

## Efecto *in vitro* del ozono sobre la función fagocítica de los leucocitos en sangre periférica

Díaz-Luis J<sup>1</sup>, Reyes-Espinosa L<sup>1</sup>, Menéndez-Cepero S<sup>2</sup>, Ascanio- García Y<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Hospital Roberto Rodríguez Fernández, Ciego de Ávila; <sup>2</sup>Clínica de Ozono, La Habana, Cuba

Email: jdiaz@hgm.cav.sld.cu

### RESUMEN

La inmunomodulación con ozono se ha fundamentado en su acción sobre las células del sistema inmune y sobre el metabolismo oxidativo. Cuando la sangre se expone a determinadas concentraciones de ozono, ocurren reacciones bioquímicas en las células que favorecen los mecanismos inmunitarios de defensa. Evaluar el efecto del ozono sobre los fagocitos de sangre periférica. Se diseñó un experimento *in vitro* en las siguientes etapas: colección de las muestras de sangre, generación del ozono médico, liberación del gas en las muestras, Incubación y evaluación de la reacción. Se coleccionaron 30 ml de sangre humana total, de 5 donantes masculinos saludables en la mañana, la que fue subdividida, 5 mL de sangre por tubo, en 6 tubos de cristal (sangre, sangre más oxígeno y cuatro con ozono). Un volumen de 5 mL de ozono, fue coleccionado a diferentes concentraciones (10, 20, 40, 80  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) en jeringuillas de cristal y de forma inmediata burbujeado en la muestra biológica. Se utilizaron dos controles negativos: sangre y sangre más oxígeno. Se mezclaron lentamente pero de forma continua, en zaranda con agitación, durante 10 minutos. Mediante el método directo microscópico de Baehner, se evaluó la función fagocítica de las células. Se aplicó la prueba T de medias para muestras dependientes y la significación fue definida como el valor de  $p < 0,05$ . Se detectó aumento significativo en la actividad fagocítica de las células ozonizadas en relación a las células de la sangre sola y con oxígeno ( $p=0.04$ ). Se determinó que la actividad fagocítica fue mayor en las muestras ozonizadas con concentraciones de 20 y 40  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . El ozono tuvo un efecto positivo *in vitro* sobre la capacidad fagocítica de las células en sangre periférica lo que dependió de la concentración del ozono.

**Palabras clave:** ozono, inmunomodulación, metabolismo oxidativo, función fagocítica

## INTRODUCCIÓN

Bocci V describió lo que ocurre cuando la sangre se expone al ozono ( $O_3$ ) fuera del organismo. El  $O_3$  reacciona con los antioxidantes del plasma y con los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) unidos a la albúmina y se descompone en peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) que es una especie reactiva del oxígeno (ERO) y productos de oxidación lipídica.<sup>1</sup>

El  $H_2O_2$  al no estar ionizado, difunde al interior de la célula, por un transitorio gradiente, entre el plasma y el agua citoplasmática, lo cual tiene un efecto oxidativo temprano. La concentración de  $H_2O_2$ , es pequeña pero suficiente para disparar la reacción bioquímica, que genera un agudo y controlado estrés oxidativo, para la activación biológica, sin toxicidad.<sup>1</sup>

Una vez en el citoplasma, el estímulo generado por el  $H_2O_2$  activa a una enzima Tirosina Kinasa que fosforila la cadena  $I\kappa B$  del complejo NF- $\kappa B$ , facilitando que el heterodímero P50-65 se mueva hacia el núcleo, y regule la expresión de genes de proteínas incluidas las citocinas. Bajas concentraciones de  $O_3$  generan bajos niveles de  $H_2O_2$ , incapaz de activar el NF- $\kappa B$  y altas concentraciones de  $O_3$ , producen altos niveles de  $H_2O_2$ , produciendo daño celular. Concentraciones de ozono entre 20  $\mu g/mL$  y 80  $\mu g/mL$  son toleradas por la sangre.<sup>2</sup>

La respuesta de células mononucleares de sangre periférica ozonizadas, difiere si se utiliza la sangre total o las células aisladas, lavadas y suspendidas en medio carente de sistemas antioxidantes. La ausencia de sistemas antioxidantes hace a las células muy sensibles al  $O_3$ , y se deprime la activación, la proliferación celular en respuesta a mitógenos y la secreción de citocinas.<sup>2</sup>

El  $O_3$  en la sangre total, induce la activación de células inmunocompetentes directamente, los productos de la reacción del  $O_3$ , se comportan como marcadores biológicos asociados con la mejoría del sistema inmune. Se ha descrito que esos compuestos favorecen la actividad de neutrófilos y su función fagocítica.<sup>3</sup>

Los neutrófilos y monocitos son fagocitos que viajan a través de la sangre por todo el organismo, en busca de patógenos invasores.

La fagocitosis es una característica importante de la inmunidad innata celular, es un mecanismo efector inespecífico de defensa, llevada a cabo por los fagocitos, donde los microorganismos, restos celulares y partículas son captados, englobados con su membrana e introducidos en el interior de la célula fagocítica con el fin de eliminarlos. Durante la fagocitosis se produce un alto consumo de oxígeno (*estallido respiratorio*), este proceso describe un camino metabólico cuya función es producir un grupo de agentes microbicidas altamente reactivos, mediante la reducción parcial de oxígeno. El propósito del estallido respiratorio es proveer una serie de agentes oxidativos reactivos como son: el anión superóxido, el peróxido de hidrógeno y la activación de la vía alterna hexosa mono-fosfato que son utilizados por los fagocitos para la destrucción de microorganismos.<sup>2</sup>

El H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generado durante la respuesta fagocítica, es letal para las células bacterianas, ocasiona lisis de la pared celular, estallido y destrucción, también tienen una función muy importante al activar cinasas y factores de transcripción que inducen la síntesis de citocinas y factores de crecimiento, es a este nivel donde se aprecia la positiva influencia de los peróxidos formados durante el tratamiento con O<sub>3</sub>.<sup>2</sup>

Con el objetivo de imitar *in vitro* los eventos biológicos que ocurren durante la ozonoterapia, se expuso la sangre al ozono y se evaluó la capacidad fagocítica de las células.

## OBJETIVOS

*General:* evaluar el efecto del ozono sobre la actividad fagocítica de los leucocitos.

*Específicos:*

- 1) Medir la actividad fagocítica de los neutrófilos en las muestras: Sangre sola, Sangre + O<sub>3</sub> y Sangre + oxígeno.
- 2) Comparar los resultados de la fagocitosis en la sangre ozonizada, con diferentes concentraciones de O<sub>3</sub>.
- 3) Comparar los resultados de la fagocitosis entre los grupos de muestras biológicas.

## MATERIALES Y MÉTODOS

En la sangre periférica se puede cuantificar los fagocitos que circulan y evaluar su actividad fagocítica por métodos inmunológicos.<sup>4</sup> Se realizó el método directo microscópico de Baehner. Método sencillo, fácil de interpretar, reproducible que no requiere separar a la célula fagocítica para evaluar su función.

Se realizó el experimento *in vitro* en varias etapas

Generación del ozono: El ozono se obtuvo a partir del oxígeno médico, mediante un generador OZOMED Plus (Habana, Cuba). Concentraciones de O<sub>3</sub> utilizadas: 10 mg/L, 20 mg/L, 40 mg/L y 80 mg/L.

Colección de la sangre humana: la muestra de 30 mL sangre se obtuvo a partir de donantes saludables, no fumadores, del sexo masculino, en la mañana; se utilizó como anticoagulante heparina (15 U/mL de sangre) y se subdividió en 6 frascos (5 mL en cada frasco) de cristal. Los controles fueron sangre sola y con oxígeno.

Liberación del gas en la muestra biológica: de forma inmediata se burbujeó el gas (5 mL) en la muestra biológica, igual volumen de células y gas (1:1) se mezclaron de forma lenta y continua, en zaranda con agitación, durante 10 minutos. Para obtener resultados reproducibles, se requiere la manipulación rápida y precisa del gas.

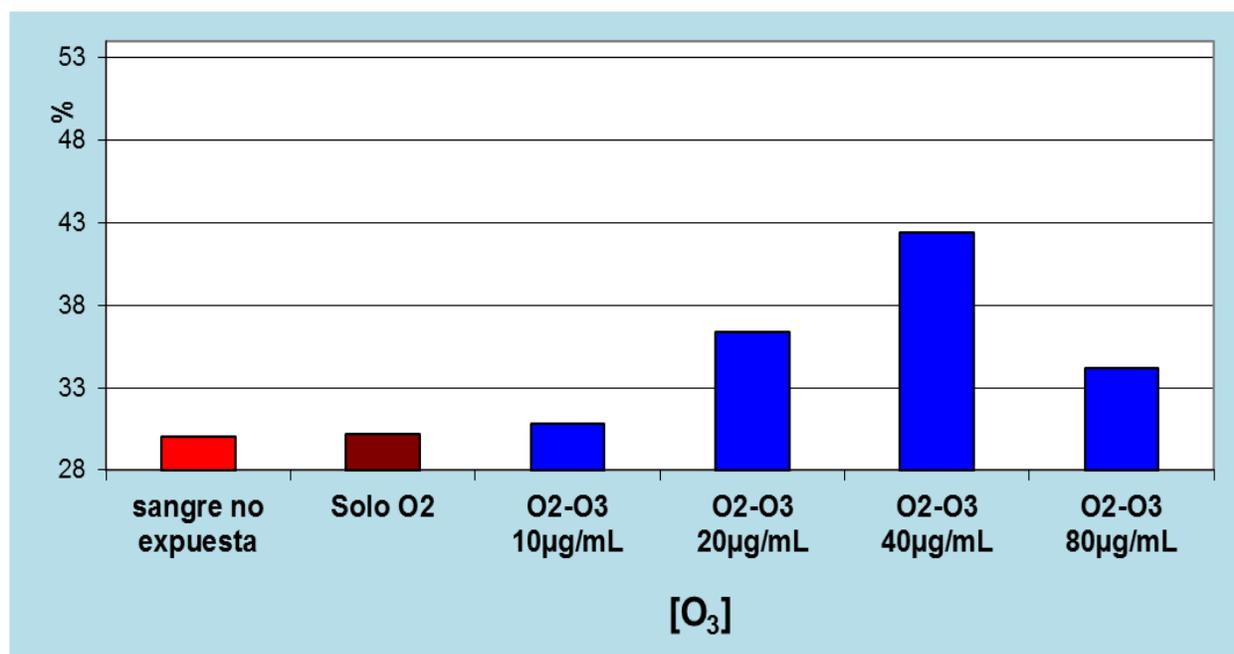
Método para evaluar la función fagocítica: Se evaluó la función celular mediante el método directo microscópico de Baehner, 1968.

Los resultados se describen como la media de los porcentos de fagocitosis  $\pm$  la Desviación estándar. Se aplicó la prueba T de medias para muestras dependientes y la significación fue definida como el valor de  $p < 0,05$ .

## RESULTADOS

La actividad fagocítica fue mayor en las células ozonizadas. Se obtuvo un incremento significativo en la actividad fagocítica de las células ozonizadas en relación con las células no

ozonizadas ( $p=0.03$ ). No hubo diferencias significativas en el resto de los grupos. Hubo incremento de la actividad fagocítica en las células ozonizadas con concentraciones entre 20  $\mu\text{g/mL}$  y 40  $\mu\text{g/mL}$  y tendencia a disminuir al exponerlas a 80  $\mu\text{g/mL}$  de ozono (figura). El efecto sobre la fagocitosis del  $\text{O}_3$  se ha demostrado en estudios clínicos.<sup>5</sup>



**Figura.** Valores de la función fagocítica en muestras de sangre *sola*, *con oxígeno* y *con ozono*.

## CONCLUSIONES

El ozono, a dosis dependiente, pudiera comportarse como un agente favorecedor de la capacidad fagocítica de las células en sangre periférica.

## RECOMENDACIONES

Desarrollar estudios preclínicos con  $\text{O}_3$  para evaluar sus efectos en diferentes parámetros inmunológicos.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Pecorrelì A, Bocci V, Acquaviva A, Belmonte G, Gardi C, Virgili F, et al. NRF2 activation is involved in ozonated human serum up regulation of HO-1 in endothelial cells. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2013 Feb 15;267(1):30-40. doi: 10.1016/j.taap.2012.12.001.
2. Schwartz A, Martínez-Sánchez G. La ozonoterapia y su fundamentación científica. *Rev Esp Ozonoter*. 2012; 2(1): 163-98.
3. Abul K Abbas, Andrew H Lichtman, Jordan S Pober. *Inmunología Celular y molecular*. 6ta ed. Madrid: McGraw-Hill-Interamericana de España, S.A.U.; 2012
4. Bradley A. Locke, Trivikram Dasu, James W. Verbsky. Laboratory Diagnosis of Primary Immunodeficiencies. *Clinic Rev Allerg Immunol* 2014; 46:154–168
5. Díaz Luis J, Padrón Sardiñas G, Menéndez Cepero S, Macías Abraham C. [Immunomodulator effect of ozone therapy in children with deficiency in immunity mediated by phagocytes]. *Mediciego* [Internet]. 2012 [citado 21 Feb 2017]; 18 (1): [aprox. 3 p.]. Disponible en: [http://bvs.sld.cu/revistas/mciego/vol18\\_01\\_2012/pdf/T9.pdf](http://bvs.sld.cu/revistas/mciego/vol18_01_2012/pdf/T9.pdf)