante siete sesiones de tratamiento; 10 animales se mantuvieron como Control. A 20 ratones machos B6D2F1, se les inoculó por la vía intraperitoneal, $1 \cdot 10^6$ células de la leucemia L-388. A 10 animales se le administró 1 mL de ozono por vía rectal, a una concentración de $6 \mu\text{g/mL}$, durante 20 sesiones; el resto se mantuvo como Control. A 20 ratones hembras B6D2F1 les fueron inoculadas $1 \cdot 10^6$ células de la leucemia L-1210. A 10 animales se le administró 1 mL de ozono por vía rectal, a una concentra-

ción de 12 $\mu\text{g/mL}$, durante cinco sesiones; el resto de los animales se mantuvo como Control. Veinte ratones machos B6D2F1 se inocularon con $2 \cdot 10^6$ células del tumor pulmonar RL-67 por vía intramuscular. A 10 animales se les administró 1 mL de ozono por vía rectal, a una concentración de 6 $\mu\text{g/mL}$, durante seis sesiones; el resto de los animales constituyó el Control.

2. A 20 ratones machos B6D2F1 se les inoculó $2 \cdot 10^6$ células tumorales del tumor RL-67 por vía intramuscular. Se administró a 10 animales, 0,5 mL de ozono a una concentración de 49 $\mu\text{g/mL}$, por vía intratumoral, durante ocho sesiones; el resto de los animales se mantuvo como Control.

3. Treinta ratones NMRI hembras, trasplantados por la vía intraperitoneal con $1 \cdot 10^6$ de células tumorales del tumor ascítico de Ehrlich (TAE), se dividieron en tres grupos. Los dos primeros fueron tratados con 0,1 y 0,2 mL, respectivamente, con una concentración de ozono de 6 $\mu\text{g/mL}$, por vía intratumoral (intraperitoneal), durante 7 d. Un tercer grupo se mantuvo como Control. Se procedió de igual forma con 30 ratones machos B6D2F1, utilizando células tumorales de leucemia L-P388. La evaluación de la actividad se realizó por comparación de la sobrevida de los grupos tratados con respecto a los Controles.

4. Veinte ratones B6D2F1 hembras fueron inoculados con $2 \cdot 10^6$ de células tumorales (TAE), por el plexo ocular. A 10 animales se les administró diariamente 1 mL de ozono por la vía rectal a una concentración de 6 $\mu\text{g/mL}$, durante 9 d. Los otros 10 animales constituyeron el grupo Control. A los 14 d los animales fueron sacrificados para el conteo de las colonias de las células tumorales del pulmón. El procedimiento se repitió, pero utilizando una concentración de ozono de 49 $\mu\text{g/mL}$.

5. Veinte ratones NMRI machos fueron inoculados con $1 \cdot 10^6$ de células tumorales por el plexo ocular, administrándoles, diariamente, 1 mL de ozono por la vía rectal a una concentración de 26 $\mu\text{g/mL}$ durante 12 d. Se evaluaron mediante el conteo de colonias de las células tumorales del pulmón.

Evaluación de las colonias de células tumorales

Al llegar el día 14 de haberse trasplantado los tumores y haber sido efectuado el tratamiento, se le extrajeron los pulmones a los animales y se depositaron en disolución de Bouin. Luego a las 72 h fueron extraídos de la disolución y seccionados sus lóbulos, procediendo al conteo de las colonias de células tumorales en cada uno empleando un esteroscopio.

Cálculos

El incremento en el índice de sobrevida o aumento de sobrevida (AS) se calculó según:

$$AS = \frac{\bar{X}_{\text{tratados}} - \bar{X}_{\text{controles}}}{\bar{X}_{\text{controles}}} \cdot 100$$

donde:

$$\bar{X} = \frac{\sum n \cdot d}{nt}$$

d día en que se murieron los ratones.

n número de ratones muertos.

n_t total de ratones.

Cuando $AS > 25\%$, significa una actividad antitumoral significativa. Cuando $AS < -20\%$, significa existencia de toxicidad.⁹

Para el análisis estadístico se utilizó la prueba de Mann Whitney para la comparación entre los grupos tratados con ozono y el Control en los experimentos sobre colonización tumoral.

RESULTADOS Y DISCUSION

El ozono administrado por vía inhalatoria resulta altamente tóxico,^{10,11}

es por ello que se decidió evaluar por otras vías la tolerancia de los ratones al tratamiento con el gas, en este caso, intratumoral y rectal, en distintos tumores, tales como: TAE, P-388, L-1210, RL-67 (Tabla 1).

No se observaron diferencias significativas entre los animales tratados y los Controles no tratados.

Los índices negativos encontrados, en algunos casos, no alcanzaron el criterio de toxicidad reconocido (índice menor que -20%) y los índices positivos no rebasaron el 25% , necesario para el reconocimiento de una actividad antitumoral significativa.

El tratamiento con ozono no condujo a un aumento significativo de la sobrevida (13%) (Fig. 1). A pesar de no haberse registrado efectos de inhibición notables, tampoco se observó que se estimulara el crecimiento tumoral.

Una de las propiedades de las células malignas que influye más notablemente sobre los resultados finales del tratamiento es su capacidad de migrar por el torrente sanguíneo y desarrollar colonias en otros órganos provocando las metástasis.

La evaluación del efecto de la ozonoterapia por vía rectal, sobre la colonización pulmonar del tumor ascítico de Ehrlich (TAE), inoculado por el plexo ocular (Fig. 2) con $2 \cdot 10^6$ células, muestra que la frecuencia de aparición de las colonias pulmonares, en el caso de los animales tratados con ozono durante 9 d, con una concentración igual a 6 $\mu\text{g/mL}$, está disminuida significativamente con respecto a los controles ($p < 0,05$). Sin embargo, este

Tabla I. Actividad antitumoral del ozono por vía rectal e intratumoral.

Tumor experimental	Dosis diaria ozono (mg)	Sesiones	Ozono (mL)	Adminstración	AS (%)
TAE	6	7	1	rectal	1,5
P-388	6	20	1	rectal	-2,4
L-1210	12	5	1	rectal	8,5
RL-67	6	6	1	rectal	-5,6
TAE	6	7	0,1	intratumoral	3,8
TAE	6	7	0,2	intratumoral	13,8
P-388	6	7	0,1	intratumoral	-2,9
P-388	6	7	0,2	intratumoral	-9,2
RL-67	49	8	0,5	intratumoral	-3,1

efecto se ve más marcado (Figuras 3 y 4) al utilizar mayores concentraciones de ozono. En estos animales tratados unos, con $26 \mu\text{g/mL}$ de ozono durante 12 d (con $1 \cdot 10^6$ células tumorales trasplantadas) y otros con $49 \mu\text{g/mL}$ de ozono durante 9 d (con $2 \cdot 10^6$ células tumorales trasplantadas) el promedio de metástasis por pulmón está disminuido significativamente ($p < 0,05$) con res-

pecto a los Controles. Se pudo observar que el tratamiento con ozono por vía rectal disminuye las células tumorales en pulmón, con un efecto dosis dependiente.

A lo largo de todo el tratamiento se pudo observar que los animales tratados mostraban mejores condiciones clínicas que los Controles. Esto puede explicarse a través de la influencia que produce el ozono en

los sistemas de defensa del organismo, como por ejemplo, la estimulación de la actividad de las células efectoras como los macrófagos y las células NK, las cuales se han relacionado ampliamente con la colonización de los pulmones y el crecimiento de las metástasis.^{1-3,12-15}

CONCLUSIONES

Los resultados de este trabajo en relación con el tumor ascítico de Ehrlich, la leucemia L-1210 y P-388 y el tumor pulmonar RL-67 indican que el ozono, empleado por vía rectal o intratumoral, según el esquema de tratamiento utilizado, no favorece el crecimiento tumoral, ni manifiesta una actividad antitumoral marcada.

El ozono por vía rectal disminuyó significativamente el número de colonias de las células tumorales presentes en los pulmones de los animales trasplantados con el tumor murino TAE con respecto al Control y se obtuvo un mejor efecto con la mayor concentración de ozono.

BIBLIOGRAFIA

1. Bocci V. Ozonization of blood for the therapy of viral diseases and immunodeficiencies. A hypothesis. **Medical Hypothesis**, 39, 30, 1992.
2. Bocci V. A reasonable approach for the treatment of HIV infection in the early phase with ozonotherapy (autohemotherapy). How "inflammatory" cytokines may have a therapeutic role. **Mediators of inflammation**, 3, 315, 1994.
3. Hernández F. Menéndez S. Wong R. Decrease of blood cholesterol and stimulation of antioxidative response in cardiopathic patients treated with endovenous ozone therapy. **Free Rad. Biol. & Med.**, 19, 115, 1995.
4. Arnan M. Effects of ozone/oxygen gas mixture directly injected into mammary carcinoma of female c3h/HeJ mice. **J. of Hol. Med.**, 7, 31, 1985.
5. Schulz S. Anticarcinogenic effects of inhaled ozone/oxygen in urethane-treated NMRI-mice. Proceedings of the Ninth Ozone World Congress, New York, USA, 3, 69, 1989.
6. Kiev H. The treatment of malignant diseases with AHIT. Proceedings of the 11th Ozone World Congress, San Francisco, USA, 3, M-4-26, 1993.
7. Hernuss P. Muller-Tyl J., Dimopoulos J. Ozono Sauerstoff Injektionsbehandlung in der gynakologischen Strahlentherapie. **Strahlentherapie**, 148, 242, 1974.
8. Hernuss P. Muller-Tyl E., Seitz W. Strahlensensibilisierender Effekt von Ozon im Tierversuch. **Strahlentherapie**, 147, 91, 1974.
9. Gabrielson E.W., Yu X.Y., Spannake W.E. Comparison of the toxic effects of hydrogen peroxide and ozone on

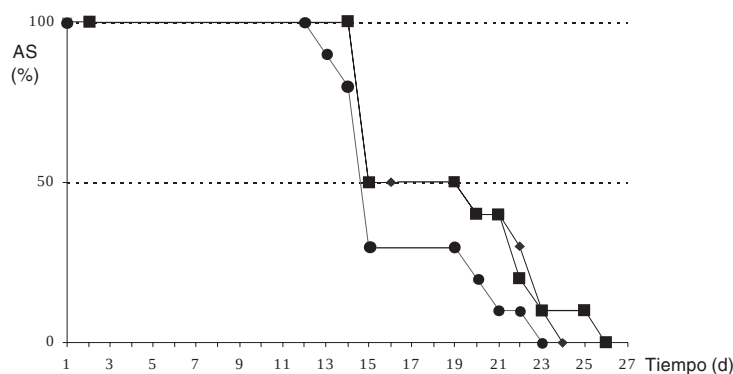


Fig. 1. Influencia del ozono ($6 \mu\text{g/mL}$) por vía intraperitoneal ($0,1$ y $0,2$ mL) en el aumento de supervivencia (AS) en animales trasplantados por la vía intraperitoneal con $1 \cdot 10^6$ células tumorales del TAE.

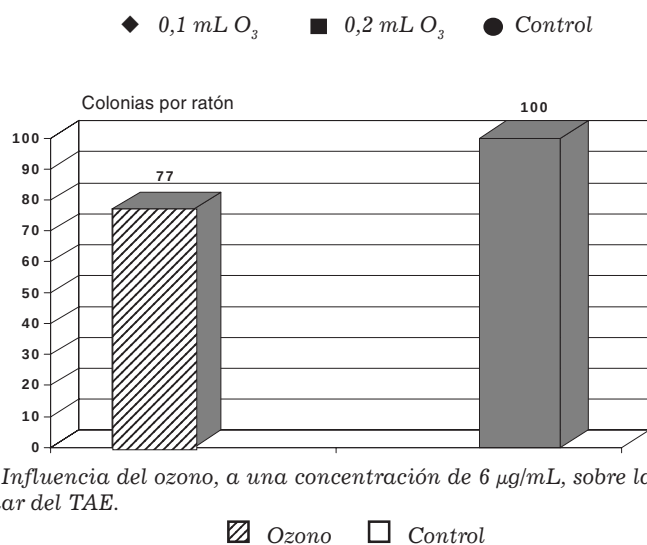


Fig. 2. Influencia del ozono, a una concentración de $6 \mu\text{g/mL}$, sobre la colonización pulmonar del TAE.

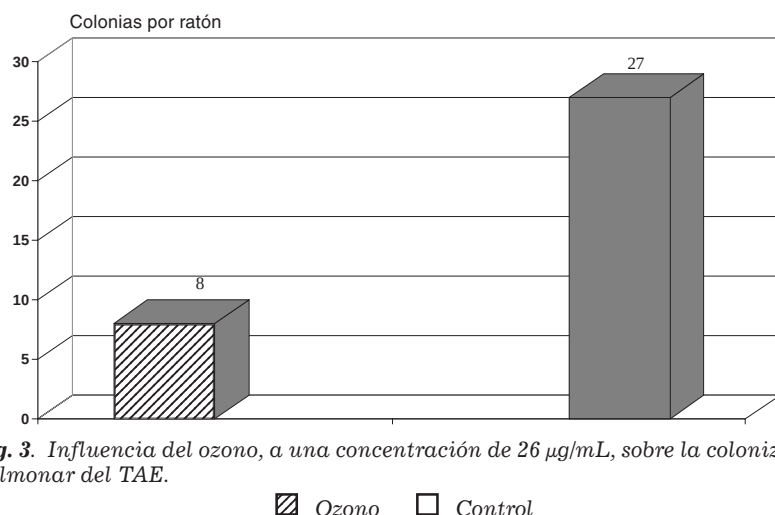


Fig. 3. Influencia del ozono, a una concentración de $26 \mu\text{g/mL}$, sobre la colonización pulmonar del TAE.

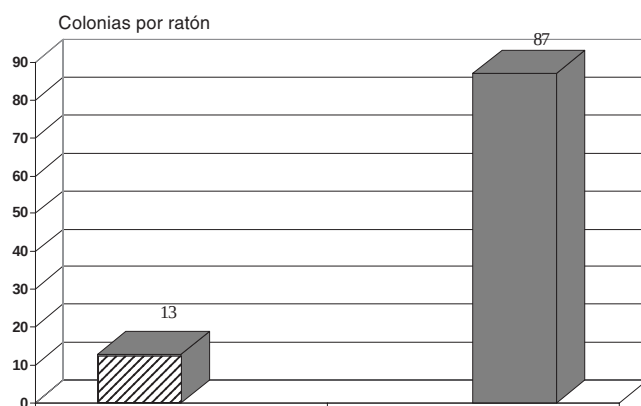


Fig. 4. Influencia del ozono, a una concentración de 49 $\mu\text{g/mL}$, sobre la colonización pulmonar del TAE

▨ Ozono □ Control.

cultured human bronchial epithelial cells. **Env. Health Persp.**, **102**, 972, 1994.

10. Fouke J.M., Wolin A.D., McFadden E.R. Effects of ozone on lung mechanics and cyclooxygenase metabo-

lites in dogs. **Prostaglandins**, **42**, 343, 1991.

11. Bello J.L. Sistema de tamizaje de sustancias antitumorales. Serie de Reseñas Nacionales No. Nacional: 2-2-86, No. Sistema: 65/86. República

de Cuba, Ciudad de La Habana, P-21, 1986.

12. Pereda M. Celia María Francoice G. Anne Ríos H. Miriam France P. Bello J.L. Actividad biológica de biopolímeros de origen marino I. Influencia sobre la actividad asesina natural (NK) en el ratón. **Rev. Cub. Oncología**, **6**, 265, 1990.
13. Pereda M, Francoice G. Anne Ríos H. France P. Bello J.L. Actividad biológica de biopolímeros de origen marino II. Influencia sobre la actividad de macrófagos peritoneales de ratón. **Rev. Cub. Oncología**, **6**, 270, 1990.
14. Pereda M., Alvarez D. Antonia Ríos H. Lascaux P. Bello J.L. Actividad biológica de biopolímeros de origen marino III. Influencia sobre la metastización pulmonar y hepática inducida por el melanoma B16MH10. **Rev. Cub. Oncología**, **6**, 275, 1990.
15. Bocci V. Ozone as a bioregulator. Pharmacology and Toxicology of Ozono therapy today. **Journal of Biological Regulators and Homeostatic Agents**, **10**, 31, 1996.