



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

ESCUELA SUPERIOR DE INGENIERÍA QUÍMICA E INDUSTRIAS

EXTRACTIVAS

SECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

EFFECTO DE LA DOSIFICACIÓN DE OZONO SOBRE LA DINÁMICA
DE CRECIMIENTO DE CELULAS TUMORALES

IN VITRO E IN VIVO

TESIS DOCTORAL

Presenta

M. en C. ARIZBETH AMITZIN PÉREZ MARTÍNEZ

DIRECTORES DE TESIS

Dra. TATIANA TIMOSHINA LUKIANOVA

Dr. JORGE ISAAC CHAIREZ ORIA



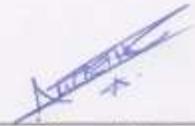


INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

CARTA CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de México, D.F. el día 21 del mes de mayo del año 2013, el (la) que suscribe Arizbeth Amitzin Pérez Martínez alumno(a) del Programa de Doctorado en Ciencias en Ingeniería Química, con número de registro B101694 adscrito(a) a la ESIQIE, manifiesto(a) que es el (la) autor(a) intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección del (de la, de los) la Dra. Tatiana Timoshina Lukianova y el Dr. Jorge Isaac Chairez Oria y cede los derechos del trabajo titulado Efecto de la dosificación de ozono sobre la dinámica de crecimiento de células tumorales in vitro e in vivo, al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del (de la) autor(a) y/o director(es) del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a las siguientes direcciones ariz_pema@hotmail.com. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.


Nombre y firma del alumno(a)



SIP-14-BIS

INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de México, D. F., siendo las 18:00 horas del día 12 del mes de Mayo del 2014 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de la Tesis, designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de ESIQUIE para examinar la tesis titulada:
"Efecto de la dosificación de ozono sobre la dinámica de crecimiento de células tumorales *in vitro* e *in vivo*".

Presentada por el alumno:

PÉREZ
Apellido paterno

MARTÍNEZ
Apellido materno

ARIZBETH AMITZÍN
Nombre(s)

Con registro:

B	1	0	1	6	9	4
---	---	---	---	---	---	---

aspirante de:

DOCTOR EN CIENCIAS EN INGENIERÍA QUÍMICA

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISIÓN REVISORA

Directores de tesis

DRA. TATIYANA TIMOSHINA LUKIANOVA

DR. JORGE ISAAC CHAIREZ ORIA

DRA. CLARA LETICIA SANTOS CUEVAS

DR. RICARDO MACÍAS SALINAS

DR. BENJAMÍN MARCOS MARÍN SANTIBÁÑEZ

DR. JUAN RAMÓN AVENDAÑO GÓMEZ

PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES
EDUCACIÓN PÚBLICA
INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
ESCUELA SUPERIOR DE INGENIERÍA QUÍMICA
E INDUSTRIAS EXTRACTIVAS
DIRECCIÓN

ING. MIGUEL ÁNGEL ALVAREZ GÓMEZ



Índice

Índice	iii
Índice de Figuras.....	vii
Índice de Tablas	ix
Resumen.....	x
Introducción	1
Capítulo I.....	4
Generalidades	4
I.1 Propiedades físicas del ozono.....	4
I.2 Áreas de aplicación del ozono.....	5
I.3 Ozono en medicina	6
I.4 Como actúa el ozono y como se puede evitar su toxicidad.....	7
I.5 Vías de aplicación de ozono.....	11
I.6 Métodos Directos.....	12
.....	12
I.7 Métodos indirectos	13
I.8 Ventajas y desventajas del ozono en el área médica (efectos secundarios)	15
I.9 Estrés oxidativo.....	16
I.10 Métodos de medición del estrés oxidativo	20
I.10.1 Métodos de control en la aplicación del ozono en el área médica (estrés oxidativo – DB-Index)	
.....	21
Capítulo II.....	26
Ozono disuelto en medio líquido	26
Metodología.....	26
II.1.1 Proceso de ozonación	26
II.1.2 Medición de ozono en fase líquida.....	27
Resultados.....	28
II.2.1 Dinámicas de ozonación de la fase líquida.....	28
II.2.2 Estudio cinético de descomposición de ozono disuelto.....	29



Conclusiones.....	33
Capítulo III.....	35
Determinación del Índice de Dobles Ligaduras (DBI)	35
Capítulo IV.....	38
Exposición de microorganismos a ozono.....	38
Metodología	40
II.1.1 Material microbiológico	40
II.1.2 Soluciones utilizadas para disolver el ozono.....	40
II.1.3 Microorganismos en agar BHI.....	40
II.1.4 Microorganismos en suspensión solución fisiológica glucosada a concentración de ozono constante	41
II.1.5 Microorganismos en suspensión solución fisiológica glucosada a concentración de ozono variable	42
II.1.6 Cuantificación de UFC en agar por análisis de imagen	43
Resultados	44
II.2.1 Determinación de la cinética de crecimiento bacteriano en agar BHI por medio de IITL.....	44
II.2.2 Efecto del tipo de solución en el que se encuentra disuelto el ozono sobre el crecimiento bacteriano	47
II.2.3 Efecto de la concentración de ozono sobre el crecimiento bacteriano	49
II.2.4 Evaluación de viabilidad celular en medio líquido.....	50
II.2.5 Modelamiento cinético de la inactivación celular.....	51
Conclusiones.....	53
Capítulo V.....	55
Aplicación de ozono a cultivo de células animales.....	55
Metodología	56
IV.1.1 Esquema general de experimentación	56
IV.1.2 Cultivo de células C6.....	57
IV.1.3 Prueba de proliferación celular.....	58
IV.1.4 Dosificación de ozono.....	60



Resultados.....	61
IV.2.1 Dosificación de ozono al cultivo de células C6.....	61
IV.2.2 Prueba de proliferación.....	61
IV.2.3 Dosificación de ozono.....	62
IV.2.4 Análisis de ITL en cultivos celulares.....	67
Conclusiones.....	68
Capítulo VI.....	70
Aplicación de ozono en animales modelo.....	70
Metodología.....	77
VI.1.1 Esquema experimental.....	77
VI.1.2 Modelo murino.....	78
VI.1.3 Cálculo del tamaño tumoral.....	78
VI.1.4 Análisis de imagen por Tomografía de Emisión de Positrones (PET).....	79
VI.1.5 Análisis clínicos en suero.....	79
VI.1.6 Determinación de hidroperóxidos totales.....	80
Resultados.....	80
VI.2.1 Dosificación del ozono en un modelo murino.....	80
VI.2.2 Evolución volumétrica del tumor.....	81
VI.2.3 Determinación colesterol total y triglicéridos totales.....	82
VI.2.4 Análisis de ITL en suero y paquete globular.....	83
VI.2.5 Análisis de ITL en muestras de riñón, hígado y tumor.....	84
VI.2.6 Determinación de hidroperóxidos en muestras de tumor y su correlación con ITL.....	86
VI.2.7 Determinación de actividad tumoral por medio de análisis de imagen por microPET y su correlación con el ITL.....	87
Conclusiones.....	90
Conclusiones generales.....	92
Recomendaciones.....	94
Bibliografía.....	96



Anexo I. Selección de los microorganismos	106
Anexo II. Método Folch: extracción de lípidos	107
Anexo III. Selección de la línea celular	108
Anexo IV. Método de cuantificación de proliferación celular CyQuant®	109
Anexo V. Conteo de células por pozo.....	111
Anexo VI. Selección de los animales modelo: BALB/c	112
Anexo VII. Método de inoculación	113
Anexo VIII. Dosificación de ozono disuelto.....	114
Anexo IX. Colesterol y triglicéridos totales.....	115
Colesterol Total. Método enzimático (CHOD-POD).....	115
Fundamento del método.....	115
Procedimiento.....	116
Triglicéridos Totales. Método enzimático (GPO-POD).....	117
Fundamento del método	117
Procedimiento.....	117



Índice de Figuras

Figura 1 Efectos fisiológicos (biológicos) de la presencia de oxígeno-ozono en la sangre	9
Figura 2. Descripción resumida de las etapas de la metodología experimental.	25
Figura 3 Diagrama del proceso de ozonación, (1) Tanque de oxígeno,(2) Generador de ozono, (3) Sistema de válvulas, (4) Reactor, (5)Analizador de ozono, (6) Sistema de adquisición de datos y PC.....	27
Figura 4 Sensor de ozono disuelto (ODS-LEPSE).....	28
Figura 5. Ozonograma de agua inyectable y solución fisiológica (NaCl 0.9%) con una concentración de ozono de 4.6 mg/L en fase gaseosa.	29
Figura 6. Dinámica de descomposición del ozono disuelto bajo diferentes concentraciones de ozono en fase gaseosa: solución fisiológica de NaCl 0.9% (a), agua inyectable (b) [Concentración de ozono Δ - 4.6 mg/L; \square -11 mg/L; $^{\circ}$ -20 mg/L; $*$ - 30 mg/L].....	30
Figura 7. Esquema de un prototipo para el análisis de ITL. (1) Tanque de oxígeno extra seco, (2) Generador de ozono UV, (3) Sistema de válvulas, (4) Reactor de vidrio, (5) Detector de ozono, (6) Tarjeta de adquisición de datos y PC	36
Figura 8 Relación entre el consumo del ozono y el número de moléculas de Estilbeno.....	37
Figura 9 Cultivo de bacterias en agar BHI.....	41
Figura 10 Esquema general de experimentación para cultivo de bacterias en solución glucosada	42
Figura 11 Variación de la ITL con respecto al tipo de solución y agente oxidante: <i>Escherichia coli</i> (a) and <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (b).....	45
Figura 12 Variación del ITL dependiendo del tipo de solución en la que se encuentra disuelto el ozono. (a) <i>Escherichia coli</i> , (b) <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	48
Figura 13 Variación del ITL a diferentes concentraciones de ozono disuelto en solución fisiológica NaCl 0.9%. (a) <i>Escherichia coli</i> , (b) <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	49
Figura 15 Esquema general de experimentación de la Etapa II.....	57
Figura 16 Metodología CyQuant para proliferación celular.	59



Figura 17 Synergy HT Multi-Mode Microplate Reader	59
Figura 18 Esquema experimental en caja de cultivo de 96 pozos	60
Figura 19 Curva de calibración de ADN con respecto al número de células.	62
Figura 20 Concentración de ADN en diferentes medios.....	63
Figura 21 Concentración de ADN en diferentes medios.....	64
Figura 22 Concentración de ADN en diferentes medios dosificación cada 2 días.	65
Figura 23 Concentración de ADN en diferentes medios con diferentes esquemas de dosificación.	66
Figura 24 Variación del ITZXXL del cultivo de células C6 bajo diferentes esquemas de dosificación.....	67
Figura 25 Esquema General de Experimentación en animales modelo.....	77
Figura 26 Evolución volumétrica del tumor.	81
Figura 27 Efecto de agente oxidante sobre contenido de colesterol y triglicéridos totales.....	82
Figura 28 DB-índice plasmático y en eritrocitos.....	84
Figura 29 Variación del ITL de muestras de tejido bajo diferentes esquemas de dosificación	85
Figura 30 Correlación entre el ITL y la cuantificación de hidroperóxidos para muestras de tumor bajo diferentes esquemas de dosificación.....	87
Figura 31 Ejemplo de imagen obtenida por microPET para una dosificación de ozono cada 5 días	88
Figura 33 Correlación entre el ITL de muestras de tumor y la actividad tumoral.....	90
Figura 34 Extracción de lípidos. Método Folch.....	107
Figura 35 Placa de 96 pozos, curva de crecimiento celular.....	110
Figura 36 Cámara de Neubauer.....	111
Figura 37 Ratón atímico desnudo.....	112
Figura 38 Inoculación subdérmica en ratones atímicos desnudos.....	113
Figura 39 Dosificación de ozono disuelto vía intraperitoneal.....	114



Índice de Tablas

Tabla 1.Efectos tóxicos del ozono	4
Tabla 2 Antioxidantes presentes en el cuerpo humano	10
Tabla 3 Valores de ITL para una población europea sana (u.c).....	21
Tabla 4 Valores de ITL para una población mexicana sana (u.c)	21
Tabla 5. Concentraciones de ozono en fase gas y líquida, y las constantes	32
Tabla 6 Efecto del ozono sobre la morfología colonial.....	46
Tabla 7 Efecto de la variación de la concentración de ozono sobre la velocidad de inactivación bacteriana en solución fisiológica de NaCl 0.9%	52
Tabla 9 Contenido del Kit CyQuantCellAssay	109
Tabla 10 Valores de la curva de calibración de ADN.....	109
Tabla 11 Reactivos utilizados para la determinación de Colesterol Total.....	116
Tabla 12 Preparación de soluciones para determinar Colesterol Total.....	116
Tabla 13 Reactivos utilizados para la determinación de Triglicéridos Total	117
Tabla 14 Preparación de soluciones para determinar Triglicéridos Totales	118



Resumen

Los efectos terapéuticos de una gran variedad de sustancias químicas suministradas a los seres humanos han sido aceptados debido a las evidencias clínicas que presentan en grandes poblaciones. En general, dichos efectos son validados a través de modelos estadísticos que no toman en cuenta la respuesta particular de los pacientes. Este tipo de procedimientos son muy utilizados en la industria farmacéutica debido a su simplicidad y a que acelera el proceso de aceptación del producto a nivel comercial.

El ozono ha demostrado tener efectos clínicos bivalentes (positivos y negativos) dependiendo de la vía de administración y la estrategia terapéutica. Lamentablemente, al tratarse de un método emergente de tratamiento de diversas enfermedades, no se ha podido validar su aplicación por los métodos anteriormente mencionados.

A diferencia de la investigación en la aplicación del ozono a nivel industrial, los estudios en el área médica son muy pobres respecto a las interacciones del ozono con las sustancias de origen biológico y sus implicaciones cinéticas (Altman, 1990) (Bocci, 2005). Una de las premisas más importantes en la aplicación de ozono para aspectos médicos tiene que ver con la inducción de una respuesta extraordinaria de los sistemas corporales asociados con la peroxidación de los lípidos y el esquema antioxidante del organismo (Bocci, 2006).

Existen diversas investigaciones que estudian en tratamiento de diversas enfermedades pacientes por medio de la aplicación del ozono, en los cuales se realizan diferentes estudios clínicos para el observar el efecto del ozono sobre la oxigenación de la sangre, y los posibles efectos sobre algunas sustancias orgánicas que actúan como antioxidantes naturales. Sin embargo, la mayoría de los estudios en el área médica, el parámetro principal de investigación es el tiempo de vida de



los pacientes, sin reportar los casos negativos encontrados y/o los posibles efectos secundarios causados por el uso de la mezcla gaseosa.

Así mismo, aún no se tienen resultados científicamente sustentados sobre los efectos del ozono en la cinética de remisión de tumores, además de los procesos biológicos y reacciones bioquímicas, particularmente la cinética de la pPOL, cambios en las fracciones lipídicas (colesterol, éteres de colesterol, ácidos grasos libres, triglicéridos y fosfolípidos) y especies reactivas del oxígeno.

Considerando las ideas anteriores, es necesario realizar estudios cinéticos y el seguimiento de algunos de los posibles compuestos generados por la presencia del ozono en el organismo, mediante el diseño de un análisis químico sobre las muestras biológicas. Este análisis deberá considerar obligatoriamente la complejidad de la muestra y su posible fraccionamiento dependiendo de la composición total para facilitar el estudio, lo cual podría permitir, en un futuro, dilucidar un esquema y cinéticas de reacción global del ozono en el organismo.

De tal forma que, en el presente trabajo se propuso evaluar el efecto del ozono sobre un sustrato biológico (microorganismos, células eucariotas y animales con un padecimiento específico), estudiando las variaciones en la cantidad de Instauración Total de Lípidos (ITL) empleando el método de Índice de Dobles Ligaduras (DBI) y correlacionándolas con las dinámicas de reacción obtenidas por diversos métodos analíticos dependiendo de la etapa de experimentación.



Introducción

Debido a su naturaleza oxidativa, el ozono se utiliza como elemento base de métodos para el tratamiento de agua, suelo y aire contaminado. En dónde existe una gran cantidad de resultados que van desde las cinéticas y esquemas propuestos de descomposición del ozono, del contaminante inicial así como de los subproductos y compuestos finales que involucran dicha reacción.

Sin embargo, el uso del ozono no solo se restringe a aplicaciones industriales y eliminación de contaminantes. Debido a sus propiedades químicas, en las últimas décadas éste gas ha sido aplicado en el área médica para el tratamiento de diversas enfermedades (diabetes, cáncer, enfermedad de Parkinson, artritis entre otras), ya sea de manera directa (inyección o exposición del ozono en fase gas) o indirecta (inyección del ozono disuelto en agua, solución fisiológica o aceites vegetales).

Existen diferentes hipótesis sobre el efecto del ozono en el organismo, sin embargo, éstas se basan en la premisa de que el ozono reacciona con los enlaces de tipo $>C=C<$ que están presentes en los lípidos de cualquier sustrato biológico como el plasma sanguíneo, la membrana celular, lípidos libres en suero etc. Ésta reacción obedece al mecanismo de Criegee, teniendo como principales productos de reacción las llamadas especies reactivas del oxígeno (ROS) como el NO, HClO, O_2 y productos de peroxidación lipídica (pPOL) como el malonidialdehído, 4-hidroxinonenal, isoprostanos entre otros.

De acuerdo a Bocci, 2005., no es el ozono, sino los ROS y los pPOL los elementos responsables de desencadenar una serie de reacciones, las cuales son responsables de los efectos tanto positivos como negativos observados en el organismo. Sin embargo, pese a la gran cantidad de resultados reportados en el área clínica, los resultados publicados sobre el seguimiento de las reacciones que



ocurren como consecuencia de introducir ozono al organismo son poca o nulamente estudiados. Más aún, la posible identificación de compuestos intermediarios que estén involucrados en las respuestas terapéuticas reportadas en el área médica han sido pobremente explorada debido a la complejidad de las reacciones involucradas.

Por lo anterior, es necesario plantear un esquema de experimentación que permita tener un panorama general enfocado en el estudio de las reacciones que el ozono tiene con los compuestos oxidables de un organismo vivo (microorganismos, células y animales con algún tipo de padecimiento).

El objetivo del presente trabajo, es estudiar el efecto del ozono sobre un sustrato biológico por medio de la aplicación de una técnica denominada Índice de Dobles Ligaduras (Double Bond Index-DBI por sus siglas en inglés). Este método permite realizar de manera directa la cuantificación de la Instauración Total de Lípidos (ITL) presentes en la muestra biológica, los cuales son el sustrato que participa en la lipoperoxidación (POL), permitiendo evaluar el primer paso de la reacción del ozono en el organismo, así como su valoración por medio de la correlación de éstos resultados con los obtenidos por medio de técnicas analíticas tradicionales. Mediante ésta técnica, es posible determinar en un corto tiempo (1-3 minutos) y con alta precisión ($\pm 1\%$) la insaturación total de los lípidos en el sustrato biológico.

Para obtener un panorama general de la relación entre la POL y la ITL, la experimentación planteada está dividida en cuatro etapas:

La primera etapa involucra la determinación del tiempo de vida media y la cinética de descomposición del ozono disuelto en agua inyectable y una solución fisiológica salina (NaCl 0.9%) a diferentes concentraciones de ozono en fase gas (4.6, 10, 20 y 30 mg/L). Lo cual servirá como base de la experimentación en las siguientes etapas que involucran el presente trabajo.

La segunda etapa, considera la exposición de microorganismos a ozono bajo diferentes concentraciones en fase gas (4.6, 10, 20 y 30 mg/L) donde se busca entender el efecto que tiene



el ozono sobre la morfología y crecimiento celular, así como la variación en el valor del ITL. Este estudio permitió evaluar la eficiencia de la reacción del ozono como agente bactericida, mostrando un mayor efecto a concentraciones altas de ozono, y al mismo tiempo generó un resultado preliminar sobre el efecto que la reacción con el ozono tiene sobre las membranas de un organismo vivo, observándose la oxidación de los dobles enlaces lipídicos que se encuentran en la membrana, dañando la célula hasta provocar la muerte celular. Cabe mencionar que grado de acción que el ozono tiene sobre la célula depende de la estructura de cada microorganismo.

La tercera etapa utilizó la exposición de un cultivo de células tumorales (C6 glioma de rata) a ozono disuelto en solución fisiológica de NaCl 0.9% con una concentración baja en fase gaseosa (4.6 mg/L). Este tipo de células, a diferencia de las utilizadas en la etapa uno, tienen mayor sensibilidad estructural por lo que el efecto del ozono en su estructura es más intenso. A partir de esta serie de experimentos se evaluó el efecto sobre el crecimiento de la biomasa el cual fue relacionado con el valor de la ITL correlacionándolo con la cuantificación de ADN. De éste análisis se observó que la presencia de oxígeno y ozono incrementa la reproducción de la célula, lo que se traduce en una alta concentración de ADN e ITL, en comparación al grupo control. Al mismo tiempo, al acelerar el metabolismo de la célula, acelera la muerte de la misma por acción de la alta cantidad de oxidantes presentes en el medio. Éstos resultados permitieron fijar una base experimental para la *cuarta etapa* de experimentación que está asociada a la exposición de ozono sobre células tumorales implantadas en un ser vivo.

Finalmente la *cuarta etapa* considera un estudio *in vivo*, en el cual se realizó la implantación de células C6 glioma de rata a un modelo murino, al cual se le dosificó ozono y oxígeno puro disuelto en la solución fisiológica de NaCl 0.9% de forma intraperitoneal, lo cual permitió evaluar las variaciones de ITL causadas por la presencia de ozono en el suero, tejido tumoral y diversos órganos. El efecto del ozono sobre el crecimiento tumoral se evaluó por medio de análisis de imagen por microPET, el cual evalúa la actividad celular dentro del tumor. En todos los casos, se relacionó esta información con la posible identificación de compuestos de la reacción del ozono (ROS y pPOL) con el sustrato biológico.



Capítulo I

Generalidades

I. 1 Propiedades físicas del ozono

El ozono es una molécula gaseosa formada por tres átomos de oxígeno, de color azul cielo con aroma acre fuerte, con un peso molecular de 48 g/mol; tiene una estructura cíclica con una distancia entre átomos de 1.26 Å, presenta una solubilidad de 49mL (en 100mL de agua a 0°C) que es diez veces mayor que la del oxígeno (4.89mL) (Bocci, 2005).

Esta molécula es la tercera sustancia estable más oxidante, después del flúor y el persulfato, lo cual explica su elevada reactividad (McMurry, 2008). El ozono es generado por un proceso exotérmico con la ayuda de un potencial eléctrico, de acuerdo a la siguiente reacción reversible (1):



Las excesivas emisiones de NO, NO₂, CO, CH₄, H₂SO₄, entre otros, han favorecido al aumento en la concentración de ozono en la troposfera por encima de 0.1 ppmv. Debido a su relativa toxicidad, esta concentración no debe rebasar los 0.03 ppmv. La combinación de los anteriores agentes químicos originan el llamado smog foto catalítico, el cual se ha convertido en la principal sustancia tóxica para los pulmones, ojos, nariz y en menor medida la piel (Bocci, 2005). De acuerdo a la concentración de ozono que exista en el aire (Altman, 1990), se presentan los siguientes síntomas (Tabla 1):

Tabla 1.Efectos tóxicos del ozono



Concentración de O ₃ en el aire (mg/L)	Sintomatología
0.1	Irritación en ojos y vías respiratorias
1.0-2.0	Rinitis, tos, jaquecas, náuseas y vómito
2.0-5.0 (10-20 min)	Disnea, espasmos bronquiales,
5.0 (60 min)	Edema pulmonar agudo y ocasionalmente parálisis respiratoria
10.0	Muerte en 4 horas
50.0	Muerte en minutos

La toxicidad de ozono sobre el tracto respiratorio no debe ser extrapolada al sistema circulatorio debido a las diferencias en la bioquímica y el régimen metabólico (Bocci, 2006).

I.2 Áreas de aplicación del ozono

La naturaleza oxidativa del ozono puede atacar a una variedad de virus, bacterias y otras toxinas. Así mismo puede oxidar compuestos fenólicos, pesticidas, detergentes, compuestos aromáticos, entre otros. Por esta razón, el ozono se ha convertido en un elemento de desinfección y purificación del agua para consumo humano y como tratamiento de agua residual (Altman, 1990). En contraparte, el cloro puede producir cloroformo y otros compuestos que son potencialmente carcinógenos como los clorofenoles. Por lo tanto, el ozono es una alternativa eficaz para la eliminación de virus y bacterias presentes en el agua potable y residual. Entre los microorganismos que puede oxidar el ozono se encuentra la *Escherichia coli*, *Streptococcus fecalis*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Bacillus megatherium* y *Endamoeba histolytica* (Altman, 1990).

Dentro de la industria farmacéutica se puede encontrar al ozono como desinfectante y en la elaboración de componentes eléctricos para oxidar las impurezas en las superficies. La concentración de ozono utilizada para inhibir el crecimiento de hongos y bacterias en el procesamiento de leche, pescado y en los mataderos dentro la industria alimenticia es de 1-3 mg/L. Así mismo, el ozono remueve malos olores provenientes de sustancias tóxicas en las aguas



de desecho, de plantas de tratamiento, molinos de papel, operaciones de composta, estaciones del metro, túneles y minas (Altman, 1990).

I.3 Ozono en medicina

En el año de 1857, Werner Siemens construyó el primer generador de ozono que se utilizó para investigar el efecto del gas sobre microorganismos patógenos (Altman, 1990) (Bocci, 2005). Durante la Primera Guerra Mundial (1911-1914), el Dr. Albert Wolf comenzó en Alemania a realizar curaciones con ozono, empleándolo como antiséptico. Posteriormente en 1932, el cirujano dentista E.A. Fisch lo utilizó para el tratamiento de úlceras e infecciones bucales. En 1935 el Dr. E. Payr señaló el efecto cicatrizante del ozono y en 1936 el Dr. Albourg propone el uso de una mezcla oxígeno/ozono insuflado por vía rectal para el tratamiento de fistulas y colitis ulcerativa (Altman, 1990) (Bocci, 2005).

Por otro lado, en 1950 Joachim Haensler fabricó el primer generador de ozono médico con posibilidades de dosificar y graduar las concentraciones de la mezcla. De esta manera, comenzó la aplicación de ozono en el área médica (Altman, 1990).

De acuerdo con la Sociedad Medica Europea de Ozono y con el Centro Nacional de Investigación Científica en Cuba, se pueden tratar las siguientes enfermedades con ozono: abscesos, acné, SIDA, alergias, fisuras anales, artritis, asma, tumores cancerígenos, esclerosis cerebral, problemas en el sistema circulatorio, cirrosis hepática, úlceras en cornea, cistitis, diarrea, fistulas, forúnculos, gangrena, úlceras gástricas, desordenes intestinales, glaucoma, hepatitis, herpes, hipercolesterinemia, colitis, micosis, osteomielitis, enfermedad de Parkinson, retinitis pigmentosa, artritis reumatoide, en el proceso de cicatrización, sinusitis, tromboflebitis, entre otras (Altman, 1990).

A diferencia de la investigación en la aplicación del ozono a nivel industrial, los estudios en el área médica son muy pobres respecto a las interacciones del ozono con las sustancias de origen biológico y sus implicaciones cinéticas (Altman, 1990) (Bocci, 2005). Una de las premisas más



importantes en la aplicación de ozono para aspectos médicos tiene que ver con la inducción de una respuesta extraordinaria de los sistemas corporales asociados con la peroxidación de los lípidos y el esquema antioxidante del organismo (Bocci, 2006).

Si bien, se sospecha que el efecto oxidativo del ozono provoca diferentes efectos en el sistema inmune, los sistemas simpático y parasimpático entre otros, es bien sabido que la presencia de compuestos derivados de las reacciones de oxidación en el cuerpo, producen una cascada de reacciones bioquímicas que no están claramente explicadas. Esta condición se presenta en muchos eventos que comprometen la salud del ser humano, tales como heridas profundas, aparición de neoplasias, etc. Sin embargo, no se sabe a ciencia cierta cuál es el mecanismo de reacción por el cual se presenta la cascada de reacciones bioquímicas (Bocci, 2006).

Si bien es aceptado que el ozono produce un número importante de beneficios en el cuerpo humano debido a que se presenta disuelto en oxígeno, aumenta la oxigenación de la sangre, mejora la circulación, estimula la oxigenación en los tejidos, etc. (Altman, 1990) (Bocci, 2005), no se ha establecido cual es el mecanismo que genera tan importantes ventajas desde el punto de vista clínico.

I.4 Como actúa el ozono y como se puede evitar su toxicidad

A pesar de que el oxígeno es fundamental para la vida, este gas tiene efectos negativos a largo plazo, ya que durante la respiración celular se forman especies reactivas del oxígeno (ROS), de los cuales, los radicales hidroxilos (OH⁻) son de los compuestos más destructivos para las enzimas y el ácido desoxirribonucleico (ADN). El proceso de envejecimiento y desordenes metabólicos (arterioesclerosis, diabetes, degeneración celular, etc.) pueden ser empeorados por la presencia de las ROS, viéndose agravado por la presencia del ozono empleado como terapia médica. Este proceso se puede prevenir si se tienen los métodos de control adecuados en la dosificación del ozono, sin importar la técnica de aplicación que se utilice (Bocci, 2005).



Por otra parte, el ozono se disuelve en el agua, plasma, fluidos extracelulares, mucosa del tracto respiratorio, alimenticio, vaginal, etc. Sin embargo en la mezcla O_3-O_2 , el oxígeno que no está en equilibrio con el ozono, debido a que el ozono reacciona inmediatamente con un número determinado de moléculas presentes en los fluidos biológicos, principalmente antioxidantes, proteínas, carbohidratos y específicamente con ácidos grasos poliinsaturados (PUFA's) (Bocci, 2005).

El orden, velocidad y secuencia de tales reacciones es hasta ahora poco conocido y ha sido descrito de forma muy somera por diversos autores (Bocci, 2006) (Hernandez, 2007) (Hunt, 1997) (Jensen, 2003). Aun cuando existen elementos significativos de los efectos en ciertas sustancias a largo plazo, no queda claro cómo se presenta el estado transitorio de reacciones de descomposición de los sustratos iniciales, la posterior formación de subproductos que pueden ser los responsables de los efectos clínicos y finalmente la acumulación de productos finales que podrían ser los responsables de algunos de los efectos secundarios tan indeseables de las terapias basadas en ozono.

Es aceptado que las principales reacciones del ozono con estas moléculas de origen biológico se presentan de acuerdo a las siguientes etapas (Bocci, 2005):

1. El ozono reacciona con el ácido ascórbico, ácido úrico, los grupos sulfhídrido (SH-) de las proteínas y glicoproteínas generando las ROS, la cual desencadena diversas etapas bioquímicas en la sangre ex vivo. Los ROS son neutralizados 0.5 – 1 min después por los antioxidantes del sistema.
2. El ozono reacciona con las dobles ligaduras ($>C=C<$) del ácido araquidónico y triglicéridos presentes en el plasma, lo que produce una molécula de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y dos moléculas de aldehído conocidos como productos de peroxidación de lípidos (pPOL).

De lo anterior se puede decir que no es el ozono, sino las ROS y los pPOL los responsables de las múltiples reacciones bioquímicas que ocurren en las células del cuerpo. En particular, la



segunda reacción en la que se involucran los efectos terapéuticos (Figura 1). Entonces, el estudio de la formación de subproductos de la reacción del ozono repercutirá en el entendimiento de los efectos clínicos pero más aún en la elección de los esquemas de aplicación de este gas como medicamento.

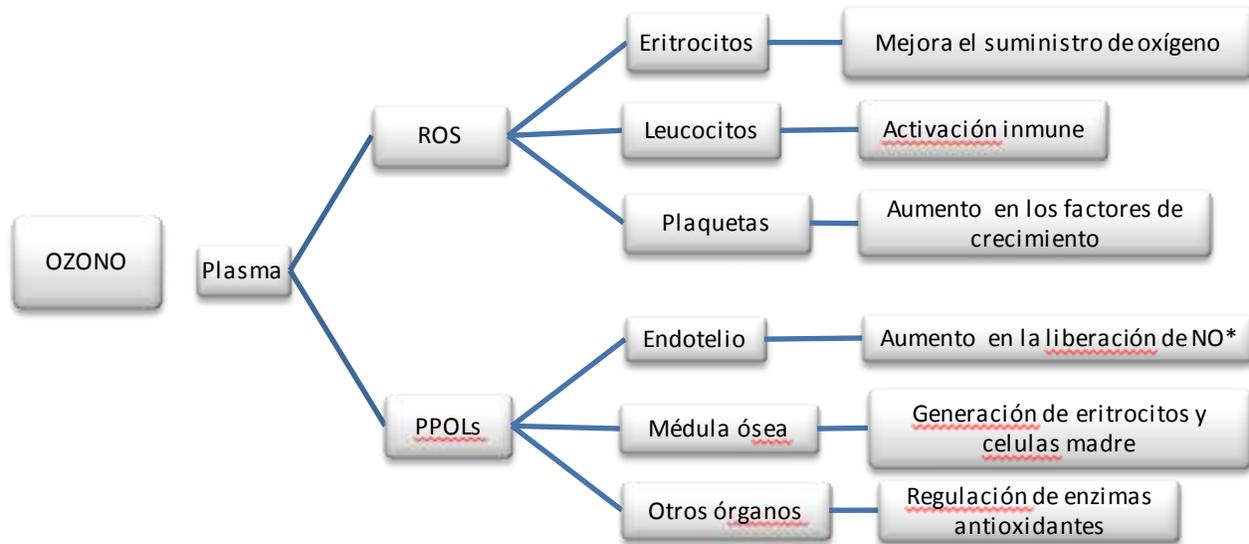


Figura 1 Efectos fisiológicos (biológicos) de la presencia de oxígeno-ozono en la sangre

Las ROS incluyen a los aniones superóxidos ($O_2^{\bullet-}$), óxido de nitrógeno (NO^*), peroxinitrito ($O=NNOO^-$), radicales hidróxido (OH^*), peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y ácido hipocloroso ($HClO$) entre otros. Todos estos compuestos son potencialmente citotóxicos, afortunadamente su tiempo de vida media es una fracción de segundo. Además, el plasma y las células producen antioxidantes capaces de neutralizarlos, siempre y cuando la concentración en la que se encuentren no sobrepase la capacidad antioxidante en el cuerpo humano (Tabla 2) (Bocci, 2005).



Tabla 2 Antioxidantes presentes en el cuerpo humano

No Enzimáticas			Enzimáticas
Hidrosolubles	Liposolubles	Proteínas quelantes	
Ácido úrico, ácido ascórbico, glucosa, cisteína, taurina, triptófano, histidina, metionina, GSH, proteínas plasmáticas	Vitamina E, vitamina A, caroteoides, coenzima Q, ácido α -lipoico, bilirrubina, melatonina, bioflavonoides, licopeno	Transferrina, ferritina, lactoferrina, albumina	Superoxidismutasa (SOD) Catalasa Glutación peroxidasa Glutación sistema redox

Los pPOL son generados después de la peroxidación de una gran variedad de PUFA's, cuyos principales productos de la reacción son los aldehídos como el malondialdehído (MDA), alquenos como el 4-hidoxi-2,3 transnonenal (4-HNE), el cual es uno de los compuestos producidos con mayor toxicidad y cuya velocidad de formación es desconocida.

Tan pronto como el ozono se disuelve en los fluidos biológicos, éste reacciona con los PUFA's, entonces la concentración de peróxido de hidrógeno aumenta. Sin embargo, con la misma rapidez comienza a disminuir debido a que la molécula se difunde rápidamente hacia los eritrocitos, leucocitos y plaquetas, mientras se desarrollan diversos procesos bioquímicos (Bocci, 2005). Debido a la presencia de enzimas como el glutatión peroxidasa (GSH-Px) y el glutatión (GSH), la concentración intracelular del peróxido de hidrógeno se reduce dentro del plasma y el líquido intracelular.

Los pPOL se han estudiado a nivel laboratorio con cultivos de tejido o bien dentro del sistema respiratorio, encontrándose que son tóxicos incluso a concentraciones de 1 μ M. Sin embargo, concentraciones de 0.01-0.5 μ M pueden estimular diversas actividades bioquímicas en las células (Bocci, 2005). Los pPOL pueden llegar a cualquier órgano particularmente a la médula ósea, en donde se obtiene la adaptación al estrés oxidativo, el cual se refiere al desbalance entre la generación de las ROS y la actividad antioxidante del organismo. Este es uno de los parámetros



indirectos que podrían ser utilizados para generar un modelo básico de entendimiento de las reacciones del ozono en presencia de sustratos de origen biológico.

La actividad de los pPOL bajo terapias prolongadas, puede originar la regulación de enzimas antioxidantes, la aparición de proteínas oxidativas y la liberación de las células madre, las cuales presentan un factor crucial que explica algunos efectos presentes en la aplicación de ozono como terapia médica (Bocci, 2005).

I.5 Vías de aplicación de ozono

Las indicaciones terapéuticas del ozono se basan en la teoría de que a bajas concentraciones de ozono (en fase gas) pueden ocurrir importantes fenómenos dentro de la célula. Se ha probado que a concentraciones de 5-10 mg/L o menores en fase gaseosa, se tienen efectos terapéuticos con un amplio margen de seguridad para el paciente. En la actualidad, se aceptan concentraciones que van de los 5 – 60 mg/L para la aplicación médica del ozono (AEPROMO, 2010).

La aplicación directa de ozono por vía intravenosa e intra-arterial ha sido prohibida desde 1984. Aunque el gas se inyecta muy lentamente, se favorece la formación de un tren de burbujas de gas, en donde el ozono se disuelve y reacciona con la sangre (ya que es más soluble que el oxígeno), el cual a su vez puede llegar hasta la circulación pulmonar y causar efectos adversos (Bocci, 2005). Lo mismo sucede con la ruta de inhalación, la cual está prohibida debido al efecto tóxico que ejerce sobre la tráquea, bronquios y pulmones, debido a que se han reportado muertes por embolia pulmonar,

Debe considerarse que si aceptamos que el efecto positivo del ozono se debe a la dinámica de sus subproductos generados a partir de las moléculas biológicas, se puede pensar en producir estos *in situ* dentro del organismos, lo que eventualmente podría producir un mejor efecto pero a la vez representa más riesgo o bien producirlos artificialmente en un medio controlado para



posteriormente inyectarlos por algún medio, lo cual aumenta la seguridad de la terapia pero puede disminuir su eficiencia como medicamento.

A continuación se presenta un breve resumen de las condiciones que son utilizadas en los dos tipos de tratamiento, conocidos como directos e indirectos, respectivamente.

I.6 Métodos Directos.

1.6.1 Insuflación Rectal

La mezcla de gases es introducida a través del recto y absorbida por el cuerpo por medio de los intestinos. Esta técnica es usada para tratar una amplia variedad de problemas de salud, y es considerado uno de los métodos más seguros. La reacción del ozono se da entonces con las sustancias presentes en el intestino grueso que en general son compuestos con un alto número de insaturaciones. Se desconoce el mecanismo bajo el cual el organismo es capaz de detectar la presencia de los compuestos derivados de la ozonación y sobre su señalización en función de su concentración (Bocci, 2005) (Altman, 1990).

1.6.2 Inyección intramuscular

En esta técnica, 10 mL de la mezcla gaseosa son inyectados al paciente en los glúteos. Este método es comúnmente usado para el tratamiento de alergias e inflamaciones (Bocci, 2005) (Altman, 1990). En este punto, la reacción del ozono se lleva a cabo con los biopolímeros que dan forma y función al músculo así como al espacio intercelular. Dichas reacciones se han caracterizado en forma general con los dobles enlaces conocidos de estos compuestos pero se desconocen las condiciones cinéticas de dicha reacción.



1.6.3 Auto hemoterapia mayor y menor

Esta técnica es usada desde 1960. La auto hemoterapia menor requiere un volumen de sangre de 10 mL aproximadamente, la cual es tratada con la mezcla gaseosa, y posteriormente regresada al paciente por medio de una inyección intramuscular. La auto-hemoterapia mayor requiere de un volumen de sangre de 50-100 mL. La mezcla de gases es entonces puesta en contacto con la sangre por algunos minutos y posteriormente la sangre es re-introducida al paciente (Altman, 1990) (Bocci, 2006) (AEPROMO, 2010).

Este tipo de tratamiento implica una reacción mucho más difícil de describir si se considera la presencia de un gran número de compuestos con diversas velocidades de reacción y con diferente relación estequiométrica en relación al ozono.

1.6.4 Bolsa de ozono

La bolsa de plástico es colocada alrededor del área a ser tratada. La mezcla gaseosa es bombeada dentro de la bolsa y es absorbida por el cuerpo a través de la piel (Bocci, 2005) (Altman, 1990). Este es uno de los pocos modelos de tratamiento donde la reacción se presenta en dos etapas, una de absorción por el tejido y una segunda de reacción directa de estos compuestos con el ozono. Este proceso requiere incluso una descripción combinada de un esquema de transferencia de masa y de la reacción cinética con el biosustrato, el cual no será considerado en este trabajo.

I.7 Métodos indirectos

1.7.1 Agua ozonada

El agua ozonada se utiliza para lavar heridas de manera externa, así como quemaduras e infecciones en la piel (Bocci, 2005) (Altman, 1990).



En esta técnica, la reacción ocurre también de forma directa con el ozono pero con una forma de transferencia de masa simplificada comparada con el caso anterior debido a la previa solubilización del gas en el agua. Un aspecto que no ha sido descrito a detalle en este esquema es la concentración de ozono que debe haber en el agua para poder regular la formación de radicales libres.

1.7.2 Inyección intra articular

El agua ozonada es inyectada directamente entre las articulaciones, es usado principalmente en Alemania, Rusia y Cuba para el tratamiento de artritis y reumatismo (Bocci, 2005) (Altman, 1990). La presencia de ligamentos y tendones formados principalmente por biopolímeros de alta densidad da lugar a reacciones con los múltiples sitios de insaturación presentes en estos compuestos.

Si bien el efecto clínico de desinflamación se puede entender desde el punto de vista fisicoquímico, no se ha establecido cuáles son los efectos generados por la acumulación de derivados de los biopolímeros con menos insaturaciones.

1.7.3 Aceite ozonado

El aceite es ozonado es aplicado como un ungüento bajo tiempos prolongados con bajas dosis de ozono (Bocci, 2005) (Altman, 1990).

Este es tal vez el método de aplicación con más resultados analíticos preliminares que han permitido esclarecer el mecanismo bajo el cual se inducen dos procesos simultáneos, la cicatrización y la eliminación de las células productoras de las infecciones. En este caso, la determinación de grupos peróxidos, ozónidos y algunos otros derivados de la reacción de ozono con sustancias orgánicas ha sido primordial para mejorar el entendimiento de los posibles mecanismos que rigen el resto de los métodos de aplicación.



I.8 Ventajas y desventajas del ozono en el área médica (efectos secundarios)

El hecho de que en el área médica se considere al ozono como una sustancia altamente tóxica y nociva para la salud, se debe a que es comparado con el efecto que causan las ROS en el organismo. Sin embargo, la formación natural de las ROS se lleva a cabo a nivel mitocondrial, en donde produce daño en el ADN. Inclusive, el daño causado por los ROS es 10 veces mayor en el ADN nuclear; mientras que en el caso del ozono éste solo actúa sobre el plasma, en donde se encuentra una gran cantidad de antioxidantes (Bocci, 2005). Todas estas reacciones se presentan a velocidades de reacción particulares que podrían ser empleadas para regular la forma de aplicación del ozono sin producir daños masivos a las células.

El uso de ozono puede llegar a ser perjudicial a la salud bajo las siguientes condiciones:

- Pacientes con deficiencia de glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (G-6PD), en la cual los glóbulos rojos se descomponen cuando el cuerpo humano se expone a ciertos fármacos o al estrés de una infección.
- Mujeres en estado de embarazo, particularmente en los primeros meses.
- Personas con hipertiroidismo, trombocitopenia e inestabilidad cardio-vascular.
- Alergia al ozono, pacientes con hipersensibilidad asmática.

Debido a lo anterior, la dosificación del ozono como terapia médica debe ser controlada, de tal manera, que la concentración de los antioxidantes presentes en los tejidos y fluidos corporales no se vea rebasada para evitar problemas de toxicidad y mutagenicidad por parte del ozono (Bocci, 2005).

Esta frase que parece evidente representa un problema de proporciones importantes cuando se considera que no se conocen los mecanismos que pueden producir los efectos adversos antes mencionados.



Es por esto que en las últimas décadas se han investigado los aspectos generales que describan de forma simple la eficiencia con la que el ozono es aplicado para tratar alguna afección con la plena seguridad de no producir un daño mayor al beneficio esperado.

I.9 Estrés oxidativo

El radical libre es una especie química que contiene un número impar de electrones y, por lo tanto, tiene al menos un electrón sin aparear en uno de sus orbitales (McMurry, 2008). Una vez que se han formado los radicales, estos pueden reaccionar con otros o con otras moléculas por diferentes mecanismos. La velocidad y la selectividad de estos tipos de reacciones dependen de la concentración de los radicales, la deslocalización del electrón del radical y de la ausencia de enlaces débiles en alguna otra molécula presente con la cual el radical puede interactuar (Cadogan, 1973) (Okezie, 1998) (Jensen, 2003) (Hernandez, 2007)

Existen radicales libres de gran importancia para los organismos vivos, estos incluyen a los radicales hidroxilo (OH^*) cuyo tiempo de vida es aproximadamente 10^{-9} s (Jensen, 2003), superóxido (O_2^{*-}), óxido nítrico (NO^*) y los radicales peróxido (RO_2^*). El peroxinitrito (ONOO^-), ácido hipocloroso (HOCl), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), oxígeno singlete ($^1\text{O}_2$) y el ozono (O_3) no son radicales libres, pero pueden fácilmente inducir reacciones de radicales libres en el organismo. El término “especies reactivas del oxígeno” (ROS) es usado para incluir no solo a los radicales sino también a los no radicales (Okezie, 1998) (Jensen, 2003) (Simos, 2011) (Hernandez, 2007) pero que eventualmente pueden facilitar la formación de los primeros.

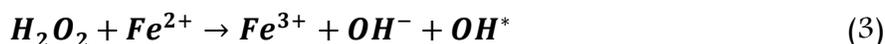
En trabajos recientes, se han descrito los mecanismos por los cuáles algunas ROS reaccionan con otros compuestos que han sido preparados artificialmente. A continuación se presentan algunas de estas reacciones que son consideradas las más representativas, dado que muchas de ellas deberán estar presentes como parte de los mecanismos de reacción que el ozono tiene con los sustratos de origen biológico.



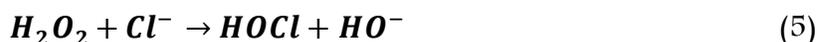
El estrés oxidativo severo causa daño celular y/o la muerte de la misma y ha sido implicado en numerosas enfermedades en el ser humano (Okezie, 1998) (Valko, 2006) (Rosales, 2007). La mayoría de las ROS se originan como subproductos del metabolismo aerobio en la mitocondria. El anión O_2^- es producido en el interior de la membrana de la mitocondria como parte de su mecanismo. El anión superóxido es la base correspondiente al hidroperóxido, HO_2 ($pK_a=4.9$). El anión superóxido puede reaccionar de acuerdo a ecuación (2) (Jensen, 2003) (Sorg, 2004):



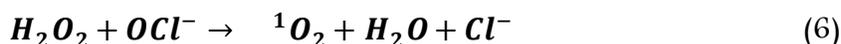
Puede producirse una gran cantidad de radicales hidroxilo a través de la reacción Fenton, en donde se requiere un metal de transición está disponible en la reacción (lo que no es extraño en muchos tejidos de origen biológico) según las ecuaciones (3) y (4).



Por otro lado, el peróxido de hidrógeno puede producir otra especie reactiva del oxígeno como el ácido hipocloroso, $HOCl$ ($pK_a=7.53$) por oxidación enzimática de los iones cloro, ecuación (5).



El ácido hipocloroso puede originar el oxígeno singulete 1O_2 .



o el radical hidroxilo de acuerdo a la reacción (7):



El peróxido de hidrógeno puede oxidar al ion bicarbonato a hidrógeno peroxicarbonato (8):

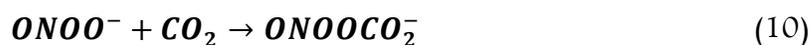




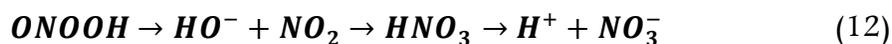
La reacción más representativa del NO es con el radical O_2^- (9):



Cuando dos radicales reaccionan, el producto será un spin en estado singulete o un spin en estado triple. El peroxinitrito puede reaccionar con CO_2 para formar nitrosoperoxicarbonato de acuerdo al siguiente mecanismo de reacción (10) y (11):



El ácido correspondiente al peroxinitrito es el ácido peroxinitroso $ONOOH$ (pKa= 6.8), el cual provoca la homólisis de los radicales OH y del NO_2 , los cuales subsecuentemente se recombinan en ácido nítrico (12):



La mayor cantidad de especies reactivas son los radicales hidroxilos. Se ha estimado que más de la mitad del daño infringido por los radicales libres es atribuido a los radicales hidroxilos, ya que estos pueden iniciar la lipoperoxidación por la extracción del hidrógeno del ácido graso insaturado (XH) (13-16):



Otro tipo de reacciones que involucran a los radicales hidroxilos es la hidroxilación, la oxidación y la ruptura de proteínas y ácidos nucleicos. Las especies reactivas del nitrógeno pueden inducir



a la nitración, nitrosación y deaminación de las bases nitrogenadas. Algunos otros oxidantes presentan cierto tipo de selectividad al tipo de biomolécula con el cual reaccionarán.

En los organismos vivos, existe en forma natural un equilibrio entre las reacciones de formación de radicales libres y de la generación de antioxidantes. Los antioxidantes pueden ser enzimáticos o no enzimáticos. El principio químico bajo el cual se encuentran estos compuestos es que reaccionan con el oxidante antes (con una constante de velocidad mayor) de que reaccione con las biomoléculas. Además de esto, los antioxidantes no enzimáticos tienen la función de secuestrar metales de transición, por lo que se reduce la reacción tipo Fenton en el organismo (Jensen, 2003) (Sorg, 2004).

Los radicales libres y otras ROS tienen funciones específicas dentro del organismo. Por ejemplo, el NO es importante en la regulación de la presión sanguínea así como un mensajero neuronal y el HOCl combate infecciones microbianas.

El sistema nervioso central es particularmente susceptible al estrés oxidativo, esto se debe a diversos factores, entre los cuales se encuentran (Jensen, 2003):

- El cerebro presenta un elevado consumo de oxígeno y tiene bajos niveles de antioxidantes endógenos.
- Existe una elevada concentración de ácidos grasos poliinsaturados.
- Es relativamente rico en Fe^{2+} promoviendo la reacción Fenton.
- El daño oxidativo es peor debido a que las neuronas no son auto regenerables.

El proceso de envejecimiento también se ha ligado al estrés oxidativo. La teoría de los radicales libres se basa en la hipótesis de que los antioxidantes endógenos no suprimen completamente los oxidantes los cuales presentan efectos acumulativos de daño oxidativo. Esto desencadena mutaciones del ADN mitocondrial resultando en la reducción de la funcionalidad de la célula y su eventual muerte (Harman, 1957) (Ames, 1993)



I. 10 Métodos de medición del estrés oxidativo

El principal mecanismo de acción del ozono como terapia es a través de un transitorio y regulado estrés oxidativo. Se han desarrollado diversos métodos para monitorear el estrés oxidativo *in vivo*, tales como (Okezie, 1998) (Pryor, 1991):

- Cuantificación directa de especies reactivas por Resonancia Electrónica de spin.
- Determinación de antioxidantes: glutatión reducido, glutatiónperoxidasa, superoxidodismutasa, catalasa.
- Determinación de prooxidantes: dienos conjugados, sustancias reactivas ácido tiobarbiturico, hidroperóxido totales, grupos carbonilos.
- Actividad total de antioxidantes: la cual caracteriza el nivel de la capacidad antioxidante de todo el organismo tomando en cuenta las defensas enzimáticas y no enzimáticas.
- Actividad total de pro-oxidante total: indica el nivel de actividad oxidativa al cual las células están sometidas, a partir de la consideración de la oxidación en lípidos y proteínas.
- El índice Redox: el cual representa el valor numérico del vector resultante de la comparación de los indicadores anteriores.
- Grado de estrés oxidativo: indica el nivel de estrés oxidativo patológico, el cual va desde grado 0 hasta 4.
- Detección de marcadores biológicos oxidados: entre los biomarcadores se pueden encontrar: productos de lipoperoxidación (malondialdehído, 4-hidroxinonenal), oxidación de proteínas (carbonilos e hidroxilos) y medición de daño en ADN (HPLC, CG).

La medición de los niveles de lipoperoxidación, así como de sus subproductos, son usados de forma rutinaria como índices de estrés oxidativo; sin embargo, hasta ahora los métodos analíticos empleados en la determinación de la lipoperoxidación presentan limitaciones asociadas a la sensibilidad, especificidad y tiempo total de análisis (Poznyak, 2001).



I. 10.1 Métodos de control en la aplicación del ozono en el área médica (estrés oxidativo – DB-Index)

El Índice de Dobles Ligaduras (DBI-Index) es un método que determina la insaturación total de los lípidos (ITL) de los fragmentos insaturados totales en el plasma y membrana celular (ITL_p, ITL_{cel}), en periodos cortos de tiempo (1-3 min) y con alta precisión ($\pm 1\%$), en el cual se evalúa la perturbación del metabolismo y la peroxidación de los lípidos (POL) cuyos fundamentos fueron desarrollados por científicos a mitad del siglo pasado (Brajnikov E.M., 1979) (Arhipoy A.YU, 2006) (Sergeev V.M., 1989).

La ITL está relacionada con los niveles de estrés oxidativo, ya que los lípidos involucrados en su determinación corresponden al sustrato restante que no está afectado por el estrés oxidativo. Los valores de ITL no dependen de la edad y sexo de la persona; sin embargo, se ven alterados cuando existe algún padecimiento clínico (Poznyak, 1996) (Turkina T.I, 1991) (Poznyak T., 2002) (Kogarco I.N., 1991) (S.L, 1997) (Poznyak T. I., 1997) (Poznyak, 2001). A continuación se muestran los valores de la ITL para una población europea sana y para una población mexicana sana (Tabla 3 y Tabla 4)

Tabla 3 Valores de ITL para una población europea sana (u.c)

ITL _{plasma}	ITL _{células}		
250 \pm 10	Eritrocitos 50 \pm 2	Linfocitos 60 \pm 2	Leucocitos 70 \pm 3

Tabla 4 Valores de ITL para una población mexicana sana (u.c)

ITL _{plasma}	ITL _{células}
160 \pm 10	Eritrocitos 100 \pm 2

Si bien esta técnica no determina el tipo de enfermedad, si puede ser utilizada como un indicador simple de la evolución de la misma incluso en condiciones subclínicas. Es evidente la influencia del estrés oxidativo en ciertos estados patológicos, especialmente en enfermedades crónicas. La



determinación del DB-índice brinda una metodología para un análisis clínico ofreciendo múltiples posibilidades en el control de los tratamientos terapéuticos. Así como una estrategia de individualización de las dosis de acuerdo a la patología.

Más allá de las implicaciones clínicas que éste método puede tener, es un indicador generalizado de los sitios reactivos de las moléculas que son susceptibles de interactuar con el ozono. Un aspecto aún más importante radica en que este índice es obtenido al evaluar la masa de ozono consumida durante un período específico de tiempo cuando este gas entra en contacto con un grupo de moléculas. Dicha estrategia experimental permite incluso evaluar de manera indirecta y en forma global la velocidad de reacción relativa que el grupo de compuestos tiene con el ozono. Se debe notar que estas condiciones lo convierten en un excelente método para describir de manera simplificada la cinética de la reacción antes mencionada.

La determinación del DB-Index en realidad coincide (bajo ciertas simplicidades) en alguna de sus etapas, con la determinación del llamado ozonograma que determina el consumo de ozono en la reacción con un sustrato biológico. Este esquema ha sido ampliamente utilizado para desarrollar modelos cinéticos basados en ecuaciones diferenciales ordinarias que han podido ser explotados en la determinación de parámetros cinéticos o bien para la determinación por algoritmos indirectos de la concentración de compuestos que no pueden medirse directamente por algún método analítico o bien cuya determinación es extremadamente difícil o costosa.

Cabe mencionar que si bien los estudios que describen la forma en la que el ozono reacciona con compuestos químicos de estructura simple son abundantes, sin embargo aquellos que involucran la reacción con sustratos biológicos no han sido ampliamente estudiados. Más aún, la forma en la que se han explicado estas reacciones no ha generado propuestas de esquemas de reacción.

Más allá de las dificultades que el estudio del ozono y sus reacciones con compuestos biológicos tienen, se debe considerar la importancia que el concepto de interacción célula-ozono tiene para el entendimiento y proposición de un posible mecanismo que explique todos los conceptos anteriormente discutidos.



Por tal motivo, este trabajo propone establecer un método de control basado en la determinación directa de la insaturación total de lípidos (ITL) en una muestra biológica (células eucariotas, procariotas, plasma y muestras de tejido). Específicamente se estudiará la insaturación total de los lípidos, ya que de acuerdo a la teoría, el ozono reacciona en primera instancia con estos compuestos, por lo cual, se puede estandarizar los niveles de la ITL de un grupo control y de esta manera, observar las variaciones cuando se presenta algún tipo de padecimiento. Además se controlará la dosis adecuada de ozono de acuerdo al valor del ITL.

Justamente, este trabajo considera el desarrollar un esquema metodológico que permita generar un avance en el entendimiento de las reacciones que se presentan entre el ozono y algunos de los elementos que se encuentran presentes en las mezclas de compuestos de origen biológico. Dicho esquema de experimentación estará enfocado a la generación de modelos de reacción que puedan utilizar la propia dinámica de los compuestos involucrados en la reacción o bien la información que represente indirectamente la variación de concentración de los compuestos antes mencionados. Dicha información puede venir de diversas fuentes incluyendo, cantidad de ADN en microorganismos puestos en contacto con ozono, cuenta viable de las mismas células, cambio morfológico de células animales, actividad tumoral por técnicas de imagenología, etc.

De ésta forma, la clase de modelos que podrán ser generados a partir del conjunto de datos anteriormente detallado darán lugar al cálculo de constantes de velocidad de reacción generalizadas que podrán ser utilizadas para caracterizar la reacción de ozono con los sustratos biológicos considerados. Más aún, el desarrollo de estos modelos que potencialmente podrían tener mayor interés de tipo clínico, permitirían eventualmente producir modelos de control para la aplicación de terapias basadas en ozono.

Por tal motivo, en el presente trabajo, se decidió llevar a cabo una planeación experimental dividida en cuatro etapas (Figura 2). En la primera de ellas se determinó la cinética de descomposición y el tiempo de vida media del ozono en medios acuosos. En la segunda etapa se realizó el cultivo de dos especies de microorganismos donde se estudiaron sus cambios



morfológicos después de la exposición al ozono disuelto. Estos estudios se realizaron a diferentes concentraciones de ozono en fase gaseosa. Obteniéndose resultados preliminares que asocian los cambios en el comportamiento de crecimiento y desarrollo de las células vivas a las diferentes dosis de ozono.

En una tercera etapa, se realizó el cultivo de células animales de rápido desarrollo (células tumorales C6). Estas células fueron expuestas a diferentes concentraciones de ozono disuelto en solución fisiológica. A través de estos resultados experimentales, se determinó el efecto en el comportamiento de la proliferación celular por la presencia de ozono u oxígeno disuelto asociado a su dosificación.

La cuarta etapa consideró la implantación de tumores en un modelo murino. Esta elección metodológica fue utilizada para observar los efectos que el metabolismo celular de un organismo vivo tiene en la cinética de las reacciones de ozonación de mezclas de compuestos de origen biológico.

De esta forma, se pudo delimitar el efecto de la aplicación de ozono a diferentes dosis sobre la cinética de desarrollo de un grupo particular de células que puede ser cuantificado de manera no invasiva. En particular, se utilizaron células de cáncer debido a que es posible utilizar técnicas de imagenología para evaluar su comportamiento externamente sin afectar la integridad de los especímenes utilizados. En este caso se consideró el análisis de la morfología del tumor, la degradación celular, la cinética de la variación en la biomasa, la ITL, antioxidantes y especies reactivas de oxígeno durante la aplicación del ozono.

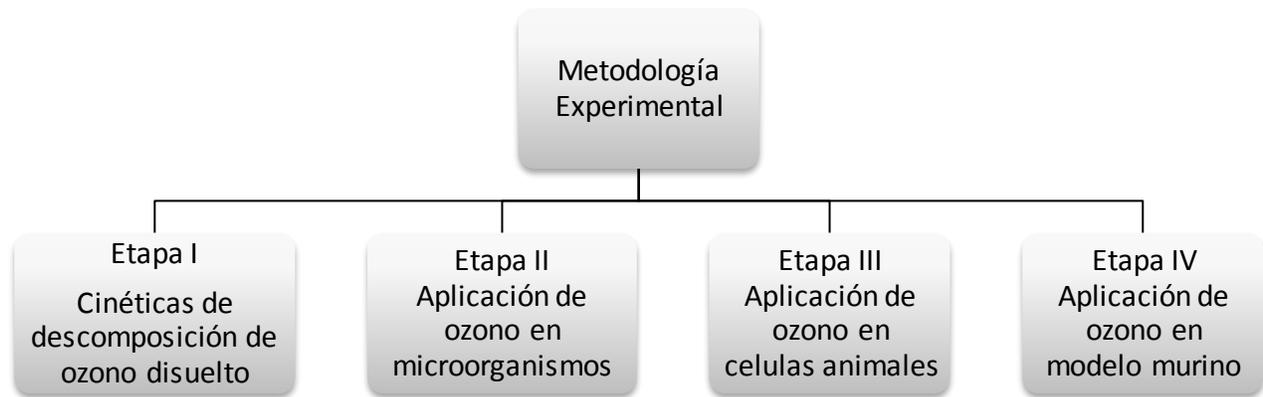


Figura 2. Descripción resumida de las etapas de la metodología experimental.

Así mismo, se utilizarán grupos de control, en los cuales se realizaran los mismos análisis pero en presencia de oxígeno puro. Esta información puede ser utilizada para determinar el efecto del oxígeno solo y en combinación con el ozono, dadas las características oxidativas que ambos tienen.

Esta planeación experimental permitirá analizar de manera individual el efecto del ozono sobre organismos *in vitro* e *in vivo*, y obtener una correlación entre la pPOL y la ITL dependiendo del grado de estrés oxidativo al que estén expuestos los sistemas de forma individual.

Por tal motivo, el presente trabajo muestra los resultados de manera gradual, ya que representa la base experimental para las etapas consecutivas.



Capítulo II

Ozono disuelto en medio líquido

Esta etapa se basa en el estudio de la cinética de descomposición del ozono en soluciones isotónicas que contienen iones cloro, ya que es de gran interés debido a sus aplicaciones prácticas, como agente antiséptico y desinfectante en procedimientos quirúrgicos. Sin embargo, se debe estudiar las interacciones del ozono con los iones cloro, ya que se pueden formar compuestos tóxicos, que pueden comprometer la integridad de ciertos compuestos vivos (Ershov, 2009) (Razumovskii, 2010). Así mismo, es de gran importancia saber el tiempo de vida media del ozono disuelto en el medio acuoso dependiendo de su concentración en fase gas, ya que esto permitirá saber el tiempo disponible para aplicar el ozono disuelto con una concentración adecuada para llevar a cabo el efecto deseado.

Metodología

II.1.1 Proceso de ozonación

La Figura 3 muestra el esquema a nivel de laboratorio del proceso de ozonación, en el cual a partir de una corriente de oxígeno extra seco y por medio de un generador de ozono (AZCO) tipo corona de descarga en concentraciones de 10, 20 y 30 mg/L con un flujo de 0.5 mL/min. Por otro lado, con un generador de ozono tipo UV (Instapura) se obtuvo una concentración de ozono 4.6 mg/L. El proceso de ozonación se llevó a cabo en un reactor de vidrio semi-continuo de 25 mL de capacidad, con un volumen de muestra de 20 mL.



Las mediciones de concentración de O_3 en la fase gaseosa a la salida del reactor se realizaron mediante un analizador de O_3 BMT-930 conectado a una computadora personal, obteniéndose una curva de concentración de ozono como función del tiempo, conocida como ozonograma.

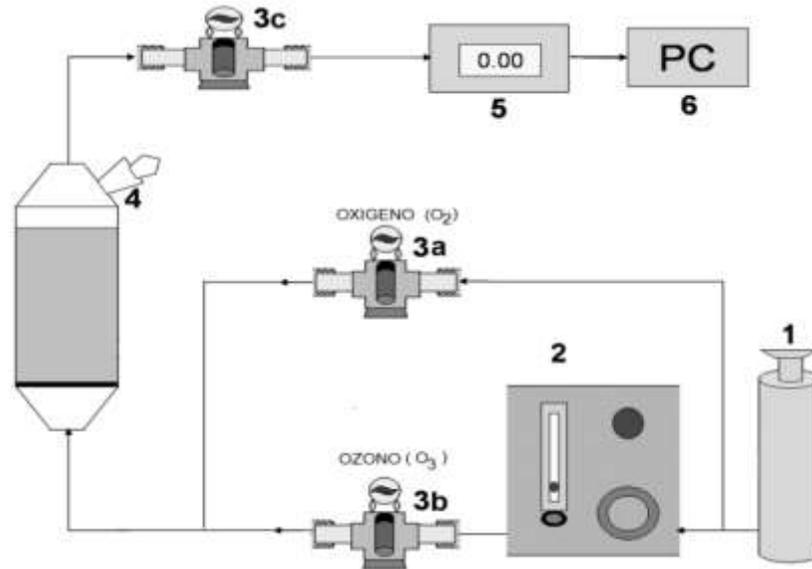


Figura 3 Diagrama del proceso de ozonación, (1) Tanque de oxígeno, (2) Generador de ozono, (3) Sistema de válvulas, (4) Reactor, (5) Analizador de ozono, (6) Sistema de adquisición de datos y PC.

II. 1.2 Medición de ozono en fase líquida

La solución fue ozonada hasta su saturación total, es decir hasta aquel punto en donde la diferencia entre la concentración de ozono de entrada y salida fue menor a 2 %. Mediante un medidor espectrofotométrico, se midió la concentración de ozono en la fase líquida empleando un sensor ODS- LEPSE (0-10 mg/L) que se presenta en la Figura 4. La solución se colocó en una celda de cuarzo de 3.5 mL con una longitud de paso óptico de 1 cm. Las mediciones se obtuvieron a una longitud de onda de 254 nm que corresponde con la longitud donde mayor absorbancia de ozono se ha reportado ($\epsilon=1830$ mL/cm mol). Con esta información, se monitoreó la concentración de ozono disuelto (mg/L, de acuerdo a la ley de Henry) con respecto al tiempo empleando medios ópticos simples.



Figura 4 Sensor de ozono disuelto (ODS-LEPSE)

Resultados

II.2.1 Dinámicas de ozonación de la fase líquida

El primer paso en la determinación de la cinética de reacción del ozono y los medios líquidos está delimitado por su dinámica de transferencia de ozono en dichos medios, los cuales servirán como medio de disolución y de administración. De forma regular, esta dinámica es inicialmente evaluada a través de la medición de la concentración de ozono a la salida del reactor como función del tiempo o mejor conocido como ozonograma.

La Figura 5 muestra el ozonograma obtenido para la solución fisiológica de NaCl (0.9%) y agua inyectable. Existe una diferencia entre el ozono necesario para saturar el volumen de ambos líquidos. Dado que el NaCl es el único compuesto diferente entre ambas soluciones, esta variación en el consumo de ozono se debe solo a la presencia de la sal en la solución fisiológica. En publicaciones recientes se ha demostrado que la presencia de dicho compuesto tiene un efecto de descomposición sobre el ozono que es notorio en las dinámicas mostradas en la Figura 6. Esto es importante, ya que se pueden formar algunos compuestos de la familia de las especies



reactivas del oxígeno que podría tener un efecto distinto sobre los compuestos oxidables que se presenten en los sustratos biológicos.

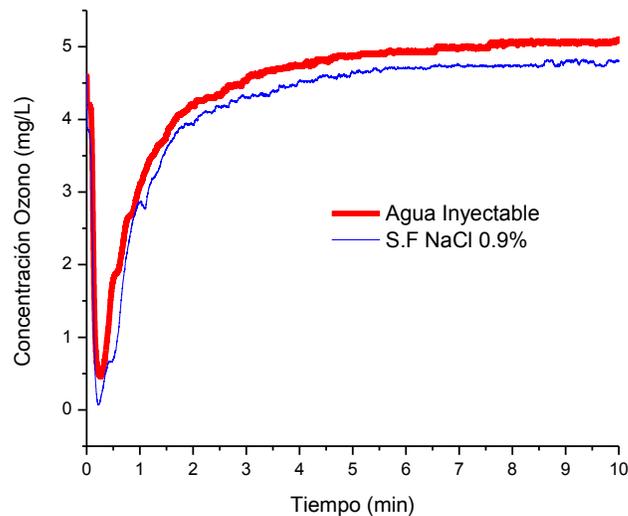


Figura 5. Ozonograma de agua inyectable y solución fisiológica (NaCl 0.9%) con una concentración de ozono de 4.6 mg/L en fase gaseosa.

Incluso, se ha demostrado que este consumo adicional de ozono en el caso de solución fisiológica puede explicarse de acuerdo a las reacciones establecidas recientemente por Razumovskii (2010). Si bien, en el mencionado artículo existen algunas suposiciones sobre la formación de algunas especies reactivas del oxígeno cuya existencia no ha sido demostrada, el mecanismo propuesto parece plausible dadas las diferencias observadas entre el consumo de ozono cuando se presenta el NaCl. Una vez que se obtuvo la saturación total de ozono en ambas soluciones, se determinó la concentración de ozono disuelto en ambos medios líquidos.

II.2.2 Estudio cinético de descomposición de ozono disuelto

Para obtener estas velocidades se debió realizar la medición de la concentración de ozono disuelto a través del tiempo (10 s). La Figura 6a y b muestran las dinámicas de descomposición del ozono en fase líquida para la solución fisiológica y agua inyectable, respectivamente. Se



observó que el tiempo de vida media del ozono disuelto es directamente proporcional con la concentración de ozono en fase gaseosa. La presencia del NaCl produce un aumento en la velocidad de descomposición de ozono. Esto es incluso más claro cuando la concentración inicial de ozono en fase líquida es mayor.

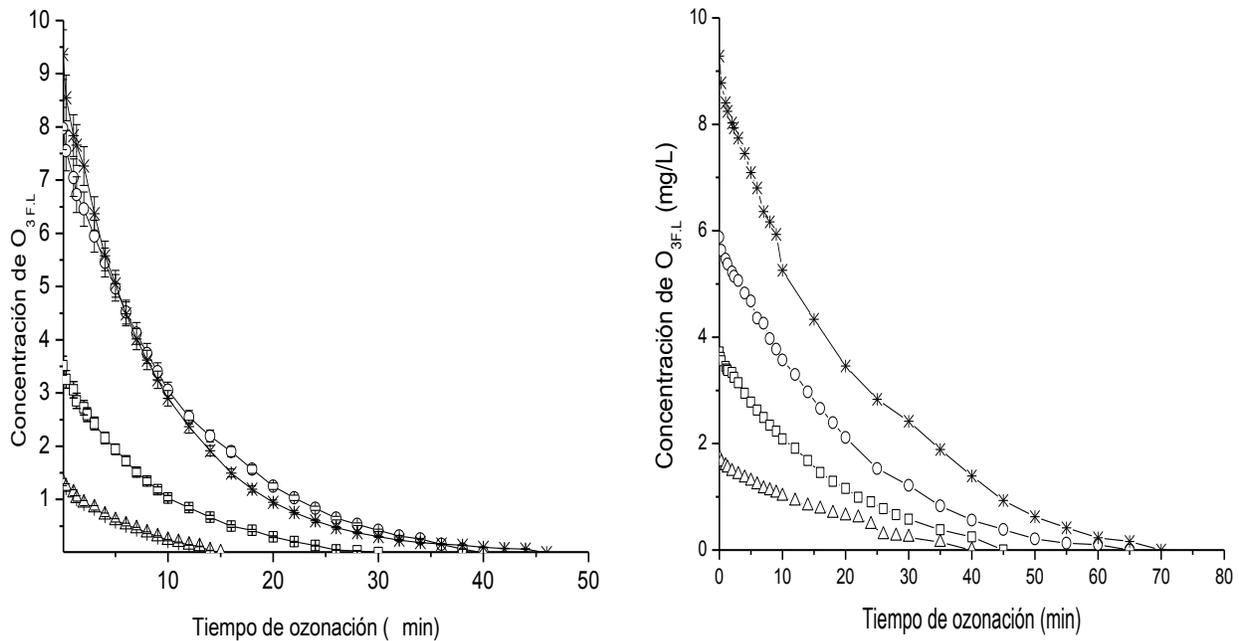
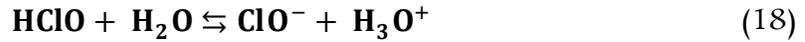
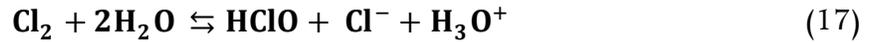


Figura 6. Dinámica de descomposición del ozono disuelto bajo diferentes concentraciones de ozono en fase gaseosa: solución fisiológica de NaCl 0.9% (a), agua inyectable (b) [Concentración de ozono Δ - 4.6 mg/L; \square - 11 mg/L; \circ - 20 mg/L; $*$ - 30 mg/L]

De lo anterior se desprende que el tiempo de vida media del ozono dentro de la solución fisiológica fue ligeramente menor en todos los sistemas (de un 10 a un 20 % en los intervalos de tiempo medidos). Como ya se ha descrito, esto se debe al efecto que el NaCl en el medio tiene sobre la molécula de ozono. De hecho se ha demostrado que al disociarse la sal, el ión cloro actúa como secuestrador del ozono, retardando su velocidad de descomposición. Bajo condiciones normales de pH (7.2) en solución acuosa, el cloro formado de la ionización de la sal, se puede encontrar como ácido hipocloroso o hipoclorito de acuerdo a la siguiente reacción:



Por lo tanto, el consumo adicional del ozono en caso de la reacción con solución fisiológica puede explicarse de acuerdo a la siguiente reacción (Langlais, 2006):



En donde, se ha reportado (Langlais, 2006) que la vida media del cloro en presencia de 1 mg/L de ozono es de 15 minutos, aproximadamente.

La Tabla 5 muestra los resultados de las mediciones de concentración de ozono en fase gaseosa y líquida obtenida para ambas muestras. Cabe mencionar que la concentración de ozono en fase líquida se determinó a partir de la concentración en fase gas utilizando la ley de Henry (para las condiciones de la reacción se utilizó la constante de 0.25 – 0.3). Es claro que según esta condición, se debe asumir estado estacionario en la reacción, lo cual no dista mucho de las condiciones observadas en el reactor ya que la descomposición de ozono se llevó a cabo sin agitación en la fase líquida.

Al aplicar este principio de estado estacionario, los resultados obtenidos por esquemas experimentales coinciden con los predichos por las condiciones teóricas. Así mismo, se obtuvo la constante de descomposición del ozono en fase líquida de acuerdo al siguiente modelo (19).

$$C_{\text{O}_3(t)} = C_{\text{O}_3(i)} e^{(-b*t)} \quad (19)$$

Donde:

$C_{\text{O}_3(t)}$ es la concentración de ozono determinada en cada instante de tiempo (mg/L).

$C_{\text{O}_3(i)}$ es la concentración inicial de ozono producida por el proceso de saturación (mg/L).

" b " corresponde con la velocidad de descomposición.



La aplicación de un modelo de mínimos cuadrados no lineales genera la determinación de las constantes de velocidad de descomposición que se muestran en la Tabla 5. De estos resultados se puede estimar que el tiempo de la descomposición del ozono en la fase líquida no depende de la concentración de ozono en la fase gas, lo cual es importante ya que refrenda la suposición de que todo el proceso de ozonación se lleva a cabo en régimen cinético.

Tabla 5. Concentraciones de ozono en fase gas y líquida, y las constantes de descomposición en fase líquida.

$C_{O_3\text{ F.G}}$ (mg/L)	$C_{O_3\text{ FL SF}}$ NaCl 0.9%(mg/L)	Tiempo de vida del ozono en SF NaCl 0.9% (min)	k (min^{-1})	$C_{O_3\text{ FL en}}$ AI (mg/L)	Tiempo de vida del ozono en AI(min)	k (min^{-1})
4.6	1.324	15	2.89	1.702	40	1.79
10	3.446	30	2.83	3.703	45	2.12
20	7.812	40	2.95	5.885	60	2.38
30	8.984	45	3.03	8.954	70	2.18

Un aspecto que si influye claramente en la determinación de la constante de descomposición de ozono es el tiempo de permanencia del ozono en el medio líquido, que en el caso de la concentración de 4.6 mg/L de ozono en fase gaseosa es de 10 – 15 min mientras que bajo la concentración de ozono de 30 mg/L fue de 45 min para la solución fisiológica. Sin embargo, la variación es tan poco significativa (menos del 5%) que nuevamente se obtiene una confirmación del régimen cinético en el reactor.

Las constantes de descomposición del ozono demuestran que en agua inyectable su descomposición es más lenta en comparación a la solución fisiológica. Como ya se ha mencionado, esto ha sido confirmado por Razumovskii (2010), que establece como la presencia de la sal en la solución fisiológica produce un efecto significativo en el aumento de la velocidad de descomposición del ozono.



En estas condiciones no habría posibilidad de incrementar la velocidad de descomposición de ozono dado que no existen elementos adicionales en la solución fisiológica que induzcan este comportamiento. De acuerdo a esta condición, se puede controlar en forma general la concentración de la ROS presentes en el medio.

Conclusiones

De acuerdo a los resultados obtenidos, se pudo observar que a mayor concentración de ozono en fase gas, mayor tiempo de residencia tiene éste dentro del medio líquido en el cuál se encuentra disuelto. Esto se ve representado en las constantes cinéticas obtenidas para cada sistema, en las que se puede observar que tanto la concentración de ozono como el medio donde se encuentra disuelto el gas tienen un papel importante sobre éste parámetro. En éste sentido, se observó una descomposición de ozono mayor en el sistema con solución fisiológica de NaCl, ya que puede formar diversos compuestos de la disociación de la sal con el ozono, formando una especie de ROS.

Por lo tanto, la saturación del medio y la correspondiente formación de ROS en el caso de la solución fisiológica NaCl 0.9% permiten tener una fuente de agentes oxidantes dependientes del ozono que se puede colocar en contacto con sustratos biológicos que serán representados por los tipos de células antes mencionados. Dado que el proceso cinético de la reacción entre las especies oxidantes y las células depende tanto del proceso que regula el contacto del ozono con las especies oxidables de las células, así como de la velocidad de reacción entre estos con las mismas ROS y el O₃ disuelto, se evaluarán diferentes formas de aplicación que evidencien estas diferencias.

Una vez que se obtuvieron las cinéticas de descomposición del ozono disuelto, y el tiempo de vida media del ozono disuelto en la solución isotónica, se procedió a realizar la planeación



experimental de las etapas consecutivas, las cuales involucran la interacción entre el ozono y diferentes organismos vivos.



Capítulo III

Determinación del Índice de Dobles Ligaduras (DBI)

El análisis de la ITL se realiza básicamente sobre los dobles enlaces de las moléculas de lípidos debido a que estos compuestos reaccionan de manera importante, si se considera la velocidad de reacción evaluada para estos compuestos de forma individual.

Las muestras de sustrato biológico se sometieron a un pre tratamiento para la extracción de los lípidos de acuerdo al método Folch (Anexo II), el cual ha sido modificado para este estudio. Las muestras se pusieron en contacto con 0.4 mL de CHCl_3 , posteriormente se adicionan 0.2 mL de CH_3OH y finalmente se agregan 0.4 mL de agua. La fase orgánica obtenida es usada para la determinación de la ITL.

La Figura 7 muestra el esquema de un prototipo para la determinación de la ITL. En él se inyectó un flujo de 0.1 L/min de oxígeno extra seco a un generador tipo UV, del cual se obtuvo una concentración de ozono en fase gaseosa de 6.4 ± 0.2 mg/L. La mezcla de gases resultante se introduce en la parte inferior del micro reactor (5 mL), el cual contiene un volumen de 4mL de CCl_4 , (el cual es inerte al ozono), y su función es de medio de difusión o transporte. El extracto de lípidos en cloroformo se inyectan en la parte superior del micro-reactor (10–50 μL), el ozono en fase gas que no reacciona con los lípidos es medido en un sensor de ozono en fase gas (BMT), obteniéndose una gráfica de variación de la concentración de ozono en fase gas con respecto al tiempo (ozonograma).

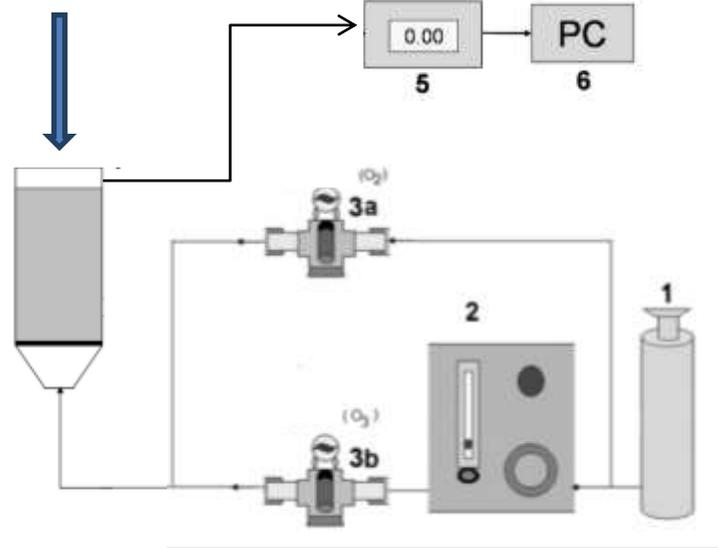


Figura 7. Esquema de un prototipo para el análisis de ITL. (1) Tanque de oxígeno extra seco, (2) Generador de ozono UV, (3) Sistema de válvulas, (4) Reactor de vidrio, (5) Detector de ozono, (6) Tarjeta de adquisición de datos y PC

De acuerdo con este método, a partir del ozonograma y por medio de una integración, se puede estimar el área bajo la curva. El ITL es calculado de acuerdo a la siguiente ecuación (17):

$$\text{ITL}_M = \frac{C_{st} V_{st} S_s V_{sol}}{S_{st} V_s W_m} \quad (20)$$

En donde:

- C_{st} es la concentración de la solución estándar (mol/mL),
- V_{st} y V_s son los volúmenes de inyección del estándar y la muestra a analizar respectivamente (mL),
- S_{st} , S_s son las áreas de los ozonogramas del estándar y la muestra (c.u),
- V_{sol} es el volumen de la solución de la muestra a analizar (mL)
- W_m es el peso del microorganismo (g).

En donde el estándar es una solución de estilbena con una concentración de $5 \cdot 10^{-5}$ mol/L. El volumen utilizado son 10 μ L, el cual se utiliza también para realizar las calibraciones del método (Poznyak, 2008).



La Figura 8 presenta relación que existe entre el área bajo la curva del ozonograma, que se traduce en el consumo de ozono y el número de moléculas de estilbeno presentes en una solución estándar. Mostrándose que en realidad existe una relación directa entre estas dos variables. Lo cual puede confirmar la sensibilidad y exactitud del método de determinación de la ITL. Esto quiere decir, que a mayor número de insaturaciones mayor será el consumo de ozono, que a su vez incrementará el valor de la ITL.

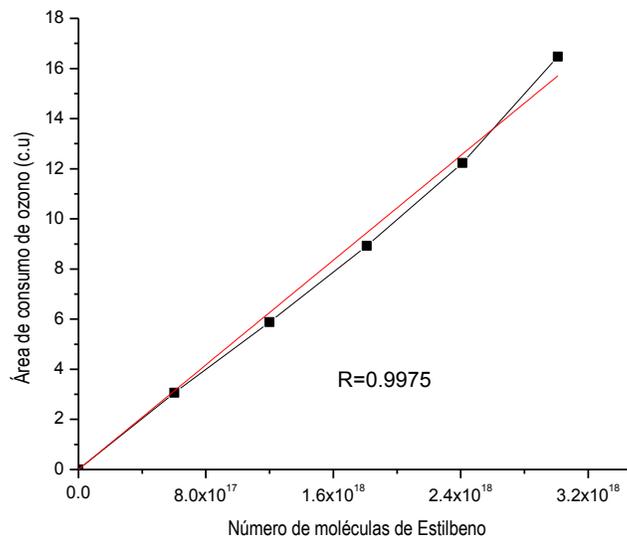


Figura 8 Relación entre el consumo del ozono y el número de moléculas de Estilbeno



Capítulo IV

Exposición de microorganismos a ozono

Debido a su potencial de oxidación, el ozono es un eficaz agente antiséptico, efectivo contra bacterias, hongos, virus, protozoos y esporas (Khadre, 2001) (Selma, 2008). El ozono o las especies reactivas formadas durante su auto descomposición destruyen a los microorganismos por la oxidación progresiva de los componentes vitales de la célula (Hunt, 1997), siendo el principal objetivo la membrana celular. En las bacterias gram negativas, las capas lipoproteicas y lipopolisacáridas son los primeros sitios de reacción (Kim, 1999). Algunos autores han reportado que éste tipo de bacterias son sustancialmente más sensibles al ataque del ozono disuelto en agua pura que las bacterias gram positivas (Restaino, 1995) (Chiang, 2009).

La eficacia del ozono es mayor cuando los microorganismos están suspendidos en agua pura o en soluciones buffer comparado con los tratados en sistemas más complejos como en la industria alimenticia (Khadre, 2001) (Selcuk, 2005) (Monje-Ramirez, 2004). Cuando los microorganismos se ponen en contacto con el agente desinfectante, su resistencia resulta en la fase Lag, en la cual presentan respuesta activa, de tal forma que la duración de ésta fase depende de la concentración de ozono utilizada (Ntampou, 2006) (Dow, 2006). Posterior a la fase Lag, sigue un decaimiento que puede ser modelada como una reacción de pseudo primer orden (Dow, 2006) (Driedger, 2001) (Larson, 2003). Éste tipo de modelamiento matemático pueden dar información sobre la dinámica de ozonación en fase acuosa, el efecto de la concentración de ozono en la desinfección y el tiempo de contacto entre el microorganismo y el agente oxidante. Sin embargo, estas herramientas no permiten llevar a cabo una estimación de la concentración de microorganismos resistentes al ataque del ozono.



Usualmente, la inactivación de microorganismos es determinada por una serie de experimentos en donde los microorganismos resistentes a la oxidación son inoculados en medio de cultivo fresco, llevándose a cabo un conteo directo de las colonias desarrolladas en un medio sólido o la biomasa en un medio líquido.

Con base a los resultados obtenidos en el Capítulo II, el objetivo de esta etapa es evaluar el efecto del ozono disuelto en soluciones fisiológicas sobre el crecimiento de dos bacterias: *Escherichia coli* y *Pseudomona aeruginosa*. La eficiencia de inactivación fue evaluada por medio de la medición de la ITL y comparada con la cantidad de unidades formadoras de colonias presentes (UFC) en el medio. Para ellos, la experimentación se dividió en tres etapas:

1. Usando agar BHI (Brain and Heart Infusion) como medio de crecimiento bacteriano y dosificando ozono disuelto sobre la superficie de cada colonia formada.
2. Usando una solución glucosada (5%) como medio de crecimiento bacteriano, exponiéndolo a ozono disuelto (concentración constante) en diferentes soluciones fisiológicas. Aquí se evaluó el efecto de la solución en la que se encuentra disuelto el ozono sobre el crecimiento de las células.
3. Usando una solución glucosada (5%) como medio de crecimiento bacteriano, exponiéndolo a ozono disuelto en una solución salina (NaCl 0.9%) a diferentes concentraciones de ozono en fase gas. En esta etapa se evaluó la concentración de ozono sobre el crecimiento de las células.

En cada uno de los sistemas, se realizará una prueba control con oxígeno puro, para observar el efecto que tiene este gas por sí mismo sobre el crecimiento bacteriano. Así mismo, se obtendrá un modelo de inactivación bacteriana para cada microorganismo por medio de los valores obtenidos del conteo de la ITL y CFU.



Metodología

II.1.1 Material microbiológico

Se seleccionaron dos microorganismos para evaluar el efecto que tiene un estrés oxidativo inducido por la presencia del ozono, sobre el crecimiento celular, para ello las cepas de *Escherichia coli* and *Pseudomona aeuroginosa* fueron obtenidas del laboratorio de microbiología de la Facultad de Estudios Superiores Campus Cuautitlan, México. Las cepas fueron mantenidas a 37°C en agar BHI.

II.1.2 Soluciones utilizadas para disolver el ozono

Se presentan tres tipos de medio líquido en el cual el ozono se encontrará disuelto, estas soluciones fisiológicas se seleccionaron de acuerdo a los siguientes criterios:

- Solución fisiológica glucosada. Debido que se manejó como medio de crecimiento de las bacterias, se utilizó como blanco.
- Solución fisiológica de NaCl 0.9%. Ésta permite mantener la presión osmótica entre el medio extracelular y el intracelular.
- Solución fisiológica de NaCl/Glucosa. Permitirá observar si hay algún efecto de la sal y el ozono sobre la glucosa, lo cual pudiera provocar algún efecto sobre la bacteria.
- Agua Inyectable. Se utilizó como blanco, ya que las soluciones fisiológicas están hechas con base agua inyectable.

II.1.3 Microorganismos en agar BHI

Ambas bacterias fueron cultivadas en agar BHI a 37°C en condiciones asépticas. Después de 24 horas de incubación, 20 µL de ozono disuelto en una solución fisiológica de NaCl 0.9% y agua inyectable como blanco, las cuales fueron dosificados en cada cepa (Figura 9) cada 30 minutos durante 12 horas, la concentración de ozono en fase gas fueron 30 ± 0.2 mg/L. Cada 30 minutos



se obtuvieron muestras para determinar la ITL, ya que en éste experimento se utilizó un medio de crecimiento sólido fue imposible llevar a cabo la cuantificación de UFC.



Figura 9 Cultivo de bacterias en agar BHI

II.1.4 Microorganismos en suspensión solución fisiológica glucosada a concentración de ozono constante

Los microorganismos fueron cultivados en una solución glucosada (5%) por 24 horas a 37°C. La Figura 10 muestra el esquema de experimentación para ésta prueba, en el cual muestras de éste cultivo fueron tomadas y mezcladas con volúmenes específicos de diferentes soluciones ozonadas: solución glucosa 5%/ NaCl 0.9%, solución fisiológica de NaCl 0.9% y agua inyectable. La concentración de ozono permaneció constante a 30 ± 0.2 mg/L en fase gas, la relación de disolución del medio de cultivo y la solución ozonada fue 1.1. Este esquema de experimentación permitirá evaluar el efecto que tiene la solución en la que se encuentra disuelto el ozono sobre la oxidación del sustrato biológico.

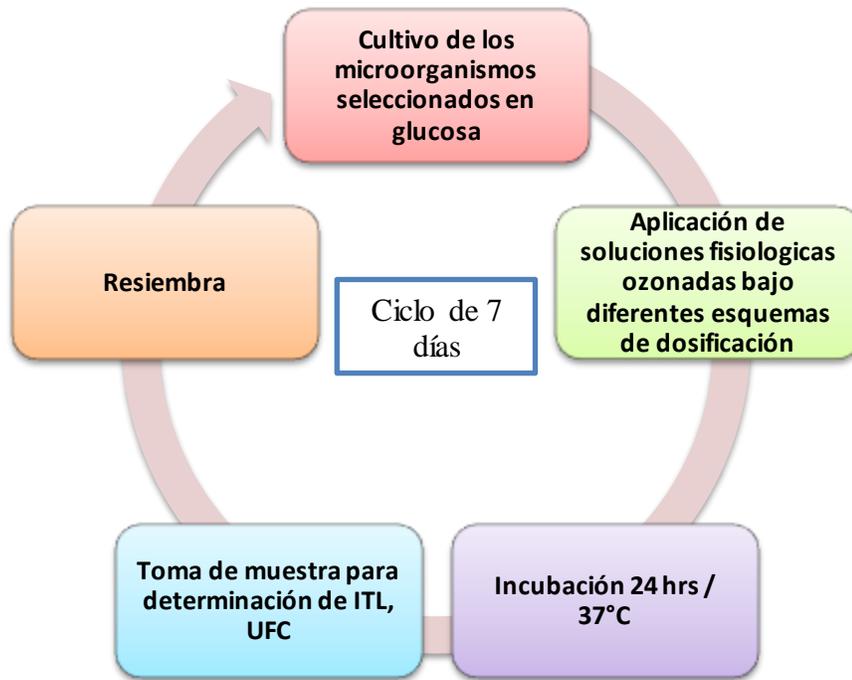


Figura 10 Esquema general de experimentación para cultivo de bacterias en solución glucosada

II.1.5 Microorganismos en suspensión solución fisiológica glucosada a concentración de ozono variable

Los microorganismos fueron cultivados en una solución glucosada (5%) por 24 horas a 37°C. Muestras de éste cultivo fueron tomadas y mezcladas con volúmenes específicos de diferentes soluciones ozonadas solución fisiológica de NaCl 0.9% y agua inyectable como blanco, de acuerdo a la Figura 10. La concentración de ozono fue 4.6, 10, 20 y 30 ± 0.2 mg/L en fase gas. la relación de disolución del medio de cultivo y la solución ozonada fue 1:1. Este esquema de experimentación permitirá evaluar el efecto que tiene la concentración de ozono sobre la oxidación del sustrato biológico.

Una vez que las muestras de microorganismos fueron expuestas al ozono, se realizó un seguimiento del crecimiento celular para observar el efecto de la exposición en la acumulación de células (biomasa). Cabe notar que el proceso de toma de alícuotas y exposición al ozono se



realizó cada 24 horas. Adicionalmente, cada día se tomaron muestras de 1 mL de cada experimento, para realizar los siguientes análisis:

- Resiembra de microorganismos por placa invertida para observar el crecimiento bacteriano en función a los días de aplicación del ozono disuelto.
- Análisis de ITL (Se describe la siguiente sección).

En este procedimiento, se buscó establecer la relación del medio utilizado para diluir el ozono con el crecimiento de biomasa. En esta parte de la experimentación, se consideró definir la relación de la ITL con la biomasa en función del diluyente del ozono y de su concentración en fase gas.

II. 1.6 Cuantificación de UFC en agar por análisis de imagen

El análisis de los resultados de UFC es importante debido a que en ellos se basa la determinación de la eficiencia de inactivación que tiene el ozono disuelto sobre los microorganismos. La cuantificación de UFC en la resiembra en agar fue hecha por medio de la implementación de un algoritmo de procesamiento de imagen (API) (Couri, 2006) (Garófano, 2005).

El esquema de API usa la siguiente secuencia:

1. Captura de imágenes en escala de grises con una resolución de 640*480 pixeles
2. Redimensionamiento de la imagen para reducir el efecto focal de la cámara
3. Eliminar el fondo de la imagen, removiendo las zonas en las que no se encuentran colonias en el agar.
4. Filtrar y sustraer la imagen para eliminar ruido y perturbaciones.
5. Realizar un ajuste por histograma para recuperar el contraste de la imagen después de ser filtrado.
6. Binarización de la imagen para recolectar la información de las células



7. Segmentación de la imagen basada en umbralización automática para recuperar solo la región de interés que contiene las células.
8. Cuantificación del área en la región recuperada de interés después del API. Ésta área es proporcional a las UFC

La aplicación del API requiere la implementación de un hardware para homogeneizar el proceso de captura de imagen. El sistema consiste en un contenedor negro para que la cámara remueva el efecto de la luz externa. El método fue calibrado con muestras no ozonadas donde las UFC estaban bien definidas.

Resultados

II.2.1 Determinación de la cinética de crecimiento bacteriano en agar BHI por medio de ITL

En ésta etapa de experimentación, debido a que el ozono fue dosificado directamente sobre las cepas, no fue posible hacer directamente la cuantificación de las UFC. Por lo que, las dinámicas de crecimiento bacteriano se obtuvieron directamente con la determinación de la ITL. Esto se realizó tomando una muestra de las células desarrolladas en el agar y homogeneizadas con relación al peso. Las constantes de crecimiento (en la fase Lag) también fueron obtenidas. En la Figura 11 se muestra el efecto del ozono y oxígeno disuelto en solución fisiológica NaCl 0.9% y agua inyectable sobre el crecimiento bacteriano.

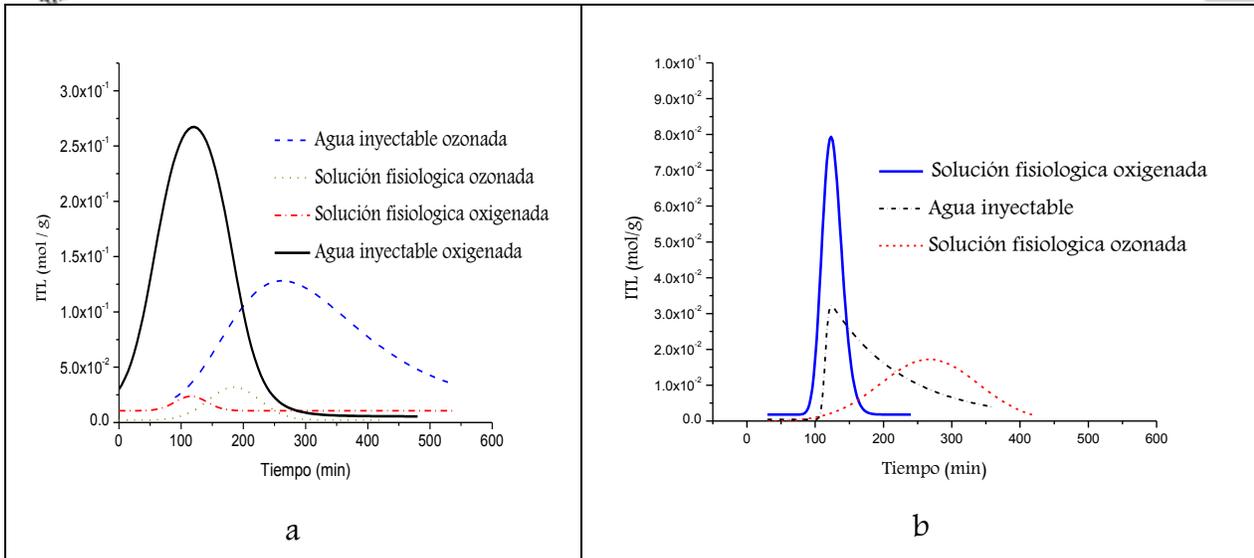


Figura 11 Variación de la ITL con respecto al tipo de solución y agente oxidante: *Escherichia coli* (a) y *Pseudomonas aeruginosa* (b)

Para ambas bacterias la dinámica de crecimiento fue mayor en presencia de puro oxígeno a los 120 min., esto puede deberse a que ésta bacteria tiene un metabolismo aerobio, por lo que la presencia del oxígeno promueve la reproducción celular, causando que la fase de crecimiento tenga una mayor disponibilidad de sustrato oxidable, reflejado en los valores del ITL. Al mismo tiempo, ésta condición acelera la muerte celular provocando una disminución del ITL. Posterior a los 120 minutos, el valor de ésta variable disminuyó de manera considerable debido a que la cantidad de elementos oxidantes es mayor comparada con la cantidad de dobles enlaces remanentes en las células activas.

Para ambas bacterias, los sistemas que involucran al NaCl muestran una menor acumulación de biomasa comparado con los otros sistemas. Esto puede ser una consecuencia de un efecto mezclado de agentes oxidantes (ozono y oxígeno) además de la presencia del ión cloro (Razumovskii, 2010). En este caso, el crecimiento celular fue inhibido por la presencia de todos éstos oxidantes originando la inactivación en el crecimiento de los microorganismos.



Como se puede observar, en todos los sistemas *Escherichia coli* presentó una mayor resistencia al ataque del agente oxidante, lo cual se ve reflejado en los valores del ITL comparados con la respuesta de la *Pseudomona aeuroginosa*. Esto puede deberse a la naturaleza propia de los microorganismos y su comportamiento en presencia a los agentes oxidantes.

Dado que las evaluaciones de las cinéticas se realizaron con métodos complementarios, la Tabla 6 solo sirve para tener una idea general de los cambios macroscópicos que las células sufren por el efecto de la aplicación de las soluciones ozonadas. Aun cuando los cambios se evalúan de forma subjetiva, ya se puede implicar una diferencia entre las observaciones realizadas con la presencia de agua inyectable ozonada y de la solución fisiológica ozonada.

Tabla 6 Efecto del ozono sobre la morfología colonial

	Antes del tratamiento con ozono		Después del tratamiento con ozono	
Características morfológicas	<i>Escherichia coli</i>	<i>Pseudomona aeuroginosa</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Pseudomona aeuroginosa</i>
Tamaño	Mediano	Pequeño	Grande	Mediano
Forma	Circular	Circular	Irregular	Irregular
Elevación	Convexo	Convexa	Convexa	Convexa
Superficie	Rugoso fino	Fina	Lisa	Lisa
Borde	Irregular	Definida	Irregular	Irregular
Propiedades ópticas	Opaca	Brillante	Opaca	Opaca
Color	Beige	Beige	Blanco	Blanco
Aspecto	Seco	Húmedo	Húmedo	Húmedo
Consistencia	Butirosa	Butirosa	Mucosa	Mucosa



II.2.2 Efecto del tipo de solución en el que se encuentra disuelto el ozono sobre el crecimiento bacteriano

Para evaluar de forma indirecta el efecto que la aplicación de las soluciones ozonadas tienen sobre las células de los microorganismos, se realizó la determinación de la ITL por el método del DB-índice sobre las muestras de cultivos celulares en medio líquido. Este método permitirá evaluar en forma general cuál ha sido el cambio en el número de los sitios que potencialmente pueden ser oxidados por la presencia de ozono y/o ROS.

Debe notarse que en este experimento se cambió el esquema experimental para favorecer el crecimiento de los microorganismos. A continuación se remarcan los cambios de importancia con respecto a la técnica desarrollada anteriormente.

En primer lugar, el procedimiento para el crecimiento de biomasa (acumulación de células de los dos diferentes microorganismos considerados en el estudio) se llevó a cabo en un medio líquido. Este esquema permitió reducir el efecto que la transferencia de ozono tiene sobre la interacción global entre el ozono y/o ROS con las células.

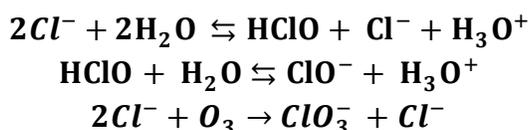
En esta fase de la experimentación se evaluó el efecto del tipo de solución acuosa en el que está disuelto el agente oxidante. En esta prueba fue posible realizar la determinación de UFC por medio de la resiembra de los microorganismos disueltos en agar BHI fresco.

La Figura 12 compara los comportamientos de las UFC y el valor del ITL para cada bacteria expuestas a ozono disuelto en diferentes soluciones acuosas, la concentración de ozono permaneció constante en 30 mg/L para todos los sistemas. Para ambos microorganismos, la presencia de NaCl presenta una relación directa en el comportamiento de ambos parámetros. Cuando la glucosa se adiciona al sistema, tanto el conteo de UFC y el ITL disminuyó en la misma proporción.



De ésta forma, *Escherichia coli* mostro ser menos resistente al ataque del ozono disuelto en agua inyectable, presentando una disminución en la acumulación de biomasa en el sistema. Por lo que ambos indicadores mostraron una disminución de más del 20% con respecto al valor del sistema con NaCl.

En el caso de la *Pseudomona aeuroginosa* se observó una dinámica similar entre ambos parámetros para todos los sistemas. Sin embargo la presencia del NaCl mostró tener un mayor efecto en la inactivación del crecimiento celular. Esto puede deberse a la formación de compuestos oxidantes de la reacción entre el ozono y el ión cloro, tales como el hipoclorito de acuerdo al siguiente esquema de reacción:



Los compuestos mencionados anteriormente, han sido utilizados como control efectivo para la inactivación de las bacterias (Langlais, 2006)

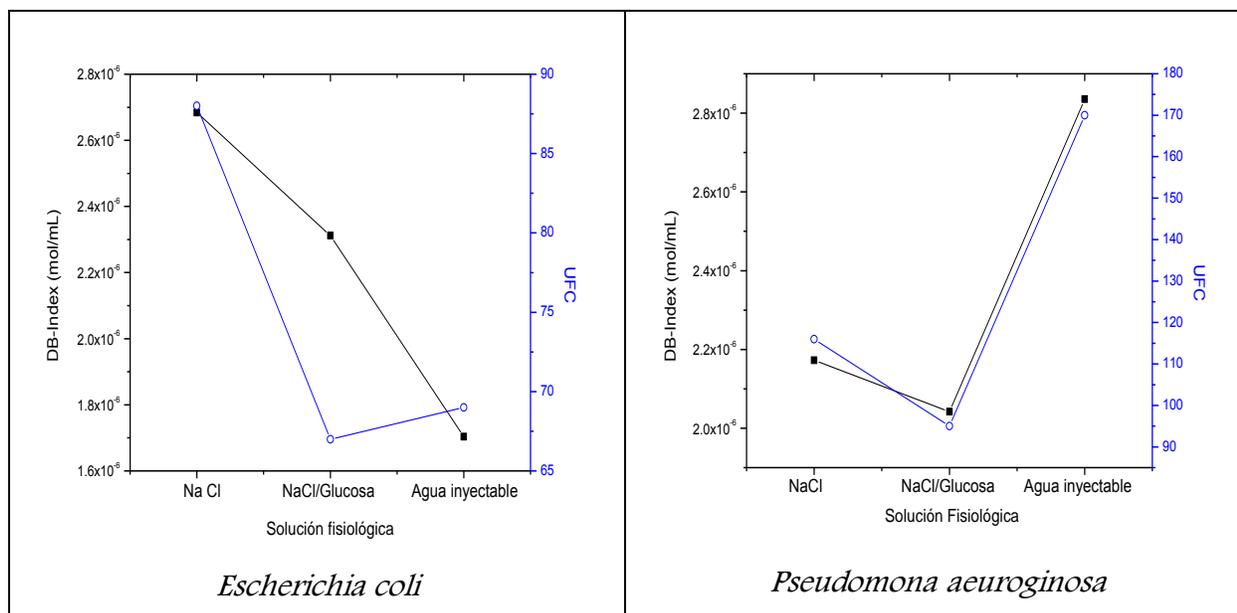


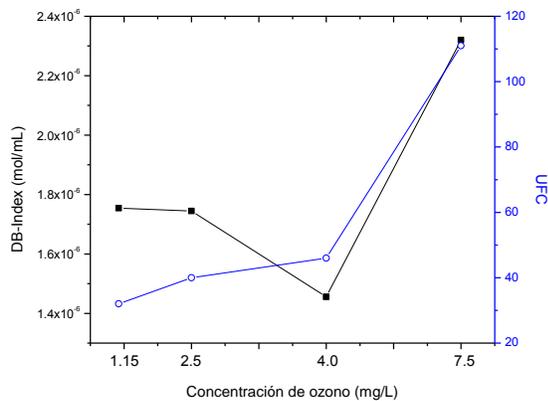
Figura 12 Variación del ITL dependiendo del tipo de solución en la que se encuentra disuelto el ozono. (a) *Escherichia coli*, (b) *Pseudomona aeuroginosa*. (°-UFC; ■-DB-Index)



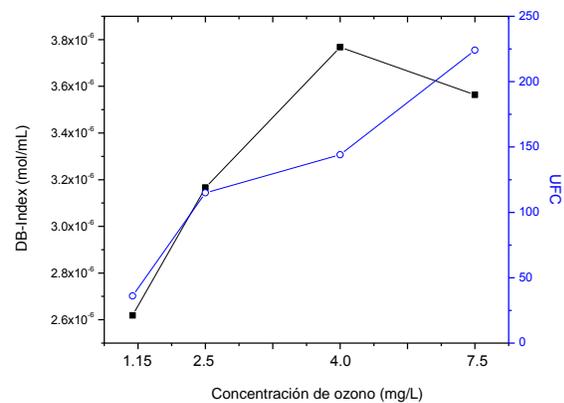
II.2.3 Efecto de la concentración de ozono sobre el crecimiento bacteriano

El objetivo de ésta etapa fue evaluar el efecto que tiene la concentración del ozono disuelto sobre la acumulación de biomasa. La Figura 13 muestra el comportamiento del ITL y la cuantificación de UFC para ambas bacterias, expuestas a ozono disuelto en solución fisiológica de NaCl 0.9%.

Para *Pseudomona aeuroginosa* se puede observar, a menor concentración de ozono menor cantidad de UFC fueron obtenidas. Siendo el comportamiento de ambos parámetros directamente proporcionales entre sí, esto quiere decir, que a mayor cantidad de ozono se presentó una mayor cantidad de UFC, habiendo mayor cantidad de dobles enlaces disponibles para ser cuantificados por medio del ITL. Así mismo, se observa que ésta bacteria presentó mayor inactivación a bajas concentraciones de ozono.



a) *Escherichia coli*



b) *Pseudomona aeuroginosa*

Figura 13 Variación del ITL a diferentes concentraciones de ozono disuelto en solución fisiológica NaCl 0.9%. (a) *Escherichia coli*, (b) *Pseudomona aeuroginosa*. (°-UFC; ■-DB-Index)

Por el contrario, para la *Escherichia coli*, se presentó una mayor inhibición a una concentración de 20 mg/L de ozono, mostrando un comportamiento opuesto al de *Pseudomona aeuroginosa*. Esto puede deberse a que a esta concentración la muerte de las célula es llevada a cabo en términos de auto reproducción, esto quiere decir, que la célula posiblemente no esté muriendo



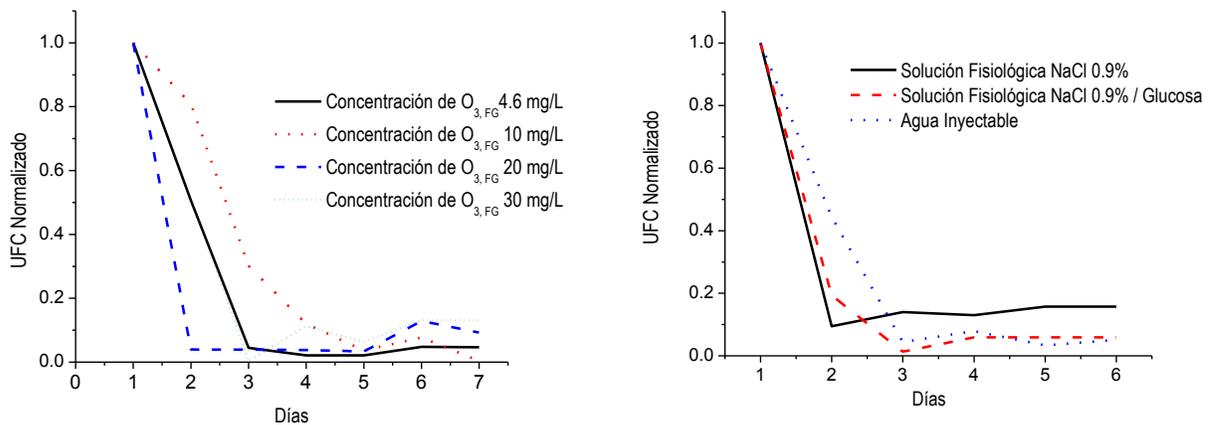
sino que su capacidad reproductiva disminuyó, liberando toxinas al medio. Siendo estas células materia prima para ser oxidada por medio de análisis del ITL.

II.2.4 Evaluación de viabilidad celular en medio líquido

Para la evaluación de la viabilidad celular, se realizó la resiembra de los microorganismos tratados con ozono, de acuerdo a los tiempos en los que se llevó a cabo la dosificación del mismo y se determinaron las UFC para cada caso. Este procedimiento se realizó con el objetivo de observar de manera indirecta el efecto que la aplicación del ozono tuvo sobre la capacidad de reproducción celular.

La importancia de este parámetro está asociada al efecto que en las células tiene la aplicación de ozono y las ROS a partir de las soluciones utilizadas en el experimento anterior. Durante el periodo de tratamiento, cada día se tomó una alícuota de 1mL del medio de cultivo con los microorganismos para realizar la resiembra de los mismos y observar la variación de unidades formadoras de colonias o microorganismos viables.

La Figura 14 muestra la cuantificación de UFC para *Escherichia coli* bajo los dos esquemas de dosificación utilizados para el crecimiento de las células en solución glucosada.





(a)

(b)

Figura 14 Cuantificación de UFC para *Escherichia coli*, (a) diferentes concentraciones de ozono, (b) diferentes soluciones en las que esta disuelto el ozono a concentración constante (30 mg/L)

La Figura 14a muestra las dinámicas de viabilidad celular por CFU a diferentes concentraciones de ozono, se puede observar que a medida que aumenta la concentración de ozono la inactivación celular o el número de UFC disminuye. Por otra parte, la Figura 14b da como resultado una mayor inactivación celular en el sistema de solución fisiológica de NaCl 0.9%, debido a las posibles especies derivadas del cloro que pudieran formarse.

II.2.5 Modelamiento cinético de la inactivación celular

El modelamiento para determinar la cinética de inactivación bacteriana tomó como base los resultados obtenidos del conteo de UFC, de acuerdo a:

$$UFC_N = e^{-bt}$$

En donde UFC_N es el valor normalizado de las UFC. Éste modelo considera un orden de reacción de pseudo primer orden y es adecuado para caracterizar todos los sistemas utilizados en éste estudio.

La Tabla 7 presenta los datos para los sistemas con concentración de ozono variable, en donde *Pseudomonas aeruginosa* muestra ser un 88% más resistente al ataque del ozono comparada con *Escherichia coli*. Ésta condición es más evidente cuando se utilizan concentraciones bajas de ozono, siendo 95% más lenta.



Tabla 7 Efecto de la variación de la concentración de ozono sobre la velocidad de inactivación bacteriana en solución fisiológica de NaCl 0.9%

Concentración de ozono disuelto (mg/L)	Constante de inactivación, b (día^{-1}) <i>Escherichia coli</i>	R ²	Constante de inactivación, b (día^{-1}) <i>Pseudomona aeruginosa</i>	R ²
1.15	0.5272	0.9113	0.0245	0.9256
2.5	0.9577	0.9406	0.1256	0.8958
5.0	1.3380	0.9860	0.2425	0.9025
7.5	2.4730	0.9734	1.2120	0.8752

La Tabla 8 muestra las constantes de inactivación de ambas bacterias, se puede observar que para *Escherichia coli* cuando se usa ozono disuelto en la solución glucosada con NaCl se presenta una mayor eficiencia de inactivación (2.4730 días^{-1}). Éste valor fue 50% mayor con respecto al presentado por el sistema con NaCl (1.6010 días^{-1}). Considerando los resultados presentados con anterioridad la reacción entre el NaCl y el ozono promueve la inactivación de ésta bacteria. La velocidad de inactivación obtenida en el sistema con glucosa pura fue 50% menor comparada con la obtenida para el sistema de NaCl, lo que comprueba el resultado.

Tabla 8 Constantes de inactivación bacteriana para diferentes soluciones ozonadas a 30 mg/L de ozono

Medio de cultivo	<i>Escherichia coli</i>		<i>P. aeruginosa</i>	
	Constante de inactivación, b (día^{-1})	R ²	Constante de inactivación, b (día^{-1})	R ²
Agua inyectable	1.0390	0.9604	0.9987	0.9125
Solución fisiológica glucosada	0.9643	0.8711	0.7625	0.9321
Solución fisiológica	1.6010	0.9641	0.8410	0.8561



NaCl 0.9%				
Solucion fisiológica glucosada con NaCl 0.9%	2.4730	0.9583	1.2120	0.8975

El efecto sinérgico entre la glucosa y el NaCl incrementa la velocidad de inactivación de 2.4730 días⁻¹ para la *Escherichia coli* y de 1.2120 días⁻¹ para *Pseudomona aeuroginosa*. Estos de valores de inactivación fueron mayores comparados con los obtenidos en la solución fisiologica de NaCl o con la solución glucosada. La eficiencia de inactivación para el agua inyectable y la solución glucosada fueron similares para ambas bacterias: 1.0390 y 0.9987 días⁻¹ y 0.9643 y 0.9125 días⁻¹ respectivamente. Por lo cual, se puede observar que en éstos medios la resistencia de las bacterias al ataque del ozono fue similar. Por otra parte, cuando se tuvo la presencia de NaCl, ésta resistencia fue diferente: 1.6010 y 0.8410 días⁻¹ en la solución fisiológica de NaCl y 2.4730 y 1.2120 días⁻¹ en la solución fisiológica glucosada con NaCl, respectivamente. En resumen, se puede concluir que la eficiencia de inactivación bacteriana depende de la naturaleza del microorganismo y del medio en el que se encuentre disuelto el ozono.

Conclusiones

Para ambos microorganismos existe una relación directa entre los valores de DB-Index y las UFC. Esto confirma la posibilidad de utilizar el uso del DB-Index como una medición indirecta del crecimiento de la biomasa. Por lo cual, éste método puede ser usado como una alternativa para caracterizar la eficiencia de inactivación de biomasa. El ozono muestra diferentes eficiencias de inactivación dependiendo de las características del microorganismo. Cuando *Escherichia coli* fue utilizada, la inactivación de éste microorganismos fue más eficiente bajo la presencia de NaCl. Por otra parte, *Pseudomona aeruginosa* muestra un alto grado de inactivación cuando el ozono fue disuelto en la solución fisiológica de NaCl. Sin embargo, ambas bacterias fueron inactivadas en mayor grado a una concentración de ozono de 10 mg/L disuelto en la solución fisiológica de NaCl. De acuerdo a las cinéticas de descomposición obtenida, la *Pseudomona aeruginosa* mostró



ser más resistente a la oxidación por el ozono comparado con la *Escherichia coli*, en donde el ozono fue más efectivo y alcanzó las mismas condiciones de inactivación en menor tiempo.



Capítulo V

Aplicación de ozono a cultivo de células animales

Debido a la naturaleza oxidativa de las especies del oxígeno promueve la necesidad de desarrollar mecanismos de defensa para proteger las células del daño oxidativo. El oxígeno molecular puede ser usado para conducir diferentes reacciones bioquímicas esenciales, como algunos procesos oxidativos. Sin embargo, bajo ciertas condiciones se forman los ROS, los cuales pueden comprometer la reproducción celular. Dependiendo del impacto que tengan éstos compuestos, las células pueden reparar el daño o activar los principales mecanismos para llevar a cabo la muerte de la misma. Así mismo, cualquier daño que involucre la función respiratoria puede provocar un impacto en la reproducción celular (Madeo, 1999) (Ott, 2007).

Aproximadamente del 1-2% del oxígeno molecular consumido durante la respiración de la celular es convertido a radicales superóxidos. La reducción de un electrón del oxígeno molecular produce en anión superóxido ($O_2^{\bullet -}$), el cual es un intermediario relativamente estable y sirve como precursor de la mayoría de las ROS como lo es el peróxido de hidrógeno. Cuando éstos compuestos reaccionan con las macromoléculas de la célula puede comprometer las funciones de la misma e influenciar directamente en la viabilidad celular y por ende su muerte (Andreyev, 2005). Los principales compuestos con los cuales reaccionan los ROS son los lípidos, cuando éstos compuestos se oxidan afectan las funciones básicas de la célula, como lo es la respiración celular, las propiedades de la membrana, el potencial electroquímico y el estado buffer de la membrana (Zhang, 1990) (Albano, 1991) (Bacon, 1993) (Ott, 2007).



Por lo que bajo condiciones normales la viabilidad celular y sus funciones son estrictamente dependientes del equilibrio adecuado entre la generación de ROS y su inactivación por medio del sistema antioxidante de la célula (Ott, 2007) (Fariss, 2005).

Por lo anterior, en ésta sección se analizará el efecto que tiene el ozono y oxígeno puro sobre el crecimiento de un cultivo de células C6 glioma de rata. Debido a que las células de origen animal son más sensibles a la presencia del estrés oxidativo que las bacterias, se decidió utilizar la concentración mínima de ozono (4.6 mg/L en fase gas) para llevar a cabo los experimentos. Por medio de la cuantificación del ADN del cultivo de células expuesto a agentes oxidantes se determinó de manera indirecta la viabilidad celular. Así mismo, se determinará la cantidad de dobles enlaces disponibles por medio de la cuantificación del ITL, estableciendo si existe una correlación entre éstos parámetros.

Metodología

IV.1.1 Esquema general de experimentación

La Figura 15, muestra el esquema general de experimentación de la Etapa II, en la cual se llevó a cabo el cultivo de la línea celular C6 de glioma de rata (Anexo III). Estas células siguen un procedimiento sustancialmente diferente de crecimiento comparado con los microorganismos.

El objetivo de este estudio fue analizar el efecto que tiene el ozono sobre la morfología y proliferación celular causado por diferentes esquemas de dosificaciones del ozono disuelto. Más aún, la estructura de la membrana celular tiene una estructura menos resistente en lo general que las bacterias. Entonces, a partir de los resultados obtenidos de esta parte, se podrán comparar los efectos de los compuestos bioquímicos ubicados en esta parte de las células.

En esta parte se busca determinar el efecto cinético que el ozono tiene sobre la acumulación de biomasa a través de técnicas de análisis de imagen que serán explicadas posteriormente. Además,



se pudo evaluar la relación que existe entre el esquema de dosificación de ozono con el cambio de la cantidad total de sitios reactivos con ozono.

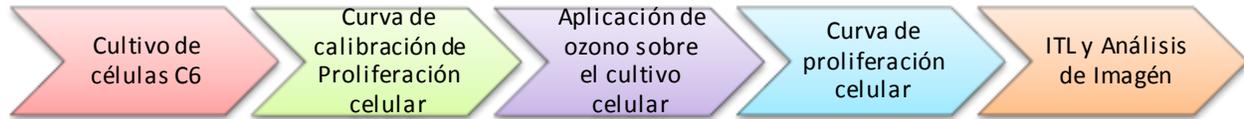


Figura 15 Esquema general de experimentación de la Etapa II.

IV.1.2 Cultivo de células C6

El cultivo de células C6 glioma de rata stock (de donde se colectó el inóculo inicial) se encontraba contenido en un frasco de Roux estéril, el cual contiene fijadores poliméricos biocompatibles que permiten un crecimiento homogéneo del cultivo celular en suspensión. El material con el que está elaborado el frasco es normalmente poliestireno virgen grado cristal debido a sus buenas propiedades ópticas, así mismo, debido a que es un material hidrofóbico requiere un tratamiento de radiación gamma que permitan tener una superficie hidrofílica (Cultek).

El procedimiento de tratamiento de este grupo de células tiene una gran similitud al desarrollado con los microorganismos. Esto se debe a que esencialmente, las dos etapas tienen un mismo tipo general de sustrato (células) pero existe una diferencia importante asociada a la estructura celular, Este parámetro será evaluado indirectamente a través de la medición de la ITL del cultivo de células C6.

Dadas las similitudes de los métodos de análisis, a partir del cultivo de C6 se realizó la siguiente metodología para llevar a cabo la resiembra de las células, el cual se desarrolló bajo estrictas condiciones de asepsia dentro de una campana de flujo laminar:

1. Del cultivo stock se extrajo el medio de cultivo RPMI (Roswell Park Memory Institute)
2. Lavar con 7-10 mL de solución Hanks; la cual sirve como solución buffer que permite la preservación de las células.



3. Colocar 2 mL de Tripsina EDTA o Tripsina benceno y agitar; esto sirve para romper las uniones que se forman entre las células y el frasco de cultivo.
4. Adicionar 4 mL del medio de cultivo RPMI enriquecido con suero fetal bovino y penicilina estreptomicina en una relación 94:5:1, respectivamente. Esto se utilizó con el objetivo de inactivar la tripsina.
5. Colocar la suspensión en un tubo tipo falcón y centrifugar por 4 min a 1000 rpm.
6. Eliminar el sobrenadante y resuspender el pellet de células con medio de cultivo
7. Colocar 1 mL de las células suspendidas en medio de cultivo en un frasco de Roux, el cual contiene de 7-10 mL de medio de cultivo RPMI.
8. Incubar por 24 horas a 37°C en una incubadora de CO₂ (atmosfera de aire y CO₂ con una proporción de 95:5) y 100% de humedad.

IV. 1.3 Prueba de proliferación celular

Posteriormente al cultivo de las células, fue necesario tener una curva patrón de proliferación celular, es decir, determinar el número de células disponibles en el medio de cultivo a las 24 horas y a los 5 días de incubación (Anexo IV).

Para ello se utilizó el método de CyQuant® (Anexo IV), el cual es un procedimiento para determinar la densidad celular en el medio. Se basa en el uso del colorante verde fluorescente, el cual aumenta su intensidad cuando se une a los ácidos nucleicos de la célula. Por lo cual es necesario llevar a cabo la lisis de las mismas para obtener una medición directa. Los reactivos utilizados fueron:

- 10 mL del colorante verde fluorescente/ bufer de lisis, para lo cual se utilizaron 500 µL del buffer de lisis, 9.5 mL de H₂O destilada y 25 µL del colorante
- Dilución 1 µL/mL de la solución de ADN

La Figura 16 muestra la metodología que se debe seguir para la medición de fluorescencia de acuerdo al método CyQuant® para la prueba de proliferación celular:

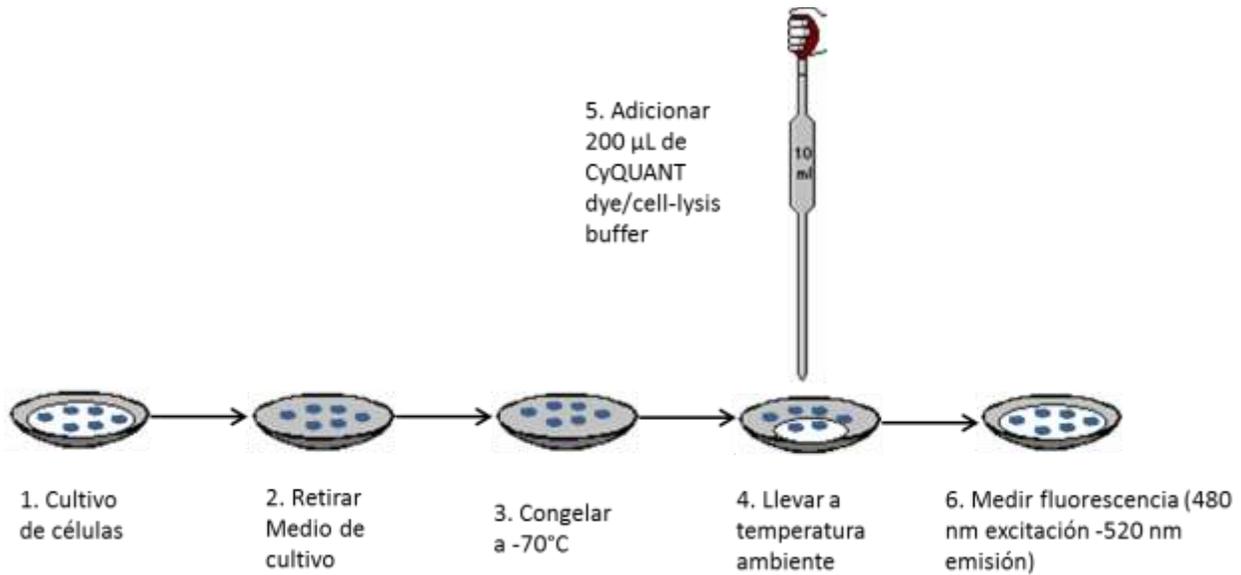


Figura 16 Metodología CyQuant para proliferación celular.

Posterior a esto, se lee la fluorescencia a 485 nm de emisión y 530 nm de detección en un equipo Synergy HT Multi-Mode Microplate Reader (Figura 17), obteniéndose la variación de la concentración de ADN con respecto al número de células presentes. Esta es una forma de medir indirectamente la concentración de biomasa de las células C6.



Figura 17 Synergy HT Multi-Mode Microplate Reader

A partir de la relación de la cantidad de células y de las variaciones de la ITL de estas mismas muestras (corridas en paralelo) se podrá establecer un modelo que defina el efecto oxidativo del



ozono sobre la eficiencia de proliferación celular. El esquema de dosificación se desarrollará a continuación.

IV.1.4 Dosificación de ozono

Las células C6 se hicieron crecer en medio RPMI en cajas de cultivo de 96 pozos. Después de 24 horas de incubación, se procedió a llevar a cabo la dosificación del ozono disuelto en solución fisiológica de NaCl 0.9%, con una concentración de ozono en fase gas de 4.6 ± 0.2 mg/L, de acuerdo al diagrama experimental mostrado en la Figura 18. Este es el esquema experimental que permitió tener experimentos en paralelo para realizar evaluaciones del efecto de dosificación de ozono sobre la proliferación celular.

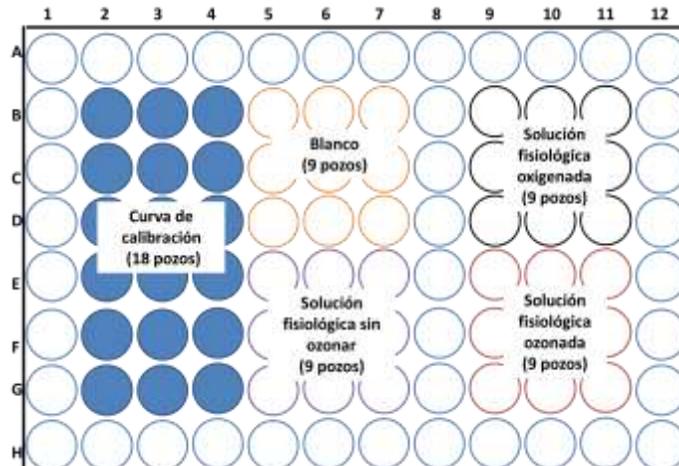


Figura 18 Esquema experimental en caja de cultivo de 96 pozos

De acuerdo con la Figura 18, se llevó a cabo el experimento en 3 cajas de 96 pozos para evaluar la dosis de ozono sobre la proliferación celular en función de la masa de ozono suministrada a cada pozo:

- Caja 1.- se realizó una única dosificación de ozono a las 24 horas de haber hecho el sembrado de las células.
- Caja 2.- se dosificó el ozono diariamente
- Caja 3.- la dosificación se llevó a cabo cada 2 días.



Cada vez que se aplicó el tratamiento se cambió el medio de cultivo por uno fresco, el volumen de solución fisiológica administrada fue 100 μ L por 100 μ L de medio RPMI. Esto permitió que las células viables pudieran tener fuente de nutrientes que les permitiera crecer. Este esquema se acerca a las condiciones en las cuales estas células se encontrarían dentro de un organismo vivo. El seguimiento de dosificación de ozono disuelto se llevó a cabo por un periodo de 5 días. Posteriormente, en el día 6, se llevó a cabo el análisis de proliferación celular de acuerdo al método anteriormente descrito.

Resultados

IV.2.1 Dosificación de ozono al cultivo de células C6

Existen diferencias evidentes entre las estructuras de las células de bacterias y animales, en particular, entre las membranas de ambos tipos de células. En las primeras, la membrana celular es muy resistente a los efectos del medio externo; en cambio para las células animales, la membrana no es tan resistente debido al tipo de medio donde regularmente crece.

En esta etapa de la experimentación, se observó el efecto del ozono sobre la proliferación de las células de cáncer (C6 glioma de rata), bajo diferentes esquemas de dosificación. A continuación se presentan los resultados obtenidos de esta etapa.

IV.2.2 Prueba de proliferación

Como primera etapa, se desarrolló una secuencia de experimentos que permitiera obtener una relación entre la concentración de células de la línea celular seleccionada con la concentración de DNA. Esta elección se desarrolló considerando que el DNA puede medirse de una forma simple y de fácil acceso en el mercado nacional. La Figura 19 muestra la curva de calibración de



ADN al día 5 de cultivo, de acuerdo con la metodología planteada, en la cual se puede observar un aumento en la disponibilidad de ADN en la muestra debido al crecimiento de las células. Esto quiere decir que si la ITL puede utilizarse como un indicador de la acumulación de biomasa, entonces existe una relación entre la concentración de DNA y la ITL, tal y como se demostrará más adelante.

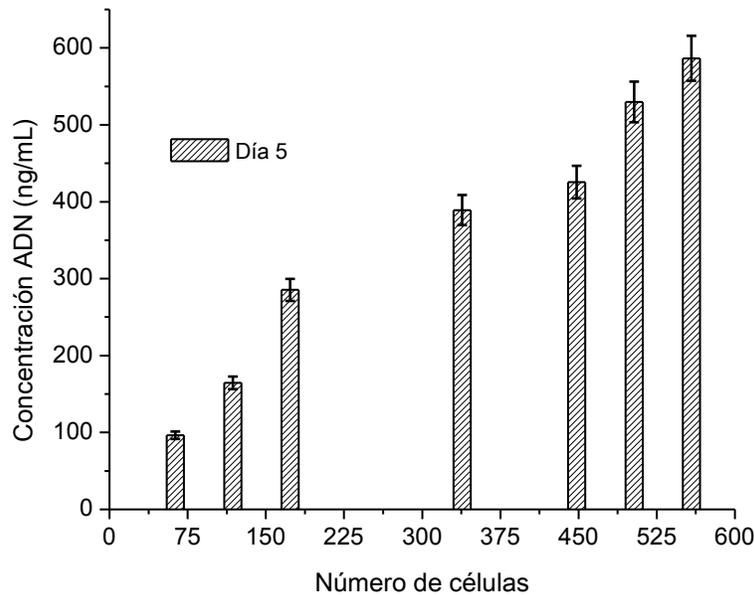


Figura 19 Curva de calibración de ADN con respecto al número de células.

Los resultados mostrados en la Figura 19 que la concentración de ADN del número de células propuesto en la curva de crecimiento celular no está dentro de la meseta de crecimiento aún después del día 5 de incubación. A partir de esta información, se pudo fijar un número de células para realizar el esquema de experimentación, en la cual se llevó a cabo la dosificación de ozono y se determinó el período a través del cual se deberá realizar el experimento.

IV.2.3 Dosificación de ozono

Dada las características diferentes de las células de los microorganismos y de la línea celular C6, se decidió utilizar un mecanismo de dosificación diferente al elegido en el caso de la experimentación anterior (bacterias). En este caso, se utilizó la solución fisiológica y la solución



fisiológica ozonada y oxigenada con diferente estrategia de dosificación: única, diaria y cada dos días.

Dosificación única

De acuerdo a los resultados obtenidos en la curva de crecimiento celular, se determinó sembrar 450 células por pozo. En este caso, el ozono fue dosificado utilizando tres soluciones: solución fisiológica, solución fisiológica oxigenada y solución fisiológica ozonada. Esta selección se utilizó para determinar el efecto promotor o inhibidor del oxígeno y/o del ozono en la proliferación celular de la línea celular C6. La Figura 20 muestra el comportamiento de la única dosificación del agente oxidante a las células al día 5.

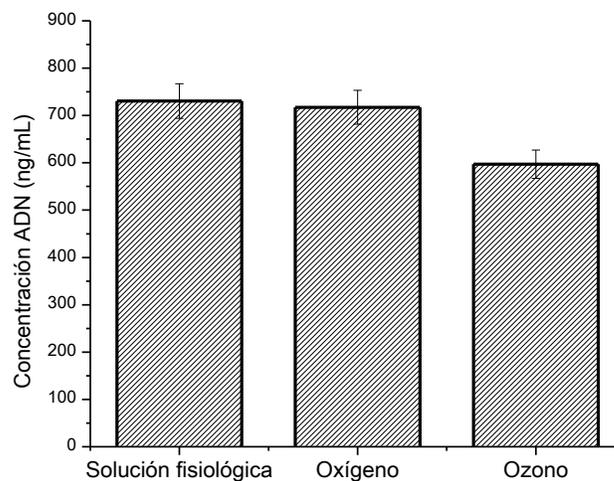


Figura 20 Concentración de ADN en diferentes medios

Se puede notar que en presencia de oxígeno (sin ozono) no se observa una variación estadísticamente significativa con relación a cuando solo se aplica la solución fisiológica. Esto parece indicar que la presencia de oxígeno no tiene un efecto importante en el desarrollo de la biomasa de las células de tipo C6. Sin embargo, cuando se tiene la presencia de ozono en una única dosificación, se observa la disminución en la proliferación celular, lo cual sugiere un efecto inhibidor o de descomposición por parte del ozono sobre la línea celular C6.



Dosificación diaria

Por otra parte, cuando se tiene una dosificación diaria de SF oxigenada y SF ozonada (Figura 21), se observa que para ambos casos se presenta un incremento de concentración de ADN con respecto al blanco (SF). Esto puede deberse a la mayor disponibilidad de oxígeno que permite el crecimiento acelerado de las células. Por otro lado, se puede presentar el caso donde el ozono también puede tener un cierto grado de activación acelerando el metabolismo celular si se dosifica con mayor frecuencia comparado con el caso donde se realizó una única dosificación.

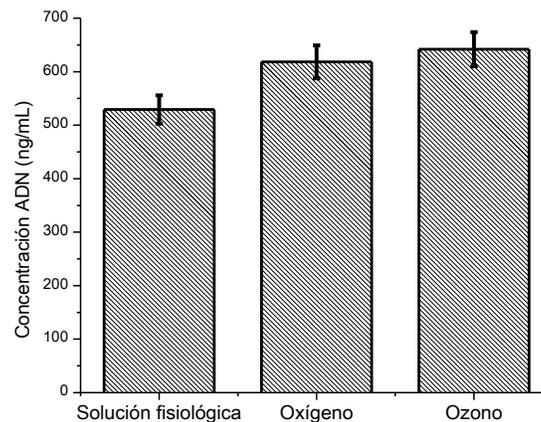


Figura 21 Concentración de ADN en diferentes medios

Lo anterior se comprueba cuando se comparan los resultados mostrados en la Figura 20 y Figura 21. De hecho, los valores de concentración de ADN son ligeramente mayores cuando se tiene una dosificación de ozono diaria (642 ng/mL) con respecto a una dosificación única (595ng/mL).

Dosificación cada dos días

En el caso de la dosificación de cada dos días, se puede observar que la presencia del oxígeno incrementa la proliferación de la célula comparado con el caso donde se inyectó ozono. Esto se demostró utilizando el aumento en la concentración de ADN y su comparación con el grupo al cual se le dosificó ozono (Figura 22). Sin embargo, la disminución de la concentración de oxígeno con relación al modo de dosificación anterior tiene un efecto significativo en la



disminución de la concentración de DNA. Esto comprueba el efecto que el oxígeno tiene sobre la proliferación celular cuando existe una cantidad en exceso de este gas en el medio. Por otro lado, el aumento de la presencia de ozono en el medio tienen un efecto que puede describirse como adverso a la proliferación celular de la línea C6.

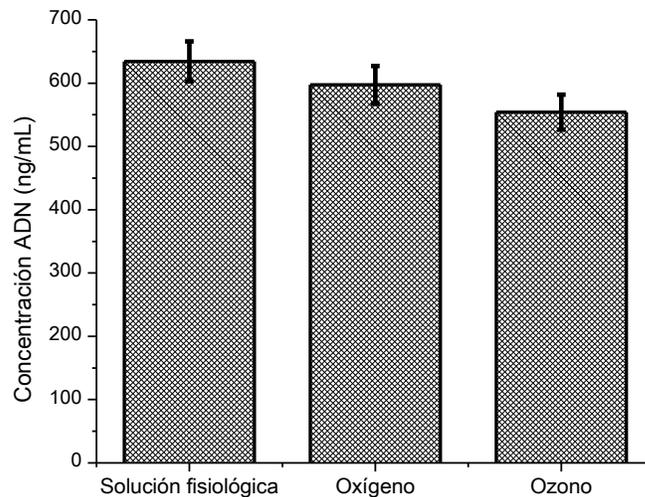


Figura 22 Concentración de ADN en diferentes medios dosificación cada 2 días.

En la Figura 23 se presenta la proliferación de línea celular C6 para los tres esquemas de dosificación.

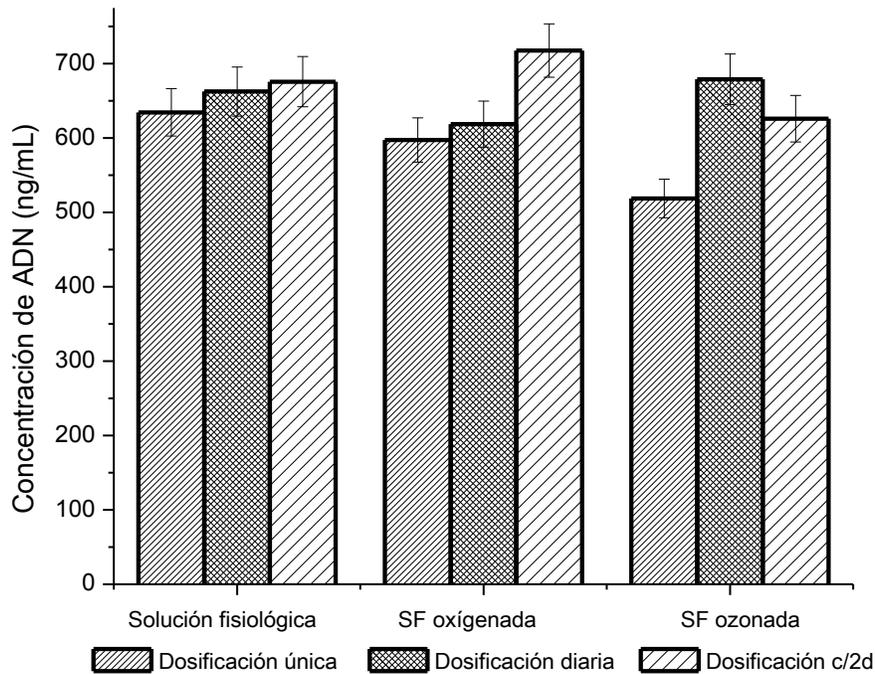


Figura 23 Concentración de ADN en diferentes medios con diferentes esquemas de dosificación.

Si se comparan las concentraciones de ADN de los tres esquemas de dosificación, se puede observar que el mayor aporte en la reproducción de las células está dado por el oxígeno cuando se dosifica cada 2 días. En el caso de la dosificación de ozono, el mayor aporte a la proliferación celular está dado cuando se tiene el esquema de dosificación diario. Si bien no existe una tendencia entre la frecuencia de dosificación y los cambios en el ADN, si se puede determinar que existe un efecto asociado a la presencia de ozono comparado con los casos donde solo se suministró oxígeno.

Se considera que el ozono puede tener un efecto ambivalente donde puede favorecer la proliferación celular cuando la dosis es adecuada (cada día en este caso) o inhibirla cuando la dosis se disminuye (dosificación única), se notó la disminución en la concentración de ADN lo que parecería indicar que el efecto inhibitor prevaleció sobre el efecto promotor de la proliferación celular de C6.



También se puede observar mayor efecto de dosificación de ozono sobre la disminución en la proliferación celular, comparado con los otros grupos experimentales, cuando se dosificó una sola vez.

IV.2.4 Análisis de ITL en cultivos celulares

Como se ha mencionado anteriormente, el ozono reacciona principalmente con los dobles enlaces de los lípidos por lo tanto, se tiene una relación directa entre el ITL y el conteo celular. La Figura 24 muestra las dinámicas de variación del ITL con respecto al crecimiento de las células C6 dependiendo del grupo experimental.

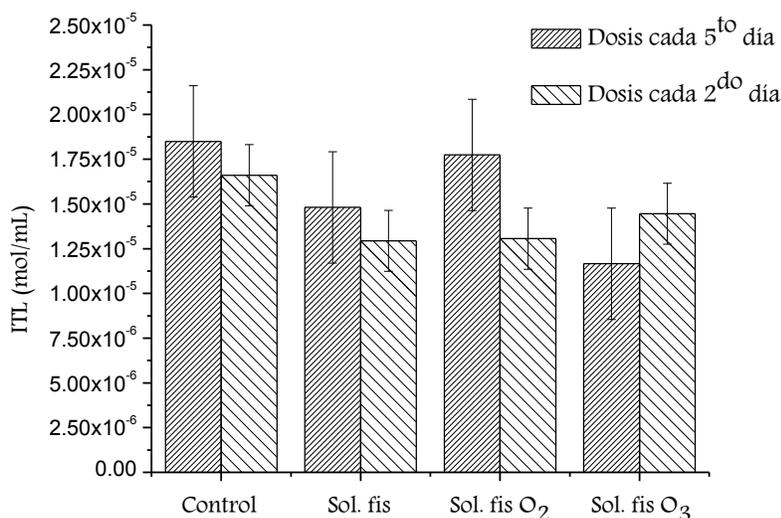


Figura 24 Variación del DB-Index del cultivo de células C6 bajo diferentes esquemas de dosificación

En la figura anterior, es claro que cuando el ozono se dosificó cada 2 días, se observa un aumento en el valor del ITL (aproximadamente 10%) debido a una mayor disponibilidad de dobles enlaces



presentes, esto como consecuencia de un mayor número de células en el medio. Por otra parte, no se observó una diferencia significativa entre el grupo control y el grupo con solución fisiológica pura.

Si el ozono es dosificado al inicio de la experimentación, se observa que la variación del ITL muestra una dinámica semejante comparada con la cuantificación de ADN. Esto quiere decir, que el comportamiento de ambos parámetros tiene la misma tendencia con respecto a la dosificación. Sin embargo, el ITL aumenta un 25% comparado con el grupo con oxígeno, y esto a su vez está correlacionado con la variación de la concentración de ADN. En el caso de la dosificación única de ozono, ésta promueve el aumento del 20% en el valor del ITL comparado con el grupo al que se le dosificó cada 2 días. De esta forma, se puede confirmar que el ozono tiene un efecto importante sobre la dinámica de crecimiento de las células C6, aumentando la concentración de ADN en éstos grupos y confirmado a su vez por la cuantificación del ITL.

Conclusiones

El ozono se dosificó a una concentración fija de 4.6 mg/L en fase gas a un cultivo de células tumorales C6 glioma de rata. Se tuvieron varios grupos de estudio, en los cuales se incluyó un grupo blanco al cual se le dosificó oxígeno puro.

Los resultados obtenidos muestran que el ozono incrementa la reproducción celular, incrementando su metabolismo celular, acelerando su curva de crecimiento. Esto fue comprobado por la cuantificación de ADN en el medio y correlacionándolo con el valor del ITL para cada grupo de estudio.

Por otro lado, la dosificación del ozono mostró ser más efectiva en cuanto a reproducción celular a tiempos más espaciados, es decir, fue más efectiva cuando se dosificó cada 5 días comparado con el grupo al que se le dosificó cada 2 días.



Las observaciones anteriores sirven como parámetro de referencia para la siguiente etapa, en la cual se dosificó el ozono a un modelo murino, haciendo más complejo el análisis del efecto del ozono sobre el crecimiento celular.



Capítulo VI

Aplicación de ozono en animales modelo

La célula es la unidad básica de la vida. Para su supervivencia, cada célula debe mantener condiciones internas que permiten el desarrollo de sus reacciones bioquímicas esenciales, a pesar de los cambios extracelulares. Por lo tanto, todas las células se caracterizan por la presencia de la membrana plasmática con permeabilidad selectiva que rodea una solución acuosa con gran concentración de elementos químicos (Manson, 2003).

La célula se multiplica y al hacerlo sus estructuras se dividen también en otras exactamente iguales a las anteriores, con los mismos componentes y funciones que la original, lo cual está determinado por el ADN y el tiempo de vida de cada grupo celular (Matthias Rath, 2001) (Manson, 2003).

Los estudios de cinética química del ozono con células como sustrato biológico, si bien son escasos, han coincidido en el tipo de tejido utilizado como elemento de prueba. En particular, las células de cáncer han sido una buena plataforma de estudio debido a su metabolismo acelerado, alta tasa de crecimiento, tamaño grande célula y sus implicaciones clínicas.

La célula normal se convierte en una célula de cáncer debido a una mutación en el ADN, algunas de estas células mueren o son eliminadas en los ganglios linfáticos. Sin embargo, otras siguen con vida y se multiplican muy rápidamente ya que carecen de un mecanismo de control de crecimiento (Matthias Rath, 2001).



Al formarse un gran número de células de cáncer, se amontonan, presionan o bloquean a otros órganos impidiéndoles realizar sus funciones biológicas correspondientes. Debido a que no se limitan al espacio en donde se formaron, se extienden a otras zonas del organismo por medio de la sangre o de la linfa, produciendo metástasis y dañando otros órganos (Matthias Rath, 2001).

El tratamiento para el cáncer varía dependiendo del tipo y estadio. Si el cáncer está confinado a un solo lugar y no se ha diseminado, el método de tratamiento más común es la cirugía; si el tumor se ha diseminado solo a los ganglios linfáticos locales, estos se pueden extirpar. Si todo el tejido tumoral no se puede extirpar por métodos quirúrgicos, las opciones de tratamiento son principalmente la radioterapia, quimioterapia o ambas. Algunos tipos de cáncer requieren la combinación de cirugía, radiación y quimioterapia (Center, 2012).

En junio de 1995, el Instituto Nacional de Salud en USA (NIH por sus siglas en inglés) incluyó el uso de agentes oxidantes (ozono, peróxido de hidrógeno) como terapia metabólica y celular y agentes anti oxidantes como tratamientos complementarios para diversas enfermedades como el cáncer (Altman, 1990) (Bocci, 2006). Este aspecto justifica más aún el uso de este tipo de células como elemento de prueba para la determinación de los posibles modelos cinéticos que rigen la interacción del ozono con sustratos biológicos. A continuación se da una breve descripción de algunos antecedentes sobre el uso de ozono en células presentes en diversos tipos de cáncer.

Se ha reportado a nivel clínico que el uso de ozono para el tratamiento de cáncer mejora la calidad de vida de los pacientes (Clavo, 2004) (Clavo, 2004) (Vaupel, 1987) (Vaupel, 1991) (Murray, 2008) (Martínez-Sánchez, 2005) (Bocci, 2005) (Lindenschmidt, 1986).

En el caso de la aplicación de ozono por auto-hemoterapia para el tratamiento de éste padecimiento, se reportó que en el 70% de los pacientes disminuyó el dolor y en un 90% aumentó su calidad de vida. Sin embargo, hoy en día no existe evidencia científicamente sustentada de que el ozono tenga beneficios sobre pacientes con cáncer, así como los efectos en el organismo a nivel químico, clínico y biológico (Clavo, 2004) (Clavo, 2004) (Vaupel, 1987) (Vaupel, 1991) (Murray, 2008) (Martínez-Sánchez, 2005) (Bocci, 2005) (Lindenschmidt, 1986).



El desarrollo de células tumorales primarias y metastásicas se producen en lugares en los cuales la presión parcial de oxígeno (pO_2) es menor comparada con la que se presenta en tejido sano, donde es equivalente a 100 mm Hg en el espacio alveolar, de 98 mm Hg medida en sangre arterial y 40 mm Hg en sangre venosa (Clavo, 2004).

En los últimos años, se han propuesto diversos métodos para oxigenar los tumores como la exposición del paciente a oxígeno puro por periodos cortos de tiempo, obteniéndose un aumento temporal en la pO_2 (Clavo, 2004). La terapia de oxigenación hiperbárica es un procedimiento en el cual el oxígeno puro grado médico se infiltra a una cámara de aire a una presión de 2.6 atm por 2 h. Durante este tiempo, el oxígeno que está solubilizado en el plasma aumenta por encima de los 5 mL/dL, siendo suficiente para satisfacer los requerimientos de los tejidos, por lo cual ninguna molécula de oxígeno es liberada por oxihemoglobina (Hernandez, 2007) (Okezie, 1998) (Bocci, 2005).

De esta manera, como cualquier otro gas, el ozono se disuelve en el plasma e inmediatamente desaparece por medio de reacciones con compuestos orgánicos (antioxidantes hidrosolubles y lipofílicos, ácidos grasos insaturados, etc.). Ésta reacción genera un número de compuestos que actúan sobre diversos componentes de la sangre, originando efectos biológicos a corto (originado por las ROS) y largo plazo (originado por los pPOL). Los efectos a corto plazo se presentan debido al repentino incremento en el peróxido de hidrógeno produciendo diversas reacciones bioquímicas en eritrocitos, leucocitos, plaquetas y células endoteliales. Los efectos a largo plazo son debidos a que la vida media de los pPOL es mayor que la de las ROS. Se sabe que los pPOL activan las células endoteliales y parenquimales de diferentes órganos (Bocci, 2005).

En general, el uso del ozono para el tratamiento del cáncer presenta diversos efectos a nivel biológico como (Bocci, 2005) (Clavo, 2004) (Clavo, 2004) (Schulz, 2008)

- Mejorar la circulación y oxigenación de tejidos isquémicos y neoplásicos.
- De manera general mejora el metabolismo.



- Corrige el estrés oxidativo crónico, ya que regula el sistema antioxidante.
- Induce la activación del sistema inmune.
- Procura un estado de bienestar en los pacientes mediante la activación del sistema neuroendocrino.

A continuación se presentan los antecedentes que describen cuáles han sido los avances al menos a nivel clínico de la aplicación de ozono en el tratamiento de cáncer. Debe notarse que en todos estos casos, solo se demuestran las evidencias clínicas sin dar una explicación clara de cuáles son los mecanismos que dan lugar a tales efectos.

En Clavo (2004) se realizó un estudio en pacientes masculinos con tumores avanzados en cabeza y cuello (H&N) tratados con radioterapia y quimioterapia. Los tumores se encontraron clasificados en la etapa IV, inoperables. En el estudio se dividieron los pacientes en dos grupos, el primero siguió un tratamiento de radioterapia/ozonoterapia y el segundo quimioterapia programada. La mezcla O_3-O_2 (grado clínico) se aplicó vía auto hemoterapia y por insuflación rectal, con una concentración de O_3-O_2 de 60 mg/L. Se encontró que la aplicación de ozono puede aumentar la oxigenación en los tumores hipóxicos H&N. Se demostró también que la ozonación en concentraciones apropiadas de ozono conduce a un estrés oxidativo transitorio que induce una regulación de antioxidantes en la circulación.

En Clavo (2004) se reporta un estudio que se llevó a cabo con 18 personas (14 con tumores en cabeza y cuello, 2 con tumores ginecológicos, 2 con metástasis en los huesos del pecho), a los cuales se les aplicó ozono vía auto hemoterapia 3 veces a la semana. El volumen de sangre utilizado fue de 200 mL y la concentración de O_3-O_2 de 60 mg/L. La oxigenación del tumor fue medida usando polarografía en 4 ocasiones: antes de iniciar la sesión 1, después de la sesión 1, 48 hrs antes de la sesión 2 y después de la sesión 3.

El efecto vascular de la sangre ozonada es explicado por el aumento de malondialdehído y peroxidación de lípidos por la activación de hexosa monofosfato con un aumento en la



producción de 2,3-difosfoglicerato en los eritrocitos. Se concluyó que la ozonación puede aumentar la oxigenación de los tumores hipóxicos.

En Vaupel (1991) estudiaron a 15 pacientes con cáncer de seno y a 5 pacientes con enfermedad fibroquística, ambos grupos sin tratamiento previo de quimioterapia o radiación, con el objetivo de analizar la influencia del oxígeno en el organismo en presencia de tumores. Para tener un seguimiento en la oxigenación del tejido se monitorearon algunos factores que determinaron la concentración de O_2 en sangre arterial, como la concentración de hemoglobina, hematocritos y saturación de oxihemoglobina arterial. Se observó que el valor promedio de pO_2 en mujeres sin cáncer fue de 65 mm Hg, mientras que en 15 mujeres con cáncer fue de 20 mm Hg, de las cuales 6 mostraron valores entre 0–2.5 mm Hg.

En Vaupel (1987) se realizó un estudio en ratas con injerto de células cancerígenas de mama, monitoreando el flujo de sangre al tumor, suministro de aire y caracterización de las células, oxigenación del tejido del tumor, suministro de nutrientes y el medio extracelular de las células tumorales. Estos factores son determinantes para obtener la cinética de crecimiento del tumor y la eficiencia de terapias no quirúrgicas como la radiación y quimioterapia. Con el objetivo de medir todo el oxígeno que es consumido por los injertos de cáncer de mama, se tomaron muestras de sangre arterial y de venas tumorales, además de medirse las presiones parciales de O_2 y CO_2 , pH, saturación de oxihemoglobina, contenido de O_2 , hematocritos, concentración de hemoglobina, etc. Se demostró que la velocidad de perfusión promedio en injertos con cáncer de seno disminuyó significativamente con el aumento de la masa del tumor, así mismo el consumo de oxígeno en los injertos disminuye con el aumento del tamaño del tumor.

En Lindenschmidt (1986) se trataron ratas aplicándoles dosis de uretano (1g/Kg). A un grupo lo expusieron a una atmósfera de 70% O_2 durante 16 semanas, encontrándose un promedio de 5 tumores por pulmón. Otro grupo de estudio fue expuesto a una atmósfera de aire, encontrándose un promedio de 20 tumores por pulmón. Así mismo, el tratamiento por hiperoxia no tiene influencia alguna sobre el tipo de tumor que se desarrolla.



En Schulz (2008) demostraron que por medio de aplicación de oxígeno-ozono (80 mL/Kg de peso corporal, cada mL contiene 50 μg de O_3) por insuflación peritoneal se logra la remisión de tumores cancerígenos primarios sin presentar efectos adversos relevantes en los análisis clínicos realizados en sangre. El estudio se llevó a cabo en 14 conejos con implantación de células escamosas cancerígenas de cuello y cabeza (H&N), de los cuales sobrevivieron 7 mostrándose en 6 de ellos la remisión total del tumor a los 90 días de tratamiento, aplicándolo cada tercer día. Como medio de comparación se utilizó insuflación solamente de oxígeno en 13 conejos de los cuales sobrevivieron 3 con una remisión total del tumor. Posterior a este tratamiento con $\text{O}_3\text{-O}_2$, los 6 conejos se separaron en dos grupos nuevamente, a los cuales se les inocularon nuevamente células cancerígenas de cuello y cabeza; sin embargo, al grupo 1 fue inmune-suprimido. A ambos grupos se les aplicó el mismo esquema de dosificación de $\text{O}_3\text{-O}_2$; el grupo al cual se inmunosuprimió se observó el crecimiento de 4-6 tumores, el grupo 2 por el contrario, no desarrolló ningún tumor en todo el periodo de observación que fue de 90 días.

En el estudio realizado por Kontorshchikova (2011) se observó el efecto de la solución salina ozonada sola y en combinación con doxorubicin (anti neoplásico) sobre una población de animales (5 grupos de ratas hembra con una población de 15 animales (250 ± 10 g)) con tumores de cáncer de mama (6-8 cm^3), cada grupo presentó las siguientes características:

- 1^{er} grupo: ratas con neoplasia sin algún tratamiento
- 2^{do} grupo: ratas con neoplasia, con tratamiento de 5 inyecciones intraperitoneales de doxorubicin (0.04 mg) cada segundo día
- 3^{er} grupo: ratas con neoplasia, con tratamientos de 6 inyecciones intraperitoneales de 0.04 mg de solución salina ozonada (Concentración de ozono 20 μg) cada segundo día.
- 4^{to} grupo: ratas con neoplasia, recibiendo 5 procedimientos intraperitoneales de doxorubicin y 6 inyecciones de solución salina ozonada.
- 5^{to} grupo: animales sanos (grupo de control)

En el primer grupo de animales se encontró que el tumor presentó una estructura sólida sin cambios morfológicos. En el segundo grupo al que se le administró dexametasona se presentaron



zonas de diversos tamaños con necrosis, distrofia irreversible en algunos sitios y daño en el núcleo de la célula, así como un incremento en la mitosis de células patológicas. En el tercer grupo se observó una disminución de las zonas necróticas comparadas con el segundo grupo, se mostraron indicios de daño en el estroma debido a la deshidratación y formación de una costra linfoide.

El cuarto grupo al cual se le aplicó un tratamiento combinado con doxorubicina y ozono, se observó una completa destrucción de las células del área afectada en comparación al grupo 1 y 3 y muy similar al grupo 2. No se encontraron diferencias relativas al número de células con forma irreversible de distrofia y destrucción del núcleo. Se registró una disminución significativa en el número de elementos con división mitótica y las células tumorales viables fueron constantes, comparado no solo con el primer y tercer grupo, así como con el segundo grupo. El estroma se encontró moderadamente endémico. El uso de la solución fisiológica ozonada potencializa la actividad antineoplástica de la doxorubicina, en la cual se observó una significativa inhibición de la actividad mitótica de las células tumorales.

En este punto se debe hacer énfasis en que el número de estudios en este campo de la aplicación de ozono es muy reducido y no presentan mayores conclusiones sobre los mecanismos y más aún sobre cuáles son las sustancias asociadas tanto a los aspectos negativos como positivos que fueron observados a nivel clínico.

El objetivo de ésta parte de la experimentación es explorar la posibilidad de usar la medición del ITL como método para caracterizar el efecto del ozono aplicado como terapia sobre un modelo murino con tumores inducidos de células C6 glioma de rata, para ello se consideran los resultados obtenidos en los capítulos anteriores, fijando la base de la experimentación para una adecuada dosificación.



Metodología

VI. 1.1 Esquema experimental

La Figura 25 muestra el esquema general de experimentación, en la cual se estudió el efecto de la dosificación de ozono disuelto en solución fisiológica de NaCl 0.9% (SF) sobre la morfología y progresión tumoral de la línea celular C6 en ratones atímicos desnudos (BALB/C NuNu; 6-8 cm) (ver Anexo VI y Anexo VII). Así mismo, se llevó a cabo el estudio de la ITL, con el objetivo de evaluar la variación que tiene este parámetro ante la presencia de oxígeno y la mezcla de oxígeno/ozono dentro de los animales de estudio (Anexo VIII).

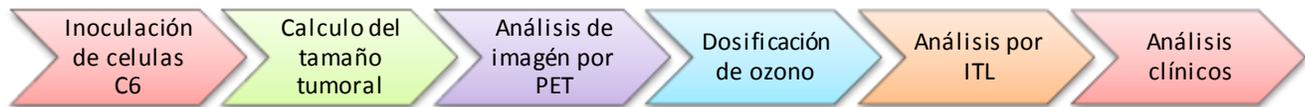


Figura 25 Esquema General de Experimentación en animales modelo

Se dosificaron 90 μ L de SF ozonada (concentración de ozono en fase gas de 4.6 mg/L) u oxigenada bajo los siguientes esquemas de experimentación.

- Grupo control: ratones inoculados sin tratamiento, n=2
- Grupo 1: ratones inoculados tratados con oxígeno cada 2 días, n=2
- Grupo 2: ratones inoculados tratados con ozono cada 2 días, n=5
- Grupo 3: ratones inoculados tratados con ozono cada 5 días, n=4

Este esquema de dosificación fue necesario para tomar en cuenta el efecto de la dosis de ozono suministrada al ratón, lo cual se traduce en un elemento importante para la evaluación del modelo propuesto.



Finalmente, se realizaron análisis clínicos como colesterol y triglicéridos totales los cuales dan una relación indirecta del efecto del ozono sobre el metabolismo de los ratones. Dichos elementos será utilizados como variables dentro de un modelo generalizado que estudie la dinámica de la actividad de las células tumorales (determinadas por imagenología) con relación a la dosificación de ozono y considerando la evaluación de posibles productos asociados a este reacción como los mencionados anteriormente.

VI. 1.2 Modelo murino

El estudio fue llevado a cabo en ratones atímicos femeninos (20-22 g), los cuales se mantuvieron en condiciones estériles y a temperatura constante (25°C), con una humedad del 60% y en periodos de luz y oscuridad de 12 horas respectivamente.

La inoculación de las células C6 glioma de rata se realizó con forme a la NOM 062-ZOO-199. Además de que el estudio fue avalado por el Comité de Ética y uso de animales del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zuribán. En base a esto, los tumores fueron inducidos por inyección subcutánea de células C6 ($1.5 \cdot 10^6$ células/ 10 μ L de solución fosfatada) suspendidas en 0.2 mL de solución buffer fosfatada. Cuando los tumores alcanzaron el tamaño y definición adecuados, se procedió a llevar a cabo el experimento.

VI. 1.3 Cálculo del tamaño tumoral

Para tener un seguimiento de la progresión tumoral, se llevó a cabo el cálculo del volumen del tumor de acuerdo a la ecuación (18):

$$\text{Volumen de tumor} = \frac{\varepsilon^2 \cdot l}{2} \quad (21)$$

En donde ε es el espesor y l es la longitud del tumor. Estas mediciones se tomaron diariamente desde el inicio al final del tratamiento. El tamaño del tumor puede considerarse también como



una variable del modelo aunque no necesariamente tendría una relación química fácilmente identificable.

VI. 1.4 Análisis de imagen por Tomografía de Emisión de Positrones (PET)

La tomografía de emisión de positrones es un método diagnóstico que permite evaluar la actividad metabólica de un grupo particular de células o tipo de tejido específico. En particular, para este estudio, se utilizó para determinar la actividad específica de las células tumorales C6 *in vivo* (dentro del modelo murino).

Por medio de la tomografía por emisión de positrones (PET) se puede obtener información cuantitativa, especial y funcional de los procesos biológicos directamente en el organismo vivo por medio de imágenes y radiofármacos PET (López-Durán, 2007). La metodología a seguir para la obtención de las imágenes en los sujetos de estudio fue la siguiente:

1. Se colocó al ratón dentro de una cámara con atmosfera de isoflurano - oxígeno (1:10) como anestesia general.
2. Se inyectó vía intraperitoneal 80 μ L de una dilución 1:4 de pentobarbital como anestesia.
3. Se inyectó vía intravenosa (vena de la cola) la dosis del radiofarmaco 18-FDG (2-[18F]-fluoro-2-desoxi-D-glucosa).
4. Se procedió a colocar al ratón dentro del microPET para la toma de la imagen.

VI. 1.5 Análisis clínicos en suero

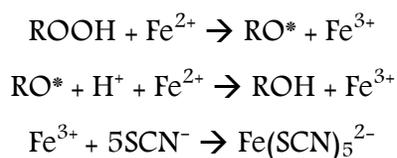
Basados en la premisa que la primera reacción que se lleva a cabo entre el sustrato biológico y el ozono es con los dobles enlaces de los lípidos y triglicéridos presentes en la muestra obtenida del organismo vivo, se decidió llevar a cabo la determinación de colesterol y triglicéridos totales presentes en el suero obtenido de los ratones atímicos de acuerdo a la metodología descrita en Anexo IX. En este punto se utilizan estas dos informaciones para definir la respuesta general de la



reacción de ozono con los compuestos del suero que son dependientes de la presencia y actividad de las células tumorales en el organismo.

VI.1.6 Determinación de hidroperóxidos totales

La cuantificación de la peroxidación de los lípidos es esencial para evaluar el daño oxidativo en enfermedades como el cáncer. La peroxidación de lípidos saturados e insaturados resulta en la formación de hidroperóxidos altamente reactivos e inestables. Tradicionalmente, la lipoperoxidación es cuantificada indirectamente por la medición de algunos compuestos, como lo son el malondialdehído, el 4-hidroxinonenal y la degradación de ácidos grasos poli insaturados. Sin embargo, por medio de un análisis colorimétrico es posible determinar la cantidad de hidroperóxidos directamente. El kit para la determinación de hidroperóxidos Cayman® utiliza una reacción redox con Fe^{2+} , debido a que los hidroperóxidos son altamente inestables y reaccionan rápidamente con el Fe^{2+} para formar Fe^{3+} de acuerdo al siguiente esquema:



Una vez que se ha formado el ión Fe^{3+} reacciona con el ión tiocianato usado como cromógeno, el cual se medirá por medio de Espectroscopia UV/VIS a una longitud de onda de 500 nm.

Resultados

VI.2.1 Dosificación del ozono en un modelo murino

Ésta etapa de experimentación involucra la inoculación de células C6 sobre ratones atímicos desnudos (sin la presencia de pelo). Se observó la evolución del tumor bajo los siguientes



esquemas de dosificación: SF ozonada cada dos días y cada cinco días; SF oxigenada cada dos días; así como el efecto del ozono sobre la morfología del tumor y la comparación de esto con la medición de la ITL correlacionándolo con diversos análisis clínicos, como lo es la determinación de colesterol y triglicéridos totales presentes en suero. Este último esquema experimental se utilizó para evidenciar el efecto de la interacción de las SF con oxígeno y oxígeno/ozono sobre el metabolismo de un sistema biológico.

VI.2.2 Evolución volumétrica del tumor

De acuerdo a la Figura 26 se observó que la presencia del ozono promueve el crecimiento del volumen del tumor con respecto al grupo control. Esto fue más evidente en la dosificación de ozono cada 2 días, en el cual se administraron en total 6.3×10^{-5} mmol, comparado con los 2.3×10^{-5} mmol del ozono administrados cada 5 días. Por el contrario, cuando se tuvo la dosificación de oxígeno, el volumen del tumor fue menor en comparación con el grupo control.

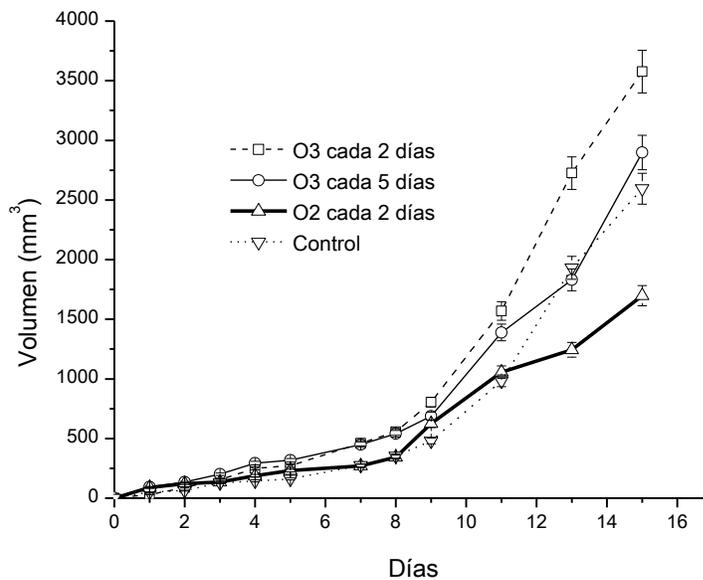


Figura 26 Evolución volumétrica del tumor.

Si bien es cierto que se observó un aumento en el volumen, no se observan indicios de vascularización del tumor. Incluso, en este caso se presentó necrosis lo que puede indicar de



manera indirecta la muerte de las células tumorales. Sin embargo, es importante relacionar todas estas observaciones físicas con un adecuado análisis de imagen que corrobore estos resultados.

Después de 15 días de dosificar el ozono y oxígeno disuelto se procedió a realizar la disección de los animales de estudio donde se obtuvieron muestras de sangre, tejido tumoral y diversos órganos para realizar los análisis químicos y clínicos. Para corroborar el efecto del oxígeno y el oxígeno/ozono y su dosificación sobre el metabolismo propio del ratón, se determinaron las variaciones de colesterol total y triglicéridos totales como indicadores directos del efecto oxidante de ambas SF.

VI.2.3 Determinación colesterol total y triglicéridos totales

De la muestra de sangre que se obtuvo de los ratones, se separó el suero del paquete globular por medio de centrifugación para posteriormente determinar colesterol y triglicéridos totales del suero. En la Figura 27 se puede observar que la presencia de un agente oxidante disminuyen los niveles de colesterol y triglicéridos totales presentes en el suero comparado con los valores del grupo control.

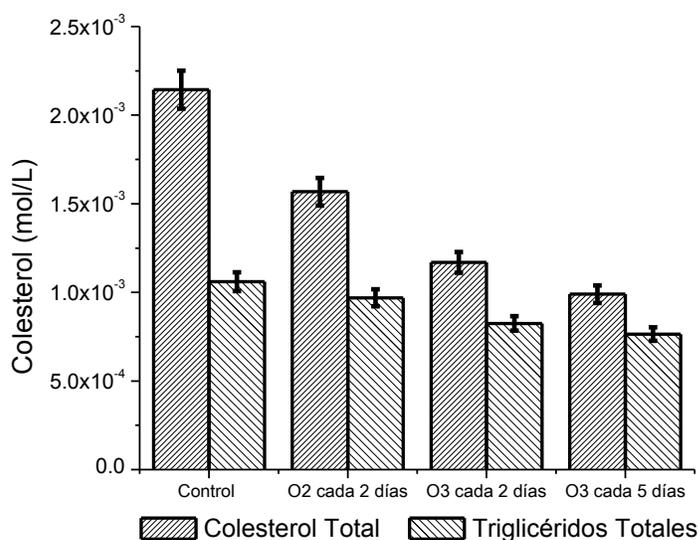


Figura 27 Efecto de agente oxidante sobre contenido de colesterol y triglicéridos totales.



Lo anterior es más evidente cuando se tiene la presencia del ozono dosificado cada 5 días (54%). Esto se puede atribuir a que cuando se tiene un periodo mayor entre una aplicación de ozono y otra, se da lugar a que el ozono tenga un efecto acumulado sobre el metabolismo celular.

Por otra parte, se observa que los niveles de triglicéridos disminuyen un 32% que es no tan significativo comparado con los de colesterol. De esta manera, comparando los resultados de evolución volumétrica y morfológica del tumor, se puede observar que no precisamente el hecho de tener dosificaciones de ozono en periodos de tiempo menor (cada 2 días), significa que se tendrá una mejor respuesta bioquímica comparado con en el caso de dosificación del ozono cada cinco días.

VI.2.4 Análisis de ITL en suero y paquete globular

Para correlacionar las variaciones del volumen del tumor, las variaciones de las fracciones de lípidos observados en suero y los cambios de la concentración de sitios reactivos al ozono, se determinó la variación de la ITL en las muestras tanto de suero como del paquete globular obtenidas de muestras de sangre de los ratones.

La Figura 28 muestra los resultados del DB-índice obtenidos para la fracción del suero y paquete globular de la muestra sanguínea de los ratones del grupo de control y tratados con SF ozonada (cada 2 y 5 días), SF oxigenada (cada 2 días). Como se puede observar, el valor del DB_{pl} -índice no tuvo variaciones estadísticamente significativas en presencia de ozono comparado con el grupo control. Esto quiere decir que no hay cambios en la disponibilidad de dobles enlaces en suero, como lo son los fosfolípidos, triglicéridos, ácidos grasos libres, etc.

Los resultados anteriores se encuentran relacionados con la forma en la que se desarrolla el tejido tumoral, ya que bajo la aplicación del ozono éste presenta una evolución volumétrica y vascularización mayor comparada con los controles y el grupo tratados con oxígeno. Al ocurrir



esto, el tumor necesita mayor cantidad de nutrientes para seguir su acelerado metabolismo celular, esto se ve reflejado precisamente en el aumento en los valores del DB_{pl} -índex.

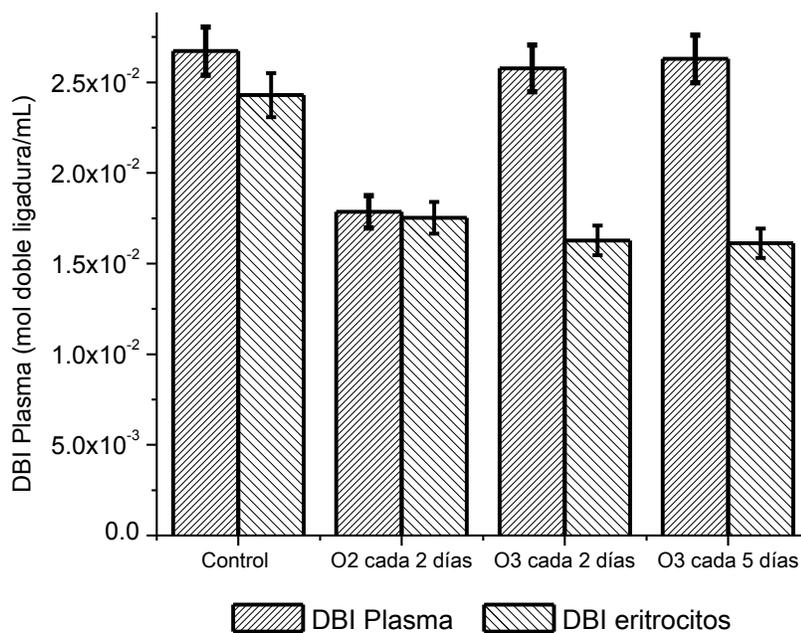


Figura 28 DB-índex plasmático y en eritrocitos

Por otra parte, si se analizan los valores del DB_{cel} -índex en el paquete globular (eritrocitos, leucocitos, plaquetas), se puede observar que si existe una disminución comparado con el grupo control. Así mismo, los resultados de DB-índex con respecto a la dosificación de oxígeno solamente están relacionados con el tamaño final que presentó el tumor, ya que el volumen tumoral fue menor en este grupo comparado con el del grupo control y del grupo tratado con ozono.

VI.2.5 Análisis de ITL en muestras de riñón, hígado y tumor

El análisis del ITL en muestras de riñón, hígado y tumor se llevó a cabo de manera complementaria para observar el efecto del agente oxidante en el organismo. Como se observa en la Figura 29 los valores del ITL disminuyen un 98% en las muestras de tejido tumoral cuando se dosificó ozono cada 5 días, comparado con el grupo control. Esto puede deberse a que la presencia del ozono generó un mayor grado de estrés oxidativo, entre otras sustancias que



inhibieron el metabolismo de la célula tumoral. De acuerdo a algunas investigaciones anteriores, la presencia de éste tipo de células inhiben la presencia de la enzima TIGAR, que es la que mantiene bajos los niveles de ROS; sin embargo, la presencia del ozono promueve la producción de ROS produciendo la muerte de las células (Salganik, 2001).

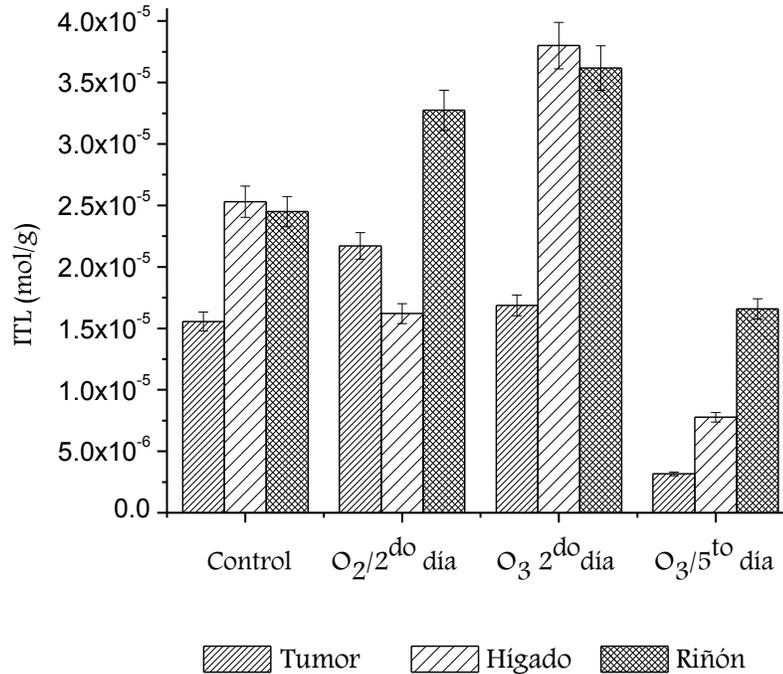


Figura 29 Variación del ITL de muestras de tejido bajo diferentes esquemas de dosificación

Por otro lado, en los sistemas en los que el ozono es inyectado cada segundo día, no se observó una variación estadísticamente significativa, debido a que el metabolismo celular no se vio afectado bajo estas condiciones experimentales. Por otra parte, en los sistemas en los que se utilizó solamente oxígeno, el valor de la ITL de la muestra de tumor aumentó un 33% con respecto al grupo control. Esto puede deberse a que las células estuvieron sobre expuestas a ciertos compuestos que promueven la proliferación celular debido a la presencia del oxígeno (Salganik, 2001) (Kontorshchikova, 2011).

Cuando se suministra oxígeno puro, los valores de ITL en el hígado disminuyeron un 40% comparado con el grupo control, debido al incremento en el consumo energético causado por la disminución del volumen del tumor. Sin embargo, la acumulación de ácidos grasos, fosfolípidos y



colesterol se vio inhibida (Koolman, 2004). Por otra parte, la generación de glucosa se ve estimulada por el metabolismo celular causada por la presencia del ozono cada segundo día, debido a que se observó un incremento del 33% en los valores del ITL. Debido a que el volumen tumoral en éste grupo fue el mayor, el organismo necesita producir una cantidad mayor de ácidos grasos como fuente de energía para que el tumor siga creciendo. Esto puede ser asociado con la presencia de ácido linoleico conjugado, ya que ha sido detectado en muestras de hígado cuando se tiene algún tipo de terapia para el tratamiento del cáncer (Seong-Ho, 2005).

Así mismo, los valores del ITL disminuyen un 50% en el grupo en el cual se dosificó ozono cada 5 días, a pesar de que no hay una variación significativa en el volumen del tumor, la producción de ácidos grasos y su acumulación en el hígado fueron menores debido al proceso de muerte celular.

Por otra parte, las muestras de riñón mostraron un comportamiento similar a los resultados obtenidos en las muestras de hígado. Sin embargo, las variaciones entre el oxígeno y ozono no fueron tan significantes. Esto puede ser explicado debido a la relación indirecta entre el riñón y el metabolismo del organismo en presencia del tumor.

VI.2.6 Determinación de hidroperóxidos en muestras de tumor y su correlación con ITL

Además del análisis del ITL en muestras de órganos, se realizó la comparación y correlación de éste parámetro con la determinación de hidroperóxidos. La Figura 30 muestra la cuantificación de los hidroperóxidos en las muestras de tejido tumoral, éste resultado confirma la hipótesis sobre una relación inversa entre éstos y el ITL. Cuando el metabolismo del tumor fue menor, el valor del ITL disminuyó debido a la baja disponibilidad de dobles enlaces en el sustrato orgánico, debido a que éstos fueron oxidados para formar hidroperóxidos, es por ello que su concentración aumenta, esto puede verse mejor ejemplificado en el grupo al que se le suministró ozono cada 5 días.

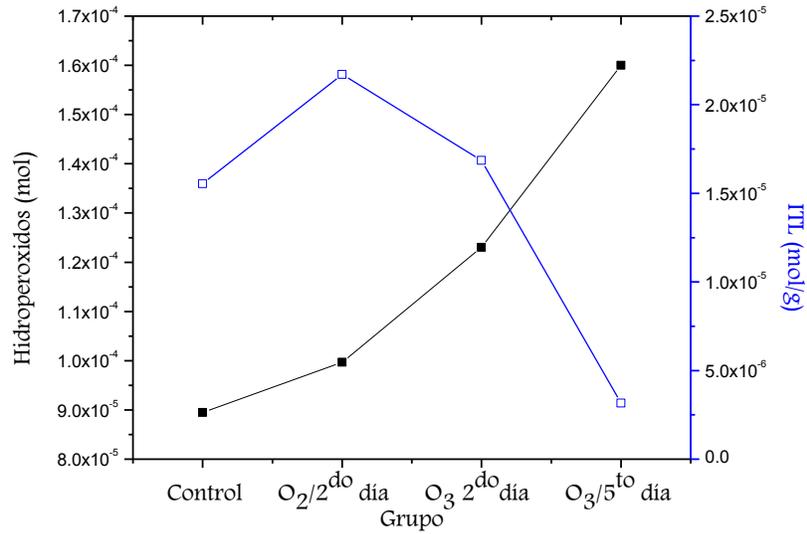


Figura 30 Correlación entre el ITL y la cuantificación de hidroperoxidos para muestras de tumor bajo diferentes esquemas de dosificación (■- Hidroperoxidos; □- ITL)

VI.2.7 Determinación de actividad tumoral por medio de análisis de imagen por microPET y su correlación con el ITL

La Figura 31 muestra un ejemplo de las imágenes obtenidas por microPET, mostrando la señal de la ^{18}F FDG en el cuerpo del ratón.

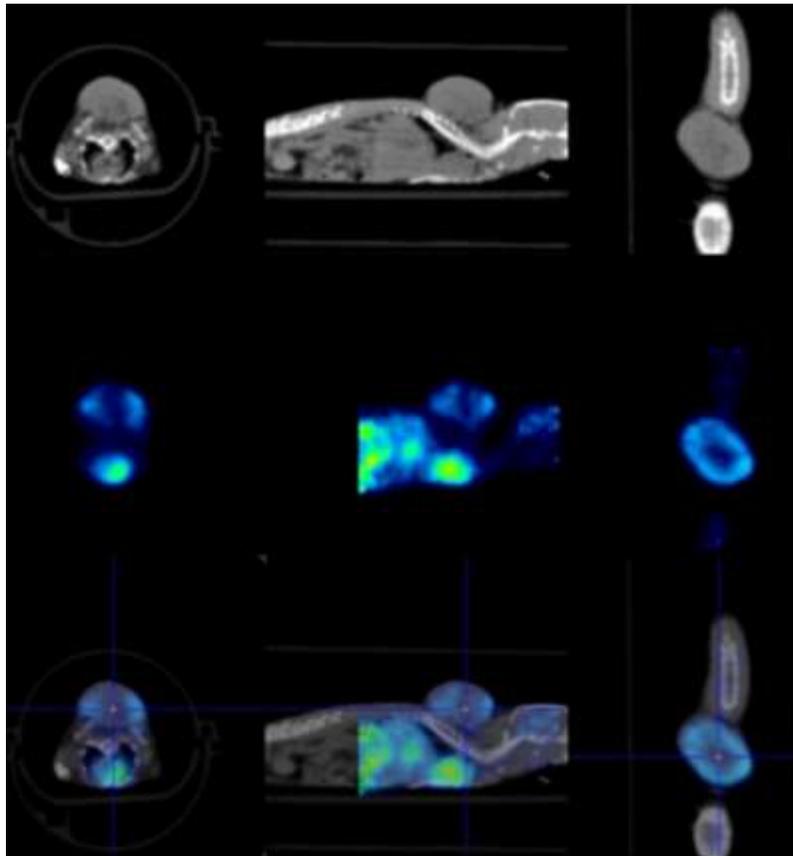


Figura 31 Ejemplo de imagen obtenida por microPET para una dosificación de ozono cada 5 días

Las zonas específicas en las que se encuentra mayor actividad tumoral se representan en color rojo mostradas en la Figura 32b, las cuales se correlacionan con los valores obtenidos en la determinación del ITL, siendo significativamente mayor comparada con el grupo control (Figura 32a).

Por otro lado, las zonas en azul son las regiones con baja o nula actividad celular, representadas por las Figura 32 c y d, correspondientes a los grupos dosificados con ozono cada 2 y 5 días, respectivamente. Estas tendencias de actividad tumoral se correlacionan con los valores obtenidos en el ITL, observándose una disminución del 80% en éste parámetro cuando se dosificó el ozono cada 5 días.

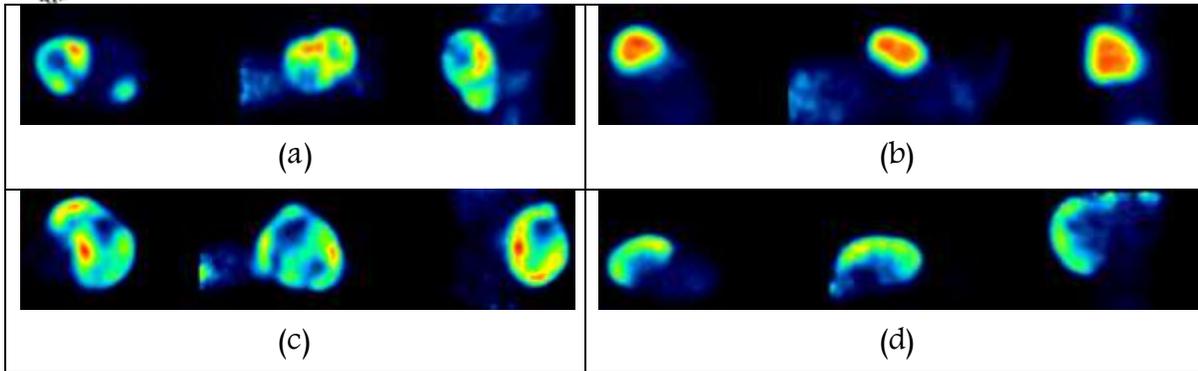


Figura 32 Medición de la actividad tumoral por medio de microPET, bajo diferentes esquemas de dosificación. (a) grupo control, (b) oxígeno cada 2 días, (c) ozono cada 2 días, (d) ozono cada 5 días

Todos éstos resultados confirman las observaciones hechas por la determinación del ITL. De cierta forma, se puede concluir que el ITL puede ser usado para caracterizar la dosificación de ozono sobre el crecimiento del tumor. Así mismo, no se necesita aumentar la dosificación de ozono para tener un mejor efecto en la actividad tumoral. Se llevó a cabo una relación entre las zonas rojas (de mayor actividad) con respecto al resto del cuerpo del ratón, de ésta forma se puede comparar de forma adecuada la actividad tumoral de cada grupo. La Figura 33 muestra el comportamiento del ITL con respecto a la actividad celular normalizada, de ésta forma cuando la actividad fue menor, el valor del ITL fue menor también.

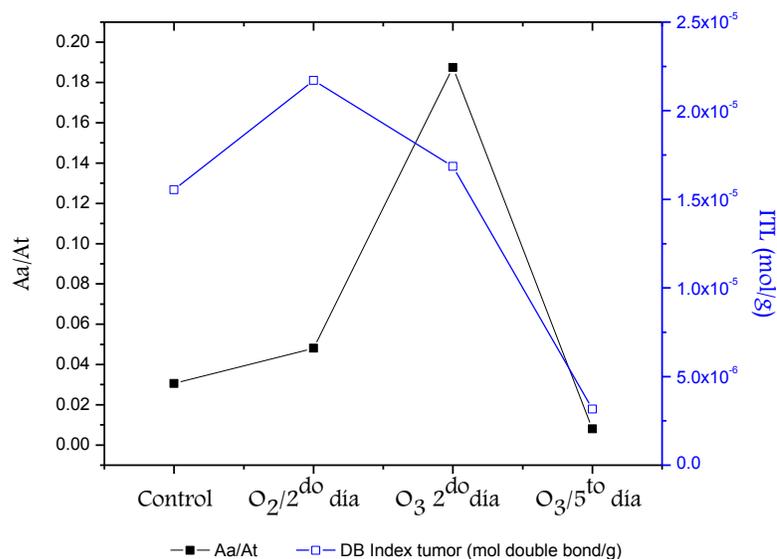


Figura 33 Correlación entre el ITL de muestras de tumor y la actividad tumoral (■- Hidroperoxidos; □- ITL)

Conclusiones

Los tumores gliales constituyen un grupo tumores comunes dentro del tipo intracraniales, tienen una evolución rápida y son muy resistentes a las terapias convencionales como la quimioterapia, radioterapia e incluso la cirugía. Ésta clase de tumores se distinguen de otros debido a que presentan una rápida reproducción celular, generando venas a su alrededor para proveerlo de nutrientes ocasionando un crecimiento acelerado del tumor, lo que puede causar a su vez obstrucciones vasculares que originan la muerte del mismo.

Cuando el tumor está sometido a un estrés oxidativo continuo inducido por la presencia de cualquier agente oxidante, en éste caso por la inyección del ozono, se origina una producción constante de ROS. Además de la estimulación de la generación de venas hacia el tumor, ocurre la adhesión de algunas integrinas ($\alpha_5\beta_3$ y $\alpha_5\beta_5$) que incrementan la proliferación celular (Onishi, 2011) (Zheng, 2007) (Kargiotis, 2006).



Todos estos factores antes descritos pueden explicar porque el volumen del tumor aumenta cuando hay mayor presencia de ozono en el organismo del ratón. Sin embargo, al mismo tiempo, se lleva a cabo la muerte de las células que integran al tumor.

La cuantificación del ITL mostró ser un indicador adecuado para evaluar el efecto del ozono sobre la dinámica de crecimiento de células tumorales, ya que muestra una relación directa con la cuantificación de hidroperóxidos y la actividad tumoral por análisis de imagen por microPET. Así mismo se observó el efecto que tiene la dosificación de ozono disuelto sobre la evolución del tumor, como resultado principal se obtuvo que a bajas dosis de ozono (cada 5 días) se tiene un mayor efecto en la inactividad de las células, disminuyendo su reproducción y por ende el valor del ITL se redujo en comparación con los otros grupos. Este efecto depende del tipo y estadio de la enfermedad, ya que se ha reportado que la aplicación de ozono reduce el tamaño de ciertos tumores (Schulz, 2008). En ésta investigación se observó que si bien el ozono tuvo un efecto positivo con respecto a la actividad del tumor cuantificado por microPET y determinación de ITL, el crecimiento volumétrico del tumor fue desmesurado.



Conclusiones generales

En éste trabajo, se demostró que por medio de un simple, pero efectivo análisis llamado Índice de Dobles Ligaduras (DB-Index) es posible controlar la dosificación del ozono sin causar algún daño en el sustrato biológico expuesto al agente oxidante. Éste análisis está basado en fundamentos químicamente establecidos de la reacción entre el ozono y los enlaces $>C=C<$ que forman la estructura lipídica de la cual todas las células están constituidas.

Por medio del estudio de una estructura celular simple como lo son los microorganismos se tuvo un panorama general de cómo actúa el ozono sobre la membrana lipídica de las células, obteniéndose que a bajas concentraciones se tiene un menor daño celular, relacionando la obtención de la cantidad de unidades formadoras de colonias (UFC) y los valores de ITL en cada grupo. Esto permitió establecer un esquema general de experimentación para las posteriores etapas que involucraron células de origen animal.

En la tercera etapa de experimentación se utilizó un cultivo de células tumorales C6 glioma de rata, en el cual se observó que a bajas concentraciones de ozono (4.6 mg/L en fase gas) disuelto en la solución fisiológica de NaCl (0.9%) se tiene una mayor proliferación celular, la cual fue medida por medio de la cuantificación de ADN. Esta información se correlacionó con el valor de la ITL, observándose que el ozono incrementa el metabolismo celular provocando el incremento de la curva de crecimiento celular. Lo anterior fue más evidente en el grupo al cual hubo mayor tiempo de reposo entre dosificación y dosificación de ozono.

En base a éstos resultados, se planteó el esquema de experimentación para la etapa cuatro que involucra un modelo murino implantado con células tumorales C6 glioma de rata, dosificado con ozono disuelto a la misma concentración de la etapa tres vía intraperitoneal, observándose que en éstos grupos el volumen del tumor se incrementó en un 50% con respecto al grupo



control, sin embargo por medio del análisis de microPET, el cual evalúa la actividad celular, se observó que en éstos grupos presentó menor actividad con respecto al grupo control. Sin embargo, un punto importante que se observó es que al grupo al cual se le dosificó el ozono cada 5 días se tuvo una reducción de la actividad celular en un 90% con respecto al control, y al grupo que se dosificó cada 2 días éste valor no fue tan representativo en comparación al grupo control. Éstos valores fueron relacionados con la determinación de la cantidad de hidroperóxidos, determinación de colesterol y triglicéridos totales, y la obtención del ITL para muestras de sangre y tejido tumoral, las cuales mostraron un comportamiento similar al de la actividad celular para el grupo al que se le dosifico ozono cada 5 días.

De acuerdo a los resultados obtenidos en las tres etapas de experimentación que involucran la exposición del ozono a un sustrato biológico, se pudo observar que para obtener mejores resultados en cuanto a efectos positivos en un organismo vivo (en este caso, disminución de la actividad tumoral) no es necesario dosificar de manera continua al individuo, es necesario tener tiempos prolongados entre una dosis y otra, de tal manera que le permitan a los organismos restablecer el balance entre los agentes oxidantes y el sistema antioxidante, ya que de ésta manera, se puede estimular una cascada de reacciones bioquímicas que permitan tener los efectos clínicos esperados.



Recomendaciones

Los resultados obtenidos en el presente trabajo muestran un panorama general del efecto del ozono sobre un organismo vivo, dando como principales contribuciones que no es necesario realizar dosificaciones en tiempos cortos, obteniéndose mejores resultados cuando se deja al organismo estabilizar el desbalance sufrido por los agentes oxidantes. Así mismo, que a concentraciones bajas de ozono en fase gas (en éste caso 4.6 mg/L) se tiene un daño celular bajo lo cual permite tener un efecto positivo dentro del organismo. Finalmente, el uso de la determinación del ITL en muestras biológicas puede servir como método de control en cuanto a las terapias que involucran agentes oxidantes.

Sin embargo, es necesario realizar análisis que involucren un estudio más detallado de cómo es que el ozono tiene los efectos sinérgicos descritos en la tesis, los cuales son:

1. Establecer las posibles reacciones que se lleven a cabo entre el ozono y fluidos biológicos que den un esquema general de que compuestos se forman y cómo influyen en el organismo, por medio de métodos analíticos como HPLC, CG/M, PCR, etc., para una población sana.
2. Una vez que se tenga la información obtenida en el punto anterior, volver a realizar los mismos estudios pero realizando las siguientes variaciones:
 - Diferentes enfermedades (cáncer, diabetes, VIH, VPH y sus variaciones)
 - Diferentes estadios de la enfermedad
 - En grupos con tratamientos alópatas y homeópatas.
 - En grupos con tratamientos que involucren agentes oxidantes como el ozono.
 - La combinación de los últimos dos puntos.



3. En relación a la determinación del ITL, establecer una norma para una población mexicana sana, lo cual permitiría su aplicación como parámetro de control en el área médica en cualquier tipo de terapia.



Bibliografía

1. **AEPROMO** Madrid Declaration on Ozone Therapy [Conference] // International Meeting of Ozone Therapy Schools. – Madrid, España.: Spanish Association of Medical Professionals in Ozone Therapy (AEPROMO), 2010.
2. **Albano E., Bellomo, G., Parola, M., Carini, R., Dianzani, MU.** Stimulation of lipid peroxidation increases the intracellular calcium content of isolated hepatocytes [Journal] // *Biochimica and Biophysica Acta.* – 1991. – 1091. – pp. 310-316.
3. **Altman Nathaniel** Ozone : life - threatening pollutant or powerful healing agent? [Journal] // *FAST, Bio-Oxidative therapies: Oxygen, Ozone and H2O2.* – 1990. – pp. 3-12.
4. **Ames B.N., Shigenaga, M.K., Hagen, T.M.** Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. [Journal] // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 1993. – pp. 7915-22.
5. **An Yan-li., Nie, Fang., Wang, Zi-yu., Zhang, Dong-sheng** Preparation and characterization of realgar nanoparticles and their inhibitory effect on rat glioma cells [Journal] // *International Journal of Nanomedicine.* – China : [s.n.], 2011. – Vol. 6. – pp. 3187-3194.
6. **Andreyev AY., Kushnareva, YE., Starkov, AA.** Mitochondrial metabolism of reactive oxygen species [Journal] // *Biochemistry.* – 2005. – 70. – pp. 200-214.
7. **Arhipov A Y U [et al.]** Spectrophotometer [Patent] : 2273004. – March 2006.
8. **Arhipov A.YU Grinevich T.V, Poznyak T.I, Kiseleva E.V, Garcia J.A** Arhipov A.YU., Grinevich T.V., Poznyak T.I., Kiseleva E.V., Garcia J.A., SPECTROPHOTOMETER. RU 2273004 C1, 27/03/2006. 3. Sergeev V.M., Burkin I. A., Levin A.B., Poznyak T. I. et. al., , No. (). [Patent] : 1500943. – USSR, 2006.
9. **Arhipov A.YU Grinevich T.V, Poznyak T.I, Kiseleva E.V, Garcia J.A** Arhipov A.YU., Grinevich T.V., Poznyak T.I., Kiseleva E.V., Garcia J.A., SPECTROPHOTOMETER. RU



- 2273004 C1, 27/03/2006. 3. Sergeev V.M., Burkin I. A., Levin A.B., Poznyak T. I. et. al., No. (). [Patent] : 1500943. – USSR, 1989.
10. **Bacon BR., O'Neil, R., Britton, RS** Hepatic mitochondrial energy production in rats with chronic iron overload [Journal] // *Gastroenterology*. – 1993. – 105. – pp. 1134–1140.
 11. **Bocci Alvaro Velio** Ozone : A new medical drug [Book]. – Siena, Italia : Springer, 2005.
 12. **Bocci Alvaro Velio** Scientific and medical aspects of ozone therapy: state of the art [Journal]. – 2006. – Vol. 37. – pp. 425–435.
 13. **Bocci Velio** Ozone, a new medical drug [Book]. – Siena, Italia : Springer, 2005. – pp. 1–3.
 14. **Brajnikov E M [et al.]** Device for the determination of organic compounds unsaturation [Patent] : 882307. – 1979.
 15. **Brajnikov E.M. V.M. Brajnikov, D.M. Lisitsyn, and T.I. Poznyak**, “Device for Determination of Organic Compounds Unsaturation” [Journal]. – 1979.
 16. **Byron K. Murray *, Seiga Ohmine, David P. Tomer, Kendal J. Jensen. Jensen, F. Brent Johnson, Jorma J. Kirsi, Richard A. Robison, Kim L. O'Neill** Virion disruption by ozone-mediated reactive oxygen species [Journal] // *Journal of Virological Methods*. – 2008. – pp. 74–77.
 17. **Cadogan J.I.G.** Principles of free radical chemistry [Conference] // The chemical society. – London : [s.n.], 1973.
 18. **Caruso Gerardo., Caffo, Mariella., Alafaci, Concetta., Raudino, Giuseppe., Cafarella, Daniele., Lucerna, Sebastiano., Salpietro, M Francesco., Tomasello, Francesco.** Could nanoparticle systems have a role in the treatment of cerebral gliomas? [Journal] // *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*. – Messina, Italia : [s.n.], 2011. – Vol. 7. – p. 744.752.
 19. **Castillo R., López, A.** Algunas consideraciones y experiencias sobre el uso del ratón atómico como modelo experimental [Journal] // *Interferón y Biotecnología*. – Cuba : [s.n.], 1988. – 3 : Vol. 5. – pp. 291–296.
 20. **Center University of Maryland Medical**
http://www.umm.edu/esp_ency/article/001289trt.htm [Online]. – 02 16, 2012.



21. **Chekaniazar Saeid** A Modified Method of Folch to Facilitate the Analysis Procedure of Tissue [Journal] // Journal of Applied Environmental and Biological Sciences. – Iran : [s.n.], 2011. – 1 : Vol. 12. – pp. 716-721.
22. **Chiang P.C., Chang, E.E., Chang, P.C., Huang, C.P.** Effects of pre ozonation on the removal of THM precursors by coagulation [Journal] // Science Total Environmental. – 2009. – 21 : Vol. 407. – pp. 5735-5742.
23. **Clavo Bernardino** Adjuvant ozonotherapy in advanced head and neck tumors: a comparative study [Journal] // Evidence based complementary and alternative medicine. – 2004. – pp. 1(3)321-325.
24. **Clavo Bernardino** Ozone Therapy for Tumor Oxygenation: a Pilot Study [Journal] // Evidence-based Complementary and Alternative Medicine. – 2004. – pp. 1(1)93-98.
25. **Conklin A. Kenneth** Dietary Polyunsaturated Fatty Acids: Impact on Cancer Chemotherapy and Radiation [Journal] // Essential Fatty Acids/Cancer. – Los Angeles CA, USA : [s.n.], 2002. – 1 : Vol. 7. – pp. 4-21.
26. **Couri S., Mercés, E. P., Neves, B. C., Senna, L. F.** Digital image processing as a tool to monitor biomass growth in *Aspergillus niger* 3T5B8 solid-state fermentation: preliminary results [Journal] // Journal of Microscopy. – 2006. – 3 : Vol. 224. – pp. 290-297.
27. **Cultek** Cultek [Online]. – Mayo 11, 2012. – http://www.cultek.com/inf/otros/soluciones/celulas%20madre/celulas_madre_tecnicas.pdf.
28. **Dow S.M., Barbeau, B., Gunten, von U., Chandrakanth, M., Amy, G., Hernandez, M.** The impact of selected water quality parameters on the inactivation of *Bacillus subtilis* spores by monochloramine and ozone [Journal] // Water Research. – 2006. – 2 : Vol. 40. – pp. 373-382.
29. **Driedger Amy. Staub, Erno. Pinkernell, Ulrich. Mariñas, Benito. Wolfgang, Koster. Urs, von Gunten** Inactivation of *bacillus subtilis* spores and formation of bromate during ozonation [Journal] // Water Research. – 2001. – 12 : Vol. 35. – pp. 2950-2960.
30. **Ershov B.G., Morozov, P.A.** The kinetics of ozone decomposition in water, the influence of pH and temperature [Journal] // Russian Journal of Physical Chemistry. – 2009. – 8 : Vol. 83. – pp. 1295-1299.



31. **Escobar Alfonso** Gliomas y angiogenesis [Journal] // Revista Mexicana de Neurociencia . - México, D.F : [s.n.], 2002. - 1 : Vol. 3. - pp. 21-24.
32. **Fariss MW., Chan, CB., Patel M., Van Houten, B., Orrenius, S.** Role of mitochondria in toxic oxidative stress [Journal] // Molecular Interventions. - 2005. - 5. - pp. 98-114.
33. **Garófano G.J. R., Venancio, C. G., Suazo, C. A. T., Almeida, P. I. F.** Application of the wavelet image analysis technique to monitor cell concentration in bioprocesses [Journal] // Brazilian Journal of Chemical Engineering. - 2005. - 4 : Vol. 22.
34. **Gregorio Martínez-Sánchez Saied M. Al-Dalain, Silvia Menéndez, Lamberto Re, Attilia Giuliani, Eduardo Candelario-Jalil, Hector Álvarez, José Ignacio Fernández-Montequín, Olga Sonia León** Therapeutic efficacy of ozone in patients with diabetic foot [Journal] // European Journal of Pharmacology. - 2005. - pp. 151-161.
35. **Grobben Bert., De Deyn, Peter Paul., Selegers, Herman.** Rat C6 glioma as experimental model system for the study of glioblastoma growth and invasion [Journal] // Cell Tissue Res. - 2002. - Vol. 310. - pp. 257-270.
36. **Harman Denham** A Theory Based on Free Radical and Radiation Chemistry [Journal] // Journal of Gerontol. - 1957. - pp. 298-300 .
37. **Hernandez Frank Antonio** To what extent does ozone therapy need a real biochemical control system? assessment and importance of oxidative stress [Journal] // Archives of medical research. - 2007. - Vol. 38. - pp. 571-578.
38. **Hernandez Frank., Menendez, Silvia., Wong, Rolando.** Decrease of blood cholesterol and stimulation of antioxidative response in cardiopathy patients treated with endovenous ozone therapy [Journal] // Free Radical Biology and Medicine. - Havana, Cuba. : [s.n.], 1995. - 1 : Vol. 19. - pp. 115-119.
39. **Hunt N.K., Marinas, B.J.** Kinetics of Escherichia coli inactivation with ozone [Journal] // Water Research. - 1997. - 31. - pp. 1355-1362.
40. **Jensen Svend J. Knak** Oxidative stress and free radicals [Journal] // Journal of molecular structure. - 2003. - pp. 387-392.
41. **Kargiotis O., Rao, J.S., Kyritsis, A.P.** Mechanisms of angiogenesis in gliomas [Journal] // Journal of Neuro-Oncology. - 2006. - Vol. 78. - pp. 281-293.



42. **Khadre M.A., Yousef, A.E., Kim, J.G.** Microbiological aspects of ozone. Applications in food: a review [Journal] // Concise Reviews in Food Science. – 2001. – 9 : Vol. 66. – pp. 1242–1252.
43. **Kim J.G., Yousef, A.E., Dave, S.** Application of ozone for enhancing the microbiological safety and quality of foods: a review [Journal] // Journal of Food Protection. – 1999. – 62 : Vol. 9. – pp. 1071–1087.
44. **Kogarco I.N. Poznyak T.I., Kiseleva E.V. et. al.** Lymphocyte and Blood Plasma Lipid Unsaturation Investigation in Hemoblastosis [Journal] // Journal of Experimental Oncology. – 1991. – pp. 1:48–51.
45. **Kontorshchikova C.N. [et al.]** Comparative analysis of the effect of small dozes of ozone and doxorubicin on the therapeutic pathomorphism of an experimental tumor [Conference] // IOA IUVA World Congress & Exhibition. – Paris, France : [s.n.], 2011.
46. **Kontorshchikova C.N., Alyasova, A.V., Shakhov, B.E., Terentiev, I.G., Tzybusov, Kuznetzov, S.N., Sazanov, S.S.** Comparative analysis of the effect of small dozes of ozone and doxorubicin on the therapeutic pathomorphism of an experimental tumor [Conference] // IOA IUVA World Congress & Exhibition. – Paris, France : [s.n.], 2011.
47. **Koolman Jan. and Röhm Klaus–Heinrich** Bioquímica: texto y atlas [Book]. – España : Editorial Médica Panamericana, 2004.
48. **Koolman Jan., Röhm, Klaus–Heinrich** Bioquímica: texto y atlas [Book]. – España : Editorial Médica Panamericana, 2004.
49. **Kyriasis A.P., Kyriazis, A.A., McCombs, W.B., Kereiakes, J.A.** Biological behaviors of human malignant tumors grown in the nude mouse [Journal] // Cancer Research. – 1981. – Vol. 41. – pp. 3995–4000.
50. **Langlais Bruno., Reckhow, A. David., Brink, R. Deborah** Ozone in water treatment application and engineering [Book Section] / ed. Association American Water Works. – [s.l.] : Cooperative Research Report, 2006.
51. **Larson Matthew A. Mariñas, Benito J.** Inactivation of *Bacillus subtilis* spores with ozone and monochloramine [Journal] // Water Research. – U.S.A : [s.n.], 2003. – 4 : Vol. 37. – pp. 833–844.



52. **López-Durán Fred Alonso., Romo Zamora, Efraín., Alonso Morales, José Luis., Mendoza Vasquez, Guillermo** Tomografía por Emisión de Positrones. Los nuevos paradigmas [Journal] // Tip Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas. - Mexico : [s.n.], 2007. - 1 : Vol. 10. - pp. 26-35.
53. **Madeo F., Frohlich, E., Ligr, M** Oxygen stress: a regulator of apoptosis in yeast [Journal] // Journal of Cell Biology. - 1999. - 145. - pp. 757-767.
54. **Manson Jones, Morris** Cell biology and genetics [Book Section]. - España : Elsevier, 2003.
55. **Matthias Rath M.D.** Cancer [Journal] // Cellular Health Series. - 2001. - pp. 27-36.
56. **McMurry John** Química Organica [Book]. - [s.l.] : CENGAGE Learning, 2008. - p. 139.
57. **Monje-Ramirez I., Orta de Velasquez, M.T.** Removal and transformation of recalcitrant organic matter from stabilized saline landfill leachates by coagulation-ozonation coupling processes [Journal] // Water Research. - 2004. - 9 : Vol. 38. - pp. 2359-2367.
58. **Noreen Razia., Moenner, Michel., Hwu, Yeukuang., Petibois, Cyril** FTIR spectro-imaging of collagens for characterization and grading of gliomas [Journal] // Biotechnology Advances. - France : [s.n.], 2012. - pp. 1-15.
59. **Ntampou X., Zouboulis, A.I., Samaras, P.** Appropriate combination of physico-chemical methods (coagulation/flocculation and ozonation) for the efficient treatment of landfill leachates [Journal] // Chemosphere. - 2006. - 5 : Vol. 62. - pp. 722-730.
60. **Okezie I. Aruoma** Free Radicals, Oxidative Stress, and Antioxidants in Human Health and Disease [Journal] // OICA International. - Great Britain : [s.n.], 1998. - 2 : Vol. 75. - pp. 199-212.
61. **Onishi Manabu., Ichikawa, Tomotsugu** Angiogenesis and invasion in glioma [Journal] // Brain Tumor Pathology. - 2011. - DOI 10.1007/S10014-010-0007-Z.
62. **Onishi Manabu., Ichikawa, Tomotsugu., Kurozumi, Kazuhiko., Date, Isao.** Angiogenesis and invasion in glioma [Journal] // Brain Tumor Pathology. - Japan : [s.n.], 2011. - Vol. 28. - pp. 13-24.
63. **Ott Martin., Gogvadze, Vladimir., Orrenius, Sten.** Mitochondria, oxidative stress and cell death [Journal] // Apoptosis. - 2007. - Vol. 12. - pp. 913-922.



64. **Poznyak T I, Kiseleva E V and Turkina T I** Distribution of the total insaturation in lipids components of plasma as a new differential diagnostic method in clinical analysis [Journal] // Journal of Chromatographic. - 1997. - Vol. 777. - pp. 47-50.
65. **Poznyak T. I. Kiseleva E. V., and, Turkina T. I.** Distribution of the total unsaturation in lipid components of plasma as a new differential diagnostic method in clinical analysis [Journal] // Journal of Chromatography A. - 1997. - pp. 777: 47-50.
66. **Poznyak T. Puga J. M., Kiseleva E., and, Martinez L.** Chromium toxic effect monitoring using ozonation method [Journal] // International Journal of Toxicology. - 2002. - pp. 21:211-217.
67. **Poznyak Tatyana** Determinación de insaturación en los lípidos de plasma y membranas celulares por medio de la ozonación para diagnóstico diferencial y monitoreo del efecto tóxico del medio ambiente, un aspecto nuevo de la aplicación de ozono en medicina [Journal] // Primer Congreso Nacional de Salud Ocupacional Seguridad e Higiene. - 2001.
68. **Poznyak Tatyana** New Method of Monitorin Study of People Health State under Toxic Effect of Environment [Journal] // In proceedings of Practical Methods for Environmental Analysis Conference. - 1996.
69. **Poznyak Tatyana, García Alejandro and Kiseleva Elena** Ozone application for the people health state monitoring by the total unsaturation index determination [Journal] // Ozonoterapia. - Enero 2008. - 1 : Vol. 1. - pp. 15-23.
70. **Poznyak Tatyana., Alejandro García, Elena Kiseleva** Ozone application for the people health state monitoring by the total unsaturation index determination [Journal] // Ozonoterapia. - Enero 2008. - 1 : Vol. 1. - pp. 15-23.
71. **Pryor William.A., Godber, Shipley Susan** Noninvasive measure of oxidative stress status in humans [Journal] // Symposium in Print. - 1991. - 10. - pp. 177-184.
72. **R. C. Lindenschmidt A. F. Tryka, and H. P. Witschi** Inhibition of Mouse Lung Tumor Development by Hyperoxia [Journal] // Cancer Research. - 1986. - pp. 1994-2000.
73. **Razumovskii S.D. [et al.]** Mechanism and Kinetics of the Reaction of Ozone with Sodoium Chloride in Aqueous Solutions [Journal] // Kinetics and Catalysis. - Moscú, Rusia : [s.n.], 2010. - 4 : Vol. 51. - pp. 492-496.



74. **Razumovskii S.D., Konstantinova, M.L., Grinevich, T.V., Korovina, G.V., Zaitsev, V.Ya.** Mechanism and kinetics of the reaction of ozone with sodium chloride in aqueous solutions [Journal] // *Kinetics and Catalysis*. – 2010. – 4 : Vol. 51. – pp. 492-496.
75. **Restaino L., Frampton, E.W., Hemphil, J.B., Palnikar, P.** Efficacy of ozonated water against various food related microorganisms. [Journal] // *Applied and environmental microbiology*. . – 1995. – 61. – pp. 3471-3475.
76. **Rosales Dr. Frank Hernández** El estrés oxidativo. Un sistema novedoso para el diagnóstico y la evaluación [Journal] // *Centro de Investigaciones del Ozono en Cuba*. – 2007. – pp. 571-578.
77. **S.L Korman D. B. and Potapov** Breast Cancer and unsaturated blood lipids [Journal] // *Wopr. Onkilog.* – 1997. – pp. 43: 164-170 .
78. **Salganik I. Rudolf** The benefits and Hazards of Antioxidants: Controlling Appoptosis and Other Protective Mechanisms in Cancer Patients and the Human Population [Journal] // *Journal of the American Collage of Nutrition* . – North Carolina, USA : [s.n.], 2001. – 5 : Vol. 20. – pp. 464S-472S.
79. **Schulz Siegfied [et al.]** Treatment with ozone/oxygen-pneumoperitoneum results in complete remission of rabbit squamous cell carcinomas [Journal] // *In. J. Cancer*. – 2008. – pp. 122, 2360-2367.
80. **Schulz Siegfied., Häussler, Ulrich., Mandic, Robert., Heverhagen, Johannes T., Neubauer, Andreas., Dünne, Anja A., Werner, Jochen A., Weihe, Eberhard., Bette, Michael** Treatment with ozone/oxygen-pneumoperitoneum results in complete remission of rabbit squamous cell carcinomas [Journal] // *In.J. Cancer*. – 2008. – pp. 122, 2360-2367.
81. **Selcuk Huseyin.** Decolorization and detoxification of textile wastewater by ozonation and coagulation processes [Journal] // *Dyes and pigments*. – 2005. – 3 : Vol. 64. – pp. 217-222.
82. **Selma M.V., Ibanez, A.N., Cantwell, M., Suslow, T.** Reduction by gaseous ozone of Salmonella and microbial flora associated with fresh-cut cataloupe. [Journal] // *Food Microbiol.* – 2008. – 25. – pp. 558-565.



83. **Seong_Ho Lee [et al.]** Conjugated linoleic acid stimulates an anti-tumorigenic protein NAG-1 in an isomer specific maner [Journal] // *Carcinogenesis*. - 2005. - 5 : Vol. 27. - pp. 972-981.
84. **Seong-Ho Lee., Yamaguchi, Kiyoshi., Kim, Jong-Sik., Eling, Thomas E., Safe, Stephen., Park, Yeonhwa., Beak, Seung Joon** Conjugated linoleic acid stimulates an anti-tumorigenic protein NAG-1 in an isomer specific maner [Journal] // *Carcinogenesis*. - 2005. - 5 : Vol. 27. - pp. 972-981.
85. **Sergeev V.M. Burkin I. A., Levin A.B., Poznyak T. I. et. al.** [Patent] : 1500943. - USSR, 1989.
86. **Shoemaker Judith M.** Ozone therapy - history, physiology, indications, results [Report]. - Nottingham, PA : [s.n.], 2005.
87. **Siegfried Schulz Ulrich Häussler, Robert Mandic, Johannes T. Heverhagen, Andreas Neubauer, Anja A. Dünne, Jochen A. Werner, Eberhard Weihe and Michael Bette** Treatment with ozone/oxygen-pneumoperitoneum results in complete remission of rabbit squamous cell carcinomas [Journal] // *In. J. Cancer*. - 2008. - pp. 122, 2360-2367.
88. **Simos Y., Karkabounas,S., Verginadis, I., Charalampidis, P., Filiou, D., Charalopoulos, K., Zioris,I., Kalfakakou,V., Evangellou, A.** Intra-peritoneal application of catechins and EGCG as in vivo inhibitors of ozone-induced oxidative stress [Journal] // *Phytomedicine*. - 2011. - pp. 579-585.
89. **Sorg Olivier** Oxidative stress: a theoretical model or a biological reality [Journal] // *Comptes Rendus Biologies*. - 2004. - pp. 649-662.
90. **Tatyana Poznyak Alejandro García, Elena Kiseleva** Ozone application for the people health state monitoring by the total unsaturation index determination [Journal] // *Ozonoterapia*. - 2008. - pp. 15-23.
91. **Tatyana Poznyak Fabio Antunez, Alejandro García and Isaac Chairez** VARIATION OF THE TOTAL UNSATURATION OF LIPIDS IN PATIENTS WITH DIABETES MELLITUS T-II TREATED BY OZONE THERAPY. [Journal] // *Ozonoterapia*. - 2009. - pp. 1(3):198-200 .
92. **Turkina T.I Marchenko L.F., Poznyak T.I., et.al.** [Patent] : 4946801/14. - USSR, 1991.
93. **Valko M. [et al.]** Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer [Journal] // *Chemico-Biological interactions*. - 2006. - Vol. 160. - pp. 1-40.



94. **Valko M., Rhodes, C.J., Moncol, J., Izakovic, M., Mazur, M** Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer [Journal] // *Chemico-Biological interactions*. - 2006. - Vol. 160. - pp. 1-40.
95. **Vaupel P.** Blood flow, oxygen consumption, and tissue oxygenation of human breast cancer xenografts in nude rats [Journal] // *Cancer Research*. - 1987. - pp. 3496-3503.
96. **Vaupel P.** Oxygenation of human tumors: evaluation of tissue oxygen distribution in breast cancers by computerized O₂ tension measurements [Journal] // *Cancer research*. - 1991. - pp. 3316-3322.
97. **Wang H. Q. [et al.]** Positive feedback regulation between AKT activation and fatty acid synthase expression in ovarian carcinoma cells [Journal] // *Oncogene*. - 2005. - 24. - pp. 3574-3582.
98. **William Pryor A. [et al.]** Free radical biology and medicine: it's a gas, man!! [Journal] // *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. - 2006. - pp. R491-R511.
99. **Young CD., Anderson SM** Sugar and fat - that's where it's at: metabolic changes in tumors [Journal] // *Breast Cancer Research*. - 2008. - Vol. 10. - pp. 202-211.
100. **Zhang Y., Marcillat, Q., Giulivi, C., Ernster, L., Davis, KJ.** The oxidative inactivation of mitochondrial electron transport chain components and ATPase [Journal] // *Journal of Biological Chemistry*. - 1990. - 265. - pp. 16330-16336.
101. **Zheng Xuexheng., Sheng, Gang., Yang, Xiifeng** Evidence from clonal and population analyses [Journal] // *Cancer Research*. - 2007. - Vol. 67. - pp. 3691-3697.



Anexo I. Selección de los microorganismos

Las bacterias seleccionadas pueden causar infección cuando ingresa al cuerpo a través de una cortadura, una úlcera, una sonda o un tubo de respiración. La infección puede ser menor y local (por ejemplo, un grano) o puede ser más seria (compromiso del corazón, la sangre o los huesos). A continuación se presentan las bacterias seleccionadas así como la descripción correspondiente

1. *Escherichiacoli*: se trata de una bacteria unicelular que se encuentra generalmente en los intestinos animales y en aguas negras. En su hábitat natural, vive en los intestinos de la mayor parte de mamíferos sanos. Es el principal organismo anaerobio facultativo del sistema digestivo. Si la bacteria no adquiere elementos genéticos que codifican factores virulentos, actúa como un comensal formando parte de la flora intestinal y ayudando así a la absorción de nutrientes. La *E. coli* puede causar infecciones intestinales y extra-intestinales generalmente severas, tales como infecciones del aparato excretor, cistitis, meningitis, peritonitis, mastitis, septicemia y neumonía Gram-negativa.
2. *Pseudomona aeruginosa*: es una bacteria gram-negativa que se encuentra ampliamente distribuida en la naturaleza, se puede aislar de muestras de suelo, aguas limpias y contaminadas, así como de plantas y animales. Puede causar diversos tipos de infecciones pero rara vez causa enfermedades graves en personas sanas. Coloniza partes dañadas del organismo, como quemaduras y heridas quirúrgicas, el aparato respiratorio de personas con enfermedades o las lesiones físicas en los ojos, desde estos lugares puede invadir el organismo y causar lesiones destructivas o septicemia y meningitis. Las personas con fibrosis quística o inmunodeprimidas son propensas a la colonización por *Pseudomona aeruginosa*, que puede conducir a infecciones pulmonares progresivas graves.



Anexo II. Método Folch: extracción de lípidos

Los lípidos que se encuentran formando parte de la membrana celular se encuentran interactuando con proteínas y polisacáridos por medio de fuerzas hidrofóbicas, de Van del Waals y quizá por enlaces iónicos. Debido a esto, se han propuesto diversos solventes o mezclas de solventes que permitan separar los lípidos del sustrato biológico. La mayoría de los métodos de extracción proponen la mezcla $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}$ (2:1), siendo el agua un componente terciario en el sistema. El extracto agita dando como resultado la formación de 2 fases (Figura 34), de las cuales la inferior está compuesta de $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}:\text{H}_2\text{O}$ (86:14:1) en la que se encuentran contenidos los lípidos, mientras que en la fase superior de $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}:\text{H}_2\text{O}$ (3:48:47) contiene los compuestos no lipídicos. Es muy importante la relación volumétrica entre el $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}:\text{H}_2\text{O}$, los cuales deben estar en una proporción lo más cercana posible a 8:4:3, de lo contrario, puede ocurrir algún tipo de pérdida de muestra lipídica (Chekaniazar, 2011).



Figura 34 Extracción de lípidos. Método Folch



Anexo III. Selección de la línea celular

Los gliomas son el tipo de tumor cerebral más común y agresivo que existe, el cual representa el 42% de tumores cerebrales en adultos y aproximadamente el 50% en niños. Los gliomas son usualmente localizados en la materia blanca de los hemisferios cerebrales, observándose con mayor frecuencia en el lóbulo frontal (Noreen, 2012) (Caruso, 2011).

Actualmente existen diferentes terapias que se aplican para el tratamiento de gliomas, como lo son la combinación de cirugías, radioterapia, quimioterapia y terapia fotodinámica. Sin embargo, se ha observado la reincidencia del tumor en un 96% de los casos atendidos por medio de cirugía. La radio terapia, quimioterapia y terapia fotodinámica son tratamientos no invasivos, sin embargo, solo son efectivos en etapas tempranas del desarrollo del tumor, además de causar efectos secundarios los cuales reducen su eficacia (Caruso, 2011) (Grobben, 2002) (Onishi, 2011).

Debido a que los gliomas son quimio y radio resistentes, y tienen un alto índice de mortalidad y morbilidad (An, 2011), en la esta etapa de experimentación, se seleccionó la línea celular C6 glioma de ratón, para llevar cabo el estudio preliminar del efecto del ozono sobre células eucariotas.



Anexo IV. Método de cuantificación de proliferación celular CyQuant®

La Tabla 9 muestra el contenido del estuche para determinación de proliferación celular, así como las características de cada uno de los reactivos:

Tabla 9 Contenido del Kit CyQuantCellAssay

Material	Cantidad	Concentracion
CyQuant GR dye	550 μ L	400X en DMSO
Celllysis buffer	11 mL	20X
DNA standard	100 μ L	100 μ g/mL solución en TE (Tris/EDTA) buffer

Para tener un blanco de referencia se procedió a realizar una curva de calibración de ADN, para lo cual se realizaron diversas soluciones de acuerdo a la Tabla 10, las cuales tenían una concentración conocida de ADN y posteriormente se leyó la fluorescencia en el equipo Synergy HT.

Tabla 10 Valores de la curva de calibración de ADN

Fila	Columna	Colorante/buffer de lisis (μ L)	ADN (1 μ L/mL)	Concentración ADN (ng/mL)
B	2-4	200	0	0
C	2-4	198	2	10
D	2-4	180	20	100
E	2-4	100	100	500
F	2-4	60	140	700
G	2-4	0	200	1000



Posterior a esto, se realizó una curva calibración de crecimiento celular, de igual forma en una placa de 96 pozos. Se consideraron 10 valores de número de células por pozo, cada una realizada por sextuplicado como se muestra en la Figura 35

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		55	55	55	220	220	220	385	385	385	550	
C		55	55	55	220	220	220	385	385	385	550	
D		110	110	110	275	275	275	440	440	440	550	
E		110	110	110	275	275	275	440	440	440	550	
F		165	165	165	330	330	330	495	495	495	550	
G		165	165	165	330	330	330	495	495	495	550	
H												

Figura 35 Placa de 96 pozos, curva de crecimiento celular

De acuerdo a la metodología se debe de adicionar a las células una solución de buffer de lisis celular/colorante fluorescente, de acuerdo a esto para 20 mL de solución, colocar 1 mL del buffer de lisis celular en 19 mL de agua destilada y 50 μ L del colorante verde fluorescente



Anexo V. Conteo de células por pozo

De acuerdo a la metodología descrita en el Capítulo II, sección II.2.2, la determinación del número de células por pozo se realiza bajo el siguiente esquema:

1. Se tomó una muestra de 10 μ L del cultivo de células C6 glioma de rata que se encontraba suspendido en el medio de cultivo
2. Para teñir las células se mezclaron con 10 μ L de azul de tripan y se homogeneizó
3. Se realizó el conteo de células por cuadrante por medio de una cámara de Neubauer (Figura 36)

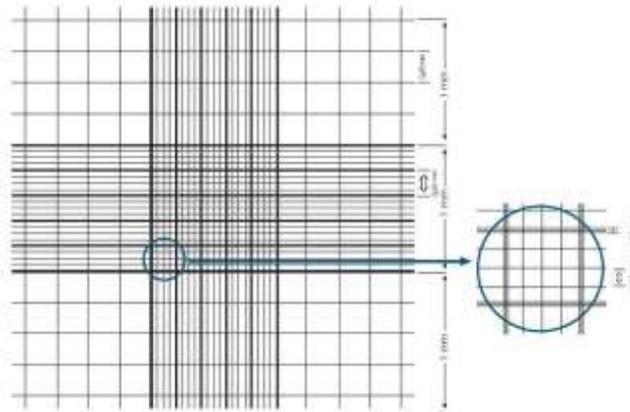


Figura 36 Cámara de Neubauer

4. Una vez que se contabilizaron las células, se realizó el siguiente cálculo para determinar el número de células por mL

$$\frac{\text{Número de células}}{\text{mL}} = \frac{\text{Número de células contadas} * 2 * 10,000}{4}$$



Anexo VI. Selección de los animales modelo: BALB/c

Los ratones atímicos desnudos (Figura 37) se caracterizan por tener una aplasia congénita hereditaria del timo, que le provoca una severa depresión inmunológica natural, y que permite el crecimiento exitoso de tejido normal o neoplásico de razas y especies diferentes. (Kyriasis, 1981). También presentan una elevada susceptibilidad a contraer enfermedades, lo que hace necesario crear condiciones de mantenimiento controladas desde el punto de vista microbiológico, de temperatura y humedad.

La posibilidad de mantener algunos de los tumores humanos en estos animales, sin que pierdan sus propiedades bioquímicas y morfológicas originales, es uno de los aspectos más importantes de este modelo, permitiendo así estudios sobre la biología tumoral y la respuesta a diversos tratamientos (Castillo, 1988).



Figura 37 Ratón atímico desnudo



Anexo VII. Método de inoculación

La inoculación de las células C6 glioma de ratón se llevó a cabo por vía subdérmica (Figura 38); en la cual, se realiza pellizcando y tirando hacia arriba de un pliegue en la piel del cuello o de la espalda se inyecta la suspensión de las células. En este caso se inocularon $1.5 \cdot 10^6$ células contenidas en 100 μ L de medio de cultivo.

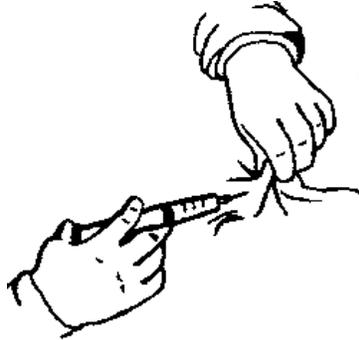


Figura 38 Inoculación subdérmica en ratones atímicos desnudos



Anexo VIII. Dosificación de ozono disuelto

La dosificación de ozono disuelto se llevó a cabo vía intraperitoneal, la inyección se aplica en el cuadrante izquierdo bajo como se observa en la Figura 39.



Figura 39 Dosificación de ozono disuelto vía intraperitoneal

En esta técnica se inserta la aguja a través de la piel, se levanta la misma contra la pared abdominal, evitando la posibilidad de una punción en el intestino. La rápida administración del fluido puede causar daños en el tejido y hemorragia debido a la presión.



Anexo IX. Colesterol y triglicéridos totales

El colesterol es una sustancia hidrófoba, insoluble en medio acuoso y por tanto insoluble en el plasma sanguíneo. El colesterol es esencial para el funcionamiento normal del organismo, ya que es un componente estructural de la membrana celular, es precursor de ácidos biliares, hormonas esteroides y vitamina D.

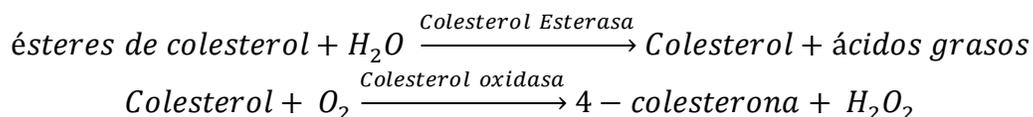
El colesterol es un constituyente primario de las lipoproteínas de baja densidad (LDL), pero puede encontrarse también en las de alta y muy baja densidad (HDL, VLDL). Las concentraciones séricas de colesterol, disminuyen en: desnutrición, esteatorrea, hepatitis, hipertiroidismo, infecciones agudas, anemia y cáncer. Las concentraciones séricas de colesterol aumentan en: hiperlipoproteinemia, cáncer del páncreas y cabeza, hipotiroidismo, síndrome nefrótico, embarazo o por predisposición genética.

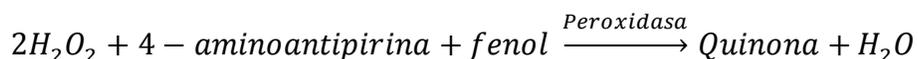
Los triglicéridos están constituidos por glicerol y ácidos grasos. Estos forman parte de las 5 clases de lipoproteínas que transportan a los lípidos en el plasma: quilomicrones, constituidos casi totalmente por triglicéridos dietéticos, VLDL, LDL y HDL. Los padecimientos en los cuales predominan los triglicéridos son: pancreatitis, intolerancia a la glucosa, diabetes mellitus, lupus eritematoso, embarazo, uso de hormonas, alcoholismo, entre otros.

Colesterol Total. Método enzimático (CHOD-POD)

Fundamento del método:

El colesterol esterasa hidroliza los ésteres de colesterol presentes en la muestra, dando colesterol libre y ácidos grasos, en una posterior oxidación enzimática mediante la colesterol oxidasa se forma peróxido de hidrógeno y colesterona. El H_2O_2 se valora por la reacción de Trinder, mediante un cromógeno, fenol y 4-Aminoantipirina, en presencia de peroxidasa, formando una quinona cuya coloración es proporcional a la concentración de ozono presente en la muestra.





La Tabla 11 muestra los reactivos necesarios para llevar a cabo esta técnica.

Tabla 11 Reactivos utilizados para la determinación de Colesterol Total

Reactivo R	Buffer pH 6.9	90 mmol/L
	Fenol	26 mmol/L
	Colesterol esterasa	1000 U/L
	Colesterol oxidasa	300 U/L
	Peroxidasa	650 U/L
	4-aminoantipirina	0.4 mmol/L
Solución Estándar	Solución de colesterol	200 mg/L

Procedimiento:

Ya que este método es colorimétrico, se debe tener una solución blanco, un patrón y la muestra de acuerdo a la Tabla 12:

Tabla 12 Preparación de soluciones para determinar Colesterol Total

	Blanco	Patrón	Muestra
R (mL)	1.0	1.0	1.0
Patrón (μL)	--	10	--
Muestra (μL)	--	--	10

Cada solución se mezcla e incuba a 37°C por 5 min o 10 min a temperatura ambiente. Posteriormente se lee la absorbancia (A) del patrón y la muestra, frente al blanco de reactivo a una longitud de onda de 505 nm. Finalmente, para determinar la concentración de colesterol total en la muestra se lleva a cabo el siguiente cálculo:

$$\frac{(A)_{\text{muestra}}}{(A)_{\text{patrón}}} * \text{Concentración Patrón} = \frac{\text{mg}}{\text{dL}} \text{ de colesterol en la muestra}$$

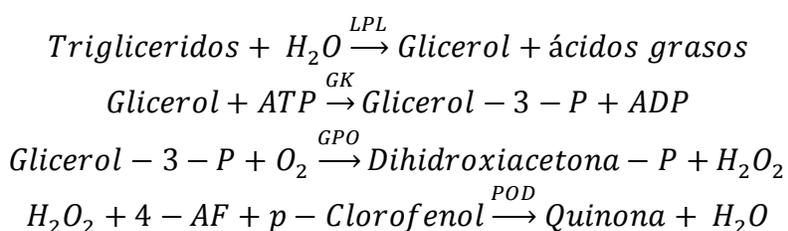


$$\text{Factor de conversión: } \frac{\text{mg}}{\text{dL}} * 0.0258 = \frac{\text{mmol}}{\text{L}}$$

Triglicéridos Totales. Método enzimático (GPO-POD)

Fundamento del método

Los triglicéridos son hidrolizados enzimáticamente a glicerol, el cual, mediante glicerol cinasa y glicerol p-oxidasa, liberan el peróxido de hidrógeno que se valora mediante la reacción de Trinder, de acuerdo a las siguientes reacciones:



En donde, la cantidad de quinona formada es proporcional a la concentración de triglicéridos y LPL. La Tabla 13 muestra los reactivos requeridos para la realización de esta técnica.

Tabla 13 Reactivos utilizados para la determinación de Triglicéridos Total

Reactivo R	Buffer GOOD pH 6.3	50 mmol/L
	p-Clorofenol	2 mmol/L
	Lipoprotein lipase (LPL)	150000U/L
	Glicerol quinasa (GK)	500 U/L
	Glicerol-3-oxidasa (GPO)	3500 U/L
	4-aminofenazona (4-AF)	0.1 mmol/L
	ATP	0.1 mmol/L
Solución Estándar	Solución de triglicéridos	200 mg/L

Procedimiento

De acuerdo a la Tabla 14, se deben realizar una serie de soluciones para llevar a cabo éste método colorimétrico



Tabla 14 Preparación de soluciones para determinar Triglicéridos Totales

	Blanco	Patrón	Muestra
R (mL)	1.0	1.0	1.0
Patrón (μL)	--	10	--
Muestra (μL)	--	--	10

Cada solución se mezcla e incuba a 37°C por 5 min o 10 min a temperatura ambiente. Posteriormente se lee la absorbancia (A) del patrón y la muestra, frente al blanco de reactivo a una longitud de onda de 505 nm. Finalmente, para determinar la concentración de colesterol total en la muestra se lleva a cabo el siguiente cálculo:

$$\frac{(A)_{muestra}}{(A)_{patrón}} * Concentración Patrón = \frac{mg}{dL} \text{ de colesterol en la muestra}$$

$$Factor \ de \ conversión: \frac{mg}{dL} * 0.0113 = \frac{mmol}{L}$$