

TÍTULO DEL PROYECTO:**EVALUACIÓN DE TOXICIDAD EN CONSUMIDORES DE AGUA DE MAR****INVESTIGADOR PRINCIPAL: WILMER SOLER T.** Bioquímico MSc.

Profesor Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia. Carrera 51D N° 62-29

Teléfono (57-4) 21060 30 y 2106093 Residencia 2646015

E-Mail: wsoler@carios.udea.edu.co y wsoler@medicina.udea.edu.co

GRUPO DE INVESTIGACIÓN SOBRE EL AGUA DE MAR (A.MAR)

Grupo en proceso de formación

INVESTIGADORES:

JAIME PÉREZ G. (Coordinador médico). MD. Especialista en medicina deportiva.

Profesor Universidad de Antioquia

LUZ ESTELA PENAGOS G. MD. Gastroenteróloga y Endoscopista.

Profesora Universidad de Antioquia

ANDRÉS PAREJA L. Estudiante de Maestría. Universidad Nacional, Medellín

NELLY DEL CARMEN VELÁSQUEZ E. Bióloga

MARÍA ELENA MARQUEZ F. Bióloga, Genetista MSc.

Profesora Universidad Nacional, sede Medellín.

FABIO ALBERTO HENAO A. MD. MSc. en Salud Pública (pendiente tesis),
Especialista en Ciencias Sociales.

LUIS GUILLERMO MEJÍA J. MD. Especialista en Medicina del Deporte y el
Ejercicio

DURACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN:	12 meses
FECHA DE INICIO:	Febrero de 2005
COSTO TOTAL DE LA INVESTIGACIÓN:	\$ 31.900.000
MONTO SOLICITADO A FUNDACIONES	
Aquamaris:	\$ 10.600.000
Proboquilla:	\$ 5.000.000
UNIVERSIDAD DE ANTIOQUIA:	\$ 12.200.000
UNIVERSIDAD NACIONAL:	\$ 4.100.000

INTRODUCCIÓN

En nuestra época reciente, la ingesta de agua de mar (AM) en humanos y el suministro a animales se viene realizando desde hace unos 100 años, a partir de los trabajos del fisiólogo francés Rene Quinton y colaboradores sobre las propiedades nutricionales y terapéuticas, lo que a su vez dio paso a la creación de los dispensarios marinos en Francia, Inglaterra, Egipto y a la cultura reciente de su consumo como nutriente en otros países europeos. Después de filtrarla (como método de esterilización en frío) y diluirla a concentración isotónica, en estos dispensarios se realizaron cientos de miles de aplicaciones por vía subcutánea, en especial entre la población infantil, para el control de la desnutrición y toda clase de enfermedades infecciosas, gastrointestinales respiratorias y de la piel (1,2,3,4), etc. Se debe recordar que en esta época no existían los antibióticos y se utilizó el AM como nutriente celular al fortalecer el medio interno o líquidos extracelulares. Quinton realizó aportes significativos sobre la similitud de este medio, en particular del plasma sanguíneo, de diferentes especies animales con el AM, respecto al contenido relativo de minerales y elementos traza (alrededor de unos 15 que se conocían en ese entonces, varios de los cuales él detectó por primera vez). Además reconoció el AM como un medio orgánico al que denominó plasma marino, en consonancia con la ya conocida hipótesis del origen de la vida en el mar y la propuesta de medio interno de Claud Bernard.

Algunos textos de fisiología como el de Giese (5) presentan tablas comparativas de la composición iónica de la sangre o los líquidos corporales de diversos animales y el agua de mar y se resalta lo siguiente: “Aunque ni la concentración relativa de sales, ni la absoluta, sean exactamente iguales en la sangre y el agua de mar, encontramos una relación fundamental entre el agua de mar y la sangre de los animales por la notable semejanza de las concentraciones relativas de los iones en cada uno. Los estudios paleontológicos muestran que la vida proviene del mar; en la fase de la evolución en que los animales desarrollaron por primera vez un medio interno, la sangre puede haber sido semejante al medio en el cual

había nacido la vida. Al parecer casi todo el mundo está de acuerdo con este concepto general (Prosser y Brown, 1961)". En el libro de Conocimientos Actuales Sobre Nutrición de la OPS (6) se puede leer: "Se calcula que la vida comenzó hace unos 2.000 millones de años en los mares precámbricos y que, finalmente, emergió de los mares ordovicienses tempranos hace 360 millones de años. En cierto sentido, al abandonar el mar, los seres vivos debieron haber retenido su "propio mar" en la forma de líquidos corporales extracelulares e intracelulares (Smith HV, 1953; Pitts RF, 1974)".

Quinton, después de un arduo y extenso trabajo de medición de osmolaridad y temperatura en diferentes especies animales, logró aportes importantes a la teoría de la evolución, basado en la emergencia de especies más avanzadas, que se resistían a los cambios de enfriamiento del planeta a partir de los 44 °C del origen de la primera célula y el aumento de la salinidad en el mar. Su trabajo, sustentado en el Instituto de Francia y sus cinco academias le mereció el reconocimiento de sabio y se le mencionó como el Darwin francés. Lamentablemente su trabajo entró poco a poco en el olvido por el significativo avance y desarrollo de los antibióticos. Sin embargo, la cultura del consumo del AM nunca desapareció totalmente y aún hoy existen algunos laboratorios que la filtran y la envasan para su comercialización en Europa y Japón (7). El diccionario Vidal francés de 1978 describe los usos y propiedades del AM como elemento nutricional y terapéutico (anexo 1).

Investigaciones recientes en el Japón han mostrado el mejoramiento de dermatitis, eczema y balance mineral en pacientes que bebieron 500 ml diarios de agua de mar durante un año, comparando con un grupo control que tomó igual cantidad de agua destilada (8). El grupo experimental presentó al final del estudio, una disminución significativa en el pelo del contenido de aluminio, mercurio y plomo, metales pesados que pueden causar toxicidad. El mismo grupo de investigadores ha reportado efecto significativamente favorable en pacientes con rinitis alérgica (9) y en la presión arterial (10), tomando agua de mar comercial obtenida de gran

profundidad y pasada por filtro de $0.22 \mu\text{m}$, que retiene la mayoría de los microorganismos. Estos investigadores atribuyen esta respuesta favorable de los pacientes al agua de mar, al contenido de elementos traza. Además, ya es bien conocido el uso tópico del agua de mar para tratar problemas de la piel y en lavados nasales (11,12,13). También se han empezado a estudiar los principios activos como antibióticos, antiinflamatorios, antitumorales, etc., sintetizados por las bacterias marinas, además de las propiedades nutricionales del plancton, en el cual se le han detectado 23 elementos traza (14,15). Hay un renovado interés de la comunidad científica por el estudio del agua de mar, como se observa en un informe de la revista Mundo Científico (16).

El AM es químicamente muy compleja, con un total de unos 85 elementos descritos hasta el año 1974 (17), con alta diversidad de sales disueltas, gases, sustancias orgánicas y microorganismos. Los elementos contenidos se clasifican en: principales, los más abundantes (sodio, cloro, magnesio, calcio, sulfato, potasio, bicarbonato, bromuro, estroncio, boro y fluoruros); los nutrientes (carbono, oxígeno, nitrógeno y fósforo), presentes en forma de macromoléculas biológicas, vitaminas y los oligoelementos, que están en muy baja concentración (cobre, cinc, cobalto, hierro, molibdeno, etc). De todos los elementos, solo algunos de los últimos presentan variación en la proporción en que se encuentran en el AM, según el ecosistema considerado. Entre los gases disueltos en el AM tenemos: el oxígeno, el nitrógeno y el anhídrido carbónico; el argón y los otros gases nobles están en menor cantidad. El oxígeno es consumido por los organismos marinos; pero también es producido en el proceso de la fotosíntesis, que ocurre en las capas superficiales del océano, por la acción del fitoplancton. El anhídrido carbónico se relaciona con la alcalinidad del AM y la regulación del pH, además se fija en la fotosíntesis y se disuelve fácilmente a partir de la atmósfera, lo que contribuye a equilibrar el contenido de CO_2 atmosférico. (18) Con relación a los microorganismos el AM contiene alrededor de un millón de bacterias por mm^3 , unos 10 millones de virus y el plancton, lo que ha llevado al reconocimiento del mar como un medio vivo. Esta abundancia de vida marina se presenta

especialmente en las zonas costeras, debido al contenido de nutrientes. La base de la cadena alimenticia es el plancton fotosintético, que fija el CO₂ y la energía solar para la formación de materia orgánica. Este plancton está compuesto de algas microscópicas y cianobacterias (16). En sus ciclos vitales, estos microorganismos aportan al AM, una serie de materiales inorgánicos y orgánicos, entre macromoléculas biológicas, vitaminas, toxinas, etc.

En Colombia se viene utilizando el AM como recurso terapéutico desde hace unos 18 años en el Centro Integral de Talasoterapia en Coveñas, especialmente como baños; sin embargo, el consumo oral como complemento nutricional se incrementó de manera significativa desde hace unos cuatro años, debido al trabajo de fundaciones con sede en Barcelona (Prodimar y Aquamaris) (19), que han difundido la obra de Rene Quinton, han creado dispensarios marinos en diversos países y han apoyado la investigación científica sobre el AM. Diferentes grupos humanos en el país se han organizado para mantener un suministro gratuito de agua con fines de consumo humano y animal. Hay varios informes médicos de unos 55 casos (anexo 2), en los que se evalúa de manera retrospectiva y actual sobre los resultados de su uso en el tratamiento de enfermedades respiratorias, hiperlipidemias, diabetes, úlceras, gastritis, desnutrición, etc. Según estos informes, hasta febrero de 2003 más de 420 personas estaban utilizando el AM. De los entrevistados, un 90% manifestaron haber obtenido beneficio de ésta práctica y el 10% restante no lo obtuvieron, pero tampoco hubo empeoramiento de los síntomas. Alrededor de un 5% de los usuarios refirieron efectos secundarios como dolor epigástrico urente y deposiciones líquidas al inicio de su consumo que significó un alivio en el funcionamiento del colon. Cerca de un 5% de los usuarios desertaron de la práctica aduciendo intolerancia al sabor del agua de mar. En las siguientes fotografías se muestra una úlcera de dos años de evolución, de una mujer diabética, antes y luego de tres meses de lavados con AM (anexo 2).



Sobre estos informes, debemos considerar que no obedecen a protocolos suficientemente rigurosos y científicos, pero tampoco se deben ignorar, en especial como elementos de partida para el diseño de preguntas de investigación, inicialmente descriptiva.

Aunque se tienen los registros históricos de la ingesta de AM y su uso actual en forma comercial hipertónica o isotónica (filtrada o refinada), lo que es reconocido oficialmente en Europa y Japón, sin efectos adversos para la salud (Diccionario Vidal francés); es muy importante para la comunidad académica y no académica considerar los posibles riesgos del consumo en su forma natural, cuya concentración es aproximadamente tres veces mayor con respecto al plasma sanguíneo y por otra parte, los riesgos de contaminación química y microbiológica en el AM, por los desechos domésticos y agroindustriales vertidos en las costas (20).

Los efectos de esta polución orgánica dependen principalmente de la cantidad de contaminantes introducidos, pero que son modificados por factores tales como la configuración del fondo, las mareas y las corrientes, que influyen sobre la difusión de los contaminantes y en especial, por el catabolismo que realizan los microorganismos marinos sobre este componente orgánico (21).

Con relación al consumo oral de AM hipertónica, ésta provocará en el organismo respuestas fisiológicas y bioquímicas como la sed y la ingestión de agua, con aumento del volumen sanguíneo y del líquido extracelular (LEC). Este aumento de los volúmenes, junto con el mayor aporte de NaCl, KCl y otros electrolitos se compensarán con una mayor excreción renal de agua y electrolitos, incluso en individuos con alteraciones importantes de la función renal (22). En segundo lugar, suponiendo que los ajustes intrarrenales estén agotados por graves alteraciones del riñón, se pondrá en marcha los ajustes sistémicos, con leve aumento transitorio de la presión arterial (PA), disminución de las hormonas circulantes (renina, angiotensina II, Aldosterona y péptido natriurético auricular) y disminución de la actividad nerviosa simpática renal, todo lo cual aumentará la tasa de filtración glomerular (TFG) y la reducción de la reabsorción de Na⁺ y otros electrolitos. De ésta manera, si no hay trastornos hormonales graves se restablecerá la presión arterial y los volúmenes corporales (22).

Sobre el K⁺, la regulación de la concentración en el LEC es rigurosa porque las funciones celulares son muy sensibles a los cambios en esta concentración. Un aumento del K⁺ plasmático de solo 4 mEq/l puede provocar arritmias cardiacas y mayores concentraciones pueden originar fibrilación o paro cardiaco. Cerca del 98% del K⁺ se encuentra intracelularmente y solo un 2% en el LEC y en caso de hiperpotasemia el ingreso a la célula constituye una primera línea de amortiguación. Hay factores hormonales (insulina, catecolaminas y aldosterona) que estimulan la captación de K⁺ por parte de las células. En el riñón la excreción de K⁺ está determinada por la TFG, las tasas de reabsorción y secreción en los túbulos. Cuando existe un aporte elevado de K⁺, la excreción adicional se

consigue casi por completo por aumento de la secreción de éste en los túbulos distales y colectores, que pueden incluso superar la cantidad que pasa al filtrado glomerular, lo que indica la potencia del mecanismo secretor de K^+ , que se estimula en presencia de aldosterona. El riñón junto con factores hormonales, también dan cuenta de la regulación de otros electrolitos como Ca^{++} , Mg^{++} y fosfatos.

Con relación a los escasos efectos secundarios por la ingesta de AM, registrados en los informes médicos de los dispensarios, como el dolor urente en la boca del estómago y las heces líquidas (no diarrea), no conocemos antecedentes en la poca literatura disponible y más bien se resaltan las propiedades regeneradoras de tejidos en todo tipo de úlceras y gastritis, y como laxantes; según el Diccionario Vidal francés, los escritos del fisiólogo Rene Quinton y los informes médicos recogidos en Colombia. Sin embargo, en artículos científicos recientes se señala la posible relación entre casos de infecciones gastrointestinales en bañistas de playas turísticas y la exposición a agua de mar contaminada con bacterias terrestres (23).

Respecto al riesgo de generación de radicales libres, se conoce que el AM es fuertemente oxidante en presencia de suficiente oxígeno, pero puede ser reductora con déficit de éste, como puede ocurrir cerca de las costas por el consumo por parte de las bacterias (24). Ciertos iones, según los estados de oxidación o las concentraciones en solución pueden catalizar la producción de estas especies químicas como ocurre con la reacción de Fenton con el Fe^{++} y el Cu^+ ; o por el contrario, en algunos casos como el Se, en dosis altas pueden ayudar en la prevención y tratamiento de algunos cánceres (25,26,27). Compuestos de Cr (VI) y Cr (V), pero no el Cr (III), presentan una potente actividad carcinogénica, como se ha podido observar entre trabajadores de industria, en estudios epidemiológicos. Al utilizar estos compuestos en cultivos de linfocitos, decrecen la viabilidad celular y el pretratamiento de las células con antioxidantes revierte parcialmente la muerte celular (28). Se conoce que en el

AM aireada el cromo está principalmente como CrO_4^- (Cr^{+6}), pero pasa a Cr^{+3} , en ambiente de poco oxígeno (24).

Dadas las propiedades del AM, por un lado beneficiosas por su contenido de minerales, elementos traza biodisponibles y otra serie de sustancias biológicamente activas (15); y por otro lado, los posibles riesgos para la salud, debido a la hipertonidad (hasta ahora desconocidos en las prácticas milenarias y actuales de su consumo en los dispensarios marinos); y la posible contaminación química por vertidos domésticos y agroindustriales con acción genotóxica, los cambios en el estado de oxidación de algunos minerales, generadores de radicales libres; y la posibilidad de provocar procesos infecciosos o inflamatorios, en especial del sistema gastrointestinal, es muy importante realizar evaluaciones clínicas, fisiológicas y bioquímicas en los consumidores de AM.

Con este proyecto se busca obtener información científica que permita despejar dudas sobre la bioseguridad del consumo de AM sin procesar y posteriormente continuar con investigaciones de intervención en humanos, las que finalmente podrán estimular el uso masivo de este recurso natural, nutritivo y terapéutico; que además, es de fácil acceso para la población. Lo anterior puede tener repercusiones en la salud general de la población colombiana y otros grupos humanos y de animales, como se ha podido observar en la historia antigua y actual de los dispensarios marinos, en los que ha sido posible disponer el AM de forma gratuita para grupos muy pobres de la población.

El agua que se está consumiendo, principalmente por vía oral, se obtiene de sitios alejados de las playas a unos 5 km., en algunos lugares se extrae de profundidad entre 10 y 20 m., y en playas mas limpias se está obteniendo de la orilla. No obstante, la gran capacidad equilibradora y depuradora del mar (21), con estas medidas se busca evitar los riesgos de contaminación de las playas turísticas y aguas dulces contaminadas (23) y con el fin de tener mayor bioseguridad en estas prácticas, se realizan los análisis microbiológicos del agua de mar que se

transporta en recipientes plásticos. A pesar del uso del agua de mar para consumo oral en humanos y animales, con fines nutricionales y terapéuticos y de algunas publicaciones recientes sobre el tema, no conocemos investigaciones sobre la posible toxicidad, debido a esta práctica.

Respecto a los riesgos de toxicidad química del AM, hemos iniciado un primer estudio *in vitro*, realizados en los laboratorios de investigación en Bioquímica del departamento de Fisiología y Bioquímica de la Facultad de Medicina de la Universidad de Antioquia y el de Biotecnología Animal de la Universidad Nacional, sede Medellín (presentados en el Segundo Coloquio Internacional y Tercero Nacional de Investigación en Alimentación y Nutrición. Medellín, Colombia. Agosto 11-13 de 2004 y en el II Congreso Internacional de agua de mar. Fuerteventura, España, diciembre de 2004); hemos encontrado en un ensayo de actividad antioxidante total (Figura 1) que el AM, obtenida en Coveñas a unos 5 Km. de la playa y 10 m. de profundidad, comparada con un patrón comercial análogo de la vitamina E (trolox) y con suero sanguíneo, no presentó actividad prooxidante generadora de radicales libres (en este caso la sal $ABTS^{\cdot+}$) (29). También realizamos estudios de citotoxicidad y genotoxicidad con leucocitos humanos incubados por una hora en esta AM de Coveñas, a diferentes diluciones, en los cuales mostramos que la viabilidad celular se mantuvo cercana al 95%, similar a la obtenida en buffer PBS isotónico. Tampoco observamos genotoxicidad evaluada por el ensayo cometa (single cell gel electrophoresis) (Figura 2), una técnica de electroforesis de DNA muy sensible y utilizada (incluso en Medellín) en estudios de biomonitorio y en evaluación genotóxica de productos naturales, sustancias contaminantes, fármacos etc.(30,31,32), la cual permite detectar daños por ruptura de cadenas sencillas en el DNA y reparación en cualquier población de células eucariotas; de tal manera que a mayor daño, mayor fragmentación del DNA, que se observa en la cola del cometa. En este estudio evaluamos 50 células por cada concentración de AM y sus correspondientes controles negativos (en PBS) y positivos (con H_2O_2). A partir de los ensayos anteriores podemos concluir que al menos en los estudios *in vitro* realizados no hubo efectos tóxicos o de daño en las

membranas celulares, ni en el DNA de células expuestas a esta AM. Sin embargo, es muy importante iniciar los estudios en personas que toman AM y realizar más trabajos con animales de experimentación.

Figura 1. Actividad antioxidante total del agua de mar, medida como disminución de absorbancia por reducción del radical ABTS^{o+}

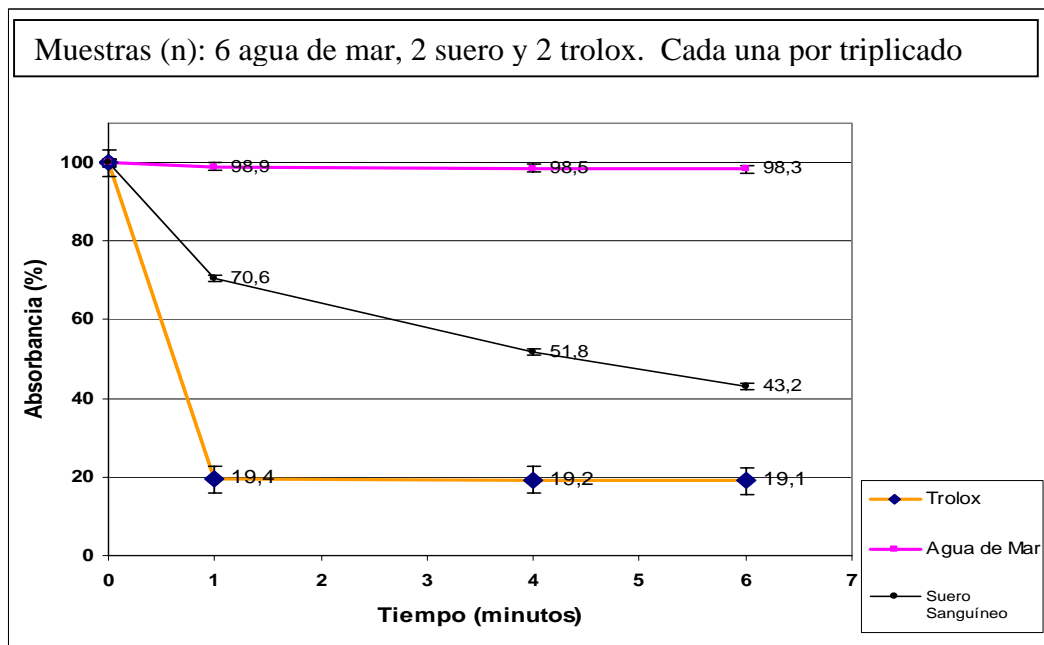
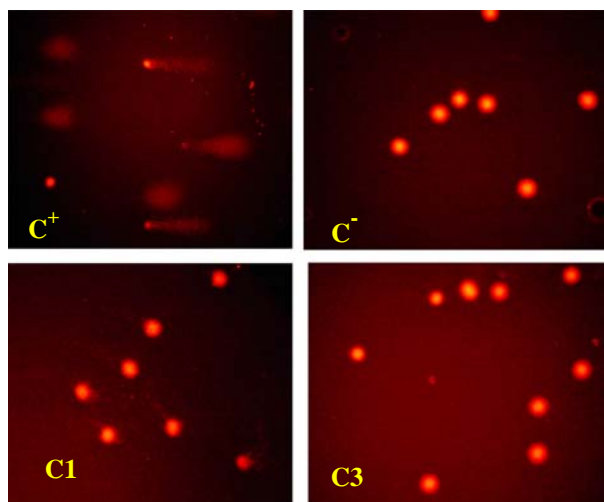


Figura 2. DNA de leucocitos humanos incubados por una hora en agua de mar (ensayo “cometa”)



C⁺ control positivo con H₂O₂, C⁻ control negativo con PBS, C1 con agua de mar al 0.9% de salinidad y C3 con agua de mar al 2.2% de salinidad.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Dado el uso creciente en humanos y animales del agua de mar como complemento nutricional y terapéutico, tema que ha sido objeto de algunas publicaciones científicas recientes e informes médicos, en los que se muestra su utilidad en diversos problemas de salud, sin efectos adversos importantes reportados; y por otra parte, los riesgos de contaminación químicas y microbiológica del AM, es fundamental estudiar en consumidores de AM sin tratar, los posibles daños citotóxicos, genotóxicos, gástrico, hepático, renal, hematológico y presión arterial (PA); de los cuales no conocemos hasta ahora que se hayan presentado o publicado. Nuestras investigaciones preliminares *in vitro* al incubar linfocitos y eritrocitos humanos en muestras de agua de mar de Coveñas, por una y dos horas respectivamente, indican la ausencia de citotoxicidad y genotoxicidad. Evaluar *in vivo* la posible toxicidad del AM significará un avance importante en el conocimiento de la bioseguridad de la terapia marina, para dar paso a estudios de intervención.

LA PREGUNTA

¿Se presentará citotoxicidad y genotoxicidad en linfocitos y alteraciones de indicadores de daño gástrico, intestinal, hepático, renal, hematológico y PA en 30 personas adultas con gastritis, que *motu proprio* estén dispuestas a consumir por vía oral, más de 700 ml semanales de agua de mar sin tratar y durante al menos cuatro meses continuos, comparado con ellos mismos al inicio del estudio?

LA HIPÓTESIS

Dada la analogía electrolítica relativa del agua de mar con el plasma sanguíneo y los antecedentes históricos de su uso terapéutico y nutricional, incluyendo la práctica reciente y nuestros resultados preliminares de ausencia de toxicidad para la membrana y el DNA celular; y por otra parte, la capacidad depuradora de los

microorganismos marinos frente a contaminación química y microbiológica terrestre, no se presentan diferencias estadísticamente significativas en la citotoxicidad y genotoxicidad de los linfocitos, ni en indicadores de daño gástrico, intestinal, hepático, renal, hematológico y PA, en un grupo de 30 personas con gastritis, que *motu proprio* consuman por vía oral, más de 700 ml. semanales de agua de mar sin tratar, durante al menos cuatro meses continuos; comparado con ellos mismos al inicio del estudio.

OBJETIVO

General

Evaluar la posible citotoxicidad y genotoxicidad en linfocitos y medir indicadores de alteración gástrica, intestinal, hepática, renal, hematológica y PA en 30 personas con gastritis, que *motu proprio* estén dispuestas a consumir por vía oral, más de 700 ml. semanales de agua de mar sin tratar, durante al menos cuatro meses continuos; comparados con ellos mismos al inicio del estudio.

Específicos

1. Evaluar la posible citotoxicidad y genotoxicidad en linfocitos de 30 personas adultas con gastritis, que *motu proprio* estén dispuestas a consumir por vía oral, más de 700 ml semanales de agua de mar sin tratar, durante al menos cuatro meses continuos; comparado con ellos mismos al inicio del estudio.
2. Evaluar el estado de las mucosas de faringe, esófago, estómago y duodeno mediante endoscopia digestiva, y realizar mediante biopsia gástrica e intestinal la detección de *Helicobacter Pylori* y el estudio anatomopatológico, en este grupo de consumidores de agua de mar, comparado con ellos mismos al inicio del estudio.
3. Determinar en sangre de este grupo de consumidores de agua de mar, las cifras de glucosa, hemoglobina, hemograma, tiempo de protrombina, enzimas transaminasas (ALT y AST), creatinina y BUN, como indicadores de función hematológica, hepática y renal y comparar con las de ellos mismos al inicio del estudio.

4. Medir las concentraciones de los iones sodio, litio, potasio, calcio, magnesio y cloro, en sangre de este grupo de consumidores de agua de mar y comparar con las de ellos mismos al inicio del estudio.
5. Medir la presión arterial sistólica y diastólica en este grupo de consumidores de agua de mar y comparar con la de ellos mismos al inicio del estudio.
6. Evaluar el estado general de salud en este grupo de consumidores de agua de mar y compararlo con el de ellos mismos al inicio del estudio.

METODOLOGÍA

Población. Se realizará un estudio cuasi-experimental (antes-después), en 30 individuos adultos de ambos sexos, con gastritis y medicados o no, que *motu proprio* estén dispuestas a consumir por vía oral, más de 700 ml. semanales de agua de mar sin tratar, durante al menos cuatro meses continuos. Los voluntarios serán residentes de Antioquia (Medellín, Rionegro, La Ceja, El Santuario etc.) y de la ciudad de Cartagena (Bolívar), lugares donde se realiza esta práctica de manera regular.

Se explicará ampliamente a las personas que voluntariamente quieran participar en el estudio sobre las condiciones y objetivos del estudio y se obtendrá el consentimiento escrito (anexo 3). Una vez finalizados las evaluaciones bioquímicas y fisiológicas, se entregará por escrito a cada participante sobre sus propios resultados y recomendaciones; y al terminar la investigación se les informará sobre las conclusiones. El proyecto se someterá a evaluación técnica y ética por parte del Centro de Investigaciones Médicas de la Facultad de Medicina de la Universidad de Antioquia (UdeA). Además se firmará, por parte de los investigadores, las actas de iniciación y finalización de la investigación y se incluyen las cartas de apoyo de la Universidad Nacional-sede Medellín y las fundaciones Aquamaris de Barcelona (España) y Proboquilla (Cartagena).

De cada voluntario se elaborará una historia clínica y un examen médico general para definir antecedentes personales y familiares de problemas de salud y el estado actual, esto se realizará en los consultorios de los médicos investigadores del estudio o en los lugares acondicionados para ello, en las ciudades diferentes a Medellín. La información se registrará antes y al final del estudio, en un formato en el que se incluye el dato de consumo de agua de mar (anexo 4).

Endoscopia digestiva superior. Procedimiento médico especializado que permite la toma de de biopsia y la visualización del esófago, estómago y duodeno. Se realizará en condiciones de ayuno de seis horas, al inicio del estudio y 12 horas después de la última ingesta de AM, al finalizar el mismo; para lo cual se utilizará medicación con xylocaina en aerosol al 2% sin epinefrina, para disminuir el reflejo nauseoso, en pacientes muy ansiosos se utilizará midazolam intravenoso para facilitar el procedimiento. Con el endoscopio se practicará una maniobra de retroflexión para evaluar la zona cardial y subcardial. Este examen tiene una duración de 3-5 minutos, con una recuperación adecuada del paciente en menos de 30 minutos en caso de sedación. Se tomará una biopsia para la prueba de ureasa que permite detectar la *helicobacter pylori* y otras del antro o del cuerpo gástrico y del duodeno, para análisis anatomopatológico. Los procedimientos los realizará una médica gastroenteróloga y endoscopista, con un equipo Olympus Gift XQ10 en la IPS de la Universidad de Antioquia o en el Centro de salud de la Boquilla en Cartagena de Indias, siguiendo estrictas normas de asepsia y antisepsia, según la Asociación Norteamericana de Gastroenterología. Anexo a la sala de endoscopia existe una unidad de atención prioritaria para recuperar al paciente sedado o atender cualquier complicación si se presentase. Todo paciente deberá firmar el consentimiento informado que se utiliza regularmente en la IPS universitaria sobre los beneficios y riesgos del procedimiento endoscópico y de la sedación.

Para las evaluaciones en sangre venosa se tomará una muestra de 15 ml, de 7 a 8 de la mañana en condiciones de ayuno de 12 horas y también 12 horas a partir

de la última toma o inyección de AM. La muestra se depositará en un tubo de ensayo con EDTA, se tomará una alícuota para la determinación de hemograma, el resto se separará por centrifugación a 2000 r.p.m. y el plasma se repartirá en viales de un mililitro, para la determinación de ionograma, glucosa, tiempo de protrombina, enzimas transaminasas (ALT y AST), como indicadores de función hepática; medición de concentración de creatinina y el BUN, como indicadores de función renal.

Prueba de genotoxicidad. Para determinar el efecto genotóxico del agua de mar en el DNA de linfocitos humanos se utilizará la técnica SCGE (single cell gel electrophoresis) o ensayo cometa, según el protocolo descrito por Singh N. et al (30). Se suspenderán en amortiguador PBS entre 5000 y 50000 linfocitos humanos aislados de sangre total por el método de centrifugación en un gradiente de densidad de Ficoll. Se utilizará como control positivo la incubación de las células con peróxido de hidrógeno (100 μ M). La viabilidad de las células se determinará mediante la exclusión con azul tripano (0.2%). 10 μ l de la suspensión celular se mezclará con 75 μ l de agarosa de bajo punto de fusión (LMA), la mezcla se colocará en un portaobjetos previamente recubierto con una capa de agarosa de punto de fusión normal. La suspensión celular se cubrirá con un cubreobjetos y se mantendrá a 4°C durante seis minutos. Luego se retirará el cubreobjetos y las láminas se sumergirán en una solución de lisis (NaCl 2.5M, Na₂EDTA 100mM, TRIS 10mm, triton X-100 1%, y DMSO 10%) a 4°C durante una hora, luego se llevarán las láminas a una solución de electroforesis alcalina para permitir desenrollamiento del DNA y expresión de sitios lábiles a álcalis (Na₂EDTA 1 mM, NaOH 300mm, pH 13) a 4°C y por 30 minutos. Luego se realizará la electroforesis durante 30 minutos a 25 voltios y 300 mA. Al término de la electroforesis, las láminas se lavarán con amortiguador neutralizante (tris 0.4M, pH 7.5) por 15 minutos y se deshidratarán con metanol absoluto.

Las láminas se teñirán con 30 μ l de bromuro de etidio 2 μ g/ml y se examinarán en un microscopio de fluorescencia equipado con un filtro de excitación de 515-560

nm y un filtro barrera de 590 nm usando una magnificación de 250X. De cada individuo se analizarán 50 células por duplicado, con un programa computarizado de análisis de imágenes que permite recolectar datos como longitud de la cola, momento de Olive (relación entre la distancia desde el centro de gravedad de la cabeza (CGH) al centro de gravedad de la cola (CGT) y el porcentaje de DNA en la cola %DNAT (31).

$$MO = \frac{CGT-CGH}{\%DNAT}$$

Análisis estadístico. Las variables continuas se estudiarán mediante la prueba t de student pareada, para comparar los dos momentos antes y final del estudio (a los cuatro meses), con una probabilidad estadística de $p < 0.05$. Se utilizará el programa STATISTICA 98.

RESULTADOS ESPERADOS: No se presentarán diferencias estadísticamente significativas en las pruebas de citotoxicidad y genotoxocidad en los linfocitos, ni en los indicadores sanguíneos de toxicidad hepática, renal o hematológica, en este grupo de bebedores de AM, entre los dos momentos a evaluar, antes y al final del estudio (a los cuatro meses). Dado los informes médicos y los usos conocidos del AM, para tratar úlceras y gastritis, se presentarán cambios favorables en los síntomas y en la anatomopatología de las células del sistema digestivo, después de cuatro meses de consumir AM.

CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES

ACTIVIDADES	MESES											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Información y consentimiento informado	■	■										
Consumo de agua de mar			■	■	■	■						
Evaluación médica y toma de muestras			■	■	■	■	■					
Medición de variables sanguíneas			■	■	■	■	■	■				
Procesamiento de los datos									■	■		
Elaboración de informe final y publicación										■	■	■
Búsqueda bibliográfica	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■

COMPROMISOS Y ESTRATEGIAS DE COMUNICACIÓN: Se entregará un informe individual a cada paciente con las conclusiones y recomendaciones derivadas del estudio. Con los resultados se participará en un evento académico de carácter nacional y una publicación en revista científica de divulgación nacional o internacional. Se entregará un informe a las fundaciones Aquamaris y Proboquilla. Una vez aprobado y finalizado el proyecto, se firmará el acta de iniciación y la de finalización respectivamente, por parte de todos los investigadores.

FUNCIONES DEL ESTUDIANTE: Colaborará en la elaboración de la encuesta clínicas, el procesamiento de la información y las pruebas de genotóxicidad.

PRESUPUESTO GLOBAL DEL PROYECTOS (pesos)

Rubros	Fuente				Total
	U de A ¹	U. Nacional ²	Fundación Aquamaris España	Fundación Proboquilla Colombia	
Personal	11.200.000	1.100.000	2.800.000		15.100.000
Pruebas Bioquímica:					
1.Cito y genotoxicidad (Equipos y Reactivos)*	1.000.000	3.000.000			4.000.000
2.Hemograma y química sanguínea			2.088.000	1.044.000	3.132.000
3.Ionograma			1.800.000	900.000	2.700.000
.Gastroscopia			2.500.000	1.000.000	3.500.000
Publicación Bibliografía y papelería			600.000		600.000
Desplazamiento a Cartagena			812.000	2.056.000	2.868.000
TOTAL	12.200.000	4.100.000	10.600.000	5.000.000	31.900.000

*Los equipos y reactivos ya existen en los laboratorios donde se realizan las pruebas.

1 Universidad de Antioquia

2 Universidad Nacional, sede Medellín

**PRESUPUESTO DE FUNDACIÓN AQUAMARIS PARA LAS PRUEBAS
BIOQUÍMICAS Y GASTROSCOPIA DE 20 INDIVIDUOS DE LA CIUDAD DE
MEDELLÍN Y ORIENTE ANTIOQUEÑO**

	Pesos
Transaminasas AST y ALT	612.000
Bilirrubina	280.000
Tiempo de protrombina	426.000
Hemograma completo	290.000
Úrea	154.000
Creatinina	166.000
Glucosa	160.000
Ionograma (Na, K, Ca, Mg, Cl y Li) Para cada individuo: \$45.000	1.800.000
Gastroscofia, para cada individuo: \$50.000	2.000.000
Análisis anatomopatológico (60 muestras)	500.000
TOTAL	6.388.000

**PRESUPUESTO DE FUNDACIÓN PROBOQUILLA PARA PRUEBAS
BIOQUÍMICAS Y GASTROSCOPIA DE 10 INDIVIDUOS DE LA CIUDAD DE
CARTAGENA**

	Pesos
Transaminasas AST y ALT	306.000
Bilirrubina	140.000
Tiempo de protrombina	213.000
Hemograma completo	145.000
Úrea	77.000
Creatinina	83.000
Glucosa	80.000
Ionograma (Na, K, Ca, Mg, Cl y Li) Para cada individuo: \$45.000	900.000
Gastroscofia, para cada individuo: \$50.000	1.000.000
TOTAL	2.944.000

GASTOS EN PERSONAL (pesos)

Nombre del Investigador	Función en el proyecto	Dedicación H/semana	Costo Aquamaris	Costo U.NAL	Costo U de A	Total
Wilmer Soler	Coordinador General	8			5.600.000	5.600.000
Jaime Pérez	Coordinador médico	4			2.200.000	2.200.000
Luz Estela Penagos	Evaluación médica y gastroscopia	3			1.700.000	1.700.000
Fabio A. Henao	Evaluación médica	3			1.700.000	1.700.000
Luis Guillermo Mejía	Evaluación médica	3				
Nelly Velásquez	Prueba genotoxicidad	6	2.000.000			2.000.000
Andrés Pareja	Prueba genotoxicidad	4	800.000			800.000
Maria E Marquez	Prueba genotoxicidad	1		1.100.000		1.100.000
TOTAL			2.800.000	1.100.000	11.200.000	15.100.000

BIBLIOGRAFÍA

1. Mahé A. El plasma de Quinton. El agua de mar nuestro medio interno. 1ª Ed Barcelona. Icaria editorial, SA. 1.999
2. Quinton R. L'eau de mer milieu organique. Constance du milieu marin originel comme milieu vital des cellules, à travers la série animale. 39a ed. Paris : Editions Encre, 1995 :503
3. Jarricot J. Origines marines de la vie et pédiatrie. 1ª Ed, Largentière. 1938.
4. Simon R, Quinton R. L'eau de mer. En injections isotoniques sous-cutanées dans le traitement de la tuberculose pulmonaire. 1ª Ed, Paris. Editions de la revue des idées. 1.906.
5. Giese AC. Fisiología General. Estructura y Dinámica Celular. 3ª Ed. México. Editorial Interamericana, SA. 1968
6. Preuss HG. Sodio, cloruro y potasio. En: Bowman AB, Russell RM. Conocimientos actuales sobre nutrición. Washington, DC: OPS- ILSI, publicación científica y técnica N° 592; 2003:330-339
7. Laboratoires Quinton International S.L. Almoradí (CE). www.quinton.es Consultado en julio de 2004
8. Kimata H, Tai H, Nakagawa K, Yokoyama Y, Nakajima H, Ikegami Y. Improvement Of Skin Symptoms And Mineral Imbalance By Drinking Deep Sea Water In Patients With Atopic Eczema/Dermatitis Syndrome (AEDS). Acta Médica. 2002; 45: 83-84
9. Kimata H, Tai H, Nakajima H. Reduction of allergic skin responses and serum allergen-specific IgE and IgE-inducing cytokines by drinking deep-sea water in patients with allergic rhinitis. Otorhinolaryngol Nova. 2001; 11: 302-303
10. Tai H, Nakagawa K, Watanabe Y, Yokoyama Y, Nakajima H, Ikegami Y, Nozaki Y, Kikuchi Y. Effect of high mineral water prepared from deep-sea water on human blood pressure and hemorheological parameter. Deep Ocean Water Res. 2000; 1:53
11. Harari M, Shani J, Seidl V, Hristakieva E. Climatotherapy of atopic dermatitis at the dead sea: demographic evaluation and cost-effectiveness. Int J Dermatol. 2000; 39: 59-69
12. Holmstrom M, Rosen G, Wahlander L. Effect of nasal lavage on nasal symptoms and physiology in wood industry workers. Rhinology. 1997; 35: 108-112
13. Seppey M, Schveri T, Hausler R. Comparative randomised clinical study of tolerability and efficacy of rhinomer force 3 versus a reference product in post-operative care of the nasal fossae after endonasal surgery. ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec. 1996; 58: 87-92
14. Arslan Z, Ertas N, tyson JF, Uden PC, Denoyer ER. Determination of trace elements in marine plankton by inductively coupled plasma mass. Fresenius J anal Chem. 2000; 366: 273-282
15. Fenical W. Chemical studies of marine bacteria: developing a new resource. Chem Rev. 1993; 93:1673-1683
16. De Long E. Los microbios oceánicos. Mundo Científico. 2002; 239: 34-41

17. Turekian KK. Los océanos. 1ª Ed, Barcelona, Ediciones Omega S.A. 1974
18. El mar. Gran Enciclopedia Salvat, Tomo 4, Bogotá, Salvat S.A. 1975
19. Fundaciones Aquamaris y Prodimar www.aquamaris.org y www.prodimar.org Consultados en julio de 2004
20. Perfiles epidemiológicos. Región costa Atlántica. Ministerio de salud. Santafé de Bogotá D.C., marzo de 1996
21. Hood DW. Los ciclos químicos del mar. En Vetter RC. Oceanografía. La última frontera. 1ª ed. Buenos Aires. Editorial El Ateneo. 1976: 30-40
22. Guyton AC, Hall JE. Tratado de fisiología médica. 10ª Ed. Madrid: Mc. Graw-Hill. Interamericana; 2001. Pp. 401-420
23. Arvanitidou M, Katsouyannopoulos V, Tsakris A. Antibiotic resistance patterns of enterococci isolated from coastal bathing waters. J Med Microbiol. 2001; 50:1001-1005
24. Turekian KK. Los océanos. 1ª Ed, Barcelona, Ediciones Omega S.A. 1974
25. Chimienti F, Aouffen M, Favier A, Seve M. Zinc homeostasis-regulating proteins: new drug targets for triggering cell fate. Curr Drug Targets. 2003 4: 323-338
26. Lu J, Jiang C, Kaeck M, Ganther H, Vadhanavikit S, Ip C, Thompson H. Dissociation of the genotoxic and growth inhibitory effects of selenium. Biochem Pharmacol. 1995; 50 213-219
27. Neve J. Selenium as a 'nutraceutical': how to conciliate physiological and supra-nutritional effects for an essential trace element. Curr Opin Clin Nutr Metab Care. 2002; 5: 659-663
28. Vasant C, Balamurugan K, Rajaram R, Ramasami T. Apoptosis of lymphocytes in the presence of Cr(V) complexes: role in Cr (VI)-induced toxicity. Biochem Biophys Res Commun. 2001; 285: 1354-1360
29. Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. Free Radic Biol Med. 1999; 26:1231-1237
30. Singh N P, Mccoy M T, Tice R, Schneider E L. A simple Technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. Experimental Cell Research. 1988; 175:184-191
31. Konca K, Lankoff A, Banasik A, Lisowska H, Kuszewski T, Gózd S, Koza Z, Wojcik A. A cross-platform public domain PC image-analysis program for the comet assay. Mutation Research. 2003; 534: 15-20.
32. Márquez-Fernández ME, López-Ortiz JB, Correa-Londoño G, Pareja-López A, Giraldo-Solano A. Detección del daño genotóxico agudo y crónico en una población de laboratoristas ocupacionalmente expuestos. Iatreia. 2003; 16:275-282