

Asociación Española de Profesionales Médicos en Ozonoterapia



“Curso Intensivo Teórico Práctico Ozonoterapia en Medicina Interna e Infiltraciones del Aparato Músculo Esquelético”

Bases Bioquímicas de los Efectos del Ozono

11-12 Noviembre, 2016. Madrid.



Gregorio Martínez Sánchez, Pharm.D, Ph.D.

gregorcuba @ yahoo.it



E-MAIL

Dr. Gregorio Martínez Sánchez, Ph.D.

“Bases Bioquímicas de los Efectos del Ozono”

Evidencias clínicas, preclínicas, y toxicológicas

Reacciones adversas

Toxicidad

Ozonoterapia y sistema inmune

Ozonoterapia y dolor

Ozonoterapia en los eventos vasculares

Papel del Nrf2 en el mecanismo de acción del O₃

Información

- Libros
- MedLine
- ISCO3/Zotero
- Revistas Científicas
- Revistas Especializadas
- Congresos / Cursos



Revista Española de Ozonoterapia

ISSN: 2174-2215

Publicada por AEPRONO (Asociación Española de Profesionales Médicos en Ozonoterapia)

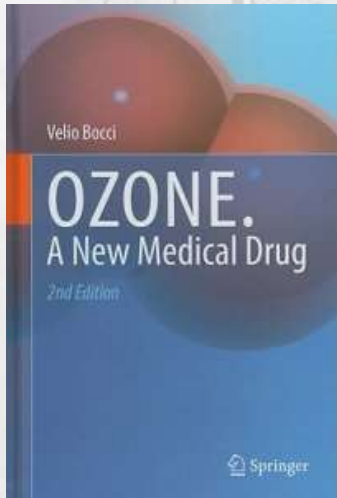


International Journal of Ozone Therapy

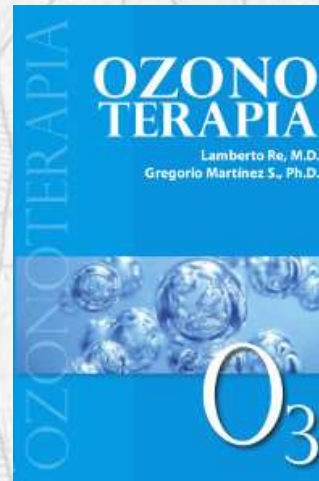
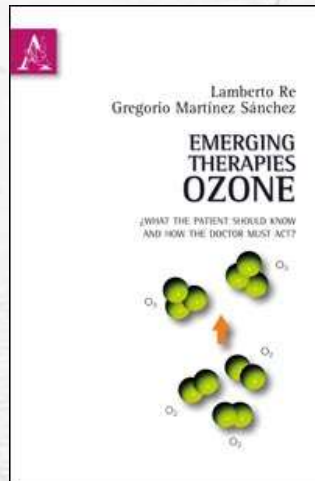
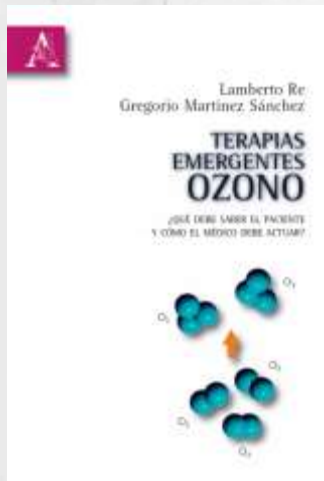


Ozone : Science & Engineering Journal

Libros / Libros de Texto



Ozone Therapy in Practice



ISCO3 / Antecedentes



- **Comité Científico Internacional de Ozonoterapia (ISCO3) se creó en Viena el 8 de octubre de 2010.**
- **El ISCO3 es una junta independiente de las asociaciones nacionales e internacionales o federaciones de la ozono terapia, y las sociedades mercantiles.**
- **ISCO3 tiene en su página web (www.isco3.org) de acceso público y gratuito la Biblioteca Digital Mundial ISCO3 Ozonoterapia.**
- **ISCO3 decidió desarrollar y mantener actualizada una biblioteca en línea con todos los artículos publicados y presentados en el tema ozono terapia.**
- **La biblioteca en línea contiene más de 2400 registros: documentos indexados y no indexados, libros, tesis, documentos históricos y otros. La base de datos crece cada día.**

ISCO3 / Antecedentes



- La Base de Datos “Ozonoterapia ISCO3” está organizada en diferentes archivos y sub-archivos para una fácil localización de los contenidos científicos. Cuenta con dos niveles de acceso: Para los **usuarios habituales** sin necesidad de conocimientos informáticos avanzados, y para **usuarios avanzados**.
- ISCO3 ofrece **acceso público y libre** a la biblioteca digital con ello proporciona una herramienta muy importante de referencia para todos los profesionales de la salud que están utilizando el ozono médico, ya sea para sus pacientes o para la investigación.

ZOTERO

Usuarios Avanzados



<http://www.zotero.org/>

Es necesario instalar el software gratuito **Zotero**, estudie las instrucciones del proveedor de software y el uso de las posibilidades que ofrece

zotero

Log In Register

Upgrade Storage

Home Groups People Documentation Forums Get Involved

Search zotero Search

Zotero [zoh-TAIR-oh] is a free, easy-to-use tool to help you collect, organize, cite, and share your research sources. It lives right where you do your work—in the web browser itself.

Download Now

Collect Organize Cite Sync Collaborate

Search your research with a single click.

A personal research assistant.

Zotero automatically researches, organizes, and cites your personal research. Whether you're writing a paper, your personal archive, or a corporate database, Zotero automatically indexes the full-text content of your library, enabling you to find exactly what you're looking for with just a few keystrokes.

Follow Zotero on Twitter

Find Zotero on Facebook

Subscribe to the Zotero blog

Zotero News

Zotero Apps Go Mobile

Announcing the Zotero 3.0 Beta Release

Major Upgrades Underway

Get Involved

Zotero wouldn't be the dynamic responsive tool it is today without the tireless efforts of all our community members. Find out how to get involved.



Ozono, desde su descubrimiento a las aplicaciones clínicas

Christian Friedrich
Schönbein
(1799 -1868)



1915
Tratamientos tópicos

1932 Odontología



1950 Oncología

1968

Auto hemo mayor
Medicina General

1981

Ortopedia

2014...

GENOMICA Evidencias
Nrf2/EpER

2000....

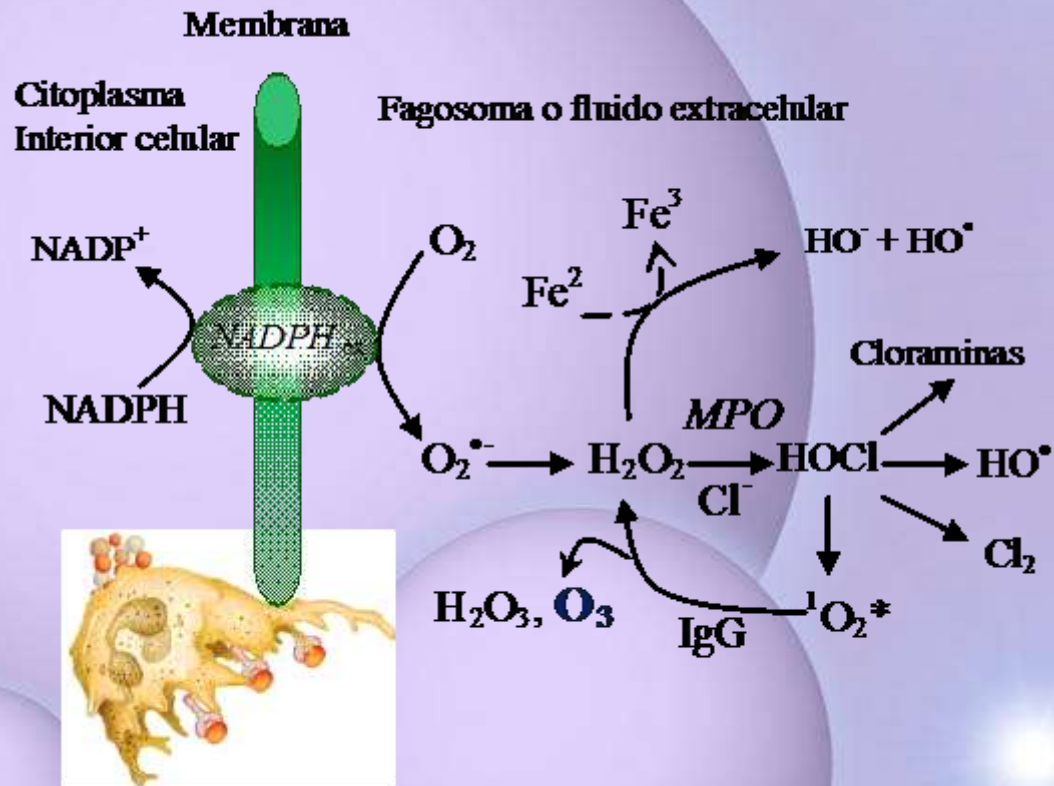
Ensayos clínicos. Guías internacionales.
Revistas especializadas, Congresos.
Sociedades científicas ...

PROTEOMICA

León OS, Menéndez-S, Merino N, Castillo R,
Sam S, Pérez L, Cruz E, Bocci V. Ozone

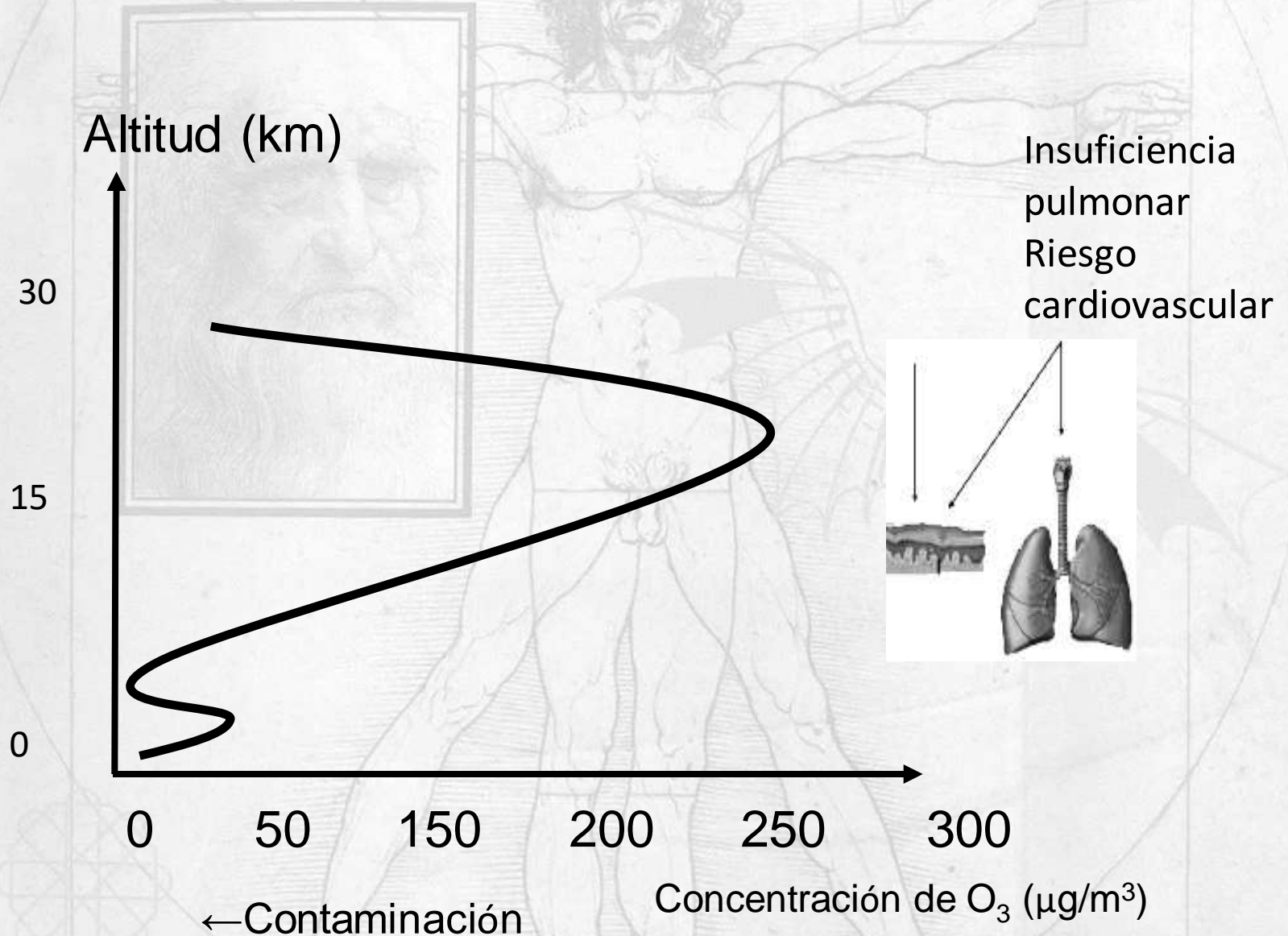
oxidative preconditioning: a
protection against cellular damage by free
radicals. *Mediators of Inflammation* **1998**;
7:289-294.

Representación esquemática de los procesos que conducen *in vivo* a la formación de O_3 por parte de neutrófilos activados.



Babior BM, Takeuchi C, Ruedi J, Gutierrez A, Wentworth P, Jr. Investigating antibody-catalyzed ozone generation by human neutrophils. Proc Natl Acad Sci U S A. 2003 Mar 18;100(6):3031-4.

Toxicidad del Ozono



ppm	$\mu\text{g}/\text{m}^3$	$\mu\text{g}/\text{mL}$	$1 \text{ ppm de O}_3 = 2\,000 \mu\text{g}/\text{m}^3 = 0,002 \mu\text{g}/\text{mL}$
90 ppb	0,128		Concentración atmosférica normal
0,001	2	0,000002	Valor detectable por humanos hipersensibles
0,003	6	0,000006	Umbral de percepción en ambiente de laboratorio
0,010	20	0,00002	Umbral de percepción de la mayor parte de los humanos. Detectable en ambientes domésticos
0,040	80	0,16	Límite máximo de emisión por un electrodoméstico
0,050	100	0,2	Concentración recomendada en espacios ventilados. Máxima conc. FDA para climatizadores
0,100	200	0,4	Máxima exposición zona industrial 8 d 6 h
0,125	250	0,5	Concentración atmosférica máxima
0,15-51	300 – 1020	0,6 – 2,04	Contaminación Ciudades de USA
0,30	600	1,2	Nivel umbral al cual aparecen efectos tóxicos en vías respiratorias. Lagrimeo, irritación de las vías resp.
0,5	1 000	2	Alarma 1 (Los Angeles / California). Nausea, dolor de cabeza, edema pulmonar
1-2	2 000 – 4 000	4 – 8	Alarma 2. Dolor de cabeza, y en el pecho, resequedad del tracto respiratorio
2-5	4 000 – 10 000	8 - 20	Mantenido por varios min puede ocasionar disnea progresiva y espasmos bronquiales
5-25	10 000- 50 000	20 - 100	Expo de 3 h, 12 ppm es letal en Conejillos de India.
25	50 000	100	Origina efectos tóxicos agudos en humanos
50	100 000	200	Expo 60 min es probablemente letal

Efectos del ozono inhalado sobre la salud

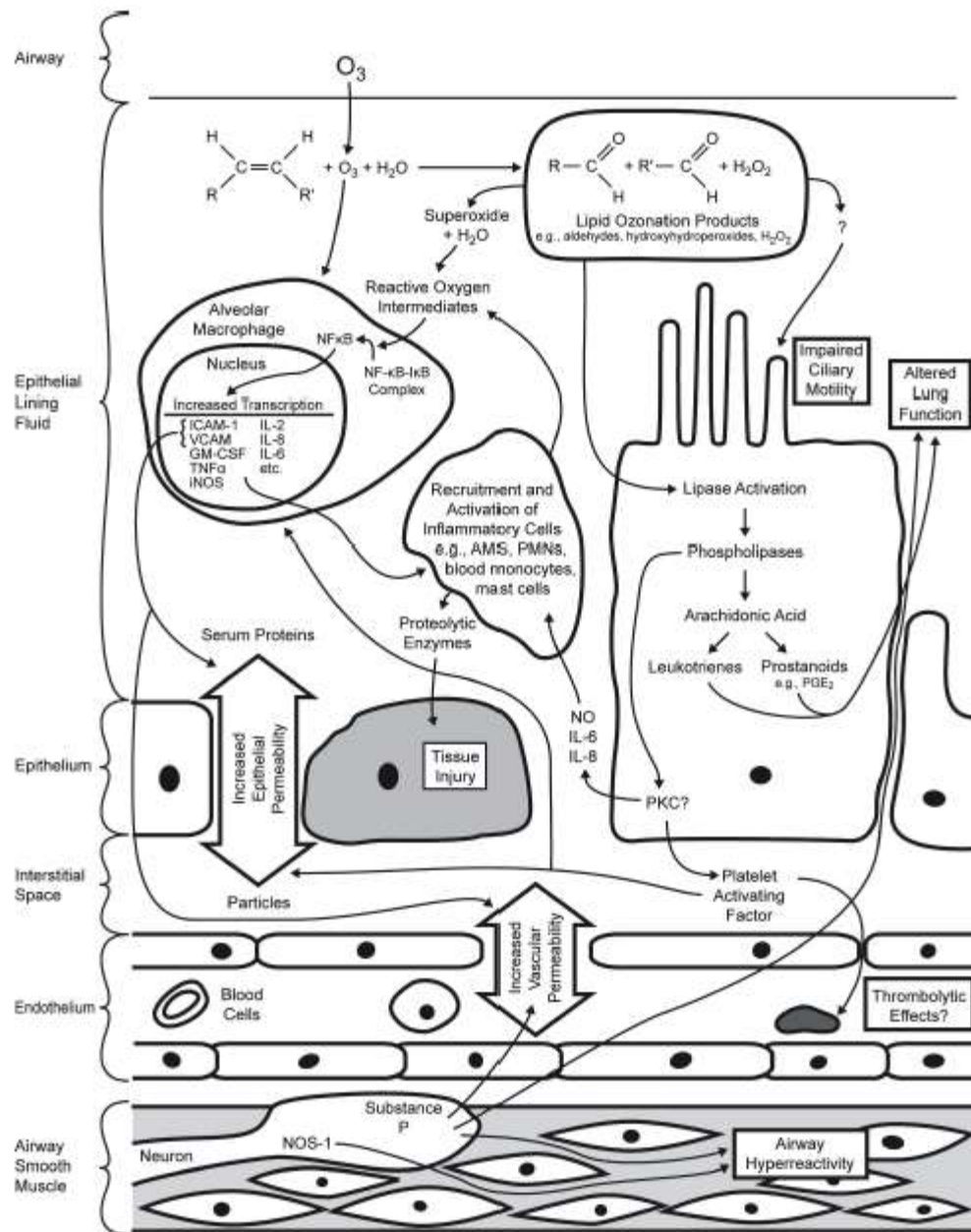
- Trastornos respiratorios agudos y crónicos
- Efectos a nivel cardiovascular
- Incidencia en la mortalidad

Fuentes:

- Estudios en humanos en cámaras
- Estudios epidemiológicos
- Adicionalmente:
 - Estudios de toxicidad en animales
 - Estudios del mecanismo de acción *in vitro*

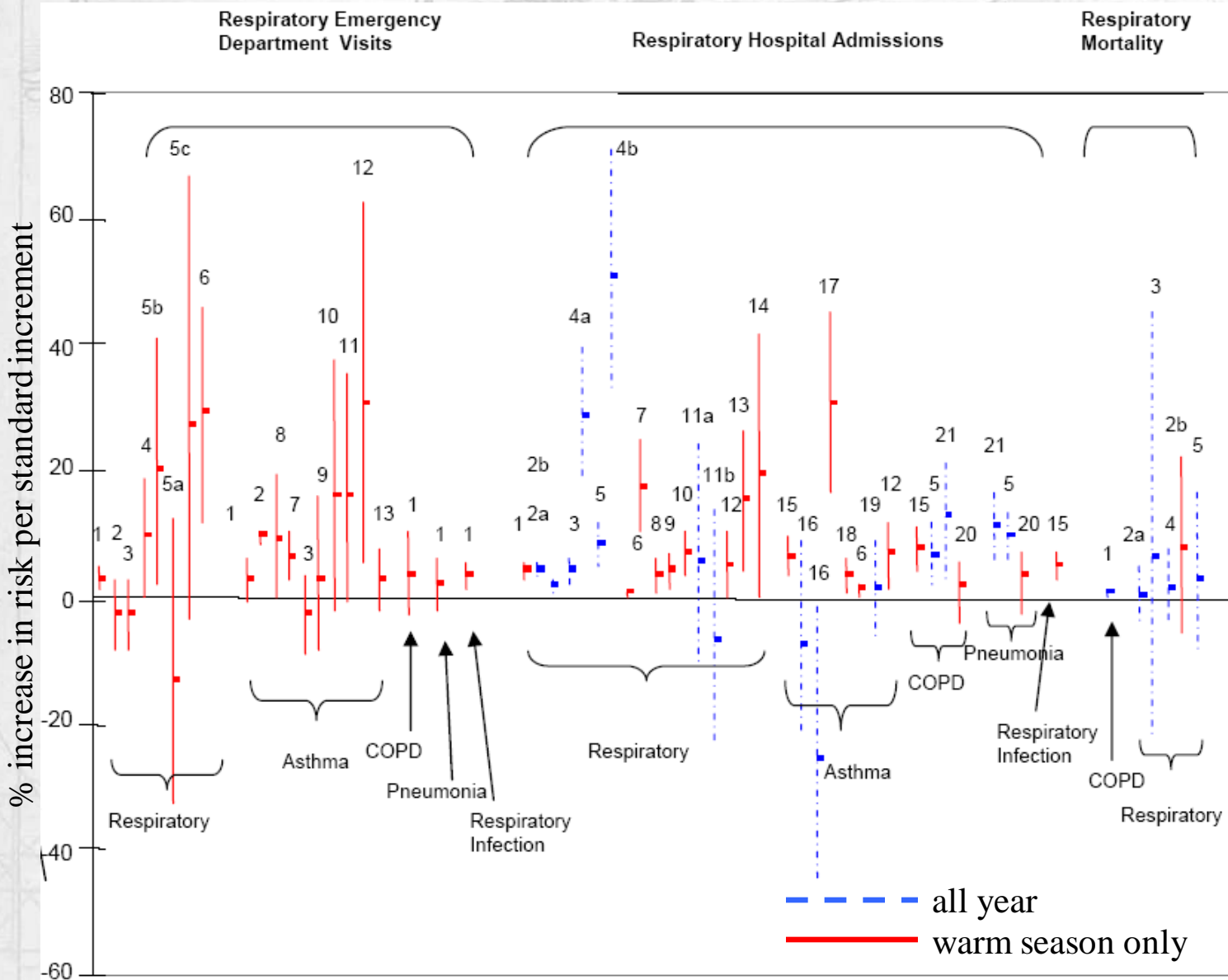
¿Por qué es tóxico el ozono para las vías respiratorias?

	Fluido alveolar superficial	Sangre
Volumen	17-20 mL	Plasma ~ 2,71 L
Proteínas totales	~7 µg/mL Total ~130 mg	~75 µg/mL Total ~202 g
Albumina	~3,5 µg/mL Total ~63 mg	~45 µg/mL Total ~122 g
Trasferrina	~0,3 µg/mL	2-3 µg/mL
Ceruloplasmína	~25 µg/L	140-400 µg/L
Lactoferrina	~0,5 µg/L	?
GSH	300-400 µM	Plasma ~3 µM Eritrocitos ~2,2 mM
Vitamina E	~2 µg/L	~10-20 µg/L
Vitamina C	~3,5 µg/L	~9 µg/L
Acido urico	~0,05 µg/mL	~0,04-0,07 µg/mL
Bilirrubina	?	~1,0 mg/dL
Glucosa	~0,4 µg/mL	~0,7-1,0 µg/mL

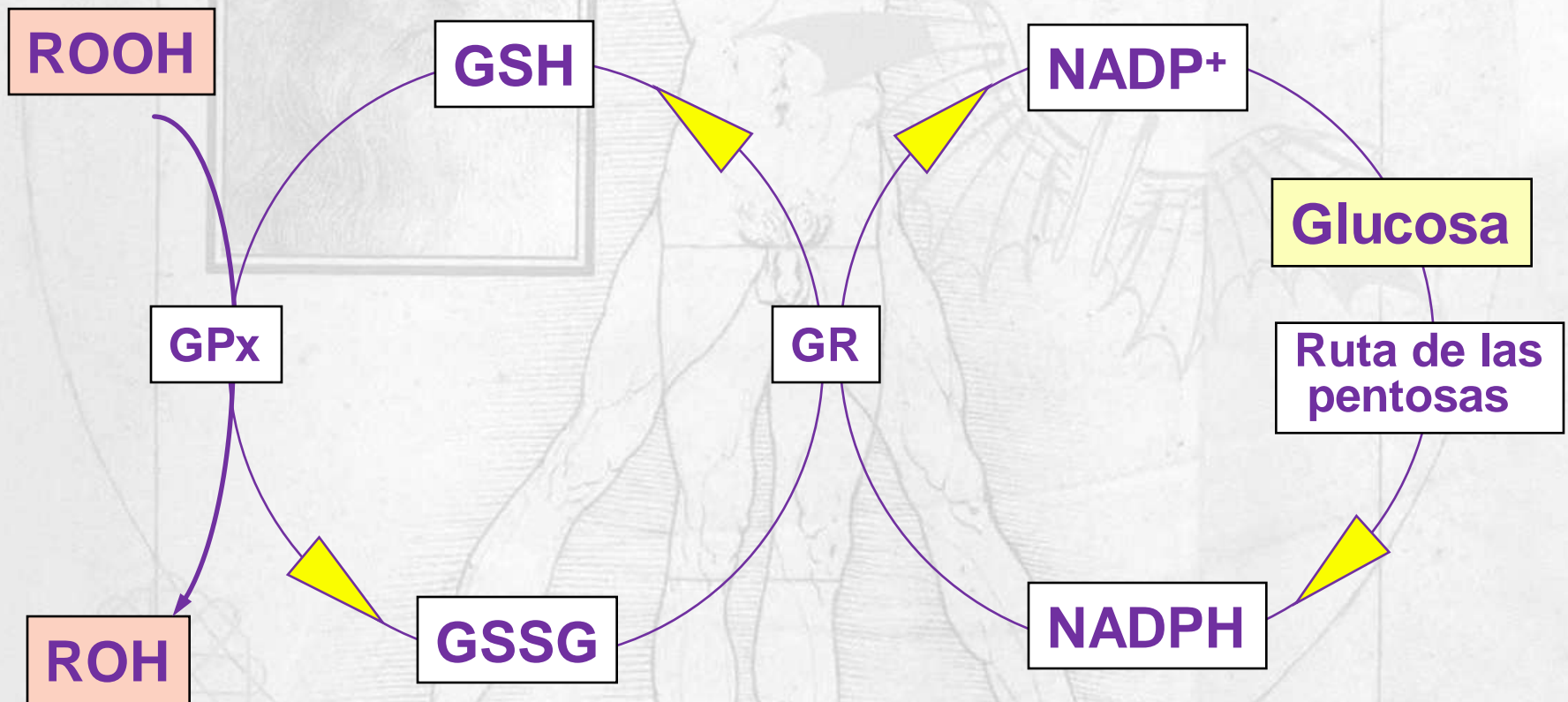


Adapted from: Pryor et al. (1995); Krishna et al. (1998); Bhalla et al. (1999)

Resumen Estudios Poblacionales



Para que pueda mantenerse la actividad de la GPx es necesaria la actividad de la Glutación reductasa (GR), una enzima que emplea el NADPH como cofactor. La GR tiene una distribución celular muy similar a la GPx.



O3 y la síntesis de mediadores hormonales

Saunas de ozono: hormonas del crecimiento y beta endorfinas

En pacientes hipertensos disminuye la presión arterial debido a que reajusta el sistema renina-angiotensina-aldosterona.

Autohemoterapia: produce una regulación y estabilización del ciclo menstrual.

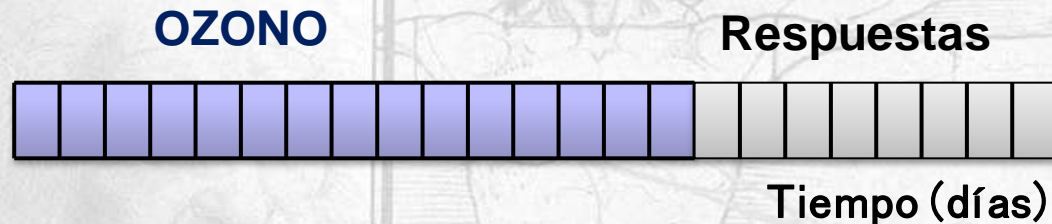
O3 y la regulación metabólica

Ozono rectal: T3/T4, creatinina, glicemia.

Autohemoterapia: colesterol y LDL.

Hemoglobina, hematocrito, proteínas totales, lactato deshidrogenasa, triglicéridos, lipoproteínas, enzimas hepáticas, bilirrubina, ácido úrico, ácido láctico y calcio, entre otras

Pre-condicionamiento Oxidativo



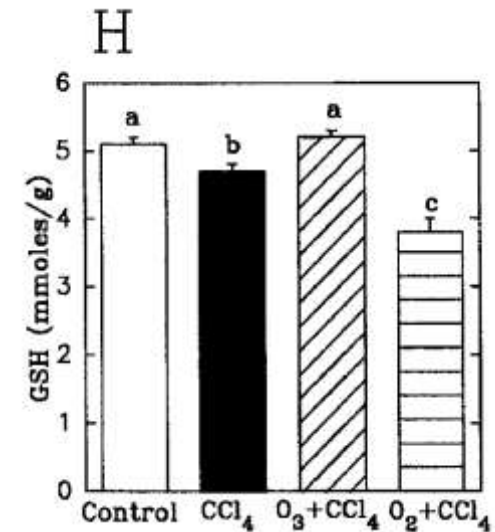
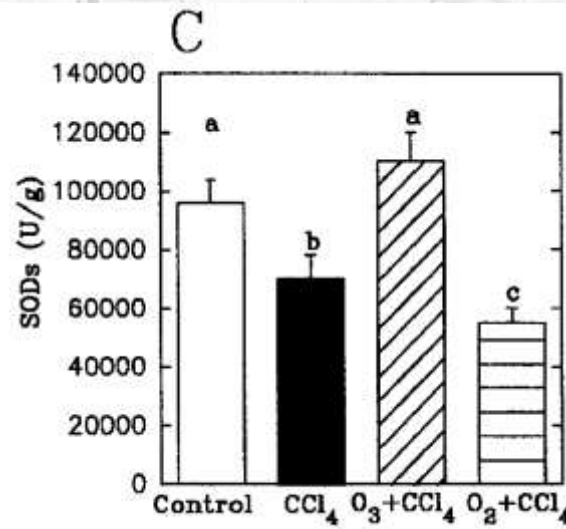
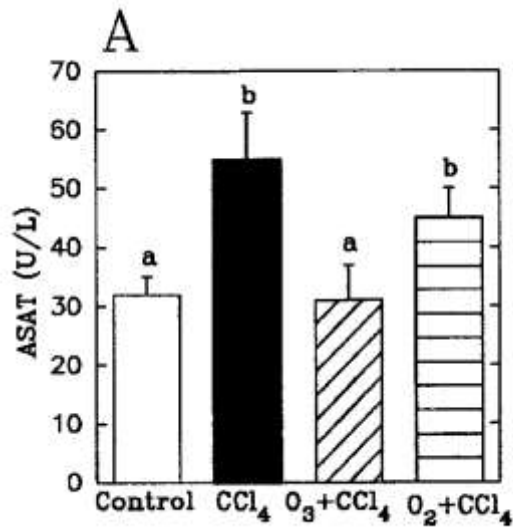
Pre-condicionamiento oxidativo con ozono: Fenómeno adaptativo que tras dosis bajas repetidas de ozono, induce mecanismos de respuesta celular dirigidos a contrarrestar el daño oxidativo.



León OS, Menéndez S, Merino N, Castillo R, Sam S, Pérez L, Cruz E, Bocci V. Ozone **oxidative preconditioning**: a protection against cellular damage by free radicals.

Mediators of Inflammation **1998**; 7:289-294.

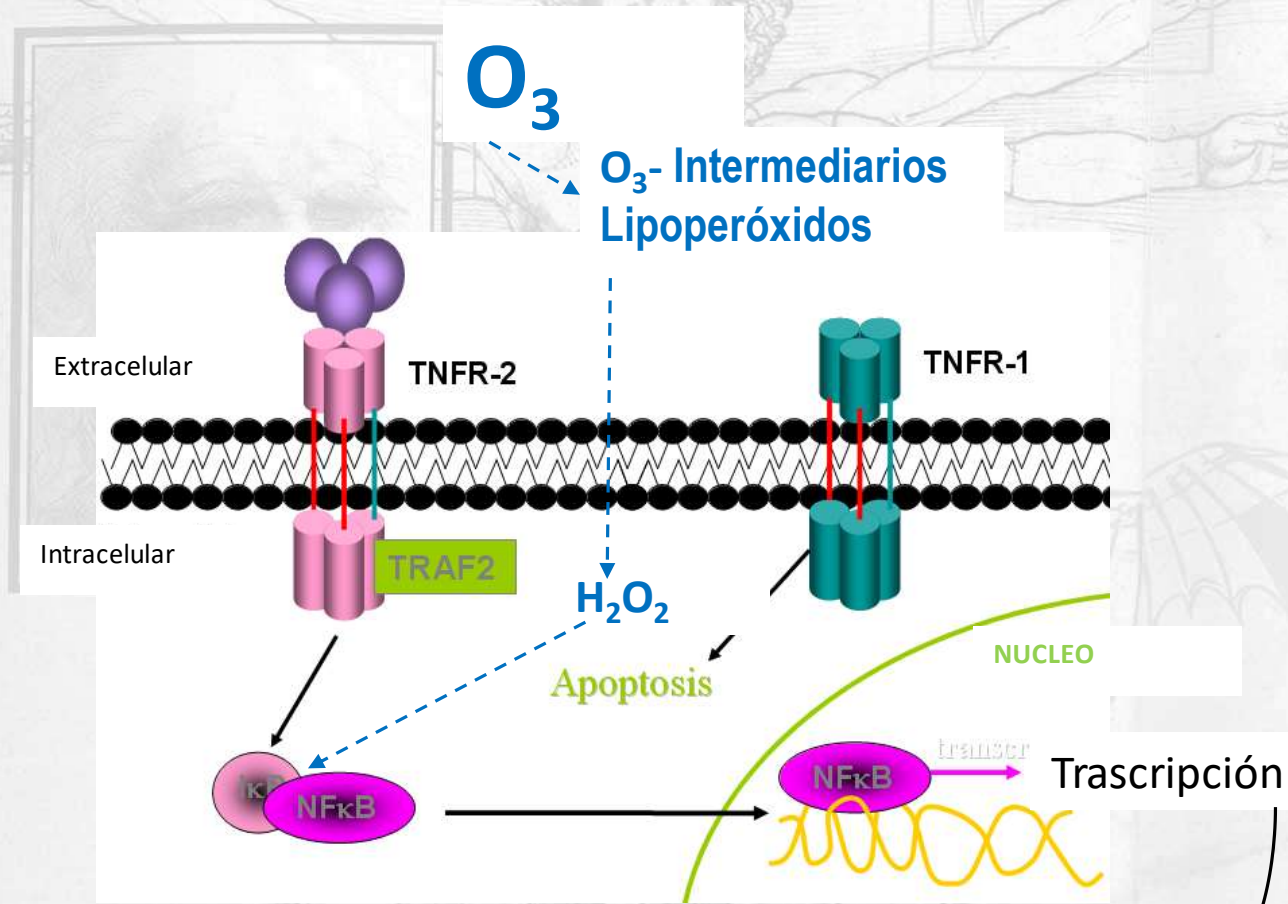
Pre-condicionamiento Oxidativo



León OS, Menéndez S, Merino N, Castillo R, Sam S, Pérez L, Cruz E, Bocci V. Ozone **oxidative preconditioning**: a protection against cellular damage by free radicals.

Mediators of Inflammation **1998**; 7:289-294.

Ozono. Modulación del sistema inmune.



TNF α , IL-1 β , Otras citocinas,
Moléculas de adhesión ICAM-1, VCAM-1
Proteína de shock térmico HSP-70, Proteínas de fase aguda,
Óxido nítrico sintasa inducible (ONSi), SOD dependiente de Mn
Hematopoyetinas, Otras proteínas

Cascada de las Caspase

Esos resultados indican que el ozono puede ser efectivo en la **prevención del dolor neuropático**, actuando a través de un mecanismo antes no explorado, la modulación de caspasas cerebrales con efectos pro-inflamatorios y pro-apoptóticos

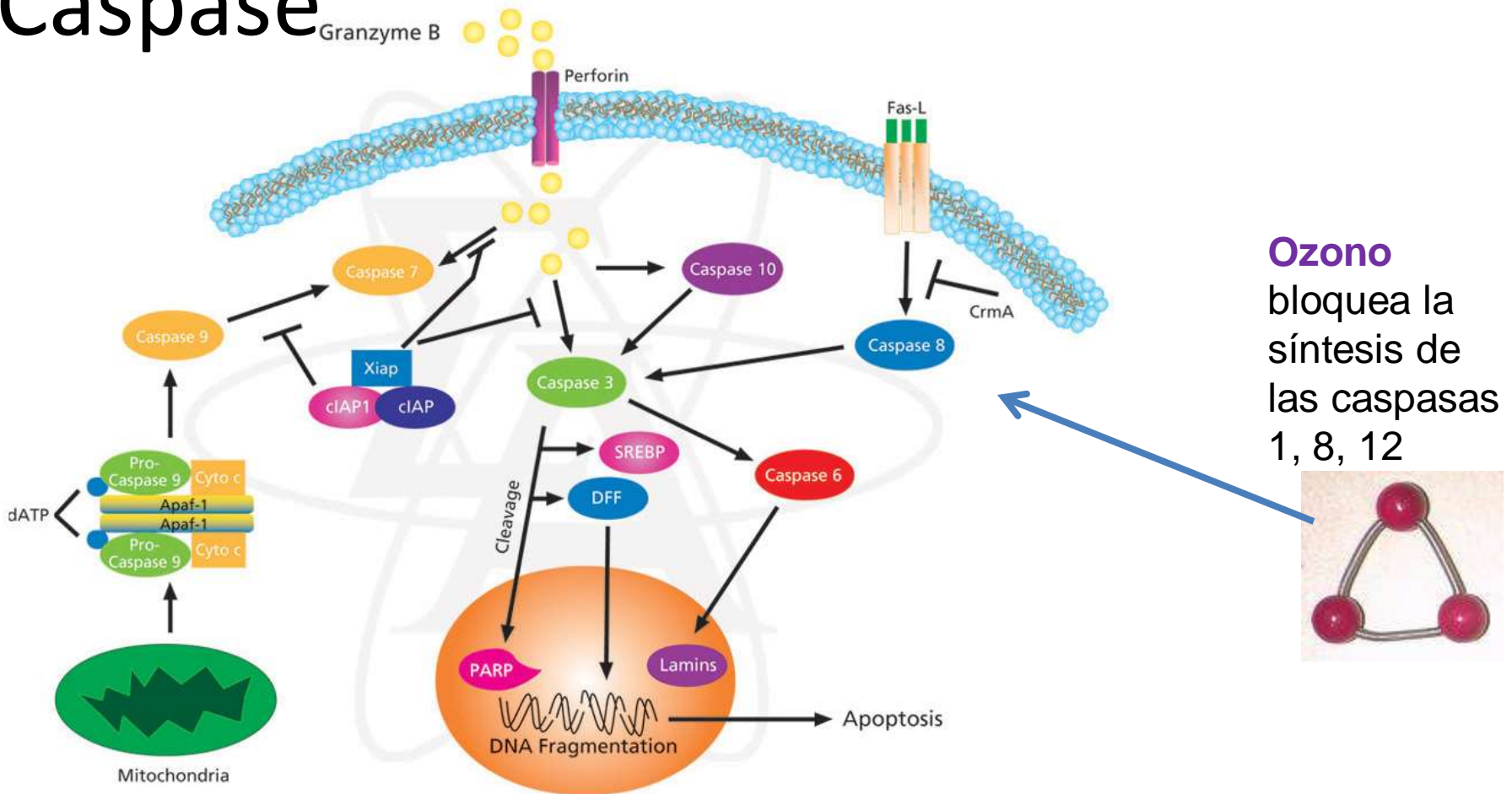
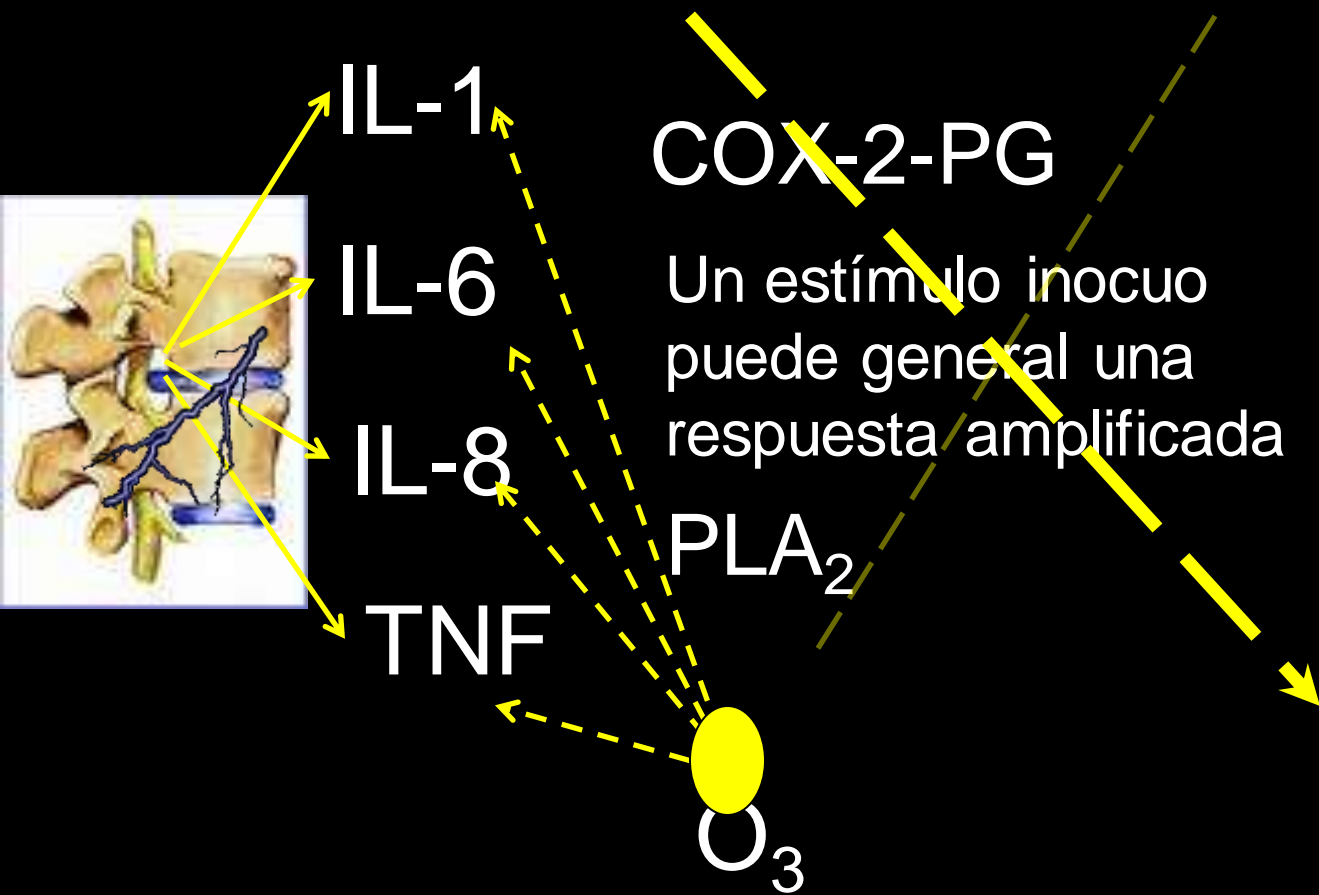


Foto de una paciente con dolor sub-escapular 1 min después de la inyección (puntos de inyección marcados con una X) con O₂/O₃ 8 µg/mL, 2-3 mL. Nótese que en la zona en la cual se refería el dolor (central y derecha en la foto) aparece una coloración rosada (eritema) mientras que en la zona donde no refería dolor (izquierda en la foto) el eritema no aparece.



Lamberto Re, Gregorio M. Sánchez, Nabil Mawsouf. Clinical evidence of ozone interaction with pain mediators. Saudi Med J 2011; Vol. 32 (12) 1363:1367.

O₃ inhibe dolor periférico



Sensibilización
al dolor
periférico

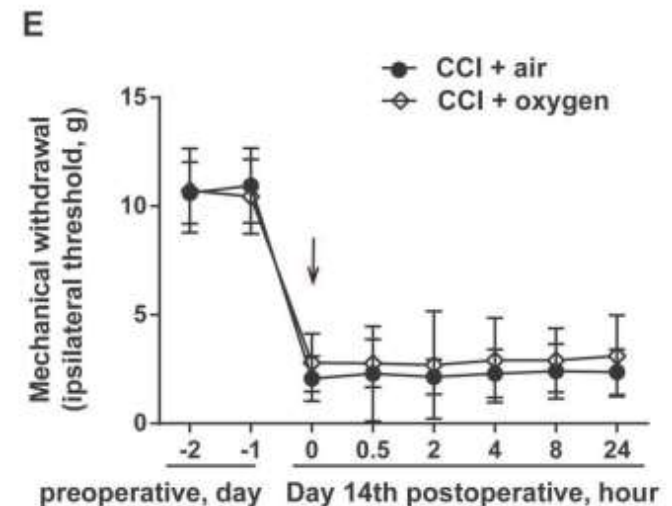
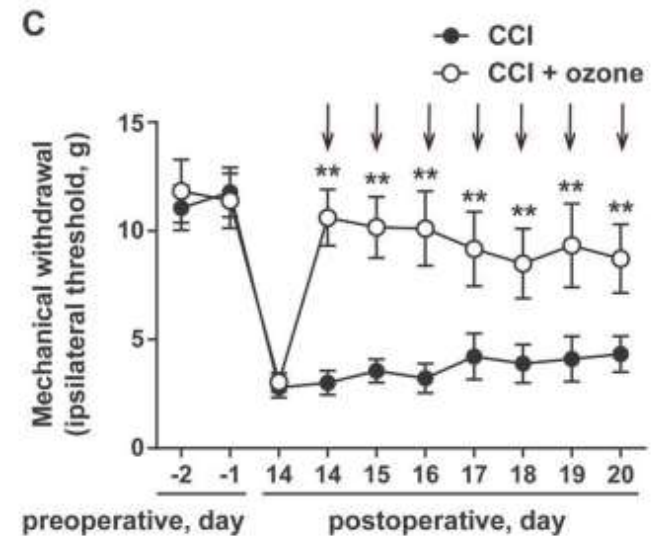
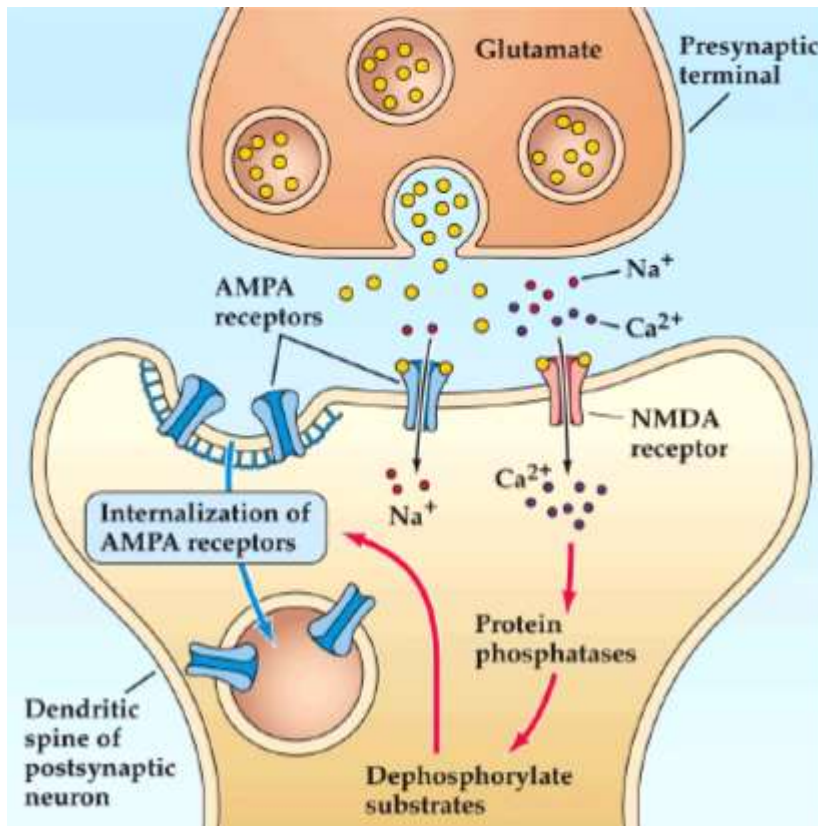


J Bone Joint Surg Am (2006)

Arterioscler Throm Vasc Biol 2006

La reacción del Ozono usualmente se aprecia mejor en la zona dolorosa

O3 activa 5'-monofosfato (AMP)-proteína cinasa activada (AMPK)



Lu L, *et al.* AMPK activation by peri-sciatic nerve administration of ozone attenuates CCI-induced neuropathic pain in rats. *J Mol Cell Biol.* **2016** Oct 15. pii: mjjw043.

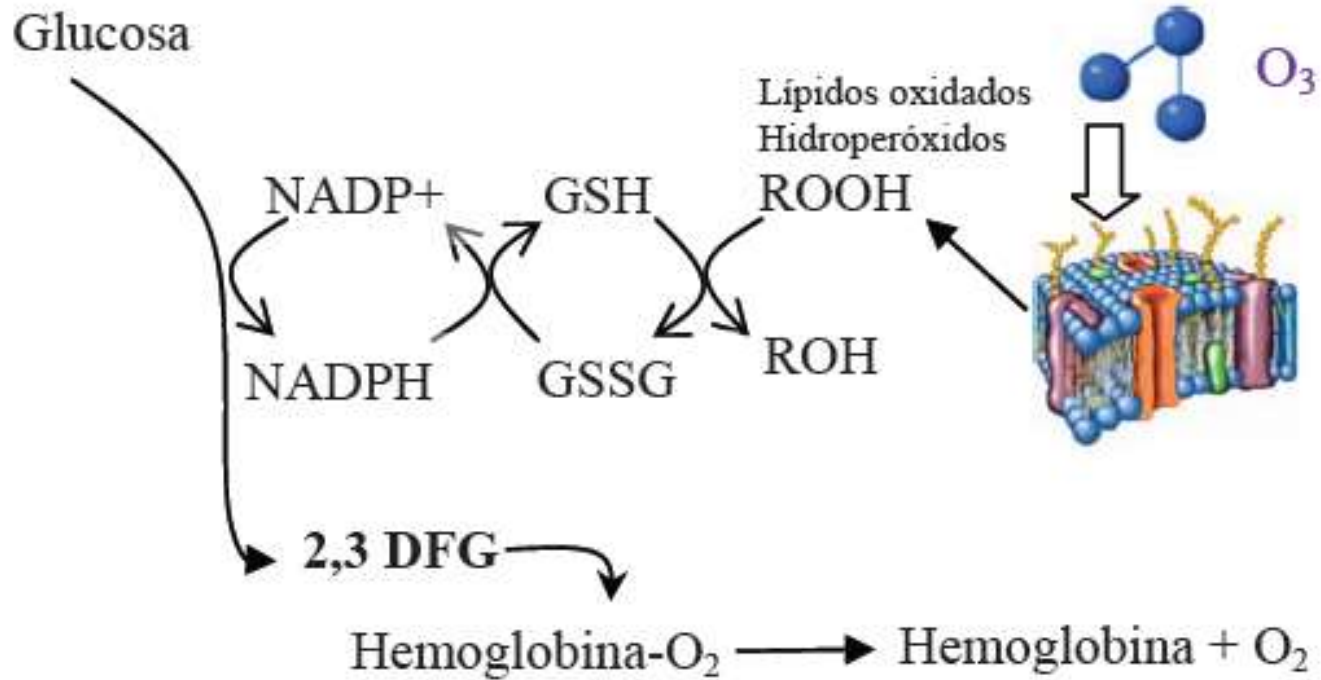
Resumen de los mecanismos de acción del ozono frente al dolor

Efecto analgésicos y miorelajantes

Oxidación (inactivación) de mediadores del dolor y receptores del dolor

Mejoría de la circulación local

Inactivación de rutas de señalización del dolor (caspasas, proteína cinasa monofosfato activada)



Mecanismo teórico para explicar la estimulación de la síntesis de 2,3 difosfoglicerato (2,3 DFG) por el ozono. ROOH, lipo-peróxido; ROH, alcohol; GSH, glutatión reducido; GSSG, glutatión oxidado.

Lamberto Re, Gregorio Martínez Sánchez. Terapias emergentes: ozono. ¿Qué debe saber el paciente y cómo el médico debe actuar?. Ed. Aracne, Roma, Italia 2010.

ISBN: 978-88-548-3706-5.

O₃ 2,3 DPG ???????

Especie	N	Método	Conc. O ₃	Conc. 2,3 DPG	Referencia
Conejo	22	-	1-3 ppm 4 h	No se modifica	(Ross, et al 1979)
Humano	-	In vivo	-	<u>No medido.</u> hipoteticamente aumenta	(Rokitansky 1982)
Humano	20 diabet. 20 sanos	ex vivo	6.5, 13, 26 - 78 µg/mL	No se modifica	(Coppola, et al 1995)
Humano	27 Arterio patia	In vivo autohemoterapia	-	No se modifica	(Giunta, et al 2001)
Humano	23 pazientes 3 sanos	In vivo autohemoterapia	-	<u>No medido</u> *	(Clavo, et al 2003)

Oxigenación muscular

THE JOURNAL OF ALTERNATIVE AND COMPLEMENTARY MEDICINE
Volume 9, Number 2, 2003, pp. 251–256
© Mary Ann Liebert, Inc.

Effect of Ozone Therapy on Muscle Oxygenation

BERNARDINO CLAVO, M.D.,^{1,2,6} JUAN L. PÉREZ, B.Sc.,^{2,3,6} LAURA LÓPEZ, R.N.,^{1,6}
GERARDO SUÁREZ, R.N.,^{1,6} MARTA LLORET, Ph.D.,^{1,2,6} VÍCTOR RODRÍGUEZ, M.D.,⁵
DAVID MACÍAS, B.Sc.,^{2,3,6} MAITE SANTANA, B.Sc.,¹ JESÚS MORERA, M.D.,^{4,6}
DOLORES FIUZA, Ph.D.,² FRANCISCO ROBAINA, Ph.D.,^{2,5,6}
and MARTINA GÜNDEROTH, Ph.D.⁷

THE JOURNAL OF ALTERNATIVE AND COMPLEMENTARY MEDICINE
Volume 9, Number 2, 2003, pp. 251–256
© Mary Ann Liebert, Inc.

Effect of Ozone Therapy on Muscle Oxygenation

BERNARDINO CLAVO, M.D.,^{1,2,6} JUAN L. PÉREZ, B.Sc.,^{2,3,6} LAURA LÓPEZ, R.N.,^{1,6}
GERARDO SUÁREZ, R.N.,^{1,6} MARTA LLORET, Ph.D.,^{1,2,6} VÍCTOR RODRÍGUEZ, M.D.,⁵
DAVID MACÍAS, B.Sc.,^{2,3,6} MAITE SANTANA, B.Sc.,¹ JESÚS MORERA, M.D.,^{4,6}
DOLORES FIUZA, Ph.D.,² FRANCISCO ROBAINA, Ph.D.,^{2,5,6}
and MARTINA GÜNDEROTH, Ph.D.⁷

ABSTRACT

Background and objective: Ozone therapy is being used to treat ischemic disorders. However, the underlying mechanisms for the success are unknown and the therapy has not been accepted fully within conventional medicine. This study sought to assess the effect of ozone therapy on resting muscle oxygenation.

Patients and design: Twenty-three (23) patients and 3 volunteers were recruited for this prospective study. Systemic ozone therapy was administered by autohemotransfusion on three alternate days over 1 week. Tissue oxygenation (mmHg) was directly measured in the tibialis anterior muscle using polarographic needle electrodes before and after the first and the third ozone therapy session.

Results: Globally, the differences in oxygenation were not statistically significant but there was a significant decrease in the percentage of low-oxygenated values ($pO_2 < 5$ mmHg) following ozone sessions ($p < 0.02$). The change in muscle oxygenation following ozone therapy was inversely correlated with age ($r = -0.298$, $p = 0.044$) and with the initial (baseline pretherapy) muscle oxygenation values ($r = -0.644$, $p < 0.001$), indicating that the more poorly oxygenated muscles benefited most from the therapy. A significant ($p = 0.001$) higher oxygenation in these tissues was observed 48 hours after the second session.

Conclusions: Ozone therapy can modify oxygenation in resting muscles, particularly of those that are most hypoxic. Our results suggest that ozone therapy could be used effectively as a complementary treatment of hypoxic and ischemic syndromes and that the therapy warrants further investigation for possible application in other clinical conditions.

Conclusions: Ozone therapy can modify oxygenation in resting muscles, particularly of those that are most hypoxic. Our results suggest that ozone therapy could be used effectively as a complementary treatment of hypoxic and ischemic syndromes and that the therapy warrants further investigation for possible application in other clinical conditions.

Clavo B, Pérez JL, López L, Suárez G, Lloret M, Rodríguez V, Macías D, Santana M, Morera J, Fiuza D, Robaina F, Günderoth M. Effect of ozone therapy on muscle oxygenation. *J Altern Complement Med.* 2003 Apr;9(2):251-6.

Oxigenación cerebral

Ozone therapy is currently being used in the treatment of ischemic disorders, but the underlying mechanisms that result in successful treatment are not well known. This study assesses the effect of ozone therapy on the blood flow in the middle cerebral and common carotid arteries. Seven subjects were recruited for the therapy that was performed by transfusing ozone-enriched autologous blood on 3 alternate days over 1 week. Blood flow quantification in the common carotid artery ($n = 14$) was performed using color Doppler. Systolic and diastolic velocities in the middle cerebral artery ($n = 14$) were estimated using transcranial Doppler. Ultrasound assessments were conducted at the following three time points: 1) basal (before ozone therapy), 2) after session #3 and 3) 1 week after session #3. The common carotid blood flow had increased by 75% in relation to the baseline after session #3 ($P < 0.001$) and by 29% 1 week later ($P = 0.039$). In the middle cerebral artery, the systolic velocity had increased by 22% after session #3 ($P = 0.001$) and by 15% 1 week later ($P = 0.035$), whereas the diastolic velocity had increased by 33% after session #3 ($P < 0.001$) and by 18% 1 week later ($P = 0.023$). This preliminary Doppler study supports the clinical experience of achieving improvement by using ozone therapy in peripheral ischemic syndromes. Its potential use as a complementary treatment in cerebral low perfusion syndromes merits further clinical evaluation.



Clavo B, Pérez JL, López L, Suárez G, Lloret M, Rodríguez V, Macías D, Santana M, Hernández MA, Martín-Oliva R, Robaina F. Ozone Therapy for Tumor Oxygenation: a Pilot Study. Evid Based Complement Alternat Med. 2004 Jun 1;1(1):93-98

Infarto cerebral agudo

Major ozonated autohemotherapy promotes the recovery of upper limb motor function in patients with acute cerebral infarction.

Wu X, Li Z, Liu X, Peng H, Huang Y, Luo G, Peng K. *Neural Regen Res.* 2013 Feb 15; 8(5):461-8

Abstract

Major ozonated autohemotherapy is classically used in treating ischemic disorder of the lower limbs. In the present study, we performed major ozonated autohemotherapy treatment in patients with acute cerebral infarction, and assessed outcomes according to the U.S. National Institutes of Health Stroke Score, Modified Rankin Scale, and transcranial magnetic stimulation motor-evoked potential. Compared with the control group, the clinical total effective rate and the cortical potential rise rate of the upper limbs were significantly higher, the central motor conduction time of upper limb was significantly shorter, and the upper limb motor-evoked potential amplitude was significantly increased, in the ozone group. In the ozone group, the National Institutes of Health Stroke Score was positively correlated with the central motor conduction time and the motor-evoked potential amplitude of the upper limb. Central motor conduction time and motor-evoked potential amplitude of the upper limb may be effective indicators of motor-evoked potentials to assess upper limb motor function in cerebral infarct patients. Furthermore, major ozonated autohemotherapy may promote motor function recovery of the upper limb in patients with acute cerebral infarction.

Item	Ozone group	Control group
Sex (male/female, n)	30/13	28/15
Age (mean ± SD, year)	64.13±11.21	63.85±10.87
Height (m)	1.68±0.06	1.69±0.07
Low-density lipoprotein cholesterol (mean ± SD, mM)	2.98±0.96	2.88±0.99
Blood glucose (mean ± SD, mM)	6.17±2.94	5.95± 2.43
Interval time between onset and treatment (mean ± SD, hour)	44.08±18.93	43.82±18.36

There were 43 patients in each group.

Efficacy	Ozone group		Control group		u	P
	n	RANK	n	RANK		
Worse	2	1	2	1		
No effect	3	25.5	5	42.5		
Some improvement	12	348	21	609		
Significant improvement	24	1 548	14	903	2.07	< 0.05
Basic cure	2	170	1	85		
Total	43	2 092.5	43	1 640.5		

Basic cure, significant improvement, and some improvement were considered as effective outcomes of therapy. The clinical total effective rate in the ozone group was significantly increased compared with the control group ($P < 0.05$; rank sum test).

Pre-clínica in vivo

Grundner HG, Erler U. [Animal experiments on ozone therapy of non-irradiated and irradiated tumors. II. Ehrlich ascites carcinoma in vivo]. Strahlentherapie 1976; 151(6):522-529.

Schulz S, Haussler U, Mandic R, Heverhagen JT, Neubauer A, Dunne AA et al. Treatment with ozone/oxygen-pneumoperitoneum results in complete remission of rabbit squamous cell carcinomas. Int J Cancer 2008; 122(10):2360-2367.

Grupo de O3

Supervivencia

7 conejos de 14

Remisión

Tumor: 6 / 14

Grupo Control

Supervivencia

3 conejos de 13

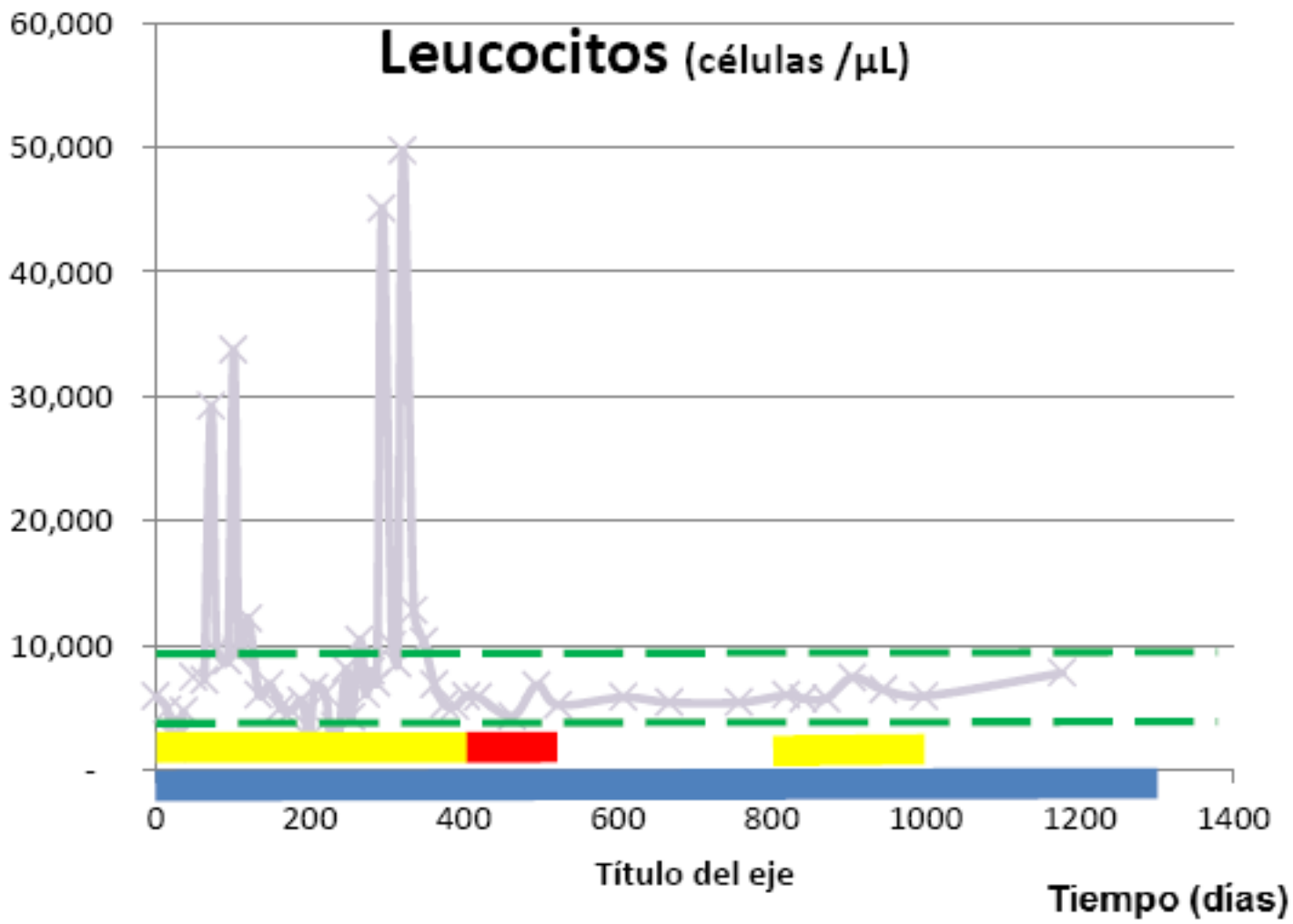
Remisión

Tumor: 2 / 13



Bocci V. Int J Cancer. 2008 Sep 1;123(5):1222; author reply 1223. doi: 10.1002/ijc.23631 Does ozone really "cure" cancer?

Dr. Manuel Veléz Aguilar. Terapia adyuvante con ozono en paciente con cáncer de páncreas metastásico. Revista Española de Ozonoterapia. Sup. 2015. En prensa.



Dr. Manuel Veléz Aguilar. Terapia adyuvante con ozono en paciente con cáncer de páncreas metastásico. Revista Española de Ozonoterapia. 2015. En prensa.

Órgano blanco	26/8/2010	16/10/2011 (pasados 14 meses)
Páncreas	Se identifica a nivel de la cabeza la presencia de una masa de ecogenicidad heterogénea, de contornos lobulados bien delimitada de dimensiones 7,79 x 6,13 x 7,39 cm en sus diámetros mayores	No se observa líquido libre o ascitis sub diafragmático, sub hepático ni morrison, páncreas, bazo sin alteraciones , homogéneos, tamaño normal. No adenopatías retroperitoneales, estructuras retroperitoneales normales.
Hígado	Se observa en situación, morfología y tamaño normal. Su ecogenicidad esta incrementada de manera difusa identificándose hacia el lóbulo derecho una lesión nodular sólida , de morfología ovoide, midiendo 2,62 cm.	La glándula hepática de situación, morfología, tamaño, contornos y ecogenicidad normal. Sin lesiones sólidas ni líquidas o de otra estirpe en su parénquima, el cual homogéneo con ecotextura conservada.

Dosis de Ozono recomendada según la modalidad de suministración ($\mu\text{g}/\text{mL}$)

LOCAL				
	Dosis			Observaciones
	Alta	Media	Baja	
Auricular	30	25	20	5 min
Agua ozonizada (lavados locales)	125-500	100-80	40-80	burbujear 10 min
Agua ozonizada (ingestión)	125	80	40	120 mL, burbujear 10 min
Vaginal	30-40	25	20	1-2 L/ 0,1-0,2 L/min
Vescico-uretral	20-25	15	10	1-2 L/ 0,1-0,2 L/min
Retal	30-40	20-30	5-10	100-150 mL
Bolsas	40-60	30	20	20-30 min
Sauna	10	8	5	20-30 min / Temp. 40-45 °C

Vías no recomendada: **inhalatoria**

Dosis de Ozono recomendada según la modalidad de suministración ($\mu\text{g}/\text{mL}$)

SISTEMICA				
	Dosis			Observaciones
	Alta	Media	Baja	
Gran Auto hemo- trasfusión	30-40	20-30	10-20	50-100 mL
Auto hemo Trasfusión menor	20-30	10-20	5-10	5 mL
Paravertebral	20	15	10	Aguja 22-27Gx1 ½, 5-20 mL
Subcutánea	10	8	5	1-2 mL máximo 100 mL/sesión
Intra-articular	20	10	5	1-2 mL (dedo), 5-20 mL otros
Acupuntura / reflexología	30	20	10	0,1 - 0,3 mL

Vías no recomendada: **itra venosa directa**

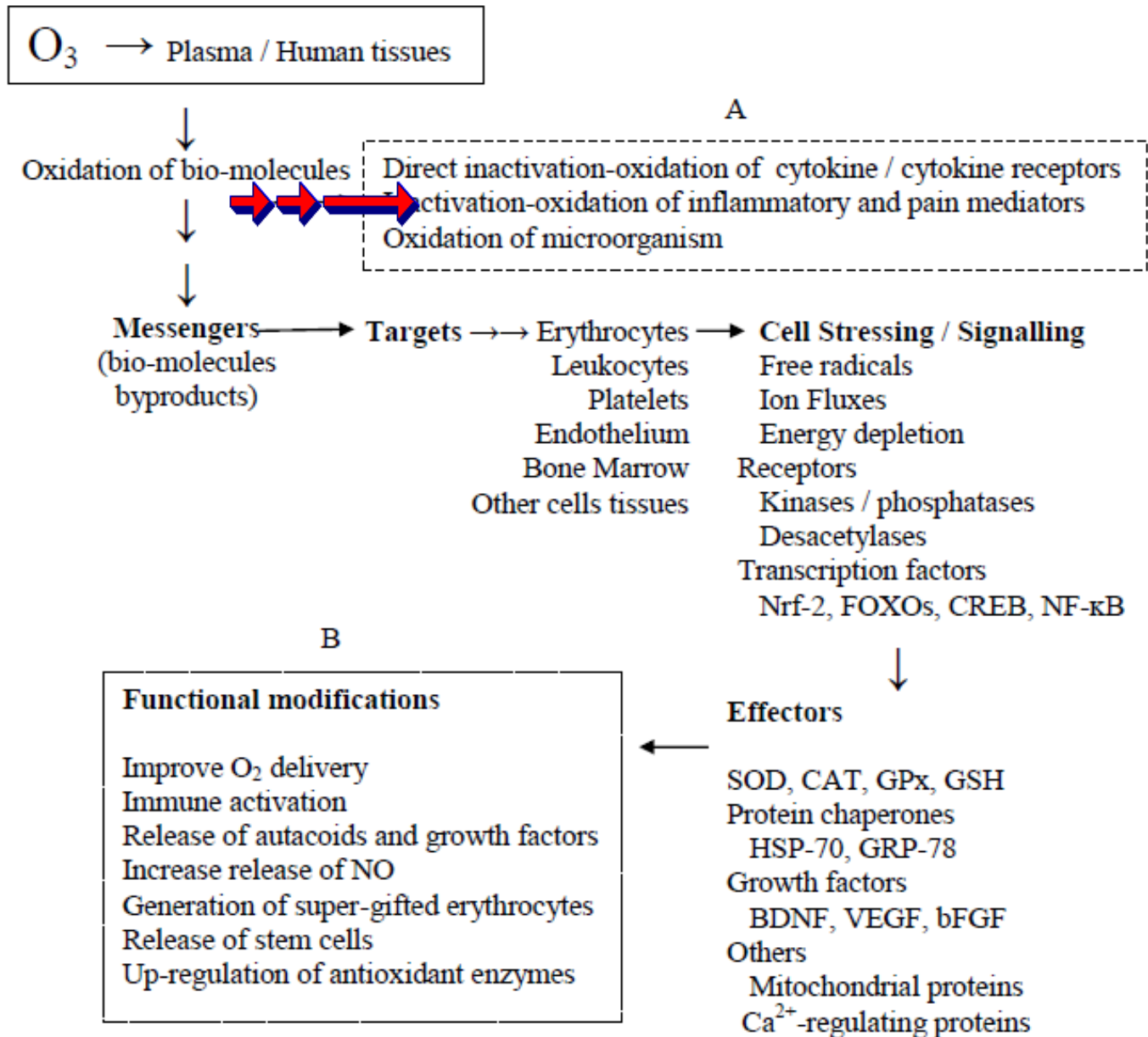
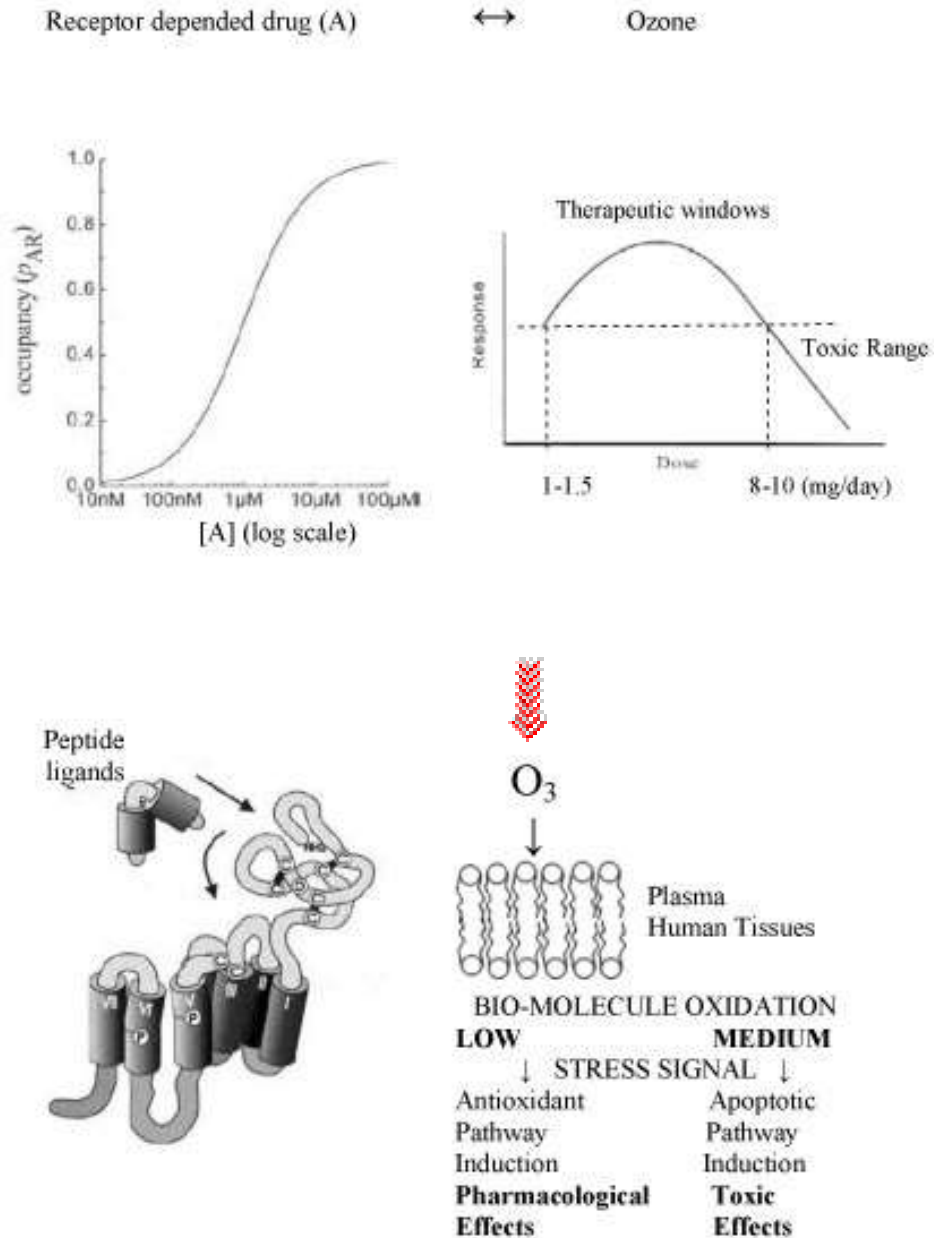
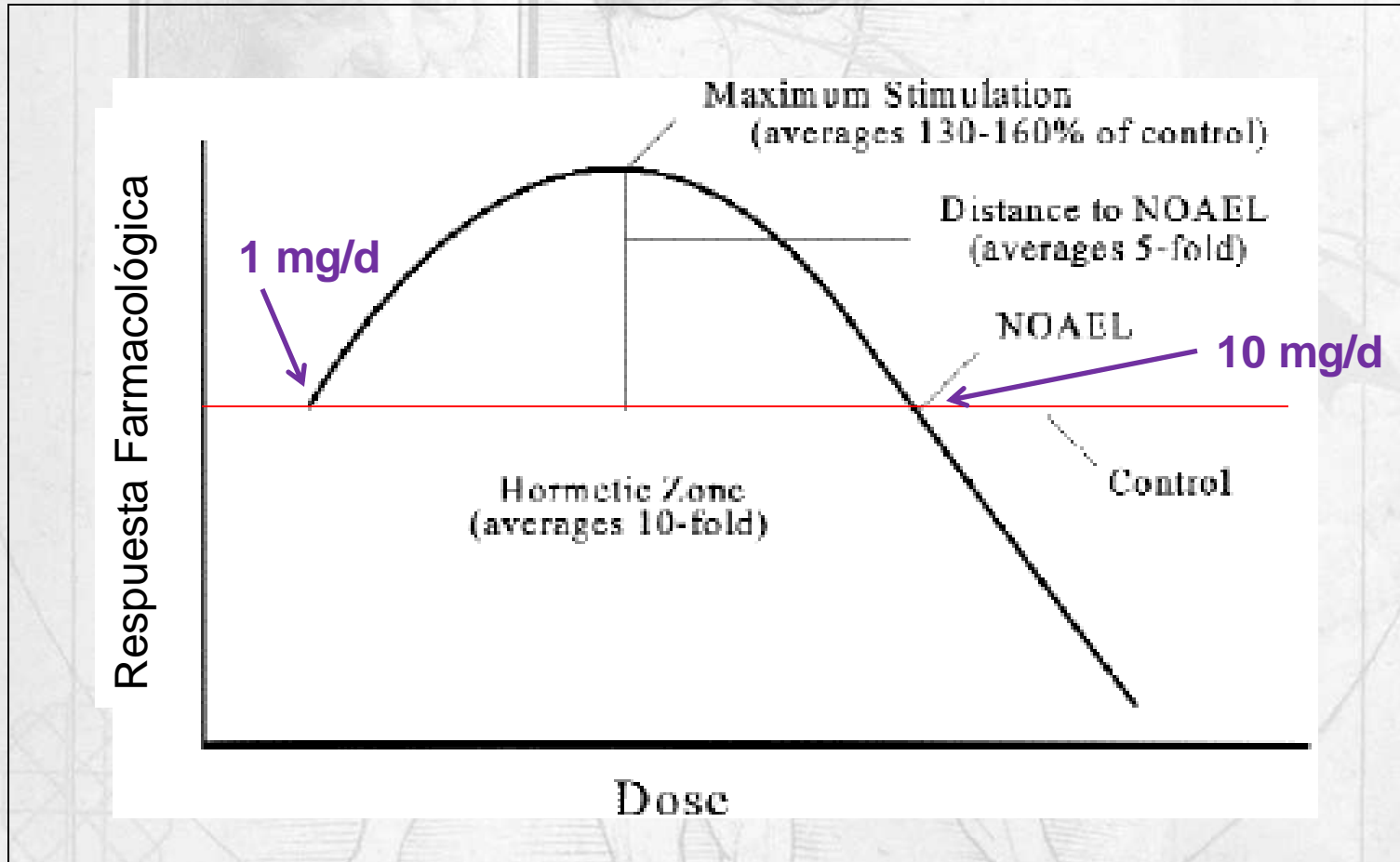


Fig 1.

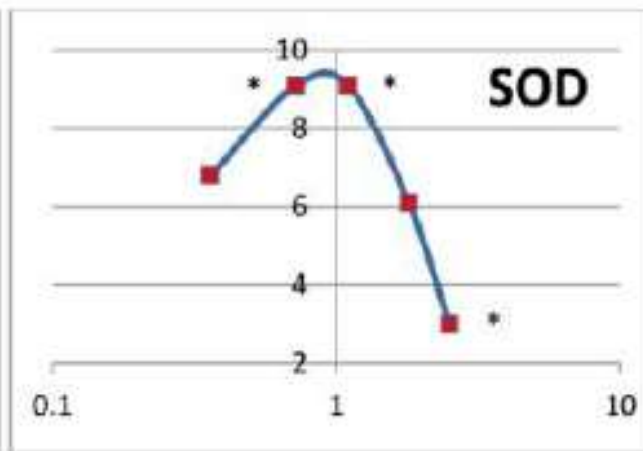
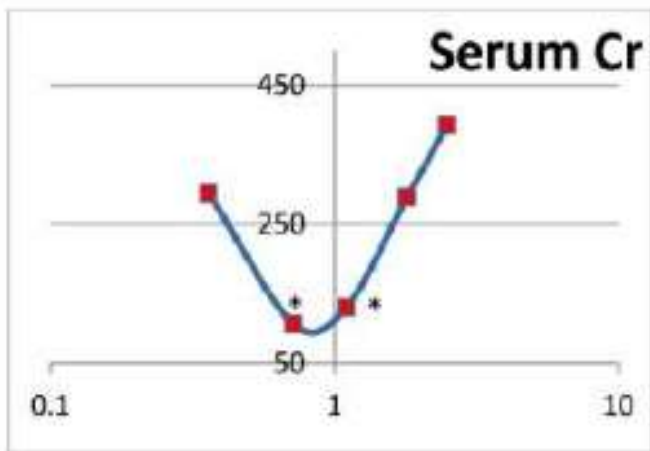


Respuesta Hormetica del O_3



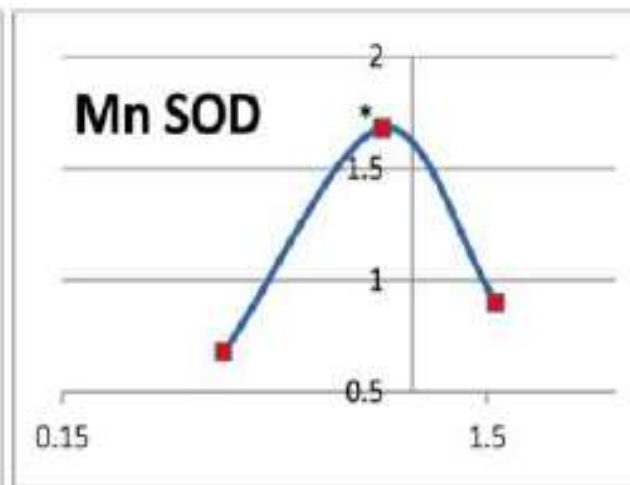
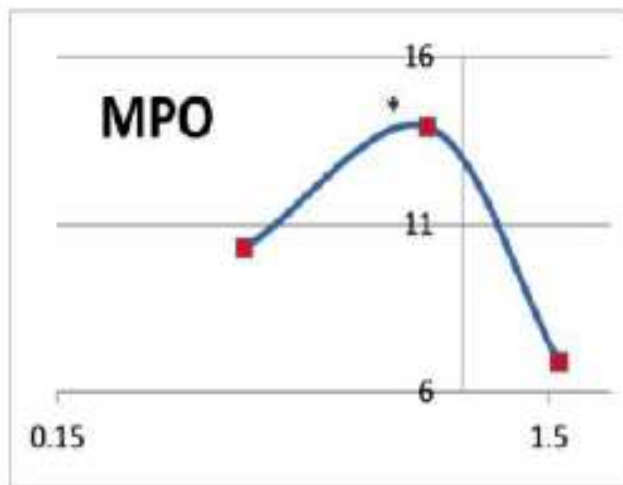
Excepto para la vía inhatoria

Respuesta hormética del ozono



Creatinina (Cr) y superosido dismutasa (SOD) después de un tratamiento por 15 con O₃ en un modelo de nefrotoxicidad por cisplatino.

Enzimas antioxidantes, después de 90 días de tratamiento con O₃, dosis log. (0.36, 0.85 y 1.57 mg/kg) vs. En un modelo en conejos



HO Isoenzymes

HO-1

- **Inducible**
- **Multiple regulatory sites**
- **Induction by:**
 - **UVA, heavy metals, oxidative stress, inflammation, O₃, etc.** (1 - 4,7, 8).

HO-2

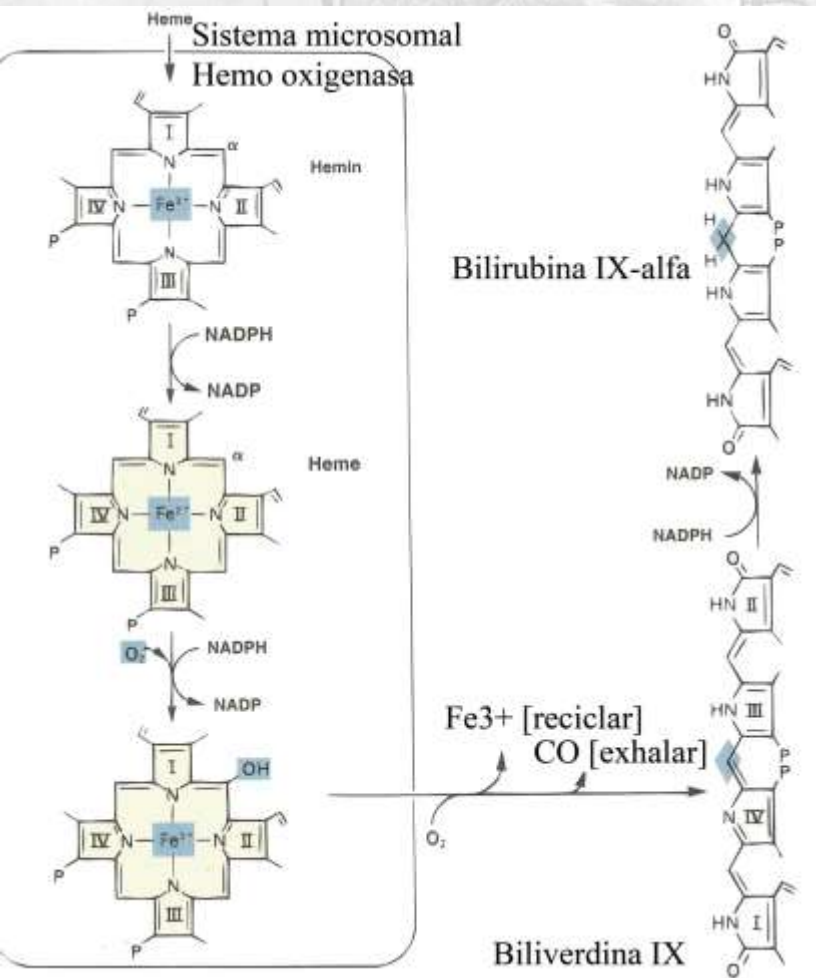
- **constitutive**
- **Has a GRE (5)**
- **Induction by**
 - **Glucocorticoids (5)**

HO-3

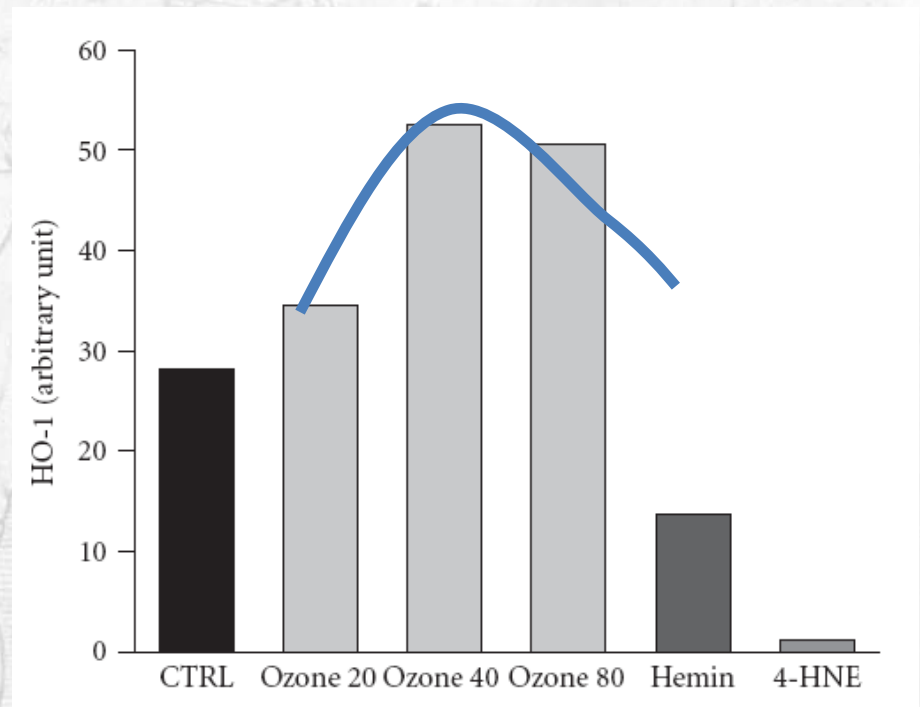
- **constitutive**
- **Heme binding (6)**

1. Applegate LA, *et al.* 1991, *Cancer Res* 51:974-978.
2. Tyrrell RM, *et al.* 1993. *Carcinogenesis* 14:761-765.
3. Shibahara S, *et al.* 1978. *Arch Biochem Biophys* 188:243-250.
4. Janssen YM, *et al.* 1994. *Am J Respir Crit Care Med* 149:795-802.
5. Raju VS, *et al.* 1997. *Biochim Biophys Acta* 1351:89-104.
6. McCoubrey WK, *et al.* 1997. *Eur J Biochem* 247:725-732.
7. Bocci *et al.* 2007. *Mediators of Inflammation*, 2007:1-6
8. Pecorelli A. *et al.* *Toxicology and Applied Pharmacology* 267 (2013) 30–40

Heme Oxygenase pathway and O3



Bocci et al. (2007). Ozonation of Human Blood Induces a Remarkable Upregulation of Heme Oxygenase-1 and Heat Stress Protein-70. *Mediators of Inflammation*.





Éxito Terapéutico del Ozono

$$= \sum A(B + C/D + E + F) + G + H$$

A. Buenas Prácticas Clínicas

B. Calidad del O2/O3

C. Dosis

D. Diagnóstico Redox

E. Experiencia del médico

F. Selección de la vía de administración

G. Factores Externos (controlables) e.j. estado nutricional

H. Factores Internos (no controlables) e.j. factores genéticos

Racional para el control de la dieta

Antes, Durante y Después de la ozonoterapia

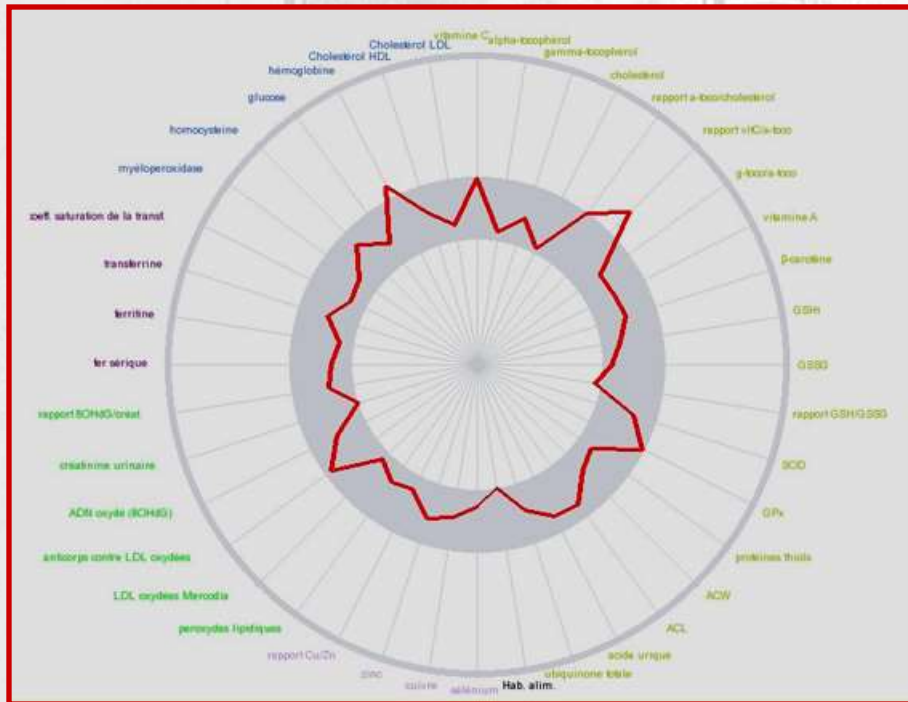
Antes: Valorar estado nutricional y restablecerlo a valores normales según los requerimientos

Durante: Mantener consumo basal de nutrientes aportados por la dieta

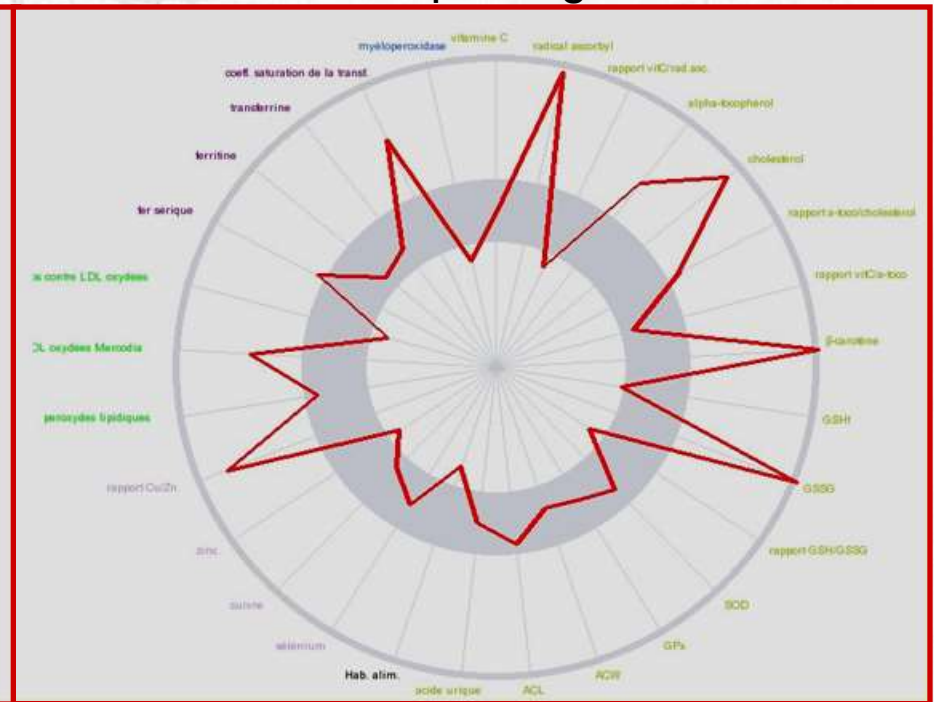
Después: Proceder a la suplementación con los nutrientes deficientes (Vit. E, C. Se, Mn, Cu, Zn)

Estudios Bioquímicos → Perfil de estrés oxidativo

Perfil Normal



Perfil patológico



Diganóstico del integral EO: Una foto del estado del EO en el paciente

Digánóstico integrado del ERO

Tipos de Estudios:

Actividad Antioxidante Total,

Enzimas,

Indicadores de daño a Biomoléculas

Antioxidantes de bajo peso molecular

Utilidad:

Diagnóstico de grupos de pacientes

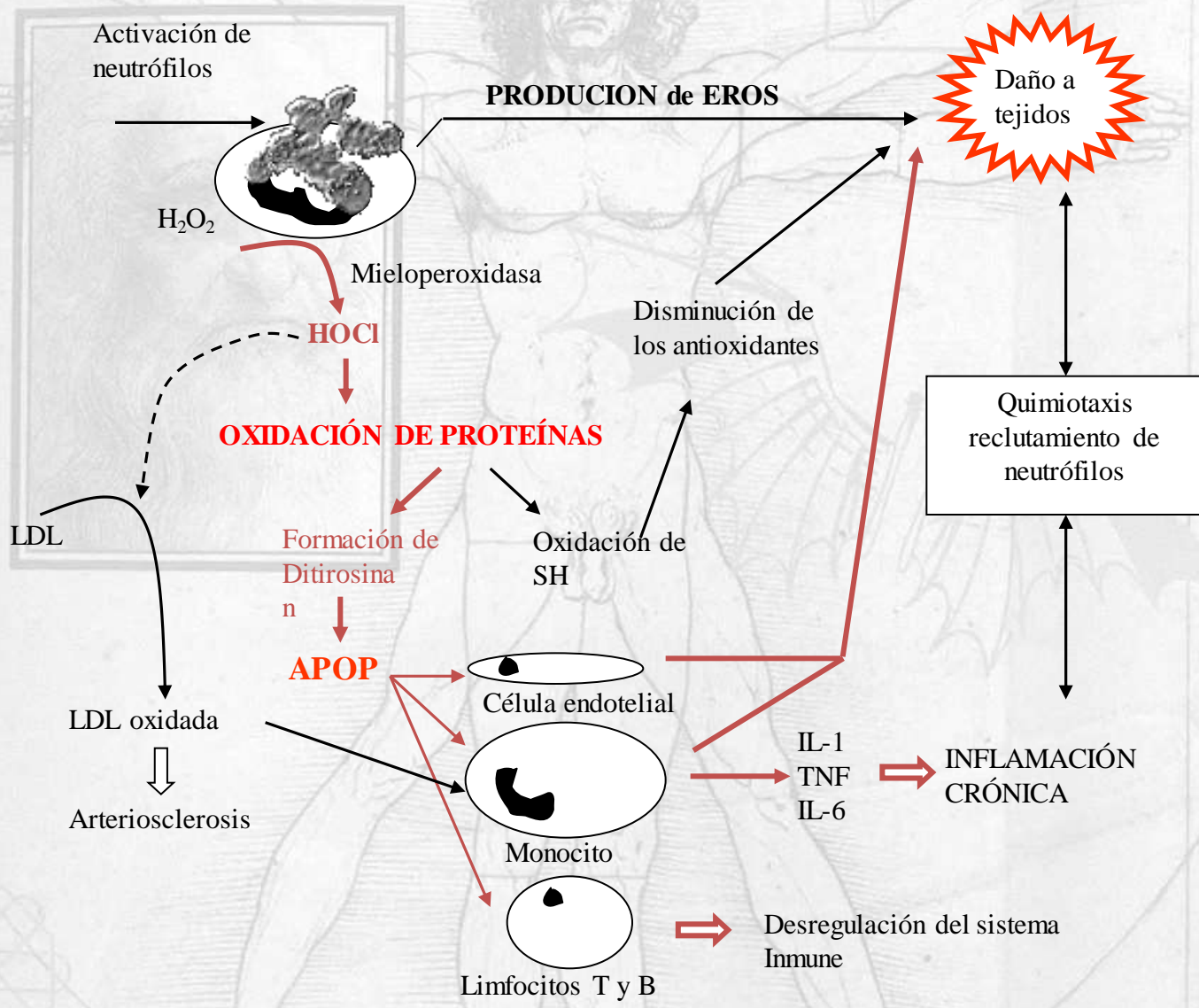
Diagnóstico de pacientes individuales

Monitoreo de una intervención nutricional

Monitoreo de una intervención farmacológica



Los sistemas Ultra micro analicos hacen posible un análisis rápido, con bajos costos y automatización.



PRODUCTOS AVANADOS DE LA OXIDACION DE PROTEÍNAS

Valores	PAOP μM
Normal	12.13 \pm 0.93
Diabetes	19-21*
Colitis	29*
Bronchitis	95**
Ataxia	119**

Monitoreo de una intervención terapéutica



Available online at www.sciencedirect.com



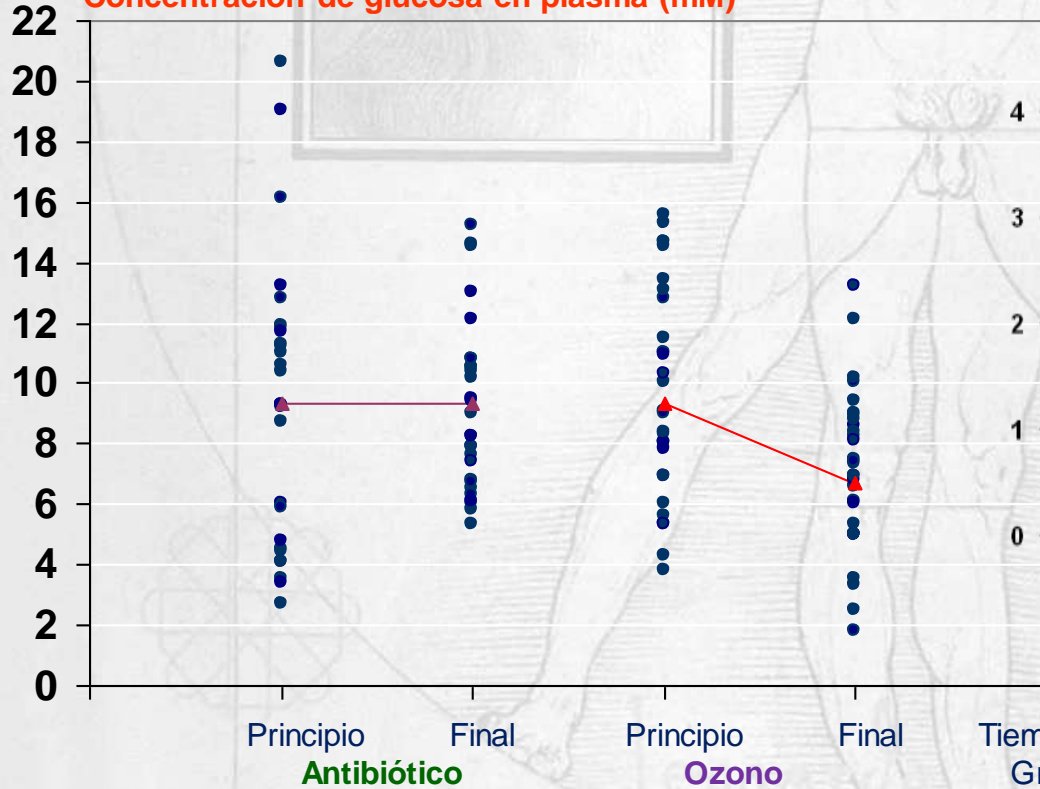
European Journal of Pharmacology 523 (2005) 151–161



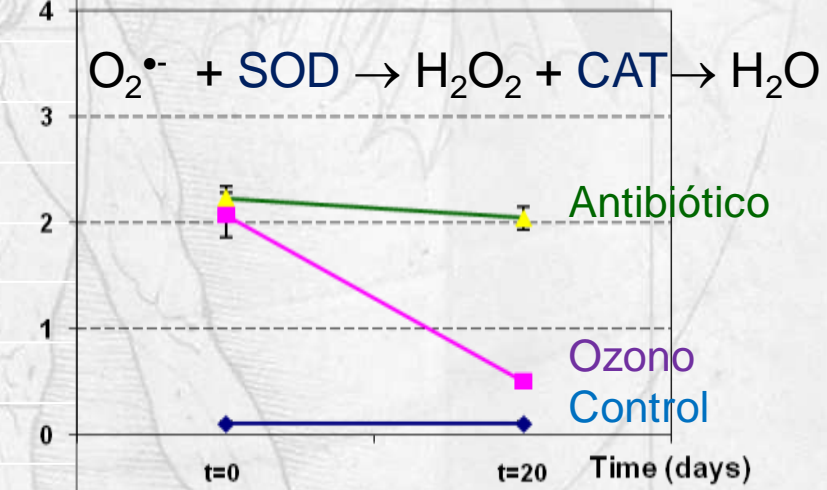
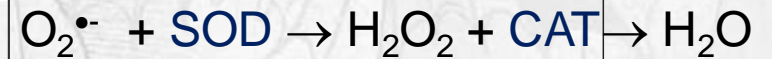
Therapeutic efficacy of ozone in patients with diabetic foot

Gregorio Martínez-Sánchez ^a, Saied M. Al-Dalain ^a, Silvia Menéndez ^b, Lamberto Re ^c,

Concentración de glucosa en plasma (mM)

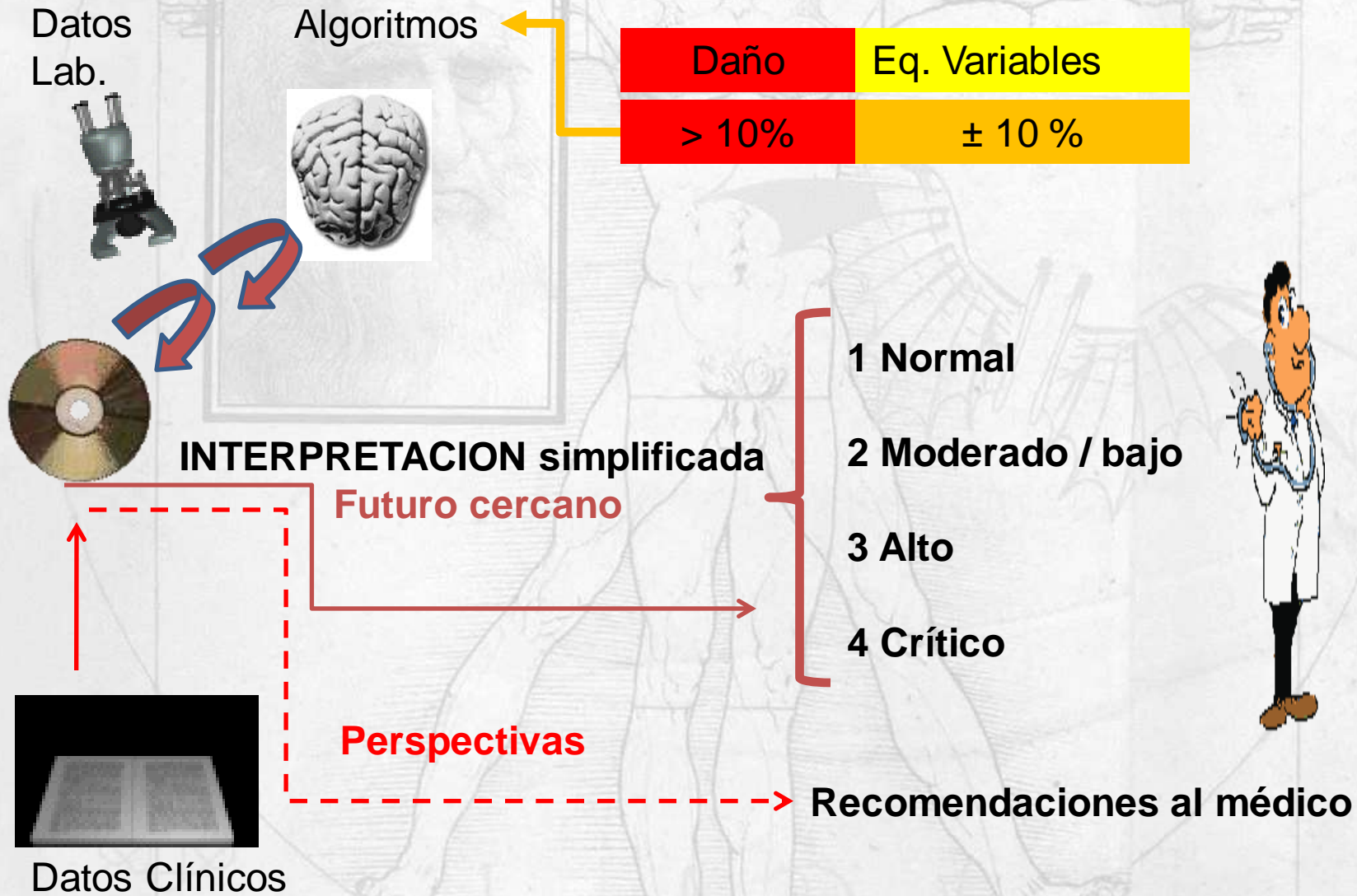


Razón CAT/SOD

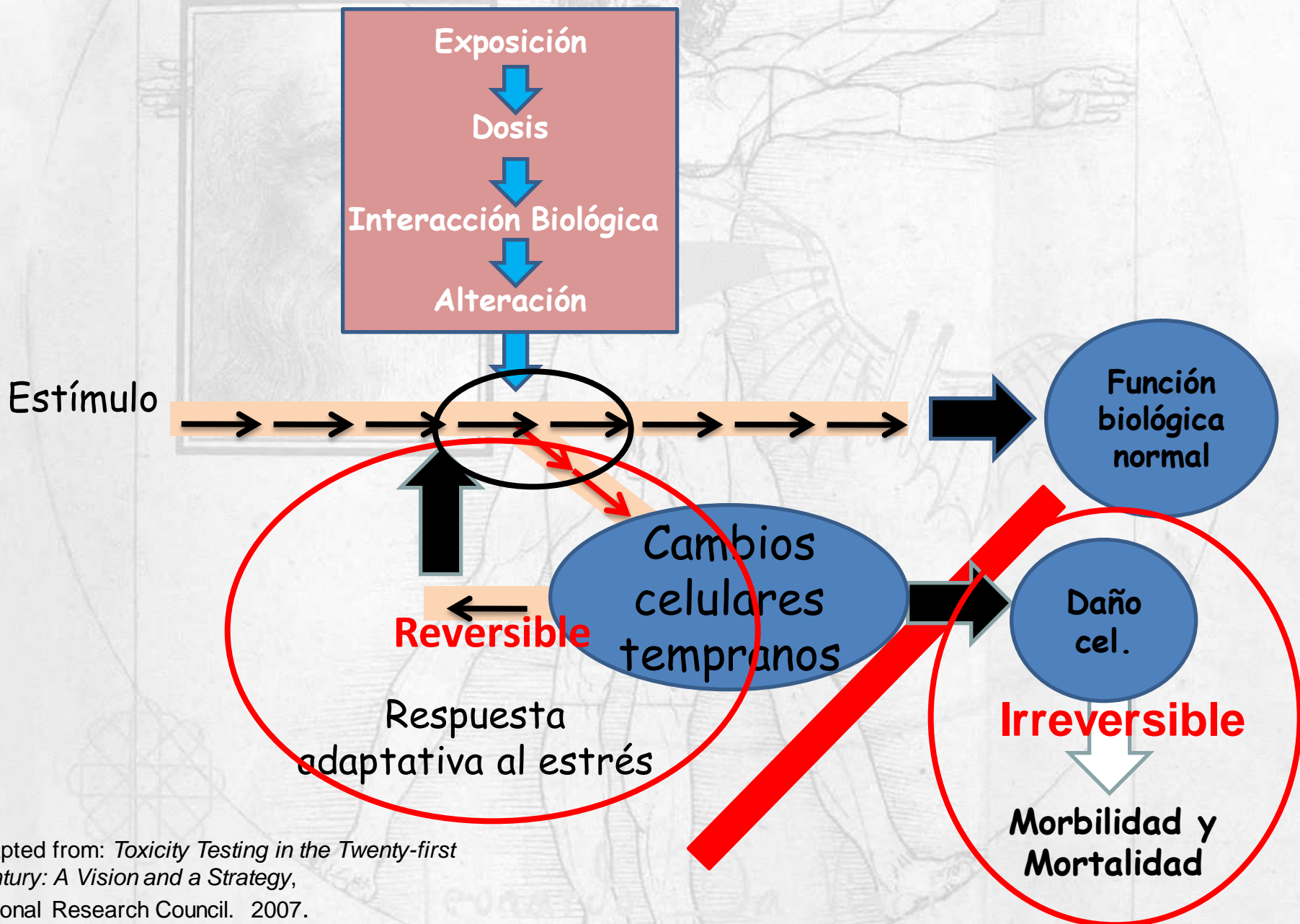


Grupo
Tiempo de colecta de las muestras

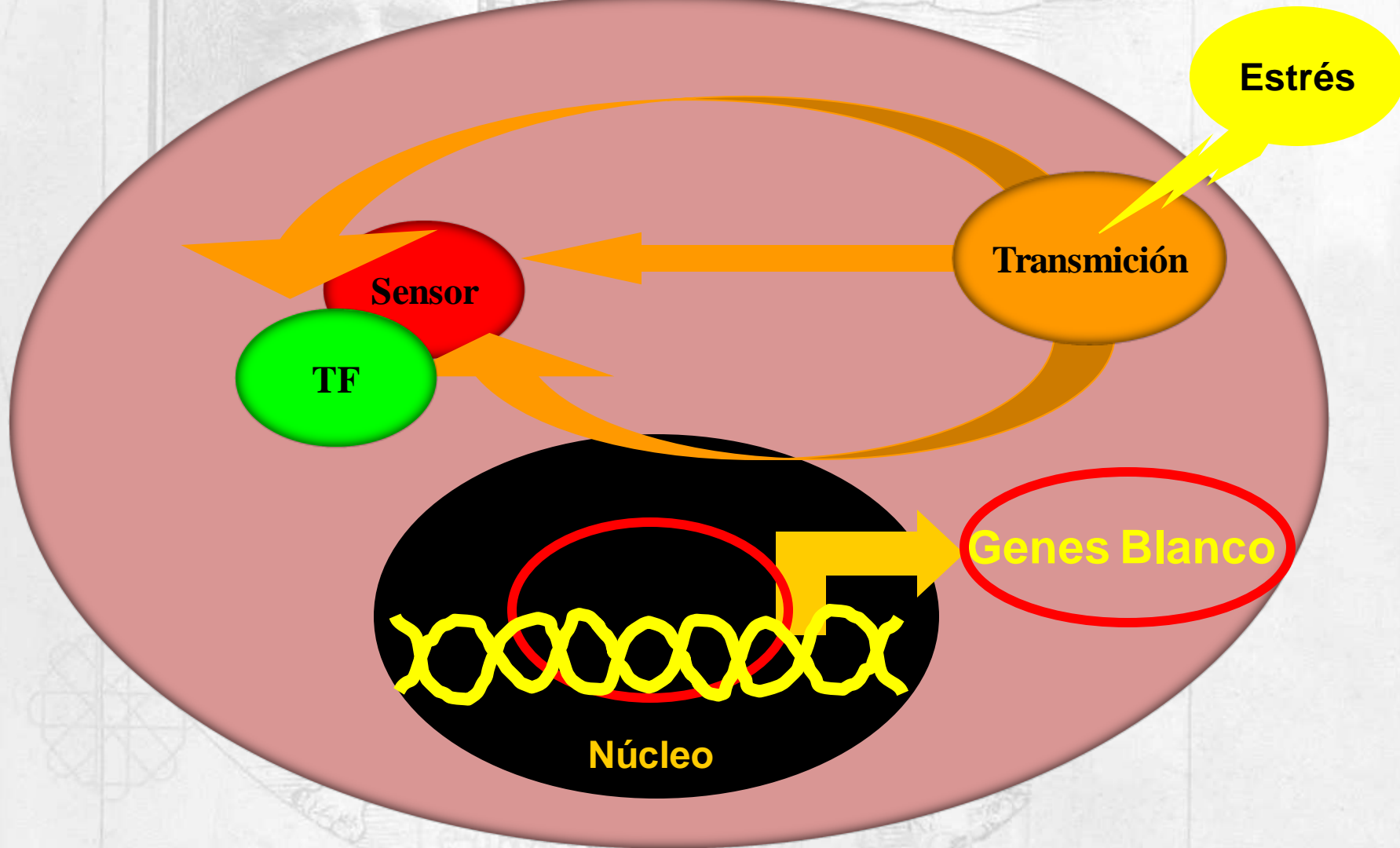
Futuro: Diagnóstico automatizado



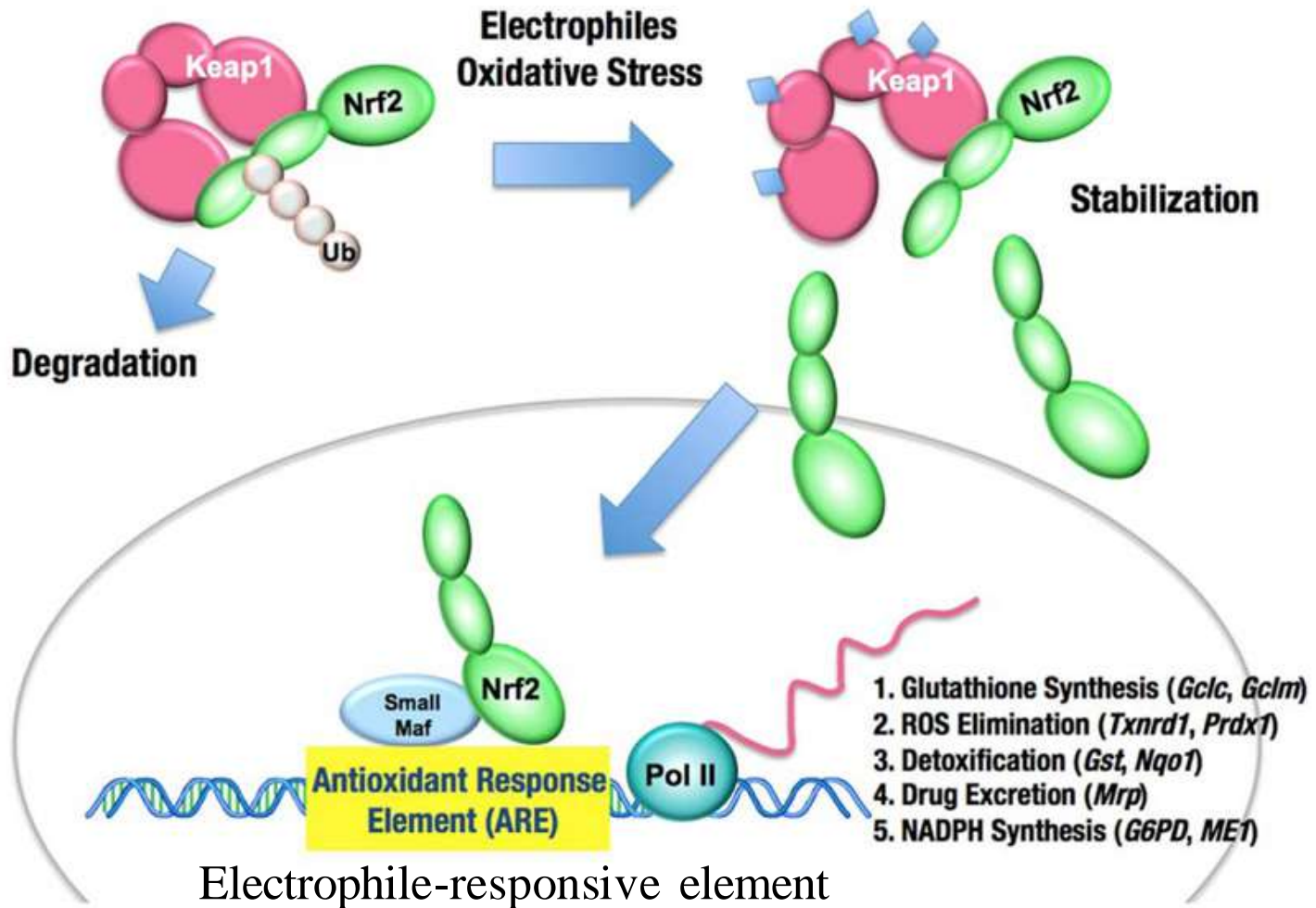
Respuesta general al estrés



Estructura de la respuesta al estrés



Nrf2-mediador de la respuesta al estrés

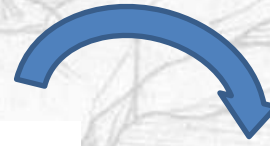


Ozone y Nrf2. Antecedentes.

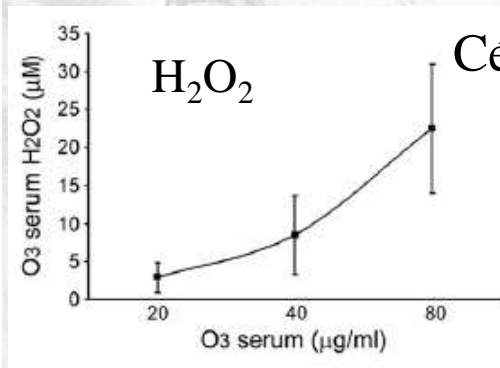
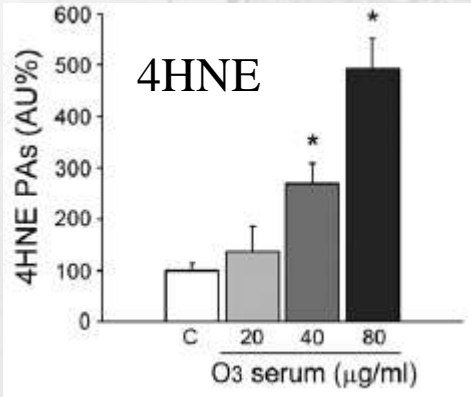
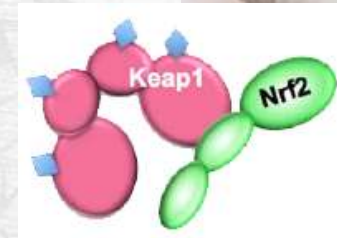
- Kim *et al.*, **2004**. Ozone induced \uparrow Nrf2 in lungs and livers of B6C3F1 mice.
- Qu *et al.*, 2011. ozonized saline activation of the Keap1-Nrf2- EpRE signaling pathway \downarrow rat's liver injury induced by CCl₄.
- Cho *et al.*, 2013. (Nrf2(-/-)) and wild-type (Nrf2(+/+)) mice. Nrf2 deficiency exacerbates oxidative stress and airway injury by O₃.

Demostración *Ex vivo* ↑Nrf2 /O₃

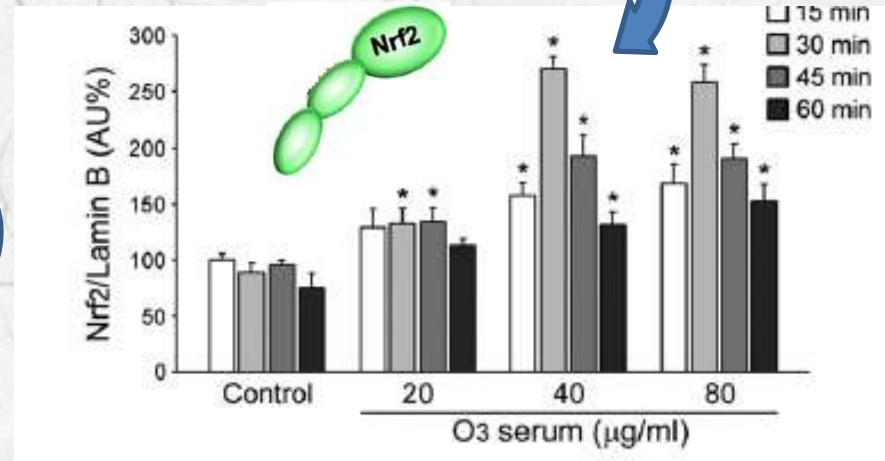
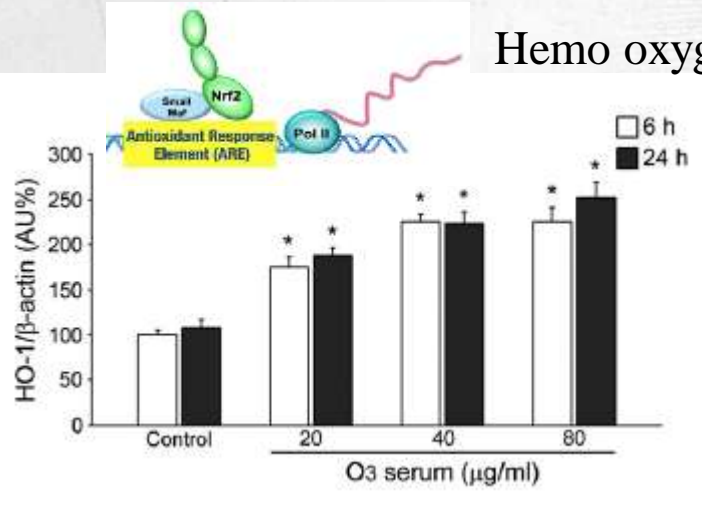
20 mL Suero humano + 20 mL O₃



Células de endotelio humanas EA.Hy926



Hemo oxygenasa 1



Is ozone pre-conditioning effect linked to Nrf2/EpRE activation pathway *in vivo*? A preliminary result. (2014)

European Journal of Pharmacology 742 (2014) 158–162



Contents lists available at ScienceDirect

European Journal of Pharmacology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ejphar



Molecular and cellular pharmacology

Is ozone pre-conditioning effect linked to Nrf2/EpRE activation pathway *in vivo*? A preliminary result



Lamberto Re^{a,*}, Gregorio Martínez-Sánchez^b, Marica Bordicchia^c, Giuseppe Malcangi^a, Antonella Pocognoli^c, Miguel Angel Morales-Segura^d, John Rothchild^e, Armando Rojas^f

^a Clinical Pharmacology & Toxicology Department, Medinat SAS, Via Hazioli 22, 60021 Camerano, Ancona, Italy

^b Medical Center Beauty Benefit – San Biagio di Osimo, Via Mons. Oscar Romero, 31, 60027 Osimo, Ancona, Italy

^c Department of Internal Medicine, University of Ancona, Politecnica delle Marche, 60131 Ancona, Italy

^d Department of Pharmacology, Faculty of Medicine, University of Chile, Santiago de Chile, Chile

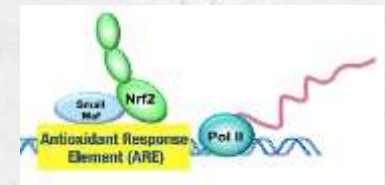
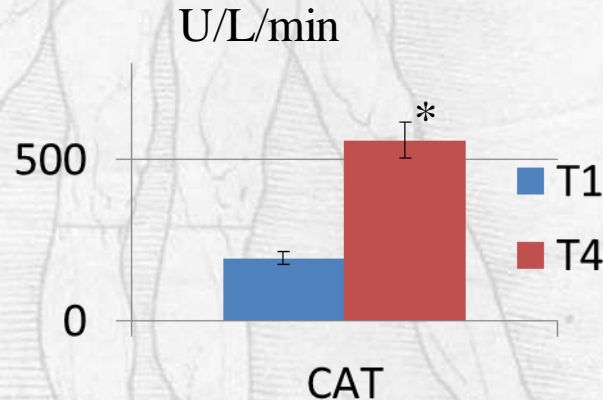
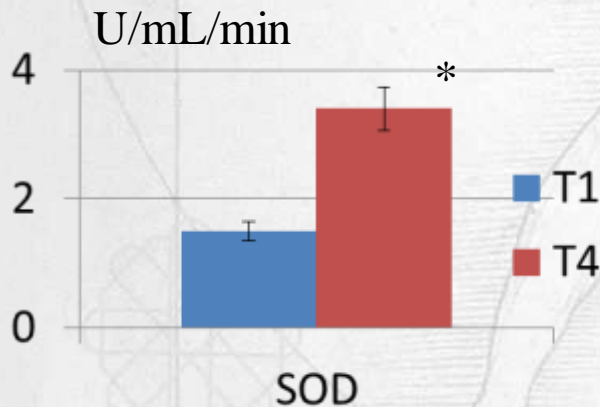
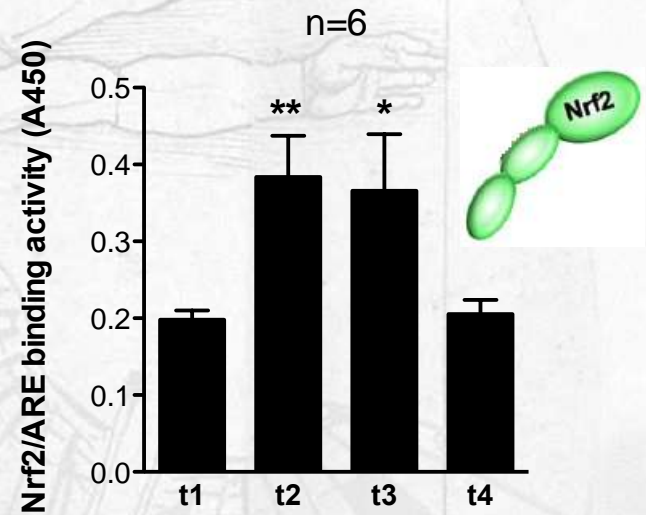
^e Holistic Dentist Clinic, 175 Mercado Street, Suite 115, Durango, CO 81301, USA

^f Biomedical Research Laboratories, Medicine Faculty, Catholic University of Maule, Talca, Chile

Demostración *In vivo* \uparrow Nrf2 / O₃

45 μ g/kg b.w O₃ 35 μ g/mL

1. Tiempo 0, Control (T1)
2. Sangre ozonizada en la botella (T2),
3. Sangre total 30 min después de la auto hemo(T3)
4. Un día después de la aplicación de 4 auto hemos (T4).

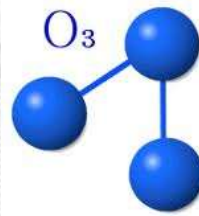


Agua ozonizada

Agua pH 7,00
Temperatura °C

Tiempo de vida del
ozono (min)

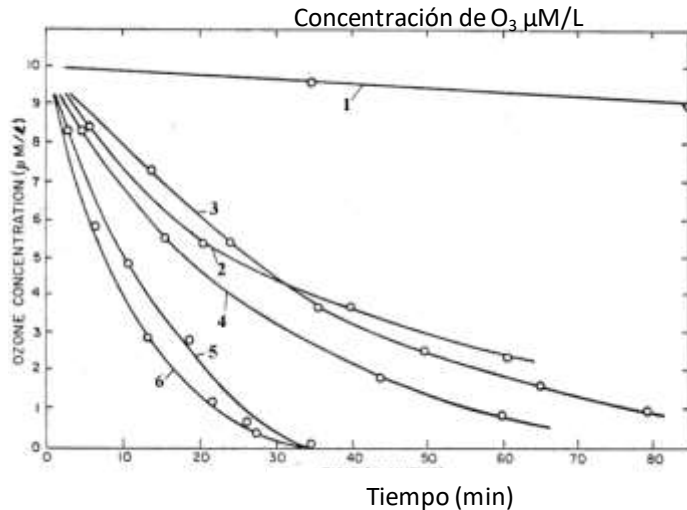
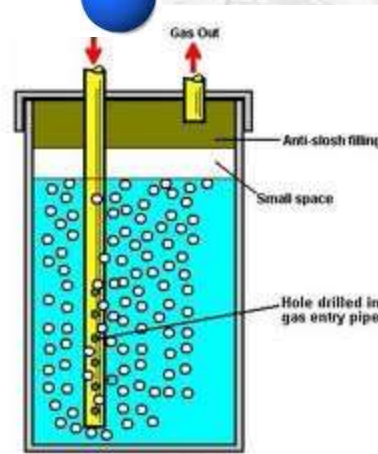
15	30
20	20
25	15
30	12
35	8



Agua 15 °C
pH

Tiempo de vida del
ozono (min)

7,6	30
8,5	10
9,2	5
10,19	2
10,4	1

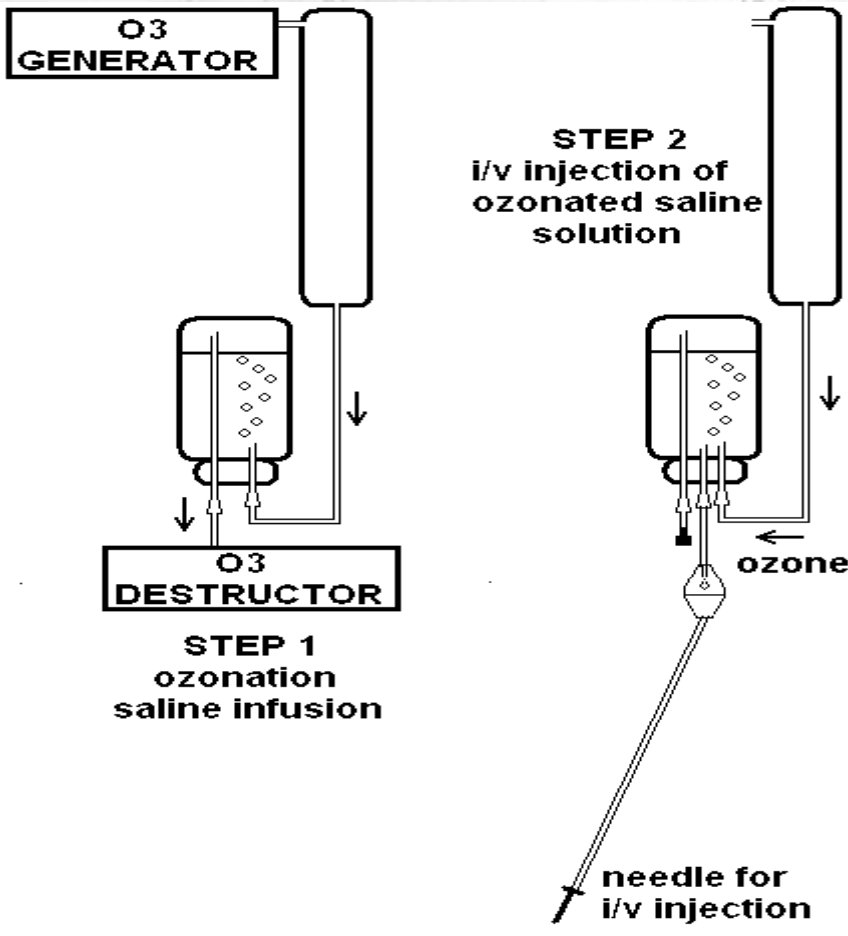


Aplicaciones Médicas:

- Tratamiento y desinfección de heridas
- Para eliminar el pus y limpiar áreas necróticas
- Eliminar gérmenes en general
- Lavado de cavidades quirúrgicas
- Gastritis



Solución Salina (0,154 M, 0,9%) ozonizada



Dosis: Baja - 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$, Media - 2 $\mu\text{g}/\text{kg}$, Alta- 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$.

Dosis (μg) = concentración de O_3 disuelto ($\mu\text{g} / \text{mL}$) \cdot Volumen de solución salina (mL).

Ejemplo: el peso del paciente pesa 80 kg; Volumen de la solución salina = 200 mL

Dosis de ozono (baja): 1 $\mu\text{g} / \text{kg} \cdot 80 \text{ kg} = 80 \mu\text{g}$
80 $\mu\text{g} / 200 \text{ mL} =$ La concentración de O_3 disuelto en solución salina = 0,4 $\mu\text{g} / \text{mL}$

La concentración de ozono desde la salida del generador = (0,4 $\mu\text{g} / \text{mL} \times 4$) = 1,6 $\mu\text{g} / \text{mL}$. El número 4 es el factor de corrección para aumentar en un 75 % la cantidad de ozono e corregir así el hecho de la cantidad burbujeada quede solo el 25 % disuelto.

Nunca superar 3.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

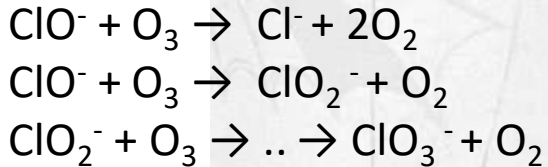
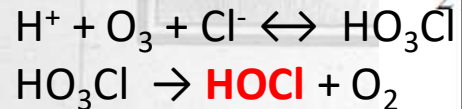
SSO3: NaCl 0,154 M= 0,9% pH 5.5-5.7 + O_3 1-2 $\mu\text{g}/\text{mL}$, flow 200 mL/min, bubble time (10-15) min

Levanov *et al.*: NaCl 1 M= 5,85 % pH. 8.4-9.8 + O₃ 30 µg/mL, flow 21 L/min

SSO3: NaCl 0,154 M= 0,9% pH 5.5-5.7 + O₃ 1-2 µg/mL, flow 200 mL/min

pH < 3
Cl (g)

pH 3-7.5
HOCl



pH > 7.5
ClO₃⁻ •OH?

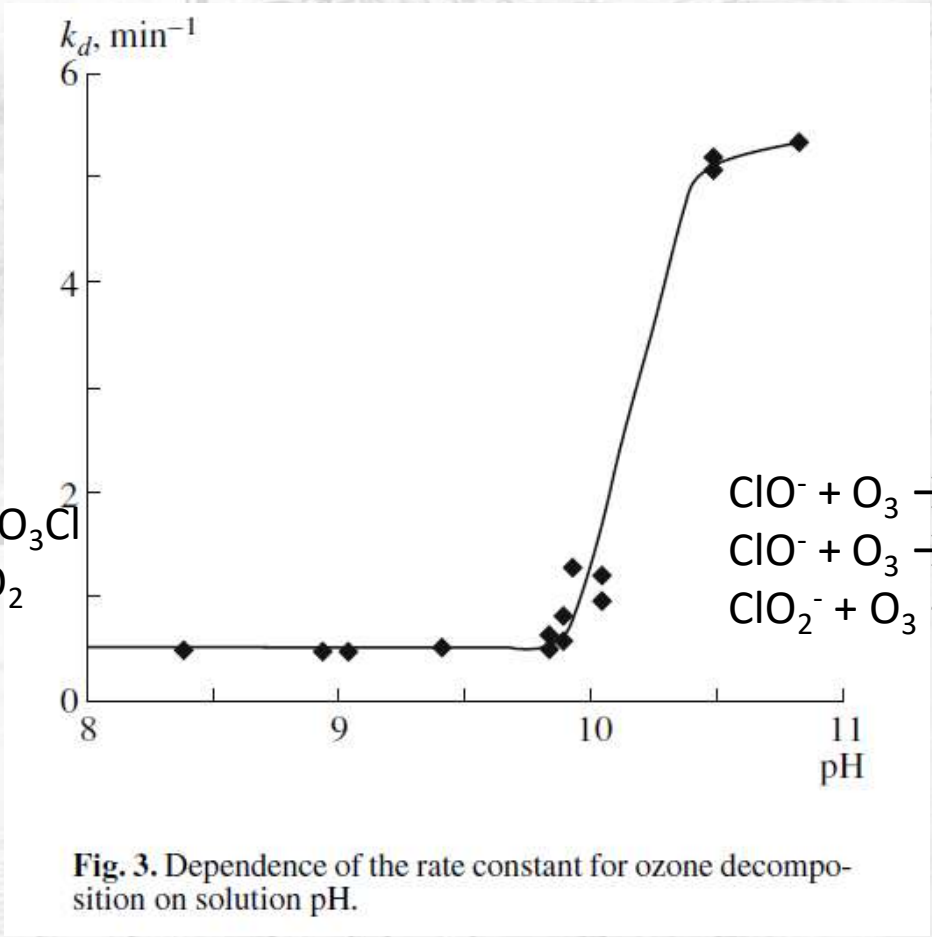


Fig. 3. Dependence of the rate constant for ozone decomposition on solution pH.

A. V. Levanov, I. V. Kuskov, E. E. Antipenko, and V. V. Lunin The Solubility of Ozone and Kinetics of Its Chemical Reactions in Aqueous Solutions of Sodium Chloride. *Russian Journal of Physical Chemistry A*, 2008, Vol. 82, No. 12, pp. 2045–2050. Faculty of Chemistry, Moscow State University, Moscow, Russia

Bocci and SSO3

(Bocci, V. *Ozone A New Medical Drug*, 295 (Springer, Dordrecht, The Netherlands, 2005).

As an example, **physiological saline (0.9 % NaCl) should never be ozonated because of the formation of hypochlorous acid.**

However, after ozonating saline with an **ozone concentration of 80 µg/mL**,... H₂O₂, and hypochlorous acid (HOCl)... **cause a chemical phlebitis.** However, at least in Russia, it does not seem to procure significant damage because the ozonation is performed at extremely low level (about 2 µg/mL), **so that it works as a placebo.** **Now I must strongly recommend to avoid the use of ozonated saline owing to inherent toxicity or/and minimal activity.**

.....They underwent five daily infusions (for 20 days) of ozonated saline solution. I believe that ozonation was carried out at a very low ozone concentration (perhaps 2-3 µg/mL), so that levels of HOCl were not too high and thus not too caustic! I must say that I am dead against this procedure. However, Zhulina *et al.* (1993) concluded that the treatment was effective because angina attacks decreased from an average of 6 to about 2 per day. There were no controls with either oxygenated saline or simple saline, **which might have shown the relevance of a placebo effect.**

Razumovskii: NaCl 0.154 M= 0,9% pH. 6.3 + O₃ 3-20 µg/mL, flow 50 L/min, 15 min
 SSO3: NaCl 0,154 M= 0.9% pH 5.5-5.7 + O₃ 1-2 µg/mL, flow 200 mL/min, 10 min

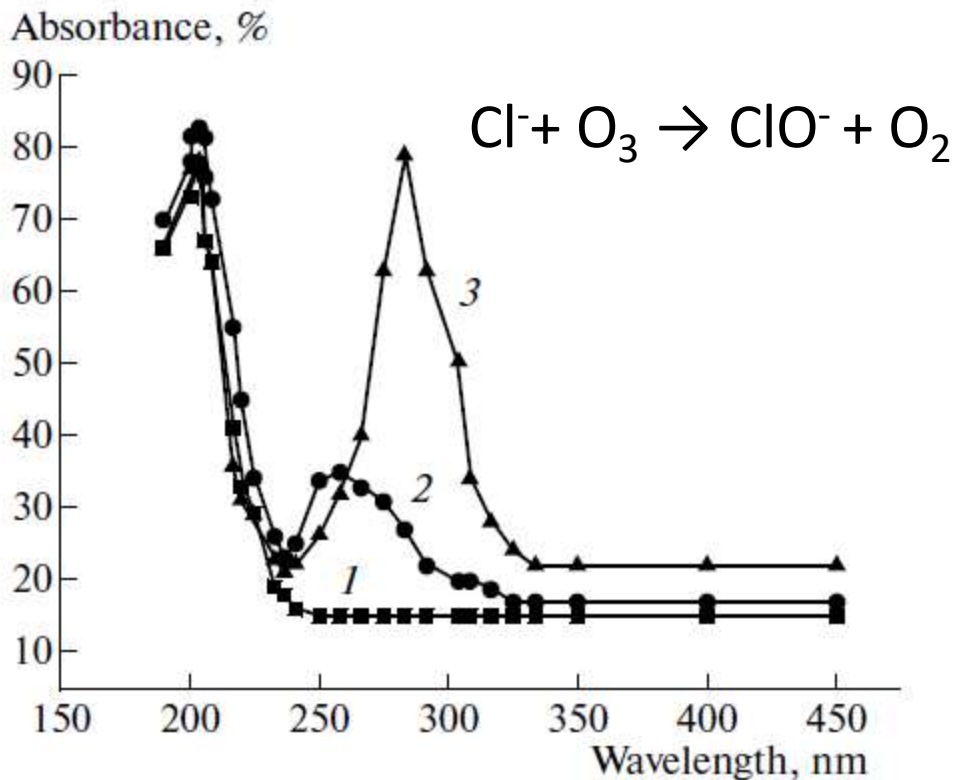
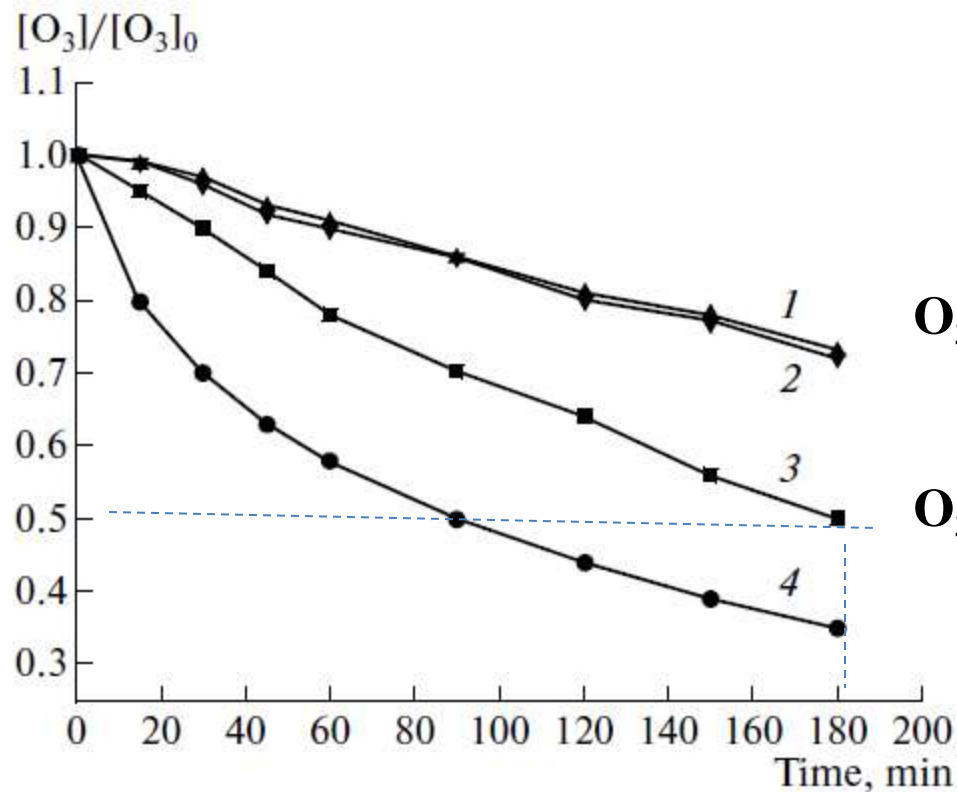


Fig. 2. UV spectra of solutions of (1) NaCl (0.9 g/100 ml), (2) ozone with NaCl (0.9 g/100 ml) stored until the half-decay of the dissolved ozone, and (3) NaClO in water.

Levanov *et al.*: HOCL is formed ~2 µM
 But this method is non sensible

HOCL ~15 µM is generated within the phagosome. Suquet C, *et al.* Arch Biochem Biophys. 2010 15;493(2):135-42.

Razumovskii, S. D., et. al. «Mechanism and Kinetics of the Reaction of Ozone with Sodium Chloride in Aqueous Solutions». *Kinetics and Catalysis* 2010 5(4)



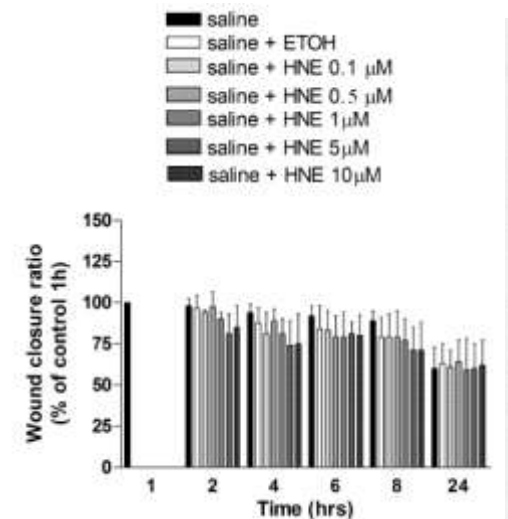
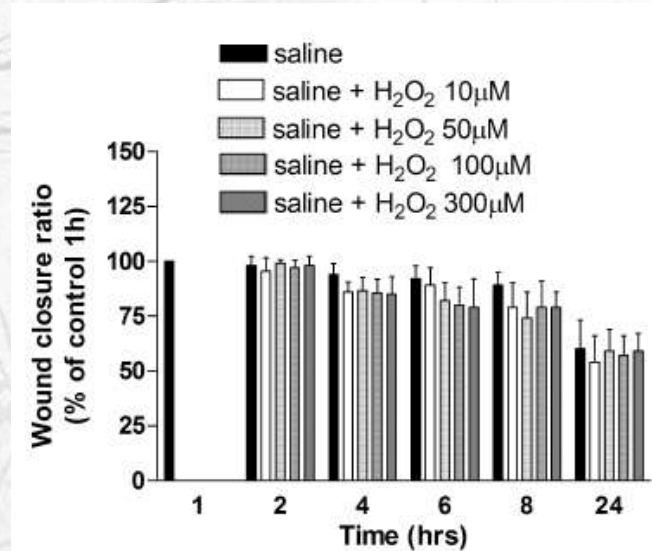
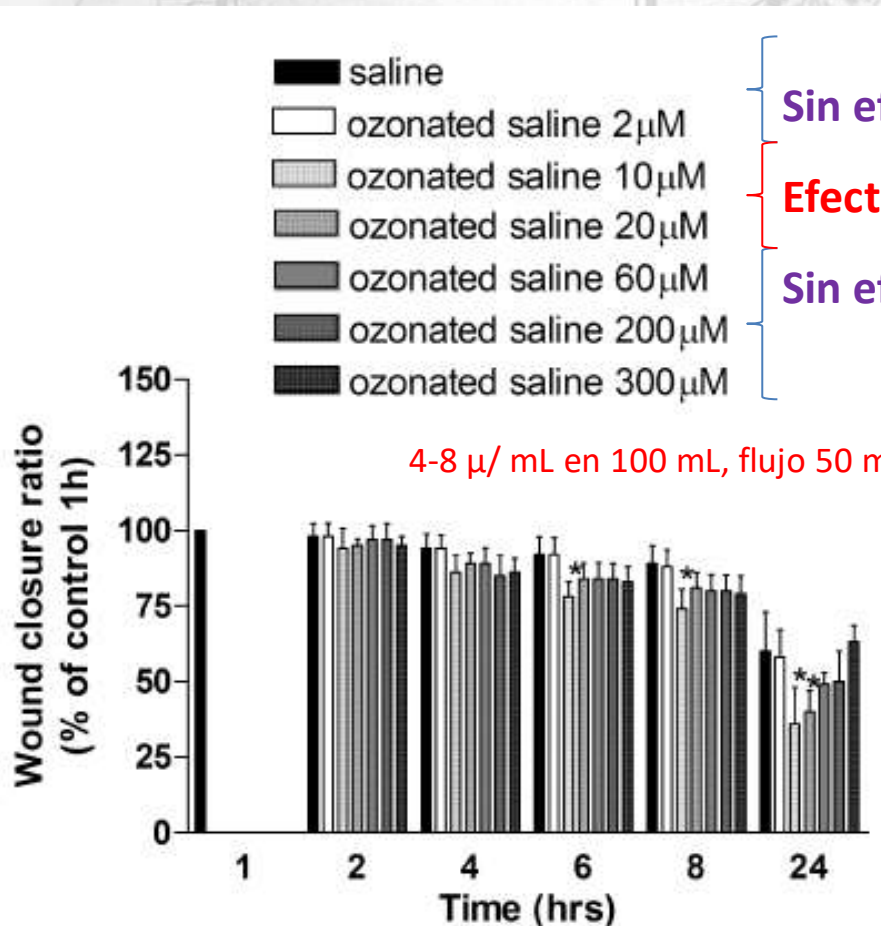
O₃ en H₂O

O₃ en NaCl 0,9%

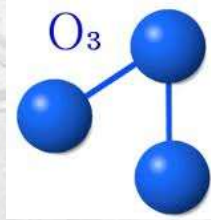
Fig. 1. Time dependences of the relative current concentration of ozone dissolved in (1) pure water and (2–4) aqueous solutions of (2) NaClO₄, (3) NaCl, and (4) CaCl₂. The salt concentration is 0.9 g/100 ml H₂O; pH 6.3.

Solución Salina (0,15 M/L)ozonizada

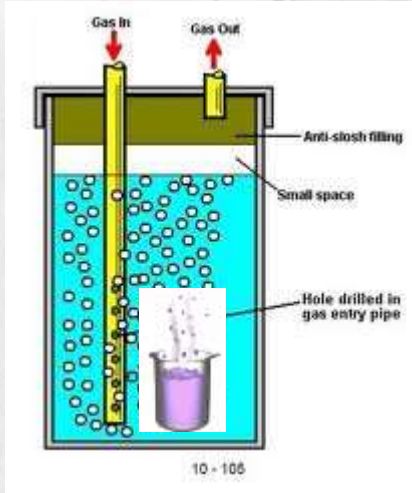
Effect of ozonated saline in wound healing



Giuseppe Valacchi *et al.* (2016) Ozone mediators effect on “in vitro” scratch wound closure. *Free Radical Research.* (i n press)



Agua ozonizada



- Obtención

1 vol. de agua + = volumen de O₃

5 min de burbujeo

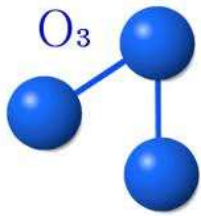
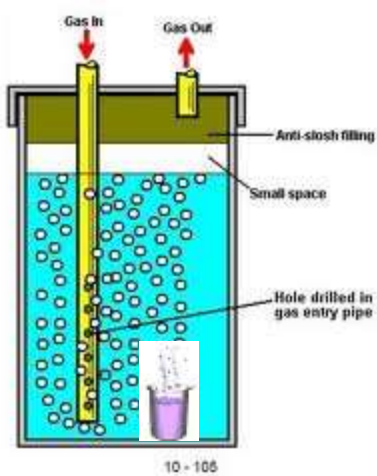
Concentración en H₂O se reduce $\frac{1}{4}$

- Estabilidad

5 oC el tiempo de vida media es de 110 h

A 20 oC el tiempo de vida media es de 9 h

Agua ozonizada



Patología	Concentración Final	Modo de Aplicación
Escaras / Heridas	25 µg/mL	Rociar o por inmersión
Hongos / Candidiasis Vaginal	25 µg/mL	Rociar / inmersión / Lavados
Psoriasis	25 µg/mL	Rociar o por inmersión
Parontoditis / Prevención de Caries	10 µg/mL	Enjuagues
<i>Helicobacter Pylori</i>	2,5 µg/mL	Ingerir
Gastritis	2,5 µg/mL	Ingerir
Úlcera gástrica	2,5 µg/mL	Ingerir

Aceites Ozonizados. Historia

OBSERVATIONS
ON THE
MEDICAL ADMINISTRATION
OF
OZONIZED OILS.

BY
THEOPHILUS THOMPSON, M.D., F.R.S.,
PHYSICIAN TO THE HOSPITAL FOR CONSUMPTION, ETC.

Received May 23d.—Read June 28th, 1859.

28 de Junio de 1859

Burbujeo con O₂ + Exposición al SOL (U.V)



Aceite de Girasol
Aceite de Cacao
Aceite de Hígado de peces

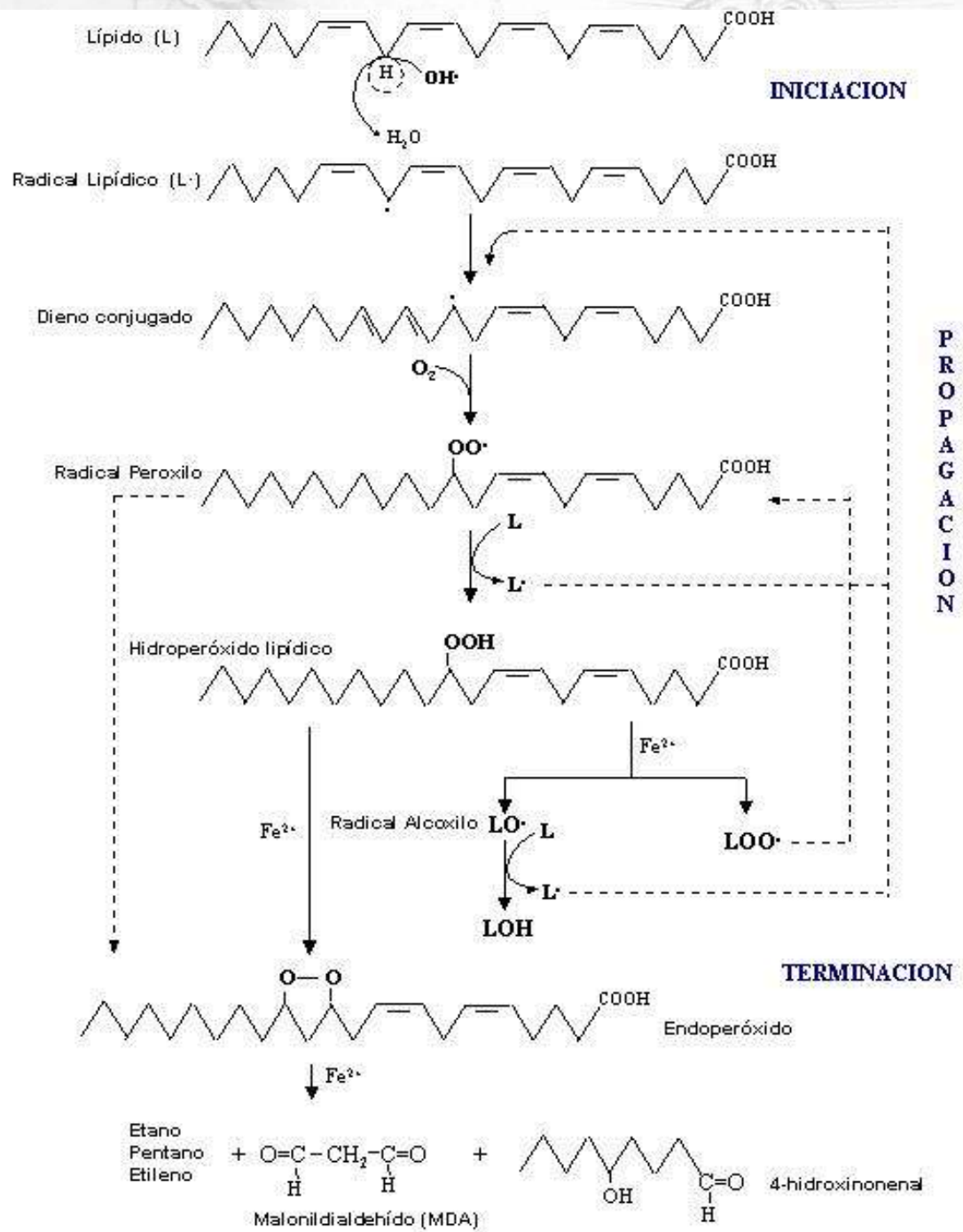


Tuberculosis



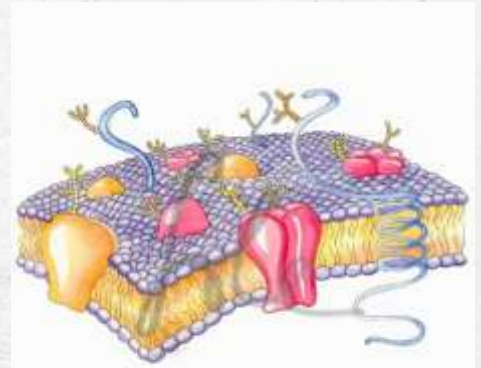
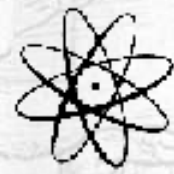
Mejorías

1904 Se inician las ventas en Farmacia en los EE.UU. Del aceite de oliva ozonizado, con el nombre de "Glycozone."



P
R
O
P
A
G
A
C
I
O
N

Peroxidación lipídica

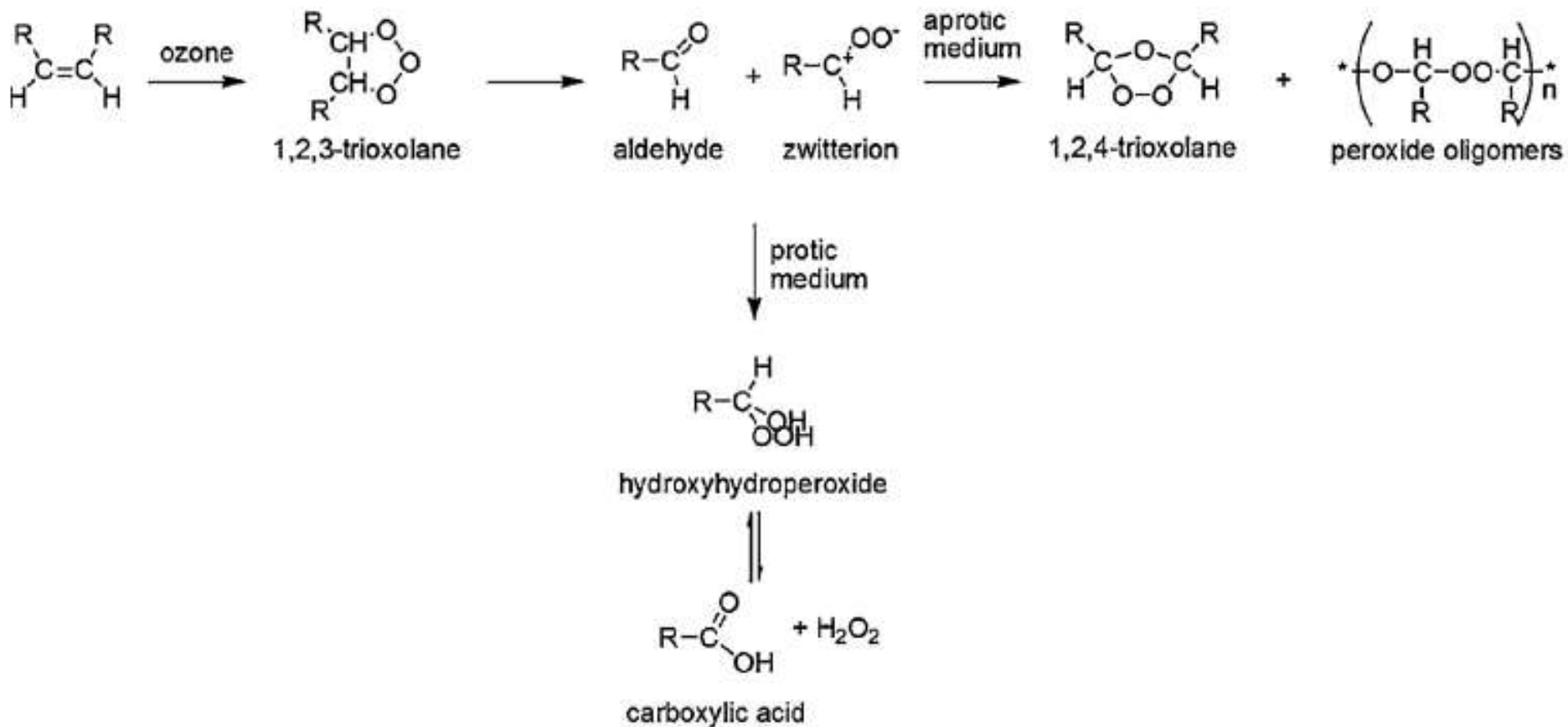


Composición porcentual de ácidos grasos insaturados (oleico y linoleico) de aceites vegetales seleccionados.

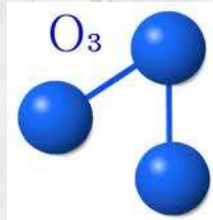


Aceite vegetal	Oleico	Linoleico
Oliva	65-85	4-15
Girasol	28-35	60-70
Soja	20-30	50-65
Coco	5-8	0,9-2
Teobroma	37-38	1-2
Palma	39-46	7-11

Química. Mecanismo de Criegee



Aceites Ozonizados. ¿Cómo se hacen?



Generador de ozono

Entrada: O₂

O₂ pureza, temperatura

O₂ humedad



Reactor Farmaceutico

Control: Calidad de la materia prima

Temperatura de reacción

Tiempo de Reacción

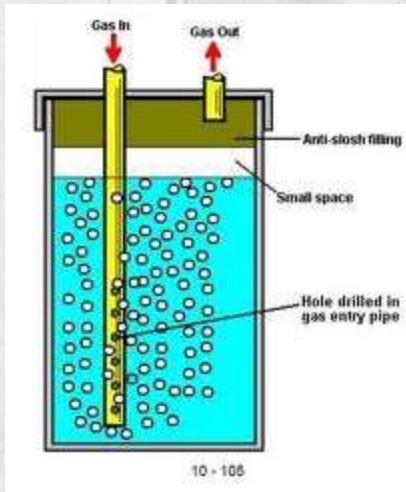
O₃ flujo

O₃ concentración

Agitación

Viscosidad

Neutralización de gases residuales



Pasos Principales:

Reacción

Parada

Control de calidad

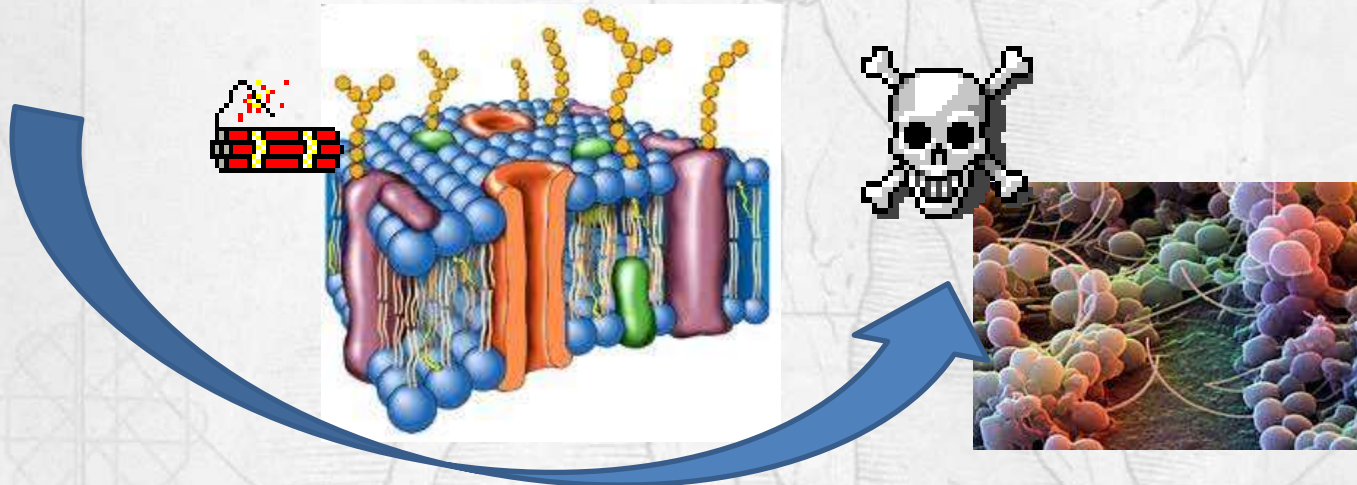
Standard Operation Procedures according Good Manufacturing Practices. Ozonia 3000® Production Cycle 2014. Innovares, Italy.

Iacopo Zanardi, Valter Travagli, Alessandro Gabbrielli, Luisa Chiasserini, Velio Bocci. Characterisation of sesame oil derivatives as dermatological preparations. Lipids. 2008, 43(9): 877-886

Aceites Ozonizados. Mecanismo

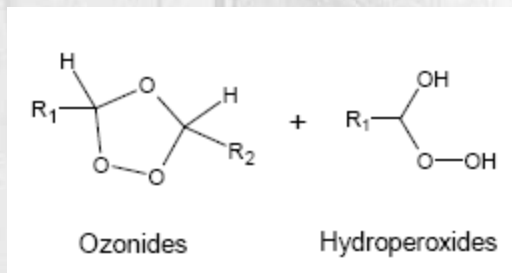
Oxidación directa: la liberación de ozono, trioxolanos y lipoperóxidos pudiera destruir directamente los microorganismos mediante su oxidación.

O₃, formaldehído, trioxolane y lipoperóxidos



Aceites Ozonizados. Mecanismo

Citotoxicidad: compuestos como trioxolanos, lipoperóxidos y aldehídos, son citotóxicos para los microorganismos y pueden inactivar rutas enzimáticas claves para su supervivencia.

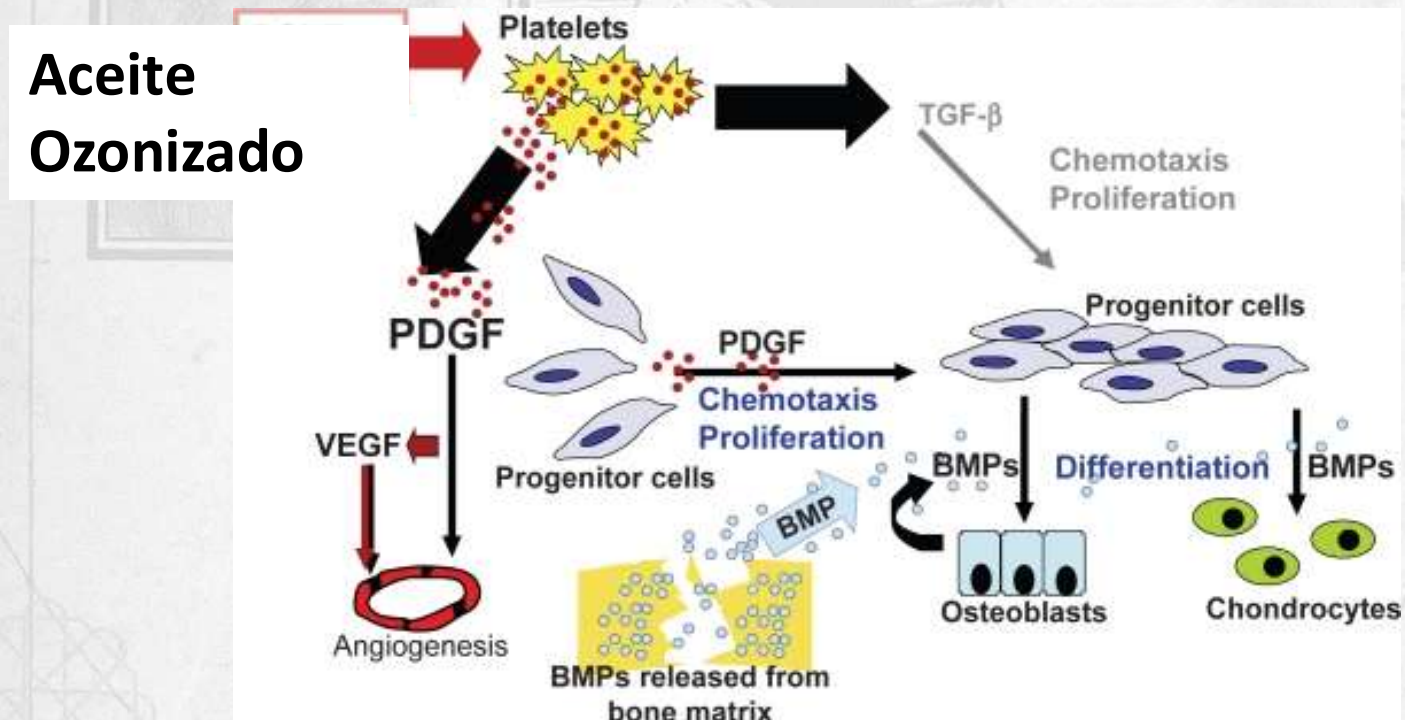


Inactivación de proteínas,
lípidos insaturados,
peptidoglicanos, ADN, ARN,
enzimas respiratorias

**Lisis /
muerte**

Aceites Ozonizados. Mecanismo

Liberación de factores de crecimiento: Diversos componentes de los aceites ozonizados pueden liberar factores de crecimiento como PDGF, TGF- β y VEGF que pueden incidir en la remodelación tisular.



G. Valacchi, Y. Lim, G. Belmonte et al., "Ozonated sesame oil enhances cutaneous wound healing in SKH1 mice," *Wound Repair and Regeneration*, vol. 19, no. 1, pp. 107–115, 2011.

Hee et al. Therapeutic Effects of Topical Application of Ozone on Acute Cutaneous Wound Healing. *J Korean Med Sci* 2009; 24: 368-74

Aceites Ozonizados. Mecanismo

Pre-condicionamiento oxidativo: la oxidación local de los tejidos por los componentes de los aceites ozonizados pueden estimular mecanismos antioxidantes endógenos y promover la reparación de los tejidos.

Abu-Gharbieh E, Bayoumi FA, Ahmed NG. Alleviation of Antioxidant Defense System by Ozonized Olive Oil in DNBS-Induced Colitis in Rats. *Mediators Inflamm.* 2014;2014:967205.

Zamora Z, González R, Guanche D, Merino N, Menéndez S, Hernández F, Alonso Y, Schulz S. Ozonized sunflower oil reduces oxidative damage induced by indomethacin in rat gastric mucosa. *Inflamm Res.* 2008 Jan;57(1):39-43.

Zamora Rodríguez ZB, González Alvarez R, Guanche D, Merino N, Hernández Rosales F, Menéndez Cepero S, Alonso González Y, Schulz S. Antioxidant mechanism is involved in the gastroprotective effects of ozonized sunflower oil in ethanol-induced ulcers in rats. *Mediators Inflamm.* 2007;2007:65873.

Aceites ozonizados. Indicadores de Calidad

Análisis	Método	Límite
Aspecto / Color	Organoléptico	Líquido transparente amarillo claro
Olor	Organoléptico	Característico, acre, no rancio
Solubilidad	Farmacopea Europea	Insoluble en agua, muy soluble en cloroformo, éter, éter de petróleo y parafina líquida
Densidad	Farmacopea Europea	0.98 ± 0.02 g/mL
Índice de acides	Farmacopea Europea	< 30 mg KOH / 1 g
Índice de peróxido	Farmacopea Europea Modificado	3500±300 mEq O₂ / kg
Índice de iodo	Farmacopea Europea	60.00 ± 20.00 g / 100 g
Viscosidad	Farmacopea Europea	625.00±40.00 mPa·s

Council of Europe (2010). *European Pharmacopoeia 7th Edition*, Druckerei C. H. Beck, ISBN 978-92-871-9700-2, Nördlingen, Germany. Metodo: 2.2.5. Relative Density. 2.2.10 Viscosity-Rotating Viscosimeter Method, 2.5.1. Acid Values, 2.5.4. Iodine Value, 2.5.5. Peroxide Value.

Especificaciones Aceites Ozonizados

Method	Especificaciones	Intervalos de IP		
		Altos	Medio	Bajos
Aceites Tratamientos Locales	IP (mEq/kg)	800-1200	600-400	400-200

- 400 IP: Para administración oral en post-cirugía y tratamiento de infecciones del TGI como *Helicobacter pylori*. Revitalización facial, rosacea, acné y estimulación de la granulación.
- 600 IP: mucosa vaginal (bulbo vaginitis) y rectal (hemorroides), nasal, úlceras tópicas, fase de epitelización, tratamiento de escaras
- 400-600 IP: heridas, úlceras tópicas, quemaduras en proceso de granulación
- 800-1200 IP: En heridas y úlceras severamente infectadas, gingivitis, alveolitis, *herpes simplex*, *herpes zoster*.

Preguntas



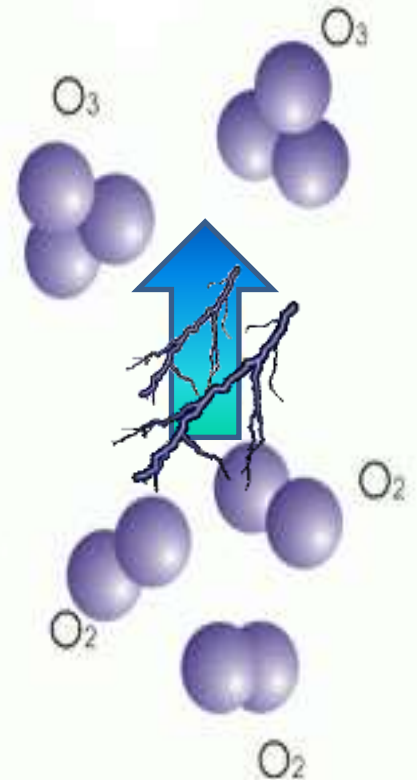
Contacte a:

Gregorio Martínez Sánchez, Pharm.D, Ph.D.

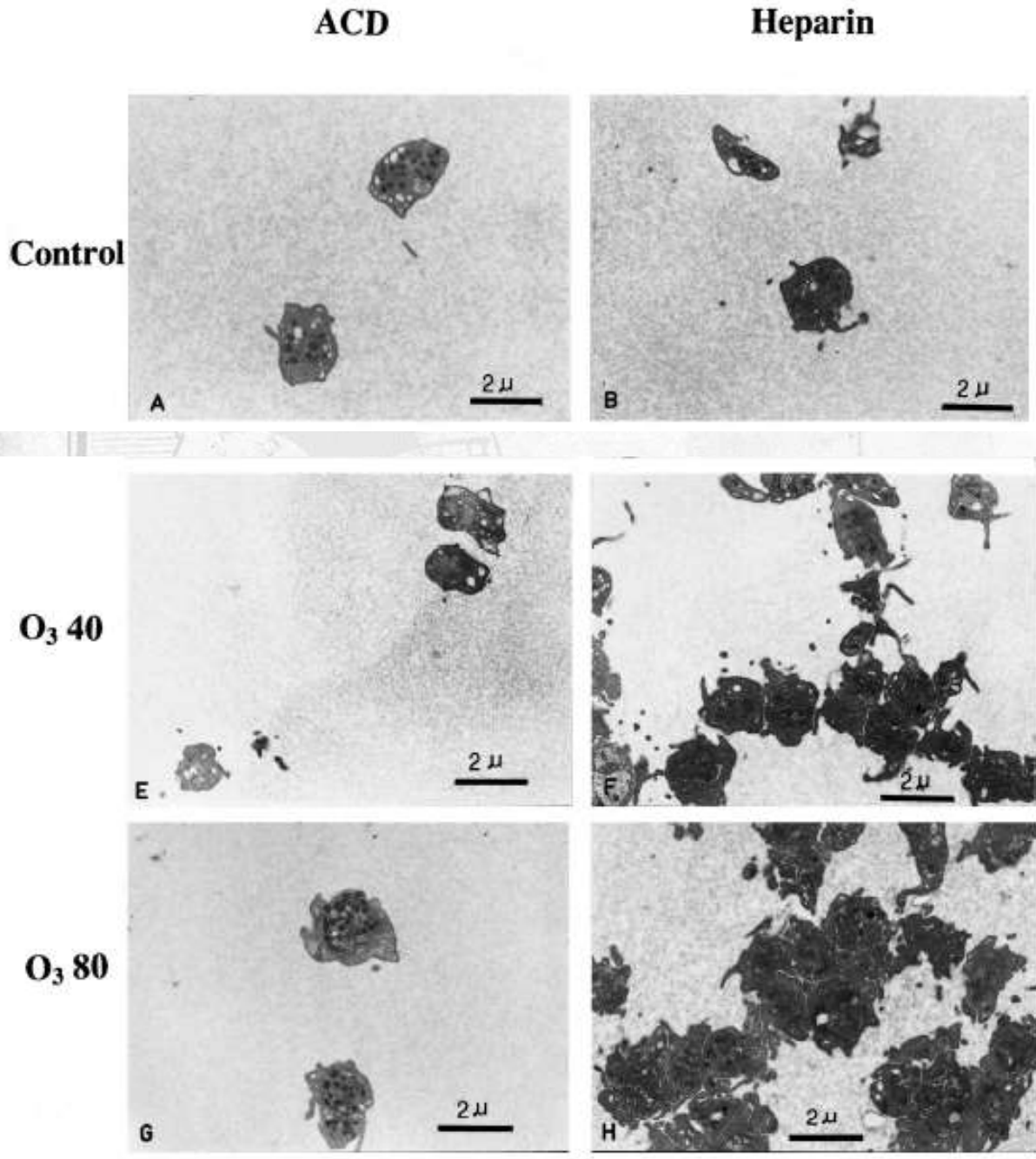
Investigador Titular

Director científico [Medical Center Beauty Benefit](#)® srl

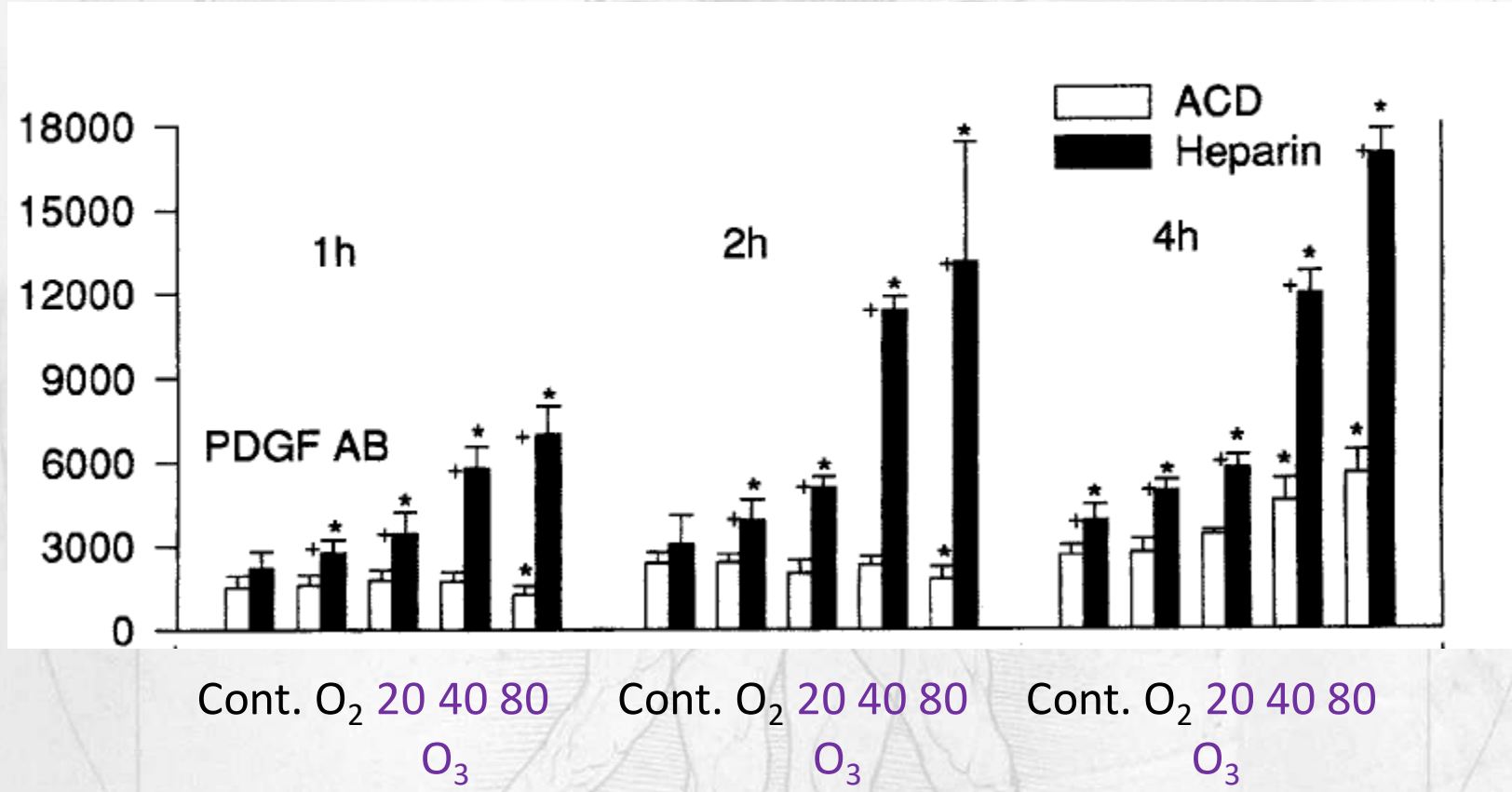
gregorcuba @ yahoo.it



Papel del anticoagulante.
Sobre la agregación:



Liberación de factores de crecimiento de plaquetas estimuladas con O3



Liberación de *Platelet-Derived Growth Factor* (PDGF) de plaquetas humanas después de 1, 2 y 4 h de incubación. El PRP fue obtenido en heparina o citrato, y no fue tratado (control), o fue tratado con O₂ solo, o O₂/O₃ a 20, 40 y 80 µg/mL 30 s antes de incubarlos.