

Publicado en el International Journal of Cancer 15-mayo-2008 Traducido por Juan Carlos Pérez Olmedo

Oxígeno-ozono

intraperitoneal

Resultados del tratamiento con oxígeno-ozono mediante neumoperitoneo en carcinomas de células escamosas en conejos.

Ozonoterapia intraperitoneal. Traducción al español

Escrito por Juan Carlos Pérez Olmedo

Domingo 04 de Abril de 2010 21:49 - Última actualización Lunes 05 de Abril de 2010 19:19

Ozonoterapia intraperitoneal. Traducción al español

Escrito por Juan Carlos Pérez Olmedo

Domingo 04 de Abril de 2010 21:49 - Última actualización Lunes 05 de Abril de 2010 19:19

Siegfried Schulz 1 – Ulrich Hiusler 2 – Robert Mandic 2– Johannes T. Heverhagen 3 – Andreas Neubauer 4– Anja A. Dunne 2 – Jochen A. Werner 2– Eberhard Weihe 5 y Michael Bette* 5.

1 Veterinary Services and Laboratory Animal Medicine, Philipp's University Marburg, Germany

2 Department of Otolaryngology, Head and Neck Surgery, University Hospital Giessen and Marburg, Campus Marburg, Marburg, Germany)

3 Departments of Diagnostic Radiology, University Hospital Giessen and Marburg, Campus Marburg, Marburg, Germany

4Department of Haematology, Oncology and Immunology', University Hospital Giessen and Marburg, Campus Marburg, Marburg, Germany

5 Departments of Molecular Neurosciences, Institute of Anatomy and Cell Biology, Phillips University Marburg, Germany.

Los carcinomas de cabeza cuello de células escamosas (CCECC) representan un grupo de tumores con gran capacidad metastásica y con una alta tasa de mortalidad en el hombre y animales. El ozono ha demostrado IN VITRO capacidad de inhibir el crecimiento de diversas células carcinomatosas y en este trabajo hemos tratado de comprobar si el ozono es capaz de ejercer IN VIVO efectos antitumorales sobre el CCECC, concretamente sobre el carcinoma VX2 implantado en las orejas de 42 conejos blancos de Nueva Zelanda. La aplicación de la mezcla de gases (oxígeno-ozono) en estos animales fue realizada insuflando en el peritoneo (neumoperitoneo) en una fase avanzada de la enfermedad, ya existían metástasis locales, regionales y a distancia (pulmonares). La insuflación de gases fue realizada durante cinco días seguidos y los resultados mostraron una tasa de supervivencia en el grupo que recibió O₃/O₂ (ozono ip) de 7 conejos supervivientes de 14 tratados, de estos, en 6 se constató remisión completa, en el grupo que recibió OXIGENO puro sobrevivieron 3 conejos de 13 conejos y de ellos hubo 2 remisiones completas, en el tercer grupo, control, que no recibió insuflaciones, de los 14 conejos sobrevivió uno y con remisión espontánea del tumor. No existieron efectos adversos y los parámetros hematológicos controlados no experimentaron variaciones significativas después de las repetidas insuflaciones de mezclas de gases. El tratamiento intraperitoneal con ozono ip indujo además en los animales en los que se erradicó el tumor un fenómeno de tolerancia contra la reimplantación del carcinoma VX2. Esta tolerancia podría ser revertida

por la inmune supresión con combinación de ciclosporina A y dexametasona sugiriendo un efecto del O₃/O₂ mediado por la activación del sistema de la auto inmuno vigilancia. Aunque el mecanismo exacto todavía no están dilucidados los datos actuales apuntan a que el tratamiento intraperitoneal con ozono ip representa una prometedora estrategia en la lucha contra el cáncer.

Palabras clave: CCECC, inmunovigilancia, metástasis, neumoperitoneo, ozono

ip, O₃/O₂, Carcinoma VX2

Los CCECC metastáticos muestran una alta tasa de mortalidad tanto en humanos como en animales. Aceptamos para nuestro estudio el Carcinoma VX2, modelo tumoral experimental con alta y rápida capacidad de propagación de metástasis, el tumor fue implantado con éxito en 41 de los 42 conejos. Este tipo tumoral ha demostrado ser muy adecuado como modelo experimental en la investigación de nuevos enfoques terapéuticos, ya que tanto el CCECC como el Carcinoma VX2 son similares en su forma de crecer y propagarse a ganglios regionales y posteriormente a distancia. El carcinoma VX 2 es del tipo tumoral virus-inducido.

Al igual que muchos tumores de cabeza – cuello (CCECC), evaden de alguna manera el sistema de inmuno-vigilancia del organismo, esta evasión puede explicarse por la desregulación de los complejos HCM

tipo I y un aumento de los CD4 + CD25 + Células T reguladoras (los T reguladores se encuentran deprimidos y son los responsables de la inmunidad antitumoral). Por lo tanto, al ser capaces de activar la vigilancia antitumoral deben ser capaces de reconocer y activar las células tumorales del CCECC. El concepto del aumento de la capacidad de inmunovigilancia es un concepto emergente en las inmunoterapia contra el cáncer, particularmente aquellos focalizados en regular la respuesta inmune o inmunomoduladores. Para aumentar la respuesta inmune contra el cáncer, las terapias con citoquinas recombinantes, la inmunización con células dendríticas y la vacunación con antígeno tumorales, así como la inmunoterapia basada en células T se encuentran actualmente en investigación.

El ozono, se encontró recientemente que es producido por los granulocitos (18), es un gas con complejas influencias sobre la biología de los radicales libres en el hombre y animales (19). La mayoría de las investigaciones se han centrado sobre su toxicidad pulmonar debido a la inhalación ambiental (20,21). Esta perspectiva tóxica sobre el aparato respiratorio limitó en gran manera los estudios in vivo en enfermedades humanas. Sin embargo, el ozono exhibe potentes efectos protectores sobre sepsis inducida polimicrobiana letal sin aparición de efectos tóxicos respiratorios cuando se administra en el peritoneo (22). Adicionalmente, la demostración de anticuerpos formados por el efecto catalizado del ozono sobre las bacterias muertas sugiere efectos inmunes endógenos producidos por la aplicación exógena de ozono (23). Los estudios in Vitro describen al ozono como un gas radiomimético, capaz de inhibir selectivamente el crecimiento aislado de células tumorales alveolares, útero, mama y endometrio (24).

Esto nos llevó a la hipótesis de que la insuflación intraperitoneal de la mezcla de gases oxígeno-ozono estimularía en el propio organismo la inmunovigilancia antitumoral.

Material y métodos

Animales:

El estudio comprende 59 conejos Credo de Nueva Zelanda adultos sanos IFFA en un rango de peso corporal entre 2 y 3 Kg., comprados a Charles River WIGA, Sulfeld, Alemania. Todos los animales se mantuvieron en habitaciones con aire acondicionado a 20-22° C, 50-60% humedad y luz artificial con un ritmo de 12 h noche-día. Se alimentaron con 100 g de "pellets" al día y tuvieron libre acceso "ad limitum" al agua (pH 2,7). Todos los animales se aclimataron durante 5 días antes del inicio del procedimiento experimental.

Ozonoterapia intraperitoneal. Traducción al español

Escrito por Juan Carlos Pérez Olmedo

Domingo 04 de Abril de 2010 21:49 - Última actualización Lunes 05 de Abril de 2010 19:19

Diseño experimental y transplante del tumor

El estudio se realizó de acuerdo a las normas FELASA y fue aprobado por el Consejo Regional de Giessen

Ozonoterapia intraperitoneal. Traducción al español

Escrito por Juan Carlos Pérez Olmedo

Domingo 04 de Abril de 2010 21:49 - Última actualización Lunes 05 de Abril de 2010 19:19

V 54-19 c 2015(1) MR, No. 24/20051, Alemania,

de acuerdo con la Ley alemana de protección de animales. Los conejos fueron divididos aleatoriamente en tres grupos experimentales: Grupo 1, 14 Animales que recibieron la mezcla de gases oxígeno-ozono (O₃/O₂); Grupo 2, 14 animales que sólo recibieron oxígeno (O₂); grupo 3, 14 animales que fueron tratados de forma similar al resto pero no recibieron insuflación de gas. Un cuarto grupo de conejos NZW fueron utilizados como donantes de Carcinoma VX2, donde las células fueron propagadas mediante inyección intramuscular.

Ozonoterapia intraperitoneal. Traducción al español

Escrito por Juan Carlos Pérez Olmedo

Domingo 04 de Abril de 2010 21:49 - Última actualización Lunes 05 de Abril de 2010 19:19

□

□

*

Correspondencia a Departamento de Neurociencia Molecular, Instituto de Anatomía y Biología Celular, Universidad de Phillips, Calle Robert Koch 8, 35032 MARBURG – Alemania. Fax +4964212866780. Email: bette@staff.uni-marburg.de.

Recibido el 27 de agosto de 2007; aceptada después de revisión el 9 de noviembre de 2009 DOI 10.1002/ijc.23382.

Publicado online el 25 de enero de 2008 en Wiley Interscience (www.interscience.wiley.com)

Fin de la observación

Ozonoterapia intraperitoneal. Traducción al español

Escrito por Juan Carlos Pérez Olmedo

Domingo 04 de Abril de 2010 21:49 - Última actualización Lunes 05 de Abril de 2010 19:19

nn

Ozonoterapia intraperitoneal. Traducción al español

Escrito por Juan Carlos Pérez Olmedo

Domingo 04 de Abril de 2010 21:49 - Última actualización Lunes 05 de Abril de 2010 19:19

Ozonoterapia intraperitoneal. Traducción al español

Escrito por Juan Carlos Pérez Olmedo

Domingo 04 de Abril de 2010 21:49 - Última actualización Lunes 05 de Abril de 2010 19:19

Insuflación O3/O2

Ozonoterapia intraperitoneal. Traducción al español

Escrito por Juan Carlos Pérez Olmedo

Domingo 04 de Abril de 2010 21:49 - Última actualización Lunes 05 de Abril de 2010 19:19

Ozonoterapia intraperitoneal. Traducción al español

Escrito por Juan Carlos Pérez Olmedo

Domingo 04 de Abril de 2010 21:49 - Última actualización Lunes 05 de Abril de 2010 19:19

O2

Inoculación del tumor

Día 0

7 14-15-16-17-18- 19 30 60

día 90

Figura 1: Representación del esquema de tratamiento

Las células frescas del tumor fueron tomadas de la pierna izquierda de los conejos donantes. Los animales de todos los grupos fueron sedados con 5 mg/kg de peso corporal de xylazina intramuscular (Rompun®, Bayer Vital, Leverkusen, Alemania) y recibieron inyección lenta y subcutánea de $1-2 \times 10^8$

Ozonoterapia intraperitoneal. Traducción al español

Escrito por Juan Carlos Pérez Olmedo

Domingo 04 de Abril de 2010 21:49 - Última actualización Lunes 05 de Abril de 2010 19:19

7 de suspensión de células tumorales en un volumen de 0,3 ml en la oreja derecha (ver fotos) (26). Se permitió el crecimiento del tumor durante 14 días. En el día 14 post-inoculación se inició la insuflación de mezcla de gases O₃/O₂ y O₂ puro a los distintos grupos por un período de 5 días, desde el día 14 al día 18, ambos incluidos. Durante las insuflaciones los animales fueron premedicados con 0,1 ml/kg de peso corporal con

glicopirrolato (Robinul®, Riemser Arzneimittel AG, Greifswald, Germany) por vía subcutánea, seguido por una breve anestesia mediante la aplicación de 0.3 ml/kg de peso corporal de medetomidina clorhidrato (Domitor, Pfizer, Karlsruhe, Germany intramuscular) más 0.3-0.6 ml/kg de peso corporal de propofol (propofol al 1% Fresenius, Fresenius Kabi Deutschland, Germany) por vía intravenosa en el sentido de oído. Después del tratamiento se aplicó por vía intravenosa el antagonista Atipamezole clorhidrato ((Antisedan Pfizer, Karlsruhe, Germany). El grupo que no recibió insuflación sirvió como grupo control. El grupo 1 y 2 recibieron insuflación de O3/O2 y O2 puro

respectivamente. El procesador de gas ozono fue el Medozon IP (Herrmann Apparatebau, Kleinwallstadt, Alemania, titular de la licencia) diseñado especialmente para la insuflación de mezcla de gases O₃/O₂ en el peritoneo, también se utilizó para insuflar al grupo O₂. Este novedoso generador Medozon Ip ha sido inventado por Siegfried Schultz , el primer autor de este documento y ha sido recientemente patentado (Az: DE102004017599.3; PCfIDR2005/000597; EP05740628.22310; patent holder Transmit GmbH Giessen, Germany). La recién sintetizada mezcla de gases O₃/O₂ fue insuflado inmediatamente desde el generador al peritoneo a

través de un equipo de ozono (OzoneSet ip REF HAB no. 18052, Herrmann Apparatebau, Kleinwal!stadt, Germany) consistente en una alargadera o prolongador de 150 cm y un filtro estéril de 40 u conectado a la salida del generador Medozon Ip. Por el tubo previamente fluye un flujo de gas de aproximadamente 10 ml para asegurar que el tubo no contiene aire cuando se abra la llave de tres vías que da paso al peritoneo. La mezcla de O₃/O₂ se aplica a razón de 80 ml/Kg. de peso corporal y a una concentración de 50 ug, correspondiendo esta concentración a un 97.5% de oxígeno y un 2,5% de ozono. La llave de tres vías conectada Vasofix Braunele (I7G, Braun Melsungen AG, Melsungen,

Germany) que fue implantada en el cuadrante inferior derecho del abdomen se utiliza para control de la AIPC (Presión intraperitoneal) antes y durante la insuflación. Análogamente, los animales del grupo control, fueron anestesiados y conectados al Generador Medozon IP, pero no recibieron la insuflación de gas. Todos los animales fueron observados hasta el día 90 post inoculación de suspensión de células tumorales. Se vigiló y controló el estado general de salud de los animales, el peso corporal, con un calibre Sylvac SA, sistema suizo se midió el tamaño del tumor de la oreja derecha, la parótida y los nodos linfáticos. Para evitar que los animales tuvieran una muerte rápida

debido a infección grave local en el sitio del tumor o por hemorragia masiva en el curso del desarrollo del tumor, la ablación de la oreja derecha 1-2 cm proximal al tumor se realizó bajo anestesia con 0,1 ml/Kg. de peso corporal de glycopyrrolato por vía subcutánea, seguida por inyección intramuscular con una combinación de 5 mg/kg de peso corporal de xylazina y 70 mg/kg de peso de ketamina.

Señales de estrés, dolor o caquexia, definida como la pérdida de peso por encima del 20%, fueron los criterios para la eutanización según lo recomendado por el Consejo Canadiense del Cuidado de los Animales (27). Además, los criterios de clasificación de efectos adversos antes

y después de la terapia con O3/O2 fueron registrados de acuerdo con el Programa de Evaluación de Terapias para el Cáncer durante todo el período de observación.

Inmune-supresión

De los conejos en los que se dio la

remisión completa después del tratamiento con O3/O2, seis de ellos se dividieron en dos grupos, de 3 conejos cada grupo. Uno de los grupos, 3 conejos, fue inmune-suprimido con una combinación de dexametasona (Dex; Dexa, Jenapharm, Jena, Germany) ; 1.5 mg/kg de peso corporal por vía subcutánea y Ciclosporina A (CSA, Sandimmun,g" Novartis Pharma, Nuremberg, Germany), 20 mg/kg de peso corporal, subcutanea. Recibieron O3/O2 + DEX + CSA.

Los animales del segundo grupo, otros 3 conejos, recibieron un tratamiento simulado. Es decir, recibieron O3/O2

pero no combinación de DEX+CSA, sino que un tratamiento simulado por vía subcutánea.

La dosis de dexametasona fue administrada de una sola vez por vía subcutánea el 2º día junto con la primera inyección de CSA (Fig 2). La inmune supresión se mantuvo con aplicaciones diarias de CSA a razón de 20 mg/kg de peso corporal, inyectados por vía subcutánea durante 11 días consecutivos.

Otro conejo que recibió el tumor por

primera vez (del grupo 3, de los que había recibido tratamiento simulado pero no tratamiento de gases) se utilizó como control de la agresividad de la suspensión tumoral.

Otro conejo que fue inmunosuprimido con DEX/CSA (control + DEX/CSA) fue utilizado como monitor para supervisar los efectos de los agentes inmunosupresores en la tasa de provocar tumor.

Todos los conejos utilizados en esta parte experimental del estudio

recibieron las mismas suspensiones tumorales del carcinoma VX2 procedentes del mismo conejo donante.

Dos días después de la aplicación de la primera inyección de los agentes inmunosupresores o del tratamiento simulado, todos los conejos recibieron una inoculación de la suspensión de células tumorales VX2. Para aumentar la posibilidad de implantación tumoral se inoculó en ambas orejas. La tasa de reimplantes tumorales se determinó a los 14 días después de la inoculación.

Tomografía computarizada

Los conejos fueron premedicados con 0,1 ml/kg de peso corporal subcutánea de glycopyrrolato y anestesiados con una combinación de xylazina 5 mg/kg y ketamina 30 mg/kg por vía intramuscular. La tomografía computarizada fue realizada con un generador Siemens Somatom Plus 14(Siemens, ErJangen, Germany).

Parámetros sanguíneos

De la oreja izquierda, libre de tumor, de la arteria central auricular se tomaron muestras de sangre arterial 14 días después post-inoculación, antes de la 1ª insuflación (de gas / del tratamiento simulado) y el día 19 (un día después de finalizado el tratamiento).

Ozonoterapia intraperitoneal. Traducción al español

Escrito por Juan Carlos Pérez Olmedo

Domingo 04 de Abril de 2010 21:49 - Última actualización Lunes 05 de Abril de 2010 19:19
