

Centro de Investigaciones del Ozono

## FRECUENCIA DE MICRONÚCLEOS EN SANGRE PERIFÉRICA DE PACIENTES TRATADOS CON OZONO

Lic. *Silvia del C. Díaz Llera* y Lic. *Yousy González Carvajal*

Descriptores DeCS: OZONO/toxicidad; OZONO/uso terapéutico; RETICULOCITOS/efectos de drogas; TESTS DE MICRONUCLEOS.

El estudio de la genotoxicidad del ozono se ha abordado en los últimos años como consecuencia del incremento de este gas en la atmósfera como fotoproducto de la contaminación ambiental.<sup>1</sup> Su alto poder oxidante se ha relacionado con enfermedades de las vías respiratorias, por lo cual se han priorizado las investigaciones para determinar el daño genético por inhalación de este gas.

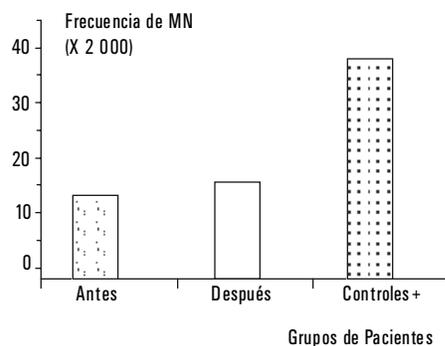
Los estudios realizados tanto *in vivo* como *in vitro* han sido revisados hace varios años.<sup>2</sup> Sin embargo, los estudios sobre la genotoxicidad de la ozonoterapia son todavía limitados. Los estudios previos realizados en pacientes cubanos antes y después de ser tratados y con muestras tratadas *in vitro*<sup>3,4</sup> demostraron que no hay manifestaciones de genotoxicidad en linfocitos de sangre periférica.

Mediante el presente trabajo se pretendió confirmar los resultados anteriores en pacientes tratados utilizando la determinación de la frecuencia de micronúcleos (MN) en otro tipo de células, eritrocitos jóvenes (reticulocitos) de sangre periférica. Esta técnica<sup>5</sup> ofrece varias ventajas con

respecto al análisis de la frecuencia de MN en médula ósea: es más económica, más sencilla y más rápida, al mismo tiempo que analiza el mismo tipo de células.<sup>6</sup> A pesar de que este ensayo no es recomendado para su aplicación en ratas y humanos debido a la actividad del bazo en la eliminación de los eritrocitos micronucleados, decidimos utilizarlo con la finalidad de confirmar este hecho en el caso de mutágenos activos como por ejemplo, los citostáticos, al mismo tiempo que corroborar los resultados citogenéticos obtenidos en otros estudios en la aplicación del ozono terapéutico.

El estudio se realizó con un grupo de pacientes tratados con ozono por vía rectal y endovenosa y otro grupo tratado con citostáticos como control positivo del ensayo. Se tomaron muestras de 5 µL de sangre a cada paciente. En el caso de los pacientes tratados con ozono las muestras fueron tomadas antes y después del ciclo de 15 sesiones de tratamiento, con una concentración de la mezcla O<sub>3</sub>/O<sub>2</sub> de 50 mg/L en un volumen de 50-100 mL para el tratamiento endovenoso y 200 para el tratamien-

to intrarrectal. Los pacientes tratados con antineoplásicos, afectados todos por linfomas de Hodgkin estaban recibiendo dosis variables de bleomicina en dependencia del estado particular de cada paciente. Es bien conocido el efecto genotóxico de esta droga. Después de tomada la muestra de sangre, ésta se depositó en un cubreobjeto preteñido con una solución de naranja de acridina (NA) a una concentración de 1 mg/mL, se realizó el frotis y se cubrió con un cubreobjeto de 24 x 50 mm. El conteo de reticulocitos se realizó en un microscopio de fluorescencia con un filtro de barrido del amarillo al naranja a 515 nm, usando el objetivo de inmersión. Los reticulocitos micronucleados (RMN) se identifican por su coloración característica en NA, en la cual la cromatina remanente en los MN toma un color verde-amarillento, mientras que el retículo se observa de color rojo. La frecuencia de RMN se determinó mediante el conteo de 2 000 reticulocitos por paciente. Los resultados obtenidos se observan en la tabla y la figura.



T-11

Fig. Medidas de la frecuencia de MN(X 2000 reticulocitos) antes y después de los tratamientos con ozono y en los pacientes tratados con citostáticos (controles positivos).

El análisis estadístico arrojó que no hay diferencia significativa entre la frecuencia de MN antes y después del tratamiento en los pacientes tratados con ozono. Sin embargo, la frecuencia de RMN en los pacientes tratados con antineoplásicos es muy significativa con respecto a la de los pacientes de ozono. Este resultado es concordante con lo obtenido hasta el momento en otros estudios<sup>3,4</sup> que han tratado de

TABLA. Frecuencia de micronúcleos (o/oo) en pacientes sometidos a ozonoterapia y a bleomicina (dosis variables)

Ozonoterapia	Vía de administración	Pretratamiento	Posttratamiento	Bleomicina	Posttratamiento
Paciente No.				Paciente No.	
01	IR	5,0	7,5	13	27,0
02	EV	9,0	12,5	14	12,0
03	EV	13,5	13,0	15	17,5
04	EV	11,0	5,0	16	22,0
05	IR	9,5	7,5	17	26,5
06	EV	3,0	10,0	18	19,0
07	IR	6,5	7,0	19	15,0
08	IR	7,0	10,0	20	25,0
09	EV	5,0	8,5	21	32,5
10	IR	7,5	9,0	22	21,5
11	IR	7,5	10,0		
12	EV	5,0	7,5		
Medias ± DE		7,45 ± 2,93	8,95 ± 2,30	1 4,79 ± 7,86	

demostrar el efecto citogenético de la ozonoterapia, los cuales han arrojado resultados negativos.

## CONCLUSIONES

1. Es posible utilizar el ensayo de micronúcleos en sangre periférica para

detectar la exposición a mutágenos potentes como es el caso de los citostáticos.

2. La ozonoterapia no incrementa la frecuencia de reticulocitos micronucleados lo cual confirma los resultados obtenidos en otros estudios que demuestran que esta terapia no presenta efectos clastogénicos ni aneugénicos en las condiciones aplicadas.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Menzel BD. Ozone: an overview of its toxicity in man and animals. *J Toxicol Environ Health* 1984;13:183-204.
2. Victorin K. Review of the genotoxicity of ozone. *Mutat Res* 1992;277:221-38.
3. Prieto E, Montejó L, Méndez del Castillo D, Menéndez S, Bello D, Jhonsaon J, et al. Evaluation of ozone genotoxicity by cytogenetic techniques. *Proceedings XI Ozone. World Congress, Sn Fco, 1993;3, Ozone in Medicine, M-3-44-M-3-52.*
4. Díaz S, Menéndez S, Eng L, Fernández I. No increase in sister chromatid exchanges and micronuclei frequency in human lymphocytes exposed to ozone *in vitro*. En: International Ozone Association. *Proceedings Ozone in Medicine, 12<sup>th</sup> World Congress of the International Ozone Association. 15<sup>th</sup> to 18<sup>th</sup> May 1995. Lille France. Tours: Instaprint, 1995:43-52.*
5. Hayashi M, Sofuni T, Ishidate M Jr. An application of acridine orange fluorescent staining to the micronucleus test. *Mutat Res* 1983;120:241-7.
6. The Collaborative Study Group for the Micronucleus test (CSGMT) (CSGMT/JEMS.MMS; The Mammalian Mutagenesis Study Group of the Environmental Mutagen Society of Japan). Protocol recommended by the CSGMT/JEMS.MMS for the short-term mouse peripheral blood micronucleus test. *Mutagenesis* 1995;10(3):153-9.

Recibido: 26 de diciembre de 1997. Aprobado: 29 de abril de 1998,

Lic. *Silvia del C. Díaz Llerena*. Calle 78 No. 912, municipio Playa, Ciudad de La Habana, Cuba.