

ESTUDIO MUTAGENICO DEL OZONO POR AUTOHEMOTERAPIA

A. De las Cagigas, (1)A.Pérez, S.Henéndez, H.Gómez

CENTRO NACIONAL DE INVESTIGACIONES CIENTIFICAS

(1) INSTITUTO DE NUTRICION E HIGIENE DE LOS ALIMENTOS

RESUMEN . Se estudió un grupo de pacientes sometidos a autohemoterapia con ozono, de los cuales se probó el fluido sanguíneo con el fin de determinar la posible inducción de mutaciones en las cepas de *Salmonella typhimurium*, como resultado de la formación de peróxidos.

INTRODUCCION

El ozono es uno de los contaminantes del aire. Las bases moleculares de su toxicidad están relacionadas con su vigorosa propiedad oxidativa. Dos hipótesis explican la acción del ozono sobre bases moleculares :

- El ozono es responsable de la oxidación de los grupos tioles en las proteínas y péptidos de bajo peso molecular.¹
- El ozono es responsable de oxidar los ácidos grasos insaturados, por su gran afinidad hacia los dobles enlaces, los cuales ataca generando peróxidos hidrofílicos de cadena corta.²

Los procesos citados podrían ocurrir en las membranas biológicas, ya que éstas son a menudo ricas en ácidos grasos insaturados y proteínas, y a su vez se encuentran bañadas por un fluido que contiene metales y es rico en oxígeno.

Los procesos iniciados por radicales libres son particularmente deletéreos debido a que ellos son conservativos y propagativos. En su interacción con los constituyentes de la célula pueden producir radicales secundarios y terciarios derivados de lípidos, aminoácidos, ácido ascórbico, glutatión y compuestos de los ácidos nucleicos.³

Los efectos acumulativos de tal cascada pueden llevar a la muerte inmediata de la célula, provocando posiblemente la necrosis del tejido y su fibrosis.

El ozono es capaz de causar efectos mutagénicos en la cepa *E. coli* K12, en *Sacharomyces cereviceae*, produciendo mutaciones puntuales. Se conoce además, que los productos finales de la peroxidación, particularmente el malonaldehído, poseen propiedades mutagénicas, siendo capaces de formar cross link con el ADN.⁴

Otros estudios⁵ en roedores, señalan al ozono como un clastógeno débil. Además, hay evidencias de la alteración en la morfología de los espermatozoides, al ser administrado el gas en muy altas dosis, por vía intratesticular.

Dada la dificultad de hacer un estudio a largo plazo, ya que los ensayos de carcinogenicidad en animales son muy caros y demoran aproximadamente 3 años es necesario la utilización de ensayos *in vitro* a corto plazo. Entre éstos, el más validado es el ensayo de *Salmo,ella typhimuriun*, que consiste en el empleo de cepas bacterianas auxotróficas para la histidina, que en presencia de un compuesto con actividad mutagénica revierten a la prototrofia para dicho aminoácido.

La cepa anterior al crecer en un medio mínimo, presenta un número de revertantes espontáneos que fluctúa dentro de un rango establecido, siendo éste el control experimental. Sin embargo, al poner las bacterias en contacto con un agente mutagénico, el número de revertantes aumenta su potencia mutagénica. Por esta razón se les denomina revertantes inducidos.

Si la relación revertantes inducidos/revertantes espontáneos es mayor que dos, se asume que el compuesto analizado es un mutágeno.

Con el objetivo de simular las condiciones *in vivo* se empleó en el ensayo, una fracción enzimática que fue denominada S₉ que contenía actividades de función múltiples (OFM), las cuales se encargaban del metabolismo del compuesto bajo estudio.

En este trabajo se empleó una fracción de hígado de ratas machos Sprague Dawley, que fue tratada previamente con aroclor 1254, conocido inductor de las OFM.

Las cepas empleadas fueron la TA 97, TA 93 y TA 100. Se aplicaron dos variantes experimentales:

Incorporación en placas. Se mezclaron 10^9 células de cada cepa con diferentes volúmenes de sangre, 0,5 mL de la mezcla S₉ o 0,5 mL de tampón fosfato pH 7,4. Esta mezcla fue homogeneizada en 2 mL de agar suave y posteriormente vertida en placas de medio mínimo.

Preincubación. Los componentes anteriores, excepto el agar, se mezclaron y agitaron durante 20 min a 37 °C, luego se les adicionaron 2 mL de agar, vertiéndose en placas de medio mínimo. En ambos casos se les realizó una incubación durante 48 h a 37 °C. Después se realizó el conteo de las colonias.

ALITHEMOTERAPIA

Esta terapia fue llevada a cabo mediante el tratamiento de la sangre con una mezcla de ozono/oxígeno (concentración 40 g/mL) y su reposición al torrente circulatorio por inyección intravascular.

COLECCIÓN DE LA MUESTRA Y TRATAMIENTO

La sangre fue tomada de 12 pacientes con patologías tales como, retinosis pigmentaria, arteritis e infarto cerebral, los cuales ya habían recibido otras aplicaciones del gas, en un rango de 5 a 80 tratamientos. A estas muestras se

les aplicó el método de incorporación en placas. Las dosis utilizadas fueron 15; 7,5 y 1,5 mg de O₃/250 mL de sangre.

Para el ensayo de preincubación se tomó la sangre de dos pacientes sanos siendo tratados con la dosis de 7,5 mg de O₃/250 mL de sangre.

RESULTADOS

En las Tablas I, II, III y IV se muestran los resultados de los tratamientos con ozono en cada ensayo. Se debe aclarar que ninguna muestra cumple de forma independiente el requisito de mutagenicidad.

La capacidad peroxidativa del ozono ha sido estudiada y se sabe que las reacciones de peroxidación lipídicas pueden producir una gran variedad de mutágenos, promotores y carcinógenos.⁶

Tabla I

Influencia de la ozonización de la sangre a dosis de 1,5 mg O₃/250 mL de sangre

t (min)	TA 97		TA 100	
	- 59	+ 59	- 59	+ 59
K	98	140	110	145
0	102	137	100	110
30	112	138	104	125
60	123	144	108	137

• revertantes espontáneos de cada cepa (controles)

Tabla II

Influencia de la ozonización de la sangre a dosis de 7,5 mg/250 mL de sangre

t (min)	TA 97		TA 100	
	- 59	+ 59	- 59	+ 59
K	97	102	96	99
0	98	111	97	104
30	100	112	123	112
60	94	101	97	104

• revertantes espontáneos de cada cepa (controles)

Tabla III

Influencia de la ozonización de la sangre a dosis de 15 mg/250 mL de sangre

t (min)	TA 97		TA 100	
	- 59	+ 59	- 89	+ 59
K	147	147	127	125
0	125	145	110	135
30	142	162	117	117
60	125	148	125	120

• revertantes espontáneos de cada cepa (controles)

Tabla IV
Influencia de la ozonización de la sangre a dosis de 7,5 mg/250 mL sangre.
Preincubación

Tiempo (min)	Volumen (L)	TA 98		TA 100	
		- S _g	+ S _g	- S _g	+ S _g
	K*	14	18	81	71
0	100	18	23	114	64
	200	16	16	106	54
30	100	21	24	73	106
	200	18	20	75	79

* revertantes espontáneos de cada cepa (controles)

Las cepas TA 77 y TA 100 han mostrado su capacidad para ser utilizadas en la evaluación de los peróxidos. Más tarde, se diseñó la cepa TA 102, especialmente introducida para la detección de mutágenos oxidativos, como peróxido de hidrógeno y otros hidroperóxidos.⁷

Para el desarrollo de este trabajo se contó sólo con las cepas TA 97, TA 100 y TA 98, las cuales habían sido utilizadas anteriormente con buenos resultados.

No se observó ningún efecto mutágeno con las cepas anteriormente señaladas, a ninguna de las dosis terapéuticas empleadas. Sería recomendable realizar el ensayo con la cepa TA 102.

BIBLIOGRAFIA

1. Menzel D. J. Toxicol. Environ. Health 13, 183, 1984.
2. Rokitansky O. Clinical considerations and biochemistry of ozone therapy Hospitalis, 52, 643, 1982.
3. Michael A., Trash E.G., Minnaragh G. and Gram T.E. Biochemical pharmacol., 31, 3 335, 1982.
4. Simic M.C., Karel M. Autoxidation in food and Biological Systems. New York. Plenum Press, 1980.
5. Goldstein B.D. The pulmonary and extrapulmonary effects of ozone in oxygen free radicals and tissue damage. 295-310; 1979.
6. Demopoulos H.B., Pietronigro D.D., Flamm E.S., Seligman N.L. The possible role of radical reactions in carcinogenesis. In Demopoulos H.M. and