

COMUNICACION CORTA

Estudio *in vitro* del efecto del ozono sobre los linfocitos T y la función fagocítica en sujetos sanos

Ivonne Corcho, Frank Hernández, Lubia Yáñez* y Tania Reyes.*

Centro de Investigaciones del Ozono, Centro Nacional de Investigaciones Científicas, Avenida 25 y 158, Playa, Apartado Postal 6880, *Laboratorios BETERA, Ciudad de La Habana, Cuba.

Recibido: 10 de noviembre de 1996. Aceptado: 30 de enero de 1998.

Palabras clave: Linfocitos T, subpoblaciones linfocitarias T, función fagocítica, leucocitos polimorfonucleares, ozono.

Key words: T lymphocytes T, lymphocytotic subpopulations T, phagocyte function a, polymorphic nuclear leukocytes, ozone.

INTRODUCCION

Estudios *in vitro* han confirmado que luego de una breve exposición de sangre humana al ozono se produce una activación de monocitos y linfocitos, probablemente debido a la oxidación de los componentes de la membrana de estas células mononucleares, lo cual induce la producción de citocinas con actividad reguladora sobre el sistema inmune, tales como interferón (IFN γ), factor de necrosis tumoral (TNF α), interleucinas (IL-1, IL-2, IL-6), factor estimulante de colonias granulocito-macrófagos (GM-CSF) y probablemente se favorecen otras funciones del sistema inmune.¹ Además, se reporta la estimulación de mecanismos inmunológicos tales como la activación de la fagocitosis y la producción de inmunoglobulinas.^{2,3} Teniendo en cuenta que hasta el momento actual no se han referido reacciones adversas a esta terapia,⁴ así como su posible influencia sobre el sistema inmune, se realizó este trabajo con el fin de evaluar el efecto del ozono sobre la expresión de linfocitos T (CD3, CD4⁺, CD8⁺) y la capacidad fagocítica de polimorfonucleares (PMN) en sangre total de individuos aparentemente sanos.

MATERIALES Y METODOS

Recolección y ozonización de la sangre

Cincuenta donantes supuestamente sanos fueron divididos en cinco grupos de 10 individuos cada uno.

Se les extrajo 20 mL de sangre heparinizada de los cuales, 10 se ozonizaron. Se utilizó un equipo OZOMED (Centro de Investigaciones del Ozono, Ciudad de La Habana) para la ozonización de las muestras a diferentes concentraciones (10, 20, 30, 40, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) de la mezcla O₃/O₂ (10 mL del gas en 10 mL de sangre), mediante burbujeo lento durante 30 s. Posteriormente, se incubaron 1 h a 37 °C.

Los 10 mL restantes de sangre se tomaron como referencia (antes del tratamiento) y recibieron igual tratamiento que las muestras ozonizadas.

Aislamiento de linfocitos y leucocitos polimorfonucleares

Los linfocitos y PMN se obtuvieron mediante una modificación de la técnica original de Weening *et al.*⁵ Se realizó el conteo de células y el ajuste de concentración (2,5 · 10⁶ linfocitos viables/mL y 40 · 10⁷ PMN viables/mL) para las correspondientes técnicas.

Determinación de subpoblaciones linfocitarias T

Se empleó la técnica de inmunofluorescencia indirecta según Loregados *et al.*,⁶ para la medición del porcentaje de expresión de los marcadores celulares CD3, CD4⁺ y CD8⁺, utilizando los anticuerpos monoclonales CD3 (PanT), CD4 (linfocitos T auxiliares) y CD8 (linfocitos T citotóxicos/supresores) (Centro de Inmunología Molecular, Ciudad

de La Habana). Además, se analizó el coeficiente CD4/CD8.

Ensayo de la capacidad fagocítica

La actividad fagocítica de los PMN se determinó frente a la *Candida albicans* según una modificación de la técnica de Leijh *et al.*⁷ La levadura fue previamente ozonizada con el suero control fresco y posteriormente, se enfrentó a los PMN, después de lo cual, se incubó a 37 °C con agitación. Se tomaron muestras a los 0, 15 y 60 min. Los resultados se expresaron en porcentaje de levaduras no fagocitadas a 15 y 60 min de incubación en relación con la cantidad inicial de levaduras (t = 0).

Evaluación estadística

Se realizó la prueba no paramétrica de Wilcoxon para la comparación intra grupo respecto a antes y después del tratamiento con ozono (p < 0,05) y la no paramétrica de Kruskal Wallis para la comparación entre los tratamientos a las diferentes concentraciones de la mezcla O₃/O₂ (p < 0,05).

RESULTADOS Y DISCUSION

Al analizar las subpoblaciones de linfocitos T en función de las diferentes concentraciones empleadas (Tablas 1, 2 y 3) no se observaron variaciones en el porcentaje de expresión de los marcadores celulares CD3, CD4⁺ y CD8⁺, antes ni después de la ozonización de la sangre, cuyos valores se mantuvieron en el intervalo de referencia establecido.⁶

Tabla 1. Porcentaje de expresión de las células CD3 antes y después de la ozonización.

| ($\mu\text{g}/\text{mL}$) | Antes | Después | p |
|-----------------------------|-----------------|-----------------|---------|
| | X \pm DE | | |
| 10 | 66,7 \pm 4,42 | 67,8 \pm 3,19 | 0,553 6 |
| 20 | 66,9 \pm 4,06 | 66,2 \pm 3,96 | 0,610 3 |
| 30 | 71,0 \pm 5,24 | 71,2 \pm 4,56 | 0,8177 |
| 40 | 69,4 \pm 4,55 | 67,8 \pm 3,70 | 0,464 9 |
| 50 | 69,3 \pm 3,49 | 68,6 \pm 3,70 | 0,260 4 |
| p | 0,116 7 | 0,117 6 | |

Significación estadística p < 0,05.

Tabla 2. Porcentaje de expresión de las células CD4⁺ antes y después de la ozonización.

| ($\mu\text{g}/\text{mL}$) | Antes | Después | p |
|-----------------------------|-----------------|-----------------|---------|
| | X \pm DE | | |
| 10 | 43,3 \pm 7,18 | 42,7 \pm 6,76 | 0,553 6 |
| 20 | 40,5 \pm 6,60 | 40,5 \pm 6,18 | 0,944 2 |
| 30 | 41,7 \pm 4,21 | 42,3 \pm 5,10 | 0,514 7 |
| 40 | 43,6 \pm 7,66 | 43,6 \pm 8,73 | 0,999 4 |
| 50 | 42,2 \pm 6,16 | 41,6 \pm 7,42 | 0,646 5 |
| p | 0,863 6 | 0,820 8 | |

Tabla 3. Porcentaje de expresión de las células CD8⁺ antes y después de la ozonización.

| ($\mu\text{g}/\text{mL}$) | Antes | Después | p |
|-----------------------------|-----------------|-----------------|---------|
| | X \pm DE | | |
| 10 | 29,3 \pm 4,90 | 28,8 \pm 3,48 | 0,767 1 |
| 20 | 28,2 \pm 7,39 | 30,1 \pm 5,26 | 0,343 3 |
| 30 | 30,0 \pm 9,43 | 28,7 \pm 8,11 | 0,406 9 |
| 40 | 27,5 \pm 6,20 | 28,7 \pm 5,94 | 0,109 7 |
| 50 | 26,5 \pm 5,06 | 25,8 \pm 6,32 | 0,5751 |
| p | 0,543 2 | 0,827 4 | |

CD3 (63 - 76 %), CD4 (30 - 51 %), CD8 (19 - 33 %).

Estos resultados coincidieron con lo de otros autores como Kenneth et al.,⁸ los cuales después de emplear varias concentraciones de ozono (20, 40, 60 $\mu\text{g}/\text{mL}$) sobre linfocitos de individuos sanos, informaron no haber encontrado efecto alguno del ozono sobre las subpobla-

ciones CD3, CD4, CD8, CD4/CD8 y las células B.

El coeficiente CD4/CD8 no mostró diferencias estadísticas entre las muestras ni con las diferentes concentraciones de ozono y sus valores estuvieron en el intervalo de referencia establecido (0,9 a 2,68) (Tabla 4).

La evaluación de la capacidad fagocítica de los PMN no mostró di-

ferencias significativas entre el inicio y después de la ozonización a diferentes tiempos de incubación con la levadura (15 y 60 min) (Tablas 5 y 6), coincidiendo con lo que ha sido reportado para esta técnica ($U_{10} = 100\%$, $U_{50} = 22,9-53,95\%$ y $U_{90} = 6,63-28,43\%$) (expresado en porcentaje de levaduras no fagocitadas). Además, la ingestión de la *C. albicans* por los PMN tuvo un comportamiento similar en todos los tratamientos con la mezcla ozono-oxígeno a las diferentes concentraciones empleadas.

In vivo, el ozono puede inducir varios efectos en áreas no pulmonares como cambios en la fagocitosis de polimorfonucleares⁹ y en la resistencia a la hemólisis.¹⁰ Sin embargo, Weideman y col.¹¹ no encontraron diferencias significativas en el índice fagocítico de neutrófilos humanos y de conejos expuestos al ozono, respecto al grupo control. De igual forma, en este estudio *in vitro*, tampoco se observaron cambios en el índice fagocítico de PMN de los grupos tratados con ozono en relación con los controles antes del tratamiento.

CONCLUSIONES

En las condiciones de trabajo aquí presentadas la mezcla ozono/oxígeno no tiene efecto *in vitro* sobre el porcentaje de expresión de las subpoblaciones linfocitarias T CD3, CD4⁺, CD8⁺ y la capacidad fagocítica de polimorfonucleares en sangre periférica de individuos aparentemente sanos.

BIBLIOGRAFIA

1. Bocci V. Ozonotherapy Today. Proceedings of the 12th Ozone World Congress, Ozone in Medicine Vol. 3, 1995.
2. Bocci V. Ozonization of blood for the therapy of viral diseases and immunodeficiencies. A hypothesis. *Medical Hypothesis*, 39, 30, 1992.
3. Aguilar E., Torres M.A., Ramos J.M., Gómez M., Menéndez S., García R. y col. Recuperación de la inmunosupresión humoral en un quemado crítico por ozonoterapia. Presentación de un caso. I Conferencia Nacional de Aplicaciones del Ozono. Centro Nacional de Investigaciones Científicas, diciembre, 1988. *Revista CENIC de Ciencias Biológicas*, 20, 106, 1989.
4. Bocci V., Ozone: a mixed blessing. New mechanism of action of ozone on blood cells make ozonated major autohemotherapy (MAH) a rational approach. *Forsch Komplementarmed.*, 3, 25, 1996.
5. Weening R.S. Oxygen consumption of phagocytizing cells in human leukocyte and granulocyte preparation: a comparative study. *J. Lab. Clin. Med.*, 83, 570, 1974.

Tabla 4. Valores del coeficiente CD4/CD8 antes y después de la ozonización.

| (µg/mL) | Antes | | Después | | p |
|---------|--------------------------|--|-------------|--|---------|
| | Capacidad fagocítica (%) | | | | |
| | $\bar{X} \pm DE$ | | | | |
| 10 | 1,45 ± 0,28 | | 1,49 ± 0,35 | | 0,475 5 |
| 20 | 1,46 ± 0,38 | | 1,52 ± 0,45 | | 0,213 5 |
| 30 | 1,57 ± 0,51 | | 1,53 ± 0,50 | | 0,721 3 |
| 40 | 1,56 ± 0,43 | | 1,62 ± 0,38 | | 0,1394 |
| 50 | 1,73 ± 0,54 | | 1,63 ± 0,48 | | 0,241 1 |
| p | 0,7821 | | 0,980 5 | | |

Tabla 5. Capacidad fagocítica de los PMN a los 15 min de incubación antes y después de ser tratados con la mezcla O₂/O₃.

| (µg/mL) | Antes | | Después | | p |
|---------|--------------------------|--|--------------|--|---------|
| | Capacidad fagocítica (%) | | | | |
| | $\bar{X} \pm DE$ | | | | |
| 10 | 44,58 ± 4,04 | | 44,32 ± 5,23 | | 0,575 1 |
| 20 | 44,52 ± 4,01 | | 46,04 ± 3,70 | | 0,202 6 |
| 30 | 39,93 ± 10,62 | | 42,41 ± 3,99 | | 0,646 5 |
| 40 | 43,26 ± 5,91 | | 43,21 ± 3,55 | | 0,444 6 |
| 50 | 43,06 ± 6,85 | | 43,46 ± 4,26 | | 0,575 1 |
| p | 0,899 3 | | 0,474 6 | | |

Significación estadística p < 0,05.

Tabla 6. Capacidad fagocítica de los PMN a los 60 min de incubación antes y después de ser tratados con la mezcla O₂/O₃.

| (µg/mL) | Antes | | Después | | p |
|---------|--------------------------|--|--------------|--|---------|
| | Capacidad fagocítica (%) | | | | |
| | $\bar{X} \pm DE$ | | | | |
| 10 | 17,15 ± 3,96 | | 16,73 ± 4,57 | | 0,721 3 |
| 20 | 19,12 ± 5,73 | | 19,16 ± 4,51 | | 0,959 4 |
| 30 | 17,47 ± 6,02 | | 18,79 ± 5,32 | | 0,168 8 |
| 40 | 18,71 ± 4,84 | | 19,46 ± 4,51 | | 0,386 3 |
| 50 | 15,36 ± 3,75 | | 16,20 ± 3,71 | | 0,332 9 |
| p | 0,509 2 | | 0,606 2 | | |

6. Loregados L.C. et al. Estandarización de la técnica de inmunofluorescencia indirecta para el estudio de subpoblaciones de linfocitos con anticuerpos monoclonales. *Rev. Cubana de Hematología, Inmunología y Hemoterapia*, 1, 185, 1995
7. Leigh, C I. Kinetics of phagocytosis and intracellular killing of *Candida albicans* by human granulocytes and monocytes. *Infect. Immunol.*, 17, 313, 1977.
8. Kenneth W. The effect of ozone on lymphocyte populations in normal and HIV-1 infected blood. *Biozon Journal*, 8, 1990
9. Peterson M.L., Harder C. et al. Effect of ozone on leucocyte function in exposed human subjects. *Envir. Res.*, 15, 485, 1978
10. Buckley R.D., Hackney J.D., Clark K. Ozone and human blood. *Arch. Envir. Health*, 30, 40, 1975.
11. Weideman P.A., Shlesinger R.B. Effect of *in vitro* exposure to ozone of eicosanoid metabolism and phagocytic activity of human and rabbit neutrophils. *Inhalation Toxicology*, 6, 43, 1994