

TRABAJOS DE REVISIÓN

Centro de Investigaciones del Ozono

ESTUDIOS SOBRE GENOTOXICIDAD DEL OZONO

Dr. Ricardo González, Dra. Cheyla Romay y Dra. Silvia Díaz-Llera

RESUMEN

Se hizo una revisión, dado que existen evidencias contradictorias sobre la genotoxicidad del ozono y se analizó la bibliografía existente sobre este tópico importante de la toxicología y las valoraciones al respecto. El ozono es una especie reactiva de oxígeno y un constituyente natural importante de la atmósfera, existen numerosas evidencias y el consenso de sus efectos tóxicos para el ser humano y los animales, especialmente por vía inhalatoria que afecta los bronquios y pulmones. Sin embargo, también muchas evidencias se han acumulado de que este gas cuando es utilizado por otras vías de administración puede ejercer efectos beneficiosos como tratamiento de enfermedades diversas, lo que ha dado apoyo al desarrollo de la ozonoterapia, sobre la que hoy se investiga en numerosos países y entre estos Cuba.

Palabras clave: Ozono, genotoxicidad, actividad clastogénica, aberraciones cromosómicas.

El ozono (O₃), es una especie de oxígeno reactivo y un importante constituyente de la atmósfera. La exposición aguda al gas por inhalación se ha reportado que produce inflamación pulmonar y daño celular al epitelio de la cavidad nasal, a los bronquios y bronquiolos, así como a los macrófagos alveolares, todo lo cual provoca la hiperreactividad bronquial y la inducción y el agravamiento de las crisis de asma.¹⁻³ Sin embargo, la ozonoterapia utilizada por otras vías de administración se investiga en forma creciente en numerosos países y los institutos nacionales de salud de Alemania, Italia, Austria y Rusia, entre otros

países, la aceptan como medicina alternativa.^{4,5} En Cuba el O₃ también se ha investigado durante más de una década con resultados alentadores para el tratamiento de diversas enfermedades humanas^{6,7} y se trabaja con el objetivo de lograr su registro sanitario como agente terapéutico.

Teniendo en cuenta que existen algunos reportes contradictorios sobre la genotoxicidad del O₃ y dada la importancia de este tópico en los estudios sobre la toxicidad de fármacos y agentes terapéuticos potenciales se decidió realizar una revisión bibliográfica exhaustiva sobre este tema que se expondrá a continuación.

EFFECTOS GENOTÓXICOS PRODUCIDOS POR LA ADMINISTRACIÓN DEL O₃ *IN VITRO* E *IN VIVO*

El primer experimento sobre la genotoxicidad del ozono por vía inhalatoria fue realizado por *Zelac* y otros⁸ Estos autores utilizaron hamsters chinos hembras que fueron expuestos a dosis de ozono de 0,48 y 0,60 mg.m⁻³ durante 5 h. Los resultados fueron comparados con un grupo control no tratado. Se observó que la frecuencia de aberraciones cromosómicas en los linfocitos periféricos de los grupos tratados con O₃ era significativamente mayor con respecto al grupo control inmediatamente después de la exposición al O₃ y 15 d después del tratamiento. Sin embargo, *Tice* y otros⁹ expusieron a los hamsters chinos a una dosis mayor de O₃ (0,8 mg.m⁻³) durante 5 h y no detectaron aberraciones cromosómicas en los linfocitos ni en las células de la médula ósea de los animales. Tampoco hubo incremento en la frecuencia de intercambio de cromátidas hermanas (ICH) en los linfocitos de los hamsters chinos ni en las células de la médula ósea de ratones C57B16 expuestos a 4 mg.m⁻³ de O₃ durante 6 h al ser examinados inmediatamente y 1, 2 y 3 semanas después de la exposición al O₃.

Gooch y otros¹⁰ no detectaron inducción de aberraciones cromosómicas y cromatídicas en linfocitos de hamsters chinos y ratones C3H expuestos a dosis de O₃ de 2 mg.m⁻³ durante 2 h. Estos autores tampoco observaron translocaciones recíprocas en los espermatozoides de los animales tratados con O₃.

Coincidiendo con los resultados anteriores, *Zhurkov* y otros¹¹ tampoco observaron aberraciones cromosómicas y cromatídicas en las células de médula ósea de ratas expuestas a 0,15 mg.m⁻³ de O₃ du-

rante 8 h diarias por 7 d ó a 5,6 mg.m⁻³ por 5 d. Bajo estas últimas condiciones experimentales la actividad mitótica en la médula ósea se redujo significativamente.

En concordancia con los resultados de los estudios anteriores, en Cuba, *Fernández* y otros¹² evaluaron la actividad citotóxica y clastogénica en la médula ósea de ratones tratados con O₃ por las vías intraperitoneal (ip) e intramuscular (im) a las dosis de 460, 930, 1 400 y 2 300 mg/kg de peso corporal, realizando 15 aplicaciones de cada una. El O₃ resultó citotóxico solo a la dosis de 2 300 mg/kg por vía ip; además presentó una actividad clastogénica débil a esta dosis y a la de 1 400 mg/kg. Estas dosis fueron 10 y 7 veces mayores respectivamente, que la máxima dosis terapéutica de O₃ empleada para la autohemoterapia en humanos.

En los animales que recibieron el tratamiento con O₃ por vía intramuscular se detectó un efecto citotóxico a partir de la dosis de 930 mg/kg, el cual es 66 veces superior que la máxima utilizada en humanos. La dosis inferior (460 mg/kg) no indujo incrementos significativos de aberraciones en los cromosomas de las células con respecto a los controles no tratados.

En otra investigación llevada a cabo por *Fernández* y otros¹³ se evaluó el efecto del O₃ sobre la espermatogénesis en ratones. El O₃ se administró en una mezcla con O₂, por vía intratesticular en dosis de 35, 50 y 70 mg/kg. Como resultado se obtuvo que no hubo afectación en la relación peso del testículo/peso corporal en los animales tratados con O₃ a ninguna de las dosis evaluadas. Sin embargo se detectó disminución del conteo de espermatozoides y alteraciones morfológicas con todas las dosis de O₃ en la segunda semana posterior al tratamiento, efectos que desapa-

recieron en las semanas subsiguientes. El ensayo de síntesis no programada de ADN realizado utilizando timidina tritiada tuvo un resultado negativo.

Más reciente, *Remigio* y otros¹⁴ evaluaron la actividad citotóxica y clastogénica en roedores tratados con O₃ por insuflación rectal, a través del análisis citogenético de la médula ósea en ratones CENP:NMRI mediante el ensayo de micronúcleos y en ratas CENP:SPRD mediante el análisis de las aberraciones cromosómicas, utilizando las dosis de O₃ de 5 y 7,5 mg/kg en los ratones y 0,44 y 0,66 mg/kg en ratas. En este experimento se utilizaron controles negativos y positivos, respectivamente, realizándose en todos los casos una aplicación diaria durante 10 d consecutivos. Los autores no observaron evidencias de efectos citogenéticos en la médula ósea de los animales tratados con la mezcla O₃/O₂ por vía rectal una vez finalizado el tratamiento. No obstante las dosis de O₃ ensayadas en este estudio en las ratas, son relativamente bajas, por lo cual el resultado en esta especie se considera no es concluyente.

En los estudios de genotoxicidad del O₃ realizados en suspensiones de microorganismos (*E. coli* y *Salmonella*) a los que se les burbujeó el gas, los resultados han sido contradictorios.

Hamelin y *Chung*¹⁵ burbujearon suspensiones de *E. coli* con O₃ en un intervalo de concentraciones entre 0,1 y 100 mg.m⁻³ por períodos que oscilaron entre 15 y 60 min y observaron la inducción de mutaciones hacia delante y reversas en sus genomas respectivos, así como roturas en la cadena del ADN.

En contraste con lo anterior, en el ensayo de Ames en el que una mezcla de O₃/aire se pasó sobre placas de agar contenidas en una cámara de exposición e inocu-

ladas con *Salmonella*,¹⁶ no se detectaron efectos mutagénicos a concentraciones de O₃ desde 1 hasta 4 mg.m⁻³ con la utilización de activación metabólica (S9) en el ensayo o sin esta. Las concentraciones de O₃ mayores que 4 mg.m⁻³ resultaron tóxicas para la bacteria en este estudio. Sin embargo, en otro estudio *Dillon* y otros¹⁷ reportaron mutagenicidad del O₃ en otra cepa de *Salmonella*.

En relación con la evaluación de la genotoxicidad del O₃ en insectos, se destaca el estudio realizado por *Erdman* y *Hernández*¹⁸ en el cual se expusieron moscas *Drosophila viridis* machos a una concentración de O₃ de 60 mg.m⁻³ durante 3 h. Períodos de tiempo mayores fueron letales para las moscas. En este estudio el O₃ indujo mutaciones del tipo dominante letales en la descendencia, calculadas por la proporción de huevos que fallaron en evolucionar a pupas.

En los estudios citogenéticos realizados en cultivos de células, *Fetner*¹⁹ fue el primero que demostró que el O₃ produce daño en los cromosomas (aberraciones en cromátidas) utilizando líneas de células KB humanas que expuso a la concentración de 16 mg.m⁻³ durante 5 o 10 min.

Gooch y otros¹⁰ estudiaron el efecto del burbujeo de O₃ a través de una suspensión de linfocitos humanos. Cuando las células fueron tratadas en fase S, la frecuencia en la pérdida de cromátidas se incrementó pero no se detectaron aberraciones en los cromosomas.

Resultados similares obtuvieron *Guerreiro* y otros²⁰ al exponer cultivos de 24 h de células de pulmón fetal humano (WI-38) a niveles de O₃ de 0,5; 1; 1,5; y 2 mg.m⁻³ durante 1 h. En este estudio se observó un incremento en la pérdida de cromátidas solo a la mayor dosis de O₃ empleada (2 mg.m⁻³).

Sin embargo, se produjo un incremento dependiente de la concentración de O_3 en el ICH, pero no se observó incremento de las aberraciones cromosómicas.

*Shiraishi y Bandow*²¹ expusieron células de hamsters chinos V79 a concentraciones de O_3 en el intervalo de 0,26 a 2 $mg.m^{-3}$ durante 2 h. Bajo estas condiciones el O_3 indujo ICH y produjo una inhibición dependiente de la concentración en el crecimiento celular.

*Hsueh y Xiang*²² reportaron que el O_3 induce ICH en los linfocitos humanos a concentraciones entre 0,3 y 1,5 $mg.m^{-3}$.

*Díaz-Llera y González*²³ realizaron un estudio en pacientes tratados con O_3 por vía intrarrectal y endovenosa y determinaron la frecuencia de micronúcleos en reticulocitos de la sangre periférica, comparándolos con otro grupo de pacientes portadores de linfoma de Hodgkin tratados con el citostático bleomicina, con efecto genotóxico reconocido.

Los resultados de este estudio demostraron que la ozonoterapia (15 sesiones con una concentración de 50 mg/mL en un volumen de 100 mL) no incrementa la frecuencia de los reticulocitos micronucleados en los pacientes tratados, lo cual confirmó los resultados obtenidos en otros estudios en cuanto a que el O_3 ni sus intermediarios tienen efecto clastogénico aparente.

*Merz y otros*²⁴ estudiaron las aberraciones cromosómicas en linfocitos periféricos de 6 personas expuestas al O_3 a una concentración de 1 $mg.m^{-3}$ durante 6 y 10 h. Los sujetos sirvieron como sus propios controles, las muestras de sangre fueron tomadas antes y después del tratamiento. Los autores no observaron aberraciones en los cromosomas de ninguno de los sujetos. Sin embargo, la mayoría mostró pérdida de cromátidas después de la exposición.

*McKenzie y otros*²⁵ también realizaron estudios citogenéticos en 26 sujetos jóvenes saludables del sexo masculino y no fumadores expuestos a 0,8 $mg.m^{-3}$ de O_3 durante 4 h. Las muestras de sangre fueron tomadas inmediatamente antes y después de la exposición, así como 3 d, 2 y 4 semanas después, no encontrando incremento significativo en el número de linfocitos con aberraciones cromosómicas ni en las cromátidas como consecuencia de la exposición al O_3 .

En cuanto a los efectos del O_3 sobre el ADN, *Rasmussen*²⁶ expuso células de hamster chino V79 al O_3 (2 a 20 $mg.m^{-3}$) durante 1 h y observó que la replicación del ADN, evaluada por la incorporación de timidina tritiada, se redujo en dependencia de la concentración del gas utilizada. Las concentraciones superiores a 4 $mg.m^{-3}$ fueron citotóxicas. El autor concluyó a partir de sus resultados que el O_3 interactúa con el ADN provocando la inhibición de la replicación.

*Borek y otros*²⁷ expusieron una línea de células epidérmicas humanas RHEK a la concentración de O_3 de 10 $mg.m^{-3}$ durante 10 min. Se evaluó la rotura de la cadena de ADN por la técnica de elusión alcalina y centrifugación en gradiente de sacarosa alcalina. En este estudio no se pudo detectar un aumento significativo en la rotura de la cadena de ADN inducida por el O_3 .

*Kozumbo y Agarwal*²⁸ realizaron experimentos con un tampón ozonizado. Ellos utilizaron fibroblastos de pulmón humano CCD-18 y células A549 epiteliales tipo II transformadas, también de pulmón. El tampón que había sido pretratado con una concentración de O_3 de 2 $mg.m^{-3}$, no indujo rotura en la cadena de ADN de estos tipos celulares.

Muy recientemente *Díaz-Llera* y otros²⁹ estudiaron mediante el ensayo Cometa el efecto genotóxico del O₃ y del H₂O₂ en leucocitos de sangre periférica extraída de 6 voluntarios saludables, no fumadores y con edad comprendida entre 22 y 48 años. Las concentraciones de O₃ utilizadas estuvieron en un rango entre 0,875 y 5,25 mM con un período de incubación de las muestras de 1 h a 37 °C. Controles positivos expuestos al H₂O₂ (4-40 mM) fueron también incluidos en el estudio. Los autores observaron incrementos en los porcentajes de células dañadas tanto por el O₃ como por el H₂O₂, los cuales fueron dependientes de la concentración de ambos agentes, así como en las mediciones de la migración del ADN (longitud del cometa). La preincubación de las células con catalasa durante 15 min disminuyó significativamente los porcentajes de células dañadas y la longitud del cometa, esto sugiere que el H₂O₂ es el principal mediador de esos efectos y que la catalasa ejerce un efecto protector eficiente.

Los autores demostraron que el O₃ induce daño en el ADN en leucocitos humanos de sangre periférica *in vitro* y que el daño fundamental es por rotura de la cadena del ADN mediada por la formación de H₂O₂, pero es reversible debido al importante papel que desempeñan los mecanismos de reparación.

En resumen, los estudios citogenéticos realizados *in vivo* en animales de laborato-

rio a los que se les administró el O₃ por las vías inhalatoria, intramuscular, intraperitoneal, intratesticular e intrarrectal, en su mayoría han mostrado resultados negativos. Aberraciones cromosómicas y en las cromátidas de los linfocitos de sangre periférica se han detectado en los hamsters chinos expuestos al O₃, pero no se han observado en los ratones y las ratas. Tampoco se han reportado efectos citogenéticos del O₃ en las células de la médula ósea ni en espermatozoides de los animales tratados.

Se ha demostrado que el O₃ es genotóxico *in vitro*. Mutaciones y rotura en la cadena del ADN ocurren en bacterias, principalmente en experimentos en los cuales el O₃ fue burbujeado a través de suspensiones de microorganismos en cultivo, en cuyo caso también se forman radicales OH· y H₂O₂. En los cultivos de células animales y humanas tratadas con O₃ se han detectado aberraciones en las cromátidas, e intercambio de cromátidas hermanas. Este último efecto puede producirse a concentraciones que oscilan entre 0,3 y 2 mg.m⁻³.

Se han aportado evidencias sólidas de que el daño inducido por el O₃ en el ADN (rotura de la cadena) en leucocitos humanos de sangre periférica es un efecto reversible, esto indica que las células se recuperan rápidamente del efecto genotóxico inducido por el tratamiento con el gas.

SUMMARY

As there are contradictory evidences on the genotoxicity of ozone, a review was made and the bibliography on this important topic of toxicology and the appraisals on this regard were also analyzed. Ozone is a reactive oxygen species and an important natural constituent of the atmosphere. There are numerous evidences and consensus about its toxic effects for human beings and animals, specially for the bronchi and lungs when it is inhaled.

However, many evidences have been also accumulated about the fact that this gas may have beneficial effects to treat several diseases when it is administered by other routes. That's why, support has been given to the development of ozone therapy, and research on this topic is made in Cuba and in many other countries.

Key words: Ozone, genotoxicity, clastogenic activity, chromosomal aberrations.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Gustafsson LE, Cotgreave I. Ozone-induced toxicity in experimental animals and isolated cell systems. *Scand J Work Environ Health* 1996;22:27-41.
2. Leikauf GD, Simpson LG, Driscoll KE. Airway epithelial cell responses to ozone injury. *Environ Health Perspect* 1995;103:91-5.
3. Kehrl H, Peden DB, Ball B. Increased specific airway reactivity of persons with mild allergic asthma after 7.6 hours of exposure to 0.16 ppm ozone. *J Allergy Clin Immunol* 1999; 104:1198-204.
4. Bocci V. Biological and Clinical effects of ozone. Has ozone therapy any future in medicine? *Brit J Biomed Sci* 1999;56:270-9.
5. Bocci V, Aldinucci C, Borrelli E. Ozone in medicine. *Ozone Sci Eng* 2001;23:207-17.
6. Menéndez S, Fernández J, Turrent J. La ozonoterapia en pacientes con neuroangiopatía diabética. *Revista CENIC Ciencias Biológicas* 1998;29:165-8.
7. Rodríguez MM, Menéndez S, García JR, Devesa E. Ozonoterapia en la enfermedad cerebro-vascular isquémica. *Revista CENIC Ciencias Biológicas* 1998;29:145-8.
8. Zelac RE, Cromroy HL, Bolch WE, Dumarant BG. Inhaled ozone as a mutagen I. Chromosome aberrations induced in chinese hamster lymphocytes. *Environ Res* 1971;4:262-82.
9. Tice RR, Bender MA, Ivett JL, Drew RT. Cytogenetic effects of inhaled ozone. *Mutat Res* 1978;58:293-304.
10. Gooch PC, Creasia DA, Brewen JG. The cytogenetic effects of ozone: inhalation and in vitro exposures. *Environ Res* 1976;12:188-95.
11. Zhurkov VS, Pechennikova EV, Feldt EG. Analysis of chromosome aberrations in bone marrow cells of rats after inhalation exposure to ozone. *Sanit* 1979;9:12-4.
12. Fernández SI, Quinzan C, Menéndez S, Gómez M. Estudio en animales de experimentación de posibles efectos teratogénicos y mutagénicos del ozono por vía intraperitoneal e intramuscular. *Revista CENIC Ciencias Biológicas* 1989;20:45-7.
13. Fernández SI, Quinzan C, Menéndez S, Gómez M, Acosta P. Estudio del efecto del ozono intratesticular sobre la espermatogénesis. *Revista CENIC Ciencias Biológicas* 1989;20:16-9.
14. Remigio A, Zamora Z, González Y, Moleiro J. Estudio del efecto mutagénico del ozono administrado por insuflación rectal en roedores. *Revista CENIC Ciencias Biológicas* 2001; 32:59-62.
15. Hamelin C, Chung YS. Repair of ozone-induced DNA lesions in *Escherichia coli* b cells. *Mutat Res* 1989;214:253-5.
16. Victorin K, Stahlberg M. A method for studying the mutagenicity of some gaseous compounds in *Salmonella typhimurium*. *Environ Mol Mutagen* 1988;11:65-77.
17. Dillon D, Combes R, Mc Conville M, Zeiger E. Ozone is mutagenic in *Salmonella*. *Environ Mol Mutagen* 1992;19:331-7.
18. Erdman HE, Hernández T. Adult toxicity and dominant lethals induced by ozone at specific stages in spermatogenesis in *Drosophila virilis*. *Environ Mol Mutagen* 1982;4:657-66.
19. Fetner RH. Chromosome breakage in *Vicia faba* by ozone. *Nature* 1958;181:504-5.
20. Guerrero RR, Rounds DE, Olson RS, Hackney JD. Mutagenic effects of ozone on human cells exposed in vivo and in vitro based on sister chromatid exchange analysis. *Environ Res* 1979;18:336-46.
21. Shiraiishi F, Bandow H. The genetic effects of the photochemical reaction products of propylene plus NO₂ on cultured Chinese hamster cells exposed in vitro. *J Toxicol Environ Health* 1985;15:531-8.
22. Hsueh JL, Xiang W. Environmental mutagenesis research at Fudan University. *Environ Sci Res* 1984;31:755-69.
23. Díaz Llera S, González Y. Frecuencia de micronúcleos en sangre periférica de pacientes tratados con ozono. *Rev Cubana Invest Biomed.* 1999;18:29-31.

24. Merz T, Bender MA, Kerr HD, Kulle TJ. Observations of aberrations in chromosomes of lymphocytes from human subjects exposed to ozone at a concentration of 0.5 ppm for 6 and 10 hours. *Mutat Res* 1975;31:299-302.
25. Mc Kenzie WH, Knelson JH, Rummo NJ, House DE. Cytogenetic effect of inhaled ozone in man *Mutat Res* 1977;48:95-102.
26. Rasmussen RE. Inhibition of DNA replication by ozone in Chinese hamster V79 cells. *J. Toxicol Environ Health* 1986;17:119-28.
27. Borek C, Ong A, Cleaves JE. DNA damage from ozone and radiation in human epithelial cells. *Toxicol. Ind Health* 1988;4:547-53.
28. Kozumbo WJ, Agarwal S. Induction of DNA damage in cultured human lung cells by tobacco smoke arylamines exposed to ambient levels of ozone. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1990;3:611-8.
29. Díaz Llera S, González Y, Prieto EA, Azoy A. Genotoxic effect of ozone in human peripheral blood leukocytes. *Mutat Res* 2002;517:13-20.

Recibido: 23 de febrero de 2004. Aprobado: 22 de abril de 2004.

Dr. *Ricardo González*. Centro de Investigaciones del Ozono. Departamento de Biomedicina, Centro Nacional de Investigaciones Científicas, Apartado 6412, Ciudad de La Habana, Cuba.