



**Revista  
Española de  
Ozonoterapia**

Número 0  
1 - Junio 2010

**aepromo** - Asociación Española de Profesionales Médicos en Ozonoterapia

**LA OZONOTERAPIA  
EN EL TRATAMIENTO  
COMPLEMENTARIO  
DEL CÁNCER**

**OZONOTERAPIA EN LA  
PARÁLISIS CEREBRAL**



**PREVENCIÓN DEL ICTUS CON  
LA APLICACIÓN DE OZONOTERAPIA**



Revista Oficial de la

**Asociación Española de Profesionales Médicos en Ozonoterapia**

## ÍNDICE

### Directora de la Revista:

Dra. Adriana Schwartz,

### Miembros comité científico:

Dr. Gregorio Martínez Sánchez, Italia  
 Dr. Velio Bocci, Italia  
 Dr. Bernardino Clavo, España  
 Dr. Gabriel Ortuño, España  
 Dr. Fernando Kirchner, España  
 Dra. Adriana Schwartz, España  
 Prof. Lamberto Re, Pharmacology, Italia  
 Dra. Agne Díaz Riverol, Cuba  
 Dra. Mirta Copello, Cuba  
 Dr. Froylan Alvarado, México  
 Dr. Eugeny I. Nazarov, Ucrania  
 Dr. Claudia N. Kontorshnikova, Rusia  
 Dr. Sergey P. Peretiagin, Rusia  
 Dr. Genadi Grechkanev, Rusia  
 Dr. Nabil Mawsouf, Egipto

### Consejo Editorial:

Dra. Adriana Schwartz  
 Dr. Fernando Kirchner  
 Dr. Dr. Gregorio Martínez  
 Dr. Gabriel Ortuño

### Consejo técnico de comunicación y diseño

Sr. Dionisio Aranda  
 Sr. Roberto Quintero  
 Sr. Juan Ramón Fernández

|   |    |
|---|----|
| EDITORIAL .....   | 4  |
| ADJUVANT HYPERBARIC OXYGEN AND OZONE THERAPY<br>IN THE TREATMENT OF CHRONIC LEG AND FOOT ULCERS<br>(PILOT CLINICAL STUDY) ..... | 5  |
| OZONOTERAPIA EN EL TRATAMIENTO<br>COMPLEMENTARIO DEL CÁNCER<br>Revisión temática para Revista Electrónica Aepromo .....         | 10 |
| OZONOTERAPIA EN LA PARÁLISIS CEREBRAL<br>Hospital Pediátrico Provincial. Sancti Spíritus 2006-2009 .....                        | 21 |
| PREVENCIÓN DEL ICTUS CON LA APLICACIÓN DE OZONOTERAPIA<br>ESTUDIO PILOTO .....  | 25 |
| HAS OXYGEN-OZONETHERAPY A FUTURE IN MEDICINE? .....   | 33 |
| EFFECT OF OZONE THERAPY ON REDOX STATUS<br>IN EXPERIMENTALLY INDUCED ARTHRITIS .....  | 40 |
| OXÍGENO-OZONOTERAPIA COMO COADYUVANTE<br>EN EL TRATAMIENTO DE LAS INFECCIONES OSEAS .....                                       | 47 |

## EDITORIAL

*Cada gran verdad científica atraviesa por tres etapas:  
Primero, la gente dice que está en conflicto con la Biblia;  
luego dicen que había sido descubierta antes;  
finalmente, dicen que siempre habían creído en ella.*

*Louis Agassiz (1807-1873)*

¡Cuando tratamos de ser mejores, todo a nuestro alrededor también se vuelve mejor!

AEPRIMO se complace y enorgullece en presentar el primer número online de la Revista Española de Ozonoterapia, poniendo a disposición de los ozonoterapeutas y en general de la comunidad médica y sanitaria nacional e internacional, el trabajo científico de investigadores en el campo de la ozonoterapia.

Desde su fundación, acaecida solo hace menos de dos años, AEPRIMO se fijó como uno de sus objetivos de acción el de hacer conocer y expandir los beneficios que la terapia médica del ozono tiene. Desde entonces este objetivo se ha venido asumiendo con entusiasmo y tesón, significándonos al mismo tiempo un reto en forma permanente.

Es un reto por tres razones básicas: La divulgación del ozono necesariamente pasa previamente por incentivar la investigación científica de tal manera que ésta se haga de conformidad a los criterios metodológicos internacionalmente aceptados, de tal manera que sus resultados puedan ser divulgados para que el lector pueda conocerlos, usarlos y si es el caso criticarlos. Es igualmente un reto porque la inmensa mayoría de las investigaciones de ozono se hacen sin contar con apoyos económicos. De allí la importancia de actuar en forma innovativa y creativa para que a pesar de las deficiencias financieras existentes sí haya interés en investigar y en publicar. Es también un reto para que la revista que estamos iniciando divulgue información científica seria, y pueda así servir de plataforma para que prestigiosos especialistas en la materia puedan llegar a todos aquellos que deseen ampliar sus conocimientos en ozonoterapia y a aquellos que aún ignoran los beneficios de la misma.

Confiamos que este proyecto se enriquezca y se mantenga vivo con vuestros aportes, comentarios y críticas que serán siempre bienvenidos. Deseamos que la revista contribuya a que la ozonoterapia vaya siendo cada día más aceptada en el mundo científico, universitario y sanitario, y para que siga siendo regularizada por las autoridades sanitarias como ya está siendo el caso en varias comunidades españolas y en otras regiones del mundo.

Aprender algo significa entrar en contacto con un mundo desconocido en donde las cosas son más extraordinarias que te hacen crecer y ser mejor. ¡Que disfrutes y aprendas de esta revista!

Dra. Adriana Schwartz  
Presidenta de AEPRIMO

# ADJUVANT HYPERBARIC OXYGEN AND OZONE THERAPY IN THE TREATMENT OF CHRONIC LEG AND FOOT ULCERS (PILOT CLINICAL STUDY)

Ahmed M. Fathi \*, M. Nabil Mawsouf\*\*

\* General and Peripheral Vascular Surgeon, Oxytherapist , Egyptian Naval Medical Services, Alexandria, Egypt.

\*\*Professor of Pain Management, Head of Ozone Therapy Unit, National Cancer Institute, Cairo University, Cairo, Egypt.

## Abstract

This pilot study describes the clinical effects of Adjunctive Hyperbaric Oxygen Therapy (HBOT) and Ozone Therapy in the treatment of chronic ulcers most of which did not respond to standard wound care and conventional methods of therapy and the patients were threatened by amputation. HBO and Ozone Therapy increased the healing rate of these ulcers, and avoided amputation. Adjuvant HBO and Ozone Therapy showed effective adjunctive therapy and we recommend a Randomized Controlled Trial to prove that effect.

## Key words

Hyperbaric oxygen therapy, Ozone therapy, Leg ulcers, Foot ulcers.

## Introduction

Leg ulcers are a common problem thought to affect about 1% of the population at some point in their lives and about 1.5 per 1000 people at any one time. Leg ulcers are more common in women than men, and the prevalence increases with age. Venous disease is present in the majority of cases; peripheral vascular disease may coexist or may be the main cause of an ulcer. Other disease processes may also be involved, such as diabetes or rheumatoid disease. Leg ulceration is chronic, and an ulcer may be present for months or years without healing. After healing, recurrence rates are high. There are many approaches to management, with large variations in practice at local and international levels.<sup>(1)</sup>

Hyperbaric Medicine is the fascinating use of barometric pressure for delivering increased oxygen dissolved in plasma to body tissues. Hyperbaric oxygen therapy (HBOT) is a form of treatment in which a patient breathes 100% oxygen at higher than normal atmospheric pressure that is greater than 1 atmosphere absolute (ATA). Therapy is given in special therapeutic chambers, which were earlier used primarily to treat illnesses of deep sea divers.<sup>(2,3,4)</sup>

Ozone (O<sub>3</sub>) is a strong antioxidant.<sup>(5)</sup> Ozone can exert

protective effects by oxidative preconditioning, stimulating and/or preserving the endogenous antioxidant systems and by blocking the xanthine / xanthine oxidase pathway for reactive oxygen species generation, as demonstrated in studies of the damage induced by carbontetrachloride (CCL<sub>4</sub>) or by hepatic and renal ischemia-reperfusion.<sup>(6,7,8,9)</sup>

Ozone has been used with good results in the treatment of patients with diabetic foot, because of its germicidal properties and its influence on the processes of oxygen metabolism, and other effects.<sup>(10)</sup>

## Aim of the Work

The present pilot study aims to clinically evaluate the effectiveness of two different modalities of Oxy-Therapy; Hyperbaric Oxygen and Ozone Therapy in the treatment of chronic ulcers.

## Patients and Methods

Patients:

This pilot study represents experience in the management of 15 cases, who had clinically diagnosed leg or foot ulcer, treated throughout the period between 2007 and 2008.

Patients were grouped into three different groups according to the severity of the case and treatment modality; Hyperbaric Oxygen Therapy; 5 patients; Ozone Therapy; 5 patients; and Combined Modality Therapy, 5 patients

Methods:

Diagnosis/Assessment; medical history, physical examination, ulcer examination, clinical investigations, ankle brachial pressure index (ABPI), investigations to exclude other causes, wound measurement, identifying hard-to-heal ulcers.

Management of wounds: the general rules to treat wounds include the accurate diagnosis and classification of the Wound, the vascular Status (ABPI), good control of blood glucose, correction of underlying cause, correction of malnutrition, treatment of Infection, debridement: of necrotic tissue and underlying osteomyelitis, obliteration

of dead space as a result of debridement, off-loading, wound care, and finally adjuvant therapy <sup>(11)</sup>.

**Hyperbaric Oxygen Therapy:** Following the protocol adapted by Jain KK <sup>(12)</sup>, sessions was done in the Multiplace Baramed 6/2/6 Hyperbaric Chambers, ETC Inc., USA. Oxygen was inhaled from a helmet or a mask at a pressure of: 2-2.5 ATA (atmospheric pressure, equals 10 - 5 meters under Sea Surface). Sessions were initially done on daily basis (6 sessions/ week). Intermittent, each session will be 90- 120 minutes, with rest every 20 sessions. The first clinical evaluation was done after 5 sessions.

**Ozone Therapy:** Following the protocol adapted by Renate Viebahn-Hänsler (2007) <sup>(13)</sup>, patients to be treated daily with ozone (generated by an ozone generator, Ozonosan Alpha 1, Germany), by rectal insufflation as systemic therapy (with an ozone concentration up to 35 µg), and local treatment by covering the lesion by a plastic bag, filled with ozone at a concentration of 60 µg,

decreased up to 20). The first clinical evaluation was done after 5 sessions. With improvement, the frequency of sessions was decreased gradually.

**Combined:** The combined modality was achieved by systemic HBOT and Local O<sub>3</sub> as described above.

For local treatment; Standard wound care, topical application of ozonated olive oil and wound dressing.

**Results**

Ten patients (66.7%) had type 2 diabetes mellitus of them 8 (53.3%) were IDDM. The mean age was 53.3 ± 9.86 years (37- 68 years). The sex distribution was 10 males (66.7%) and 5 females (33.3%), with a ratio of 2:1. In addition, 10 patients (66.7%) were threatened by amputation.

The main data of the studied patients is shown in table 1.

**Outcome**

Successful results were achieved in 11 (73.3%) out of

Table (1): Clinical Data of the Studied Patients

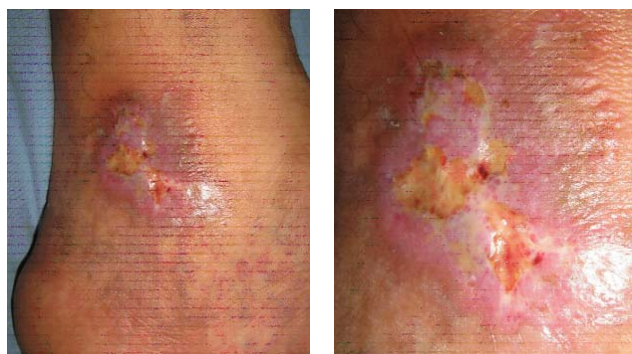
| Modality            | Age    | Sex | Diabetes | Diagnosis | Threat of Amputation                        |     |
|---------------------|--------|-----|----------|-----------|---|-----|
| HBOT                | Case 1 | 66  | Male     | IDDM      | Rt Arterial Leg Ulcer                       | Yes |
|                     | Case 2 | 52  | Female   | IDDM      | Lt Neuropathic Foot Ulcer                   | Yes |
|                     | Case 3 | 38  | Male     | No DM     | Lt Recurrent Venous Ulcer                   | No  |
|                     | Case 4 | 50  | Female   | IDDM      | Rt Neuropathic Foot Ulcer                   | Yes |
|                     | Case 5 | 46  | Male     | No DM     | Lt Venous Ulcer                             | No  |
| O <sub>3</sub>      | Case 1 | 65  | Male     | IDDM      | Rt Neuropathic Foot Ulcer-Diabetic gangrene | Yes |
|                     | Case 2 | 55  | Male     | IDDM      | Rt Neuropathic Foot Ulcer                   | Yes |
|                     | Case 3 | 37  | Male     | No DM     | Lt Recurrent Venous Ulcer                   | No  |
|                     | Case 4 | 54  | Male     | No DM     | Bilateral Venous-Traumatic Ulcers           | No  |
|                     | Case 5 | 60  | Female   | NIDDM     | Rt Neuropathic Foot Ulcer                   | No  |
| HBOT-O <sub>3</sub> | Case 1 | 62  | Male     | IDDM      | Neuropathic Foot Ulcer-Diabetic gangrene    | Yes |
|                     | Case 2 | 41  | Male     | No DM     | Bilateral Venous-Traumatic Ulcers           | Yes |
|                     | Case 3 | 55  | Female   | IDDM      | Lt Arterial Ulcer Heel                      | Yes |
|                     | Case 4 | 68  | Male     | NIDDM     | Lt Arterial Ulcer Heel                      | Yes |
|                     | Case 5 | 51  | Female   | IDDM      | Neuropathic Foot Ulcer-Diabetic gangrene    | Yes |

the studied 15 patients. The most effective modalities were combined modality 4 out of 5 (80%), the ozone therapy 4 out of 5 (80%), the HBOT 3 out of 5 (60%). Considering the severity of cases, combined modality was the most effective but with more selection of cases which suffered more from ischemia, infection and/or edema. Ozone therapy was very effective, easier to apply with less complication and higher patient compliance.

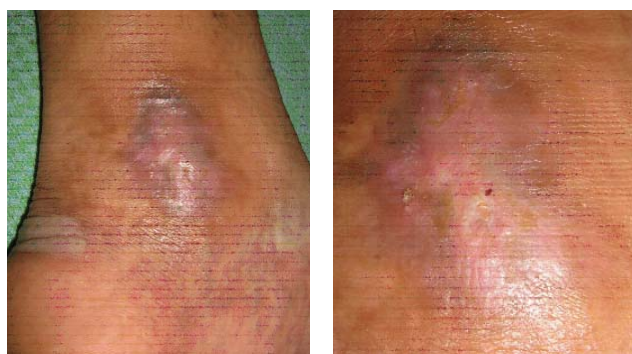
A striking feature was that out of the 10 patients threatened by amputation, seven (70%) patients had their limbs saved.

**Clinical case treated with HBOT:**

Male, 38 yrs, smoker not diabetic. complaining of recurrent left leg ulcer since 1 month provoked by Trauma, then infected wound, gradually increased in size. Similar ulcer developed in the same place since 10 years and lasted for 3 Years. (Figure 1)



Before HBOT



After HBOT

Figure (1): Left Recurrent Venous Ulcer treated with HBOT

Clinical case treated with ozone therapy:

A 65 years male IDDM patient was diagnosed as Rt diabetic foot gangrene; Wagner 4 classification. The main problem was diabetic foot, Infection and neuropathy. He was recommended for Right below knee amputation. He was unfit for HBOT because of his heart problem. He received ozone therapy daily (Topical 80→60 µg/ml) and rectal insufflation 15 – 35 µ/ml 250 – 300 ml for 5 days followed by surgical debridement. Ozone therapy continued 3 sessions / week for seven weeks then twice / week for four weeks and finally once / week for 12 weeks. This was followed by using ozonated olive oil only. The maximum concentration for rectal insufflation was 35 µ/ml and the volume was 300 ml. Topical ozone concentration dropped gradually from 80 µ/ml till 20 µ/ml. (Figures 2, 3)

Before Ozone

After Ozone

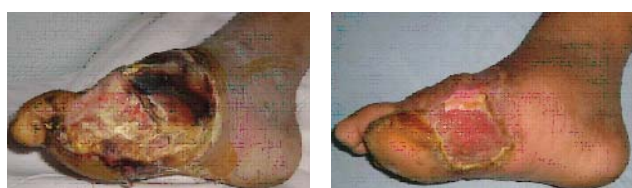
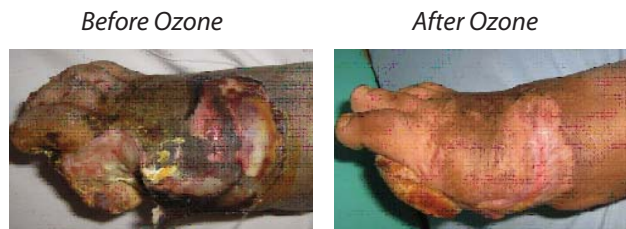


Figure (2): Right Neuropathic Foot Ulcer-Diabetic gangrene treated with ozone therapy.



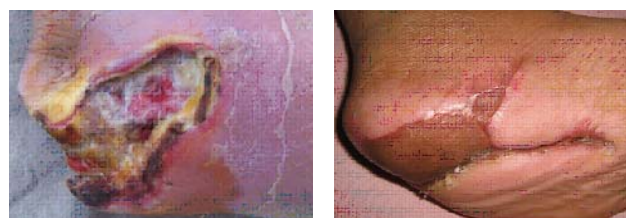
Before Ozone

After Ozone

Figure (3): Same case other view.

Clinical cases treated with combined HBOT and ozone therapy:

A 55 years female patient with uncontrolled IDDM and ulcer of the left heel. She was suffering from pains of the left leg and foot. She passed serial debridements and unfit for re-vascularization. She was planned for below knee amputation. There was complete occlusion of tibialis posterior artery and occluded segments of tibialis anterior and superficial safenous arteries. There was left leg ischemia (ABPI 0.65), severe diabetic foot infection, gangrenous arterial Ulcer of the Heel. The surgical decision was to control diabetes, ischemia, and infection. This to be followed by debridement, grafting (plastic surgery) and proper foot wear. The oxy-therapy protocol was to start with HBOT till control of ischemia and infection by 20 sessions daily; 6 days / week. This is to be followed by topical ozone three sessions / week (60 µg/ml) till wound is clean; then three sessions / week (40→20 µg/ml) to promote healing. The total therapy was 23 sessions HBOT and 37 sessions topical ozone in a four month period. (Figure 4)



Before HBOT-O<sub>3</sub>

After HBOT-O<sub>3</sub>

Figure (4): Lt Arterial Ulcer Heel treated by combined modality.

Another case of 68 years male, NIDDM, smoker with severe pains of the left leg and foot. He suffered from intermittent claudications and was unfit for revascularization. There was a pressure ulcer of the left heel and left superficial safenous artery occlusion. (Figure 5)

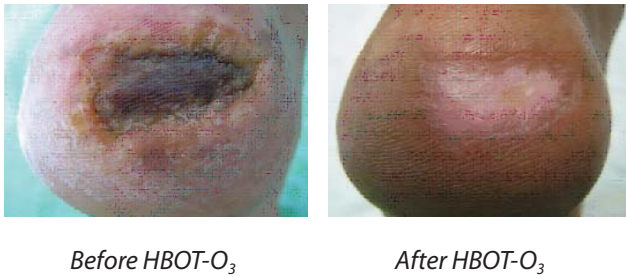


Figure (5): Lt Arterial Ulcer Heel treated by combined modality.

**Discussion**

HBO promotes wound healing by counteracting tissue hypoxia and is a valuable adjunct in management of ischemic, infected, and non-healing wounds. (12) It is generally accepted that correction of wound-hypoxia is required to provide enough O<sub>2</sub> that would support growth of regenerating tissues. (14)

Rationale of HBO for ulcers based on the hypoxia theory has been a matter of controversy, between authors

who do not recommend the use of HBOT in venous ulcers; reporting that the role of HBOT seems very limited, and that reported successful cases would heal without the need for HBO, (15) or reporting that it is difficult to justify such an expensive, ineffective, complication-prone treatment modality for problem extremity wounds. (16)

Several studies reported favorable results in treating venous ulcers with HBO. (17, 18) Specifically, two Double-Blind, Randomized-controlled studies; the first has significantly demonstrated an improvement in venous stasis ulcers that showed no response to standard wound care. (19) The second concluded that hyperbaric oxygen enhanced the healing of ischemic, non-healing diabetic leg ulcers and may be used as a valuable adjunct to conventional therapy when reconstructive surgery is not possible. (20)

On the other hand, authors supporting its use only in extraordinary circumstances as a useful adjunct in the treatment of some life- or limb-threatening situations where it can be cost effective. (21) Also, Jain et al, 2004 reported that HBO will remain an important adjunct to wound healing but its role needs to be redefined. (12)

**Clinical Comparison**

| HBO                            | Ozone  |
|--------------------------------|--|
| Selected cases (Systemic Only) | Most cases (Topical & Systemic)                              |
| Expensive                      | Less expensive   |
| Less patient compliance        | High patient compliance                                      |
| Claustrophobia                 | No   |
| Major Side Effect              | Side effects   |
| Oxygen toxicity                | Reversible minor skin irritation IF many high conc. sessions |
| Decompression illness          | Respiratory irritation IF improper ozone generator is sed    |
| Complex                        | Ease & simple method   |
| Cautious selection of patients | Applicable especially in high risk patients                  |
| Numerous contraindications     | Less contraindications                                       |

**Conclusions**

Oxy-Therapy is a beneficial adjuvant therapy that:

- Accelerates the rate of wound healing,
- Preserves a functional extremity,
- Reduces the need for Amputation, and
- Increases the rate of complete healing of bad ulcers on long-term therapy

Ozone Therapy:

- Highly effective treatment of bad healing ulcers
- Improves some systemic disorders present in those patients

- Enhances the sense of wellbeing

Hyperbaric Oxygen Therapy:

- Valuable for treating Selected cases of diabetic foot complications and impaired wound-healing. (Hypoxic)

Combined Modality

- More beneficial in Selected cases (Hypoxia, infection, edema)
- Costly



### Recommendations

From this pilot study we conclude that Adjuvant HBO and Ozone Therapy increased healing rates of chronic leg ulcers which did not respond to standard wound care and conventional methods of therapy, even in the presence of

significant and severe co morbidities and challenges.

We also support many recommendations that the role of HBOT and Ozone Therapy should be redefined by good randomized controlled studies to improve the level of evidence supporting their use in the management of venous ulcers and the cost effectiveness of its use.

### References

- 1- Wilkinson EA, Hawke CI. Does Oral Zinc Aid the Healing of Chronic Leg Ulcers? A Systematic Literature Review. *Arch Dermatol* 1998; 134: 1556- 1560.
- 2- Fife Caroline E, Buyukcakir C, Otto GH, et al (2002): The predictive value of transcutaneous oxygen tension measurement in diabetic lower extremity ulcers treated with HBOT. *Wound Repair and Generation* 2002; 10: 198- 207.
- 3- Bakker DJ (2000): Hyperbaric oxygen therapy and the diabetic foot. *Diab Metab Res Rev* 2000; 16: S55- S58.
- 4- Sahni T, Hukku S, Jain M, et al (2004): Recent Advances in Hyperbaric Oxygen Therapy. *Medicine Update* 2004; 14: 632- 639.
- 5- Bocci V (1999): Biological and clinical effects of ozone. Has ozone therapy a future in medicine? *Br J Biomedical Science* 1999; 56: 270- 279.
- 6- Leon OS, Menendez S, Merino N (1998): Ozone oxidative preconditioning: a protection against cellular damage by free radicals. *Mediat Inflamm* 1998; 7: 289- 294.
- 7- Barber Menendez S, Leon OS (1999): Prevention of renal injury after induction of ozone tolerance in rats submitted to warm ischemia. *Mediat Inflamm* 1999; 8: 37- 42.
- 8- Peralta C, Leon OS, Xaus C (1999): Protective effect of ozone treatment on the injury associated with hepatic ischemia-reperfusion: antioxidant-prooxidation balance. *Free Radic Res* 1999; 31: 191- 196.
- 9- Peralta C, Xaus C, Bartrons R (2000): Effect of ozone treatment on reactive oxygen species and adenosine production during hepatic ischemia-perfusion. *Free Radic Res* 2000; 33: 595- 605.
- 10- Martinez-Sanchez G, Al-Dalain SM, Menendez S, et al (2005): Therapeutic efficacy of ozone in patients with diabetic foot. *Eur J Pharmacology* 2005; 523: 151- 161.
- 11- Fathi AM, Mawsouf MN: Adjuvant HBO and ozone in diabetic foot and badly healing wounds. In proceedings European Cooperation of Medical Ozone Societies Congress, Baden Baden, Germany, November 2008.
- 12- Jain KK (ed). HBO Therapy in wound healing, plastic surgery, and dermatology. In: *Textbook of Hyperbaric Medicine*. Hogrefe & Huber Germany. 2004: 147- 166.
- 13- Renate Viebahn-Hänsler (ed.): *The use of ozone in medicine*. 5th English edition, Karl F. Hanser Publishers, Heidelberg, Germany, 2007: 44, 60.
- 14- Gordillo GM, Sen CK. Revisiting the essential role of oxygen in wound healing. *The American Journal of Surgery* 2003; 186: 259- 263
- 15- Mathieu D, Linke JC, Wattel F. Non-Healing wounds. In: Mathieu D (ed): *Handbook on Hyperbaric Medicine*. Springer, The Netherlands. 2006: 400- 427.
- 16- Ciaravino ME, Friedell ML, Kammerlocher TC. Is Hyperbaric Oxygen a Useful Adjunct in the Management of Problem Lower Extremity Wounds?. *Annals of Vascular Surgery* 1996; 10: 558-562.
- 17- Perrins JD., Barr PO. Hyperbaric oxygenation and wound healing. In Schmutz J. (ed). *Proceedings of the 1st Swiss symposium on HBO*. Foundation for Hyperbaric Medicine, Basel. 1986 : 119-132.
- 18- Fischer BH. Treatment of ulcers on the legs with hyperbaric oxygen. *J Dermatol Surg*. 1975 ; 1 : 55-58.
- 19- Hammerlund C., Sundberg T. Hyperbaric oxygen reduced size of chronic leg ulcers: a randomized double-blind study. *Plast Reconstr Surg*. 1994 ; 93 : 829-833.
- 20- A. Abidia, G. Laden, G. Kuhan, et al. The Role of Hyperbaric Oxygen Therapy in Ischaemic Diabetic Lower Extremity Ulcers: a Double-blind Randomised-controlled Trial. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2003; 25: 513-518.
- 21- Roth RN and Weiss LD. Hyperbaric oxygen and wound healing. *Clinics in Dermatology* 1994; 12: 141-156.

# OZONOTERAPIA EN EL TRATAMIENTO COMPLEMENTARIO DEL CÁNCER

## Revisión temática para Revista Electrónica Aepromo

### Dr. Froylán Alvarado Güémez

Presidente de la Asociación Mexicana de Ozonoterapia A.C.

Director Médico de Ozonoterapia México S.A. de C.V.

Profesor Titular del Programa de Entrenamiento en Ozonoterapia. Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Sinaloa. México.

### Con la colaboración de:

#### 1) Dra. Vivian Borroto Rodríguez

Especialista en Medicina Familiar

Máster en Medicina Bioenergética y Natural

#### 2) Luisa B. Lima Hernández\*

Lic. Bioquímico

Especialista en Nutrición Humana

Máster en Medicina Bioenergética y Natural

Investigadora Titular y Profesora

\*Centro Nacional de Medicina Natural y Tradicional, Ciudad de la Habana, Cuba.

8/05/2010

## INTRODUCCIÓN

**Cáncer** es un término muy amplio que abarca más de 200 tipos de tumores malignos. Cada uno de ellos posee unas características particulares, que en algunos casos son completamente diferentes al resto de los otros cánceres, pudiendo considerarse enfermedades independientes, con sus causas, su evolución y su tratamiento específico<sup>1</sup>.

La palabra cáncer deriva del latín, y como la derivada del griego karkinos, significa 'cangrejo'. Se dice que las formas corrientes de cáncer avanzado adoptan una forma abigarrada, con ramificaciones, que se adhiere a todo lo que agarra, con la obstinación y forma similar a la de un cangrejo marino, y de ahí deriva su nombre.<sup>1</sup>

## CLASIFICACIÓN DE TUMORES MALIGNOS O CÁNCER<sup>1</sup>

- Los cánceres que derivan de los tejidos mesenquimatosos o mesodermo se denominan sarcomas (del griego sarcos, "carnoso"); por ejemplo: fibrosarcoma, mixosarcoma, liposarcoma, condrosarcoma, osteosarcoma, angiosarcoma, lifangiosarcoma, sinoviosarcoma, leiomiomasarcoma, rhabdomyosarcoma.
- Las neoplasias malignas de origen epitelial, derivadas de cualquiera de las tres capas germinales del embrión, se denominan carcinomas; por ejemplo: carcinoma epidermoide o escamoso, carcinoma basocelular, adenocarcinoma, cistoadenocarcinoma, coriocarcinoma, carcinoma de pene.
- Los tumores que proceden del tejido nervioso son

los gliomas (realmente no se trata de un tumor derivado de células nerviosas, sino de uno de los tipos celulares encargados de su sostén, las células gliales, el tejido "conectivo" del cerebro, por así decir).

- Los cánceres hematológicos son los linfomas y las leucemias, siempre malignos (derivados del tejido linfóide y el mielóide respectivamente).
- Los tumores malignos que no cumplen las reglas anteriores y acaban en -oma, son: el melanoma, el hepatoma, el seminoma. También están los mesoteliomas, que se originan en las membranas serosas (pleura, pericardio, peritoneo), y que pueden tener componente epitelial o mesenquimatoso.

## EPIDEMIOLOGÍA

El cáncer es la segunda causa principal de muerte, detrás de las enfermedades cardíacas. Sin embargo, las muertes por enfermedades cardiovasculares están disminuyendo, mientras que las muertes por cáncer están aumentando. Se estima que a lo largo del siglo XXI, el cáncer será la principal causa de muerte en los países desarrollados.<sup>1</sup>

El cáncer es una condición común y es un problema grave de salud. Se estima que 7,6 millones de personas en el mundo murieron de cáncer en 2007. Una de cada cuatro personas muere de cáncer. Puede afectar a personas de todas las edades, incluso los fetos, pero el riesgo para la mayoría de las variedades aumenta con la edad. El cáncer causa cerca del 13% del total de defunciones. Según la Sociedad Americana del Cáncer, 7,6 millones de personas

murieron de cáncer en el mundo durante 2007.<sup>1,2</sup>

La evolución de cada cáncer está sujeta a múltiples factores que van a interactuar entre sí. Estos factores varían dependiendo tanto del tumor como del paciente. Entre estos últimos destacan factores hereditarios, obesidad y sedentarismo.<sup>1,2</sup>

### CARCINOGENESIS<sup>3</sup>

Es un proceso que se desarrolla durante largos años desencadenado por sustancias responsables de producir esta transformación denominados **agentes carcinógenos**.

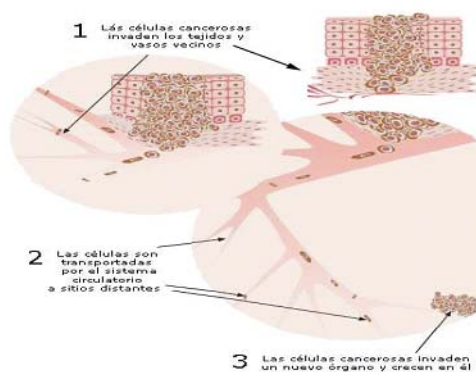
Básicamente el proceso consta de 3 estadios: Iniciación, Promoción y Progresión.

**1. Iniciación:** ocurren mutaciones del ADN, que inician el proceso, pero insuficientes para producir un cáncer. Solamente existen cambios reversibles a nivel molecular, permaneciendo los tejidos normales.

**2. Promoción:** Si sobre las células iniciadas actúan de nuevo y de forma repetida, los agentes carcinógenos, la multiplicación celular comienza a ser más rápida y la probabilidad de que se produzcan nuevas mutaciones aumenta. A esto se le llama **fase de promoción** y las células involucradas en esta fase se denominan **células promocionadas**. Actualmente conocemos muchos factores que actúan sobre esta fase, como el tabaco, la alimentación inadecuada, el alcohol, sustancias tóxicas, entre otros.

Las células iniciadas y promocionadas sufren nuevas mutaciones. Cada vez se hacen más anómalas en su crecimiento y comportamiento. Adquieren la capacidad de invasión, tanto a nivel local infiltrando los tejidos de alrededor, como a distancia, originando las metástasis.

**3. Progresión:** En esta fase, las células iniciadas y promocionadas sufren nuevas mutaciones. Cada vez se hacen más anómalas en su crecimiento y comportamiento. Adquieren la capacidad de invasión, tanto a nivel local infiltrando los tejidos de alrededor, como a distancia, originando las metástasis.



Para que se produzca un cáncer es necesario que de forma acumulativa y continuada se produzcan alteraciones celulares durante un largo periodo de tiempo, generalmente años.

Como resultado las células están aumentadas en su número, presentan alteraciones de forma, tamaño y función y poseen la capacidad de invadir otras partes del organismo.

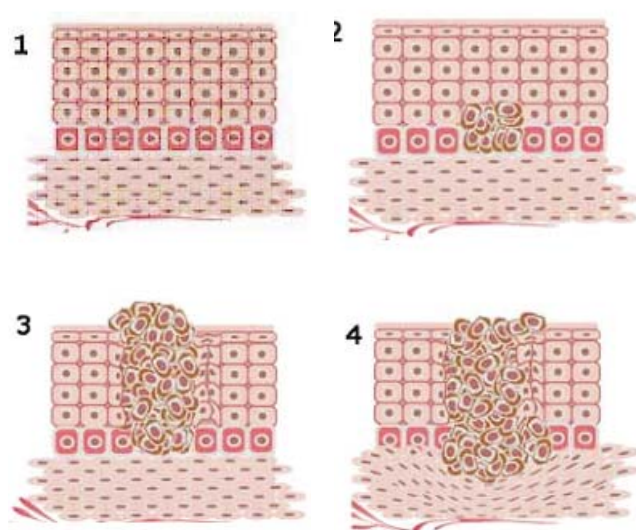
### AGENTES CANCERÍGENOS

La carcinogénesis consiste en la transformación de las células normales en células malignas. Un carcinógeno es una sustancia que puede producir alteraciones en la estructura y función de una célula que den lugar a un cáncer.

La potencia y la dosis del carcinógeno desempeñan un papel importante en el desarrollo de la neoplasia maligna. Aunque la controversia es grande, la mayoría de los autores coinciden en que la carcinogénesis es un proceso complejo que afecta a muchos estadios provisionales a medida que la célula va sufriendo la transformación. Los factores ambientales y la forma de vida pueden estar relacionados con la mayoría de las neoplasias malignas. Además, hay otros muchos factores del huésped que afectan a la sensibilidad que tienen la célula hacia los cambios carcinogénicos.<sup>3,4</sup>

Entre los carcinógenos más conocidos destacan; humo del cigarro, amianto, estrógenos, grasa alimentaria, bebidas alcohólicas, ingesta calórica desequilibrada y agentes ambientales como hidrocarburos halogenados y asbestos.<sup>4</sup>

Otras causas conocidas de cáncer son la exposición a radiaciones, enfermedades infecciosas entre las que destacan infecciones bacterianas como en el caso del helicobacter pilori y más comúnmente diversas enfermedades virales asociadas con el Virus de Epstein Barr (EVB), el virus de las hepatitis B y C (HBV y HCV), el herpes-virus humano 8 HHV8, el virus del papiloma humano (HPV), el virus simiano 40 (SV 40) y el virus humano T linfotrópico (HTLV-1).<sup>4</sup>



## ONCOGENES Y CÁNCER<sup>4</sup>

El cáncer es conocido por afectar a dos genes conocidos como:

- Oncogén
- Gen supresor tumoral

El oncogén se encarga de alentar el crecimiento celular. El cáncer parece ser la causa de que el oncogén entre en 'suspensión' de modo que las células crecen y se multiplican a un ritmo más rápido. El cáncer también desactiva el gen supresor tumoral. Este gen está diseñado para regular el crecimiento celular y asegura que las células se reproduzcan sólo cuando es necesario.

La combinación del oncogén hiperactivo, y el gen supresor de tumores desactivado significan que el cáncer puede crecer rápidamente y extenderse a otras partes del cuerpo, generalmente a través del sistema linfático.

## ESTRÉS OXIDATIVO Y CÁNCER

Se define estrés oxidativo como el desbalance entre la producción de Especies Reactivas de Oxígeno superando la capacidad antioxidante celular, provocando daño oxidativo, relacionado directamente tanto agudo como crónico, incluyendo incremento en la proliferación celular. Este estímulo puede resultar en la formación de células preneoplásicas y/o, daño irreparable al ácido desoxirribonucleico (ADN), mutaciones y neoformaciones celulares con expansión clonal.<sup>5</sup>

El cáncer es un fenómeno de etapas y funciones múltiples, en el cual se han delineado 3 estados para el desarrollo de la patología, que son inicio, promoción y progresión, y en todas ellas los radicales libres y Especies Reactivas del Oxígeno juegan un papel muy importante.<sup>6</sup>

### Inicio del proceso neoplásico

Actualmente es bien conocido que la evolución celular a la neoplasia comprende la alteración secuencial de oncogenes y/o genes supresores de tumores, cuyos productos proteínicos participan críticamente en las vías de transducción de señales y en la regulación de la expresión génica, sobre todo de las proteínas encargadas del mantenimiento celular, reparación del ADN y regulación de la apoptosis, entre otras.

Una de las consecuencias del daño oxidativo a los nucleótidos es la generación de una mutación o bien, la alteración en la expresión de un gen; por esta razón, la célula tiene sistemas que le permiten por un lado prevenir que el daño ocurra, y por otro, una reparación rápida y eficaz. Sin embargo, una frecuencia elevada en el daño oxidativo de los nucleótidos libres o en el ADN hace que los sistemas de protección fallen.<sup>6</sup>

Estos daños ocasionan mutaciones, y estas activan los oncogenes, y producen la inactivación de genes supresores de tumores, y en consecuencia, el inicio de la neoplasia o el tumor. La etapa de inicio es resultado tanto de una lesión persistente en el ADN como de una remoción deficiente de estas lesiones por los sistemas de reparación,

antes del inicio de la síntesis del material genético en la etapa S (síntesis) del ciclo celular, lo que genera la introducción de las alteraciones mutagénicas en el ADN de las células recién generadas. Así, el proceso carcinógeno surge de la omisión en la reparación de las bases dañadas o como consecuencia de una serie de eventos genéticos de eliminaciones o translocaciones asociadas con rupturas de cadenas del material genético que no fueron reparadas. Las translocaciones están asociadas al inicio de varias neoplasias en humanos a través de la activación de oncogenes. Uno de los ejemplos más estudiados es el linfoma de Burkitt, donde el oncogén *myc* es activado por una translocación entre el cromosoma 2 y 8. Otros ejemplos de oncogenes asociados al inicio de neoplasias por translocación o eliminación son *N-ras*, *Ha-ras*, *myb*, *sis*, *abl*, implicados en patologías como neuroblastoma, cáncer mamario y varios tipos de leucemias.<sup>6</sup>

Las especies altamente reactivas como el radical hidroxilo ( $\cdot\text{OH}$ ), causan oxidación en el ADN, mientras que el Peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ) causan tanto oxidación como nitración de las bases nitrogenadas. La vida media del radical hidroxilo ( $\cdot\text{OH}$ ) es muy corta, por lo que todavía es un enigma el mecanismo exacto por el cual este radical llega hasta el ADN. Necesariamente tendría que generarse cerca del ácido nucleico para lograr oxidarlo, mientras que el Peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ) difunde con facilidad en las membranas, por lo que resulta más comprensible su efecto sobre las bases nitrogenadas, esto aunado a que es una de las principales especies reactivas generadas en procesos inflamatorios.

Uno de los principales estudios que demostraron que los radicales libres dañan al ADN proviene de la observación de que el peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), en presencia de sulfato de hierro, induce fragmentación de los cromosomas, desde entonces se ha estudiado la interacción de los radicales libres no sólo con el ADN, sino también con las proteínas, los lípidos y el ácido ribonucleico (ARN), entre otras biomoléculas. Básicamente, la modificación oxidativa de estas moléculas genera la desregulación de la homeostasis celular, lo que deriva en carcinogénesis; de hecho, la presencia de aductos del ADN como la 8-dehidro-2'-desoxiguanosina (8OHdG), están considerados como biomarcadores de daño oxidativo y de carcinogénesis debido a su alta mutagenicidad en células humanas. Se han reportado modificaciones oxidativas en prácticamente todos los nucleótidos, tanto polimerizados en ácidos nucleicos, como en sus formas monoméricas libres. Se ha visto que la transversión GC TA se relaciona con la presencia de 8-dehidro-2'-desoxiguanosina (8OHdG) en la presencia de oncogenes como *ras* y en genes supresores de tumores como *p53* tanto en cáncer hepático como de pulmón. Algunos autores han propuesto que la simple presencia de 8OHdG en el ADN es suficiente para propiciar la formación de tumores.<sup>6</sup>

### Promoción de tumores<sup>6</sup>

Una vez que se ha iniciado la modificación oxidativa del ADN, los radicales libres toman mayor relevancia,

como moduladores de la promoción de los tumores.

Básicamente la promoción consiste en la activación de las vías de señalización que controlan la proliferación, ciclo celular, apoptosis o la síntesis de proteínas de protección, como las proteínas antioxidantes, o las proteínas de choque térmico. Varios agentes promotores de tumores regulan estas vías, entre ellos están las especies reactivas de oxígeno, como los productos de la lipoperoxidación como el malondialdehído (MDA) o el 4-hidroxinonenal (4-HNE), entre otros metabolitos.

El mecanismo molecular por el cual los radicales libres inducen la promoción de tumores no se conoce con exactitud. Se han postulados mecanismos tanto genéticos, como epigenéticos. La inducción de un estado celular prooxidante permite la expresión alterada de genes o la deficiente actividad de varias proteínas de señalización debido a una modificación oxidativa en sus grupos sulfhidrilos, los cuales se ubican principalmente en los centros catalíticos, todo esto conduce a un fenotipo celular alterado.

Como ejemplo de lo anterior, se puede mencionar a la proteína c cinasa (PKC), la cual media la activación de varias vías involucradas en la proliferación, diferenciación y transformación oncogénica. La proteína c cinasa (PKC) puede ser regulada por la oxidación directa de las cisteínas en su centro catalítico; de hecho, este efecto ocasiona que la cinasa sea activada sin el requerimiento fisiológico de calcio ( $Ca^{2+}$ ), o de fosfolípidos. Por otro lado, se ha reportado que el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) induce la redistribución de proteína c cinasa (PKC), lo que modifica sustancialmente su función normal. Otras proteínas que reciben modificación directa de las especies reactivas de oxígeno y que influyen en la progresión de tumores son *c-jun* y *c-fos*, ambas componentes del factor de transcripción AP-1, el cual regula la expresión de genes relacionados en la proliferación celular. De hecho, el AP-1 ha sido considerado como uno de los factores de transcripción seriamente modificados en varios tipos de cáncer.

Otro factor de transcripción regulado por las especies reactivas de oxígeno y con gran repercusión en el cáncer es el factor nuclear KB (NF- KB), el cual regula la expresión de varias proteínas involucradas en las vías de supervivencia y muerte. Se ha observado en varios tipos de cáncer una actividad incrementada del factor nuclear KB (NF- KB), generando un aumento de la síntesis de proteínas anti-apoptóticas, como son Bcl-2 y FLIP, entre otras. Es bien sabido que la activación de este factor de transcripción es el responsable de la resistencia a terapias anticáncer en varios tipos de tumores, lo que ha puesto al NF-KB como uno de los principales blancos para el control molecular del cáncer.

En gran medida, la promoción y progresión de tumores por las especies reactivas de oxígeno depende de la activación de los sistemas endógenos de generación de estas especies reactivas, como la NADPH oxidasa, óxido nítrico sintetasa inducible (iNOS), Xantina oxidasa, y la cadena respiratoria mitocondrial. Existe suficiente evidencia experimental de la participación de estas enzimas en los

procesos cancerígenos.

La mayoría de los sistemas enzimáticos productores de radicales libres están regulados por las vías de señalización que los activan o los inhiben según los requerimientos fisiológicos.

Por otra parte, la iNOS produce cantidades micromolares de óxido nítrico ( $NO \cdot$ ) y se ha demostrado que es una enzima involucrada también en procesos carcinógenos mediados por inflamación crónica. En la actualidad existe cierta controversia sobre el papel que juega el óxido nítrico ( $NO \cdot$ ) en los procesos carcinógenos, esto debido a que los efectos del óxido nítrico ( $NO \cdot$ ) dependen de su concentración, de la interacción con otros radicales libres, metales y proteínas, así como del tipo celular, y de los blancos genéticos que suele afectar. Si bien para muchos investigadores está claro el papel del  $NO \cdot$  en procesos angiogénicos, los cuales son fundamentales para la progresión de tumores, este radical libre también puede dañar directamente al ADN por un lado, y al mismo tiempo presentar protección contra citotoxicidad, inhibir o promover la proliferación celular, y puede ser proapoptótico o antiapoptótico. Esto hace que los resultados experimentales de la función del  $NO \cdot$  en carcinógenos se evalúen con extremo cuidado debido a la ambigüedad de las funciones que despliega.

Aún así la evidencia experimental obtenida en ratones deficientes de óxido nítrico sintetasa inducible (iNOS) muestra una clara correlación positiva en la promoción y progresión de tumores. Estos ratones presentaron mayor resistencia al daño en colon inducido por triclorobenceno y una menor letalidad, reduciendo la modificación postraduccional de proteínas como la formación de nitrotirosinas, así como la formación de malonaldehído (MDA) y otros productos de la lipoperoxidación. Al someter a estos ratones animales a una dieta con dextran sulfato de sodio, lo cual genera inflamación en colon y cáncer, se encontró que mostraron menos signos y síntomas de colitis comparados con el grupo control. Por otro lado la inoculación con células de melanoma B16-F1 desarrolló menos tumores que el grupo control, lo que dejó claro la participación de óxido nítrico sintetasa inducible (iNOS) en la progresión de tumores.

Además de los sistemas antes mencionados existen otras vías endógenas que también pueden generar especies reactivas de oxígeno. El sistema de las ciclooxigenasa (COX) está formado por 3 enzimas que catalizan la transformación del ácido Araquidónico en prostaglandina  $H_2$ , la cual es al mismo tiempo la molécula precursora de otras prostaglandinas, lo que pone a las COX como enzimas fundamentales en los procesos inflamatorios, sobre todo la isoforma inducible COX-2.

### Progresión de tumores

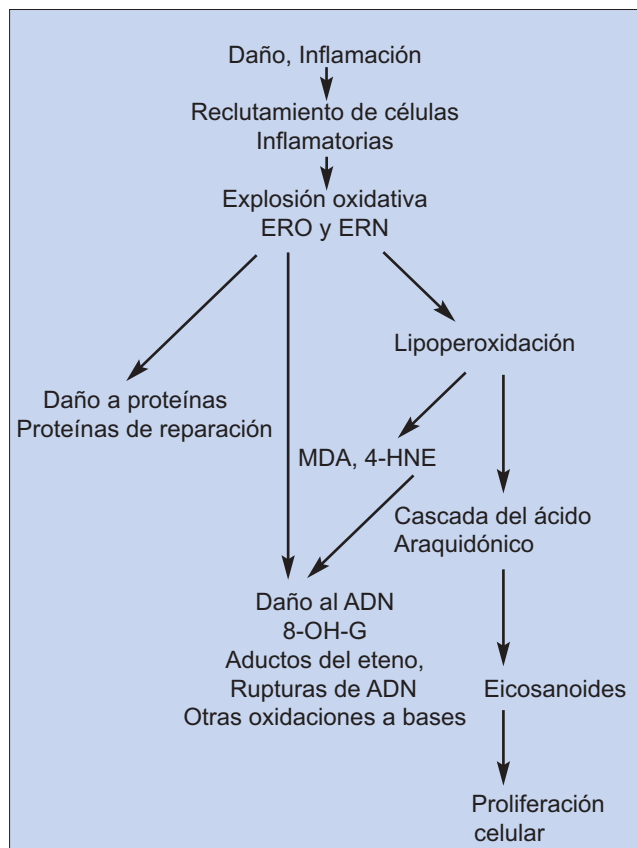
Durante el evento de progresión siguen presentes varios de los eventos que se presentaron en la etapa de promoción, pero de manera exacerbada. Las especies reactivas de oxígeno ahora tienen un efecto a nivel del genoma, induciendo el rearreglo de los oncogenes que

fueron inicialmente mutados, lo que permite la progresión del tumor. Se ha observado que el tratamiento con antioxidantes como glutatión (GSH) o disulfiram inhiben la progresión maligna de papilomas a carcinoma escamoso invasivo, en modelos murinos de cáncer de piel. Por otro lado, el tratamiento con un inhibidor de la síntesis de glutatión (GSH) como el dietilmalato, incrementa significativamente la progresión del tumor, lo que deja claro la participación de los radicales libres en la progresión de tumores.<sup>6</sup>

**Inflamación, radicales libres y carcinogénesis<sup>6</sup>**

El daño crónico generado tanto por agentes infecciosos como por bacterias o virus, así como por irritaciones, inicia una respuesta inflamatoria caracterizada por la infiltración a la zona de daño de células inmunológicas. Una medida de defensa para eliminar al agente agresor y a las células dañadas es la **explosión oxidativa** en la que dichas células generan radicales libre de oxígeno y nitrógeno. Sin embargo, el efecto no es totalmente focalizado, y sus secuelas van más allá de la zona afectada, ocasionando daño en las células epiteliales y del estroma de la vecindad.

Una vez iniciado el fenómeno de estrés oxidativo, el daño molecular es inminente, presentándose prácticamente todas las moléculas como en ADN, proteínas y lípidos, los cuales de una u otra forma influyen en el proceso carcinógeno, como se ilustra en el siguiente esquema:



Esquema 1. Mecanismos de daño molecular en procesos de inicio de tumores en inflamación crónica. MDA, malonaldehído; 4 HNE, 4 hidroxinonenal

Se ha comprobado que la sobrecarga oxidativa en diversas patologías es la causa principal de la generación de tumores malignos, como por ejemplo se pueden mencionar la hemocromatosis, la hepatitis viral B y C en hígado, enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa en colon, infección por virus de papiloma humano en cérvix, y la infección por helicobacter pylori en el estomago por sólo citar algunas (cuadro 1). Se ha demostrado que la inflamación crónica contribuye en 25% en los casos totales de cáncer.

Cuadro 1. Cánceres atribuidos a infecciones

| Agente infeccioso                 | Cáncer   |
|-----------------------------------|--|
| Virus del Papiloma Humano         | Cervicouterino   |
| Virus de hepatitis B o C          | Hepático   |
| Virus de Epstein Barr             | Linfoma de Burkitt, enf. de Hodgkin, cáncer nasofaríngeo |
| Virus de inmunodeficiencia humana | Sarcoma de Kaposi  |
| Virus del herpes                  | Sarcoma de Kaposi  |
| Helicobacter pylori               | Carcinoma y linfoma gástrico                             |
| Schistosoma hematobium            | Cáncer de vejiga   |
| Scustosoma japonicum              | Cáncer de colon  |

El cáncer de colon puede ser un buen ejemplo de la carcinogénesis inducida por inflamación crónica. Este cáncer es 30 veces más frecuente que el cáncer de intestino delgado debido a que, en contraste con este último el colon presenta por un lado niveles muy elevados de bacterias fecales y por otro una infiltración de células inmunológicas ocasionada por las primeras.

La actividad respiratoria de las bacterias es una fuente muy importante de peróxidos y radical superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) que en presencia de hierro genera radical hidroxilo (·OH), esto se agrava si se toma en cuenta que el hierro derivado de la dieta no se absorbe del todo y se concentra en las heces fecales en niveles 10 veces superiores que en la mayor parte de los tejidos. Los pigmentos biliares como la bilirrubina y la Biliverdina, pueden unir el hierro en una forma que es capaz de dirigir la reacción de Fenton.

El cáncer de colon puede ser un buen ejemplo de la carcinogénesis inducida por inflamación crónica. Este cáncer es 30 veces más frecuente que el cáncer de intestino delgado debido a que, en contraste con este último el colon presenta por un lado niveles muy elevados de bacterias fecales y por otro una infiltración de células inmunológicas ocasionada por las primeras.

La actividad respiratoria de las bacterias es una fuente muy importante de peróxidos y radical superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) que en presencia de hierro genera radical hidroxilo (·OH), esto se agrava si se toma en cuenta que el hierro derivado de la dieta no se absorbe del todo y se concentra en las heces fecales en niveles 10 veces superiores que en la

mayor parte de los tejidos. Los pigmentos biliares como la bilirrubina y la Biliverdina, pueden unir el hierro en una forma que es capaz de dirigir la reacción de Fenton.

### **P53 Y LAS PROTEÍNAS SUPRESORAS DE TUMORES**

Varias de las proteínas que controlan la apoptosis, también regulan el ciclo celular. Una de ellas es la p53. Su sobreexpresión conduce a la célula a entrar en apoptosis, lo que explica que en los procesos tumorales la actividad de p53 está prácticamente inhibida. Esto permite a las células transformadas tener mayor resistencia a la apoptosis y en consecuencia, ser invulnerables a las terapias anticáncer que justamente elimina a las células malignas por medio de la apoptosis. La proteína p53 es un factor de transcripción que regula la expresión de varios genes cuyos productos resultantes se encargan del mantenimiento de la integridad del genoma. Como es sabido, la translocación de p53 al núcleo es fundamental para la expresión de los genes que controla.<sup>6</sup>

En estudios *in vitro* se ha observado que p53 se transloca al núcleo tras un tratamiento con radiaciones UV en tiempos cortos (1 a 2 h), abandonando el núcleo para localizarse una vez más en él a las 12 h. El pretratamiento con antioxidantes bloquea la localización nuclear temprana, lo cual sugiere fuertemente que p53 es requerido bajo condiciones de estrés oxidativo para una eventual reparación del ADN tras el daño por radicales libres. Por otro lado, estos estudios mostraron que el tratamiento con agentes carcinógenos que no generan estrés oxidativo no indujeron la translocación nuclear temprana de p53, sino hasta 12 horas después del tratamiento.<sup>6</sup>

Como se mencionó antes, los radicales libres pueden modificar postraduccionalmente la actividad de p53, pero también se ha reportado que el gen que codifica para p53 es un blanco común de mutaciones inducidas por radicales libres, lo que conduce a una deficiente o nula producción de la proteína.<sup>6</sup>

En estudios recientes se ha corroborado la participación de la COX en la carcinogénesis, por ejemplo, la inhibición de la COX-2 suprimió la poliposis intestinal, que permite el desarrollo de cáncer de colon<sup>7</sup>. Otro estudio llevado a cabo, en ratones genéticamente modificados deficientes de COX-1 y COX-2 mostró una reducción en la diferenciación epidérmica y en la promoción de tumores de piel.<sup>8</sup>

### **CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICAS DE LAS CÉLULAS CANCEROSAS<sup>9</sup>**

Las células cancerosas para sobrevivir requieren forzosamente cambiar sus características bioquímicas, entre las que destacan:

- 1) Disminución de la enzima superóxido dismutasa manganeso dependiente (Mn-SOD), dejando a la superóxido Dismutasa, cobre zinc dependiente (Cu-Zn SOD) como el único agente destructor del anión superóxido(O<sub>2</sub>·)

- 2) Tiene niveles de catalasa y SOD muy reducidos
- 3) Forman cantidades elevadas de anión superóxido (O<sub>2</sub>·)
- 4) Inactivación de la enzima Cu-Zn SOD remanente
- 5) La acumulación de grandes cantidades de O<sub>2</sub>· incrementa la inhibición de la Catalasa, que podría depletarse, aumentando los niveles de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>
- 6) Elevados niveles de oxidación del ADN con elevación de la 8.OHdG
- 7) Alta tasa de lipoperoxidación (evidenciada por elevación del 4 hidroxí nonenal (4HNE))
- 8) Ruptura de ADN
- 9) Inhibición de la apoptosis

### **MECANISMOS FISIOPATOLÓGICOS INVOLUCRADOS EN EL CÁNCER**

La desdiferenciación de células normales hacia el cáncer ocurre cuando experimentan privación del 60% ó más del oxígeno, durante un extenso periodo de tiempo. Para sobrevivir cambian su patrón metabólico energético de la vía aeróbica por la fermentación anaeróbica de la glucosa, obteniendo 20 veces menos energía en forma de ATP (150kJ contra 2,870 kJ).<sup>10, 11, 12</sup>

La fermentación de la glucosa deja como residuos finales CO<sub>2</sub> y ácido láctico, generando un área de acidez importante. Macrófagos y células T interpretan la señal de acidez como daño puntual que requiere ser reparado. Se liberan entonces factores de crecimiento que estimulan las células a replicarse.<sup>13</sup> A mayor cantidad de células cancerosas, mayor acidez, más factores de crecimiento, más células cancerosas, en un círculo vicioso que llevará hasta la muerte.

### **PAPEL DE LA HIPOXIA EN EL CÁNCER**

El factor inducible por hipoxia (hipoxia inducible factor) [HIF] es un factor de transcripción que regula la respuesta celular a la hipoxia y actúa como regulador de la homeostasis del oxígeno<sup>14-15</sup>. La identificación del sistema de transcripción HIF por Wang y Semenza es crucial para entender la fisiología del O<sub>2</sub>; sabemos actualmente que el HIF y la hipoxia son los mayores determinantes en la angiogénesis y que, por ejemplo, regulan los procesos de invasión y metastización determinantes de la agresividad tumoral.<sup>16</sup> Este factor de transcripción activa genes que codifican las proteínas que aumentan la disponibilidad del oxígeno y permiten la adaptación metabólica en ausencia del mismo, controlando la expresión de decenas de productos implicados en la angiogénesis, la eritropoyesis, la glucólisis, la invasión, la apoptosis, el tono vascular, la regulación del pH, la homeostasis epitelial y la resistencia a los fármacos.

El gen HIF 1A que codifica el HIF-1α es un heterodímero compuesto por cadenas alfa (reguladas por el O<sub>2</sub>) y beta dispuestas en doble hélice. Pertenece a una familia de factores de transcripción que consta de 3 sub-

unidades alfa (HIF-1 $\alpha$ , HIF-2 $\alpha$ , HIF-3 $\alpha$ )

Además, estas adaptaciones a la hipoxia vuelven a los tumores más difíciles de tratar y con mayor resistencia a las terapias. Una parte importante de este proceso consiste en la adaptación de los productos de los genes en respuesta a la hipoxia y muchos de estos genes reguladores de hipoxia son mediados por el HIF1A; se estima que alrededor del 1% del genoma es regulado por la hipoxia.<sup>16,17</sup>

La hipoxia tumoral por sí sola es un importante factor epigenético de la regulación de la proteína HIF-1 $\alpha$ . Además de inhibir al HIF-1 $\alpha$ , la hipoxia genera radicales libres de oxígeno, que son capaces de estabilizar la proteína HIF-1 $\alpha$  y de inducir los genes *HIF* (factor inducible por hipoxia) y *VEGF* (factor de crecimiento vascular endotelial).<sup>17,18</sup>

Cuando se establece la hipoxia, hay una respuesta celular para evitar la apoptosis y se activa el factor de transcripción HIF-1 $\alpha$ , que genera un heterodímero con el HIF-1 $\beta$  (ARNT) en el elemento de la respuesta a la hipoxia (HRE), lo que lleva a una respuesta celular múltiple con activación de los oncogenes, aumento de la vascularización con producción de factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF), aumento del transporte de glucosa (GLUT1) y de la actividad de la anhidrasa carbónica (CA9) y aún a la inducción de varios genes apoptóticos. Se sabe que el HIF actúa sobre los genes codificadores de la eritropoyetina, transferrina, endotelina-1, óxido nítrico sintasa inducible (iNOS), hemooxigenasa 1, factor de crecimiento insulínico-2 (IGF-2), proteína de unión 1, 2 y 3, al factor de crecimiento insulínico (IGFBP 1, 2, 3), transportadores de glucosa (GLUT) y enzimas glucolíticas promoviendo la adaptación metabólica a la hipoxia, y es también regulado por la presión de O<sub>2</sub>, dependiendo de la expresión de la subunidad HIF-1 $\alpha$ . La capacidad de adaptación de la hipoxia por las células malignas es fundamental para el crecimiento tumoral.<sup>18</sup>

La hipoxia es uno de los factores microambientales claves promotores de la inestabilidad genética en los tumores, que distingue los cánceres humanos. Estudios recientes han demostrado que la hipoxia por sí misma puede llevar a condiciones que eleven la mutagenesis e inhiban los procesos de reparación del ADN.<sup>19,20</sup>

Se ha demostrado también que la hipoxia, algunos genes supresores tumorales, factores de crecimiento y citocinas aumentan la estabilidad y/o transactivación del HIF1A, lo que resulta en un incremento de la producción del HIF-1 $\alpha$  y, como consecuencia, la angiogénesis tumoral, la adaptación metabólica a la hipoxia y el aumento de la supervivencia celular, debido a su acción en varios genes diana.<sup>20</sup>

El HIF-1 $\alpha$  será crucial en la iniciación de la angiogénesis, en el crecimiento tumoral, la progresión y la metástasis. De esta forma, nos parece fundamental desarrollar técnicas para bloquear o inhibir la angiogénesis y el factor HIF1 $\alpha$ , reduciendo la posibilidad de desarrollar neoplasias más agresivas y, de este modo, reducir la morbilidad y mortalidad por cáncer.<sup>20</sup>

Es importante destacar que la fisiología de los tumores

sólidos difiere de la fisiología de los tejidos sanos en un sinnúmero de importantes aspectos, la mayoría de los cuales radica en la diferencia entre los 2 tipos de vasculaturas. Comparada con la vasculatura regular y ordenada de los tejidos normales, los vasos sanguíneos en los tumores son por lo general bastante anormales, los capilares están distendidos, con paredes filtrantes y flujo sanguíneo muy lento. El crecimiento tumoral requiere también del crecimiento continuo de nuevos vasos o angiogénesis. Esas diferencias fisiológicas pueden significar un problema para el tratamiento del cáncer; por ejemplo, la hipoxia en los tumores sólidos conduce a la resistencia a la radioterapia y a algunas drogas antineoplásicas.<sup>21</sup>

### PAPEL DE LA OZONOTERAPIA EN EL CÁNCER

El Ozono (O<sub>3</sub>) es una forma alotrópica del oxígeno con 3 átomos y 2 electrones desapareados, que tiene un poder oxidante mayor que el oxígeno. Las aplicaciones médicas requieren de medidas seguras que eviten exponer las vías aéreas a este gas por sus conocidos efectos tóxicos a este nivel. La autohemotransfusión o Autohemoterapia mayor, así como la insuflación rectal de ozono cumplen totalmente con este requerimiento. En concentraciones apropiadas, esta técnica conduce a un estrés oxidativo transitorio que puede estimular y regular los sistemas antioxidantes de la sangre.<sup>22</sup> Este mecanismo ha sido relacionado a la protección que la Ozonoterapia ejerce contra el daño por radicales libres del corazón y en la prevención de trastornos renales, hepáticos, así como de otras enfermedades.<sup>22-25</sup>

Dos procesos vitales que favorecen el desarrollo tumoral son la inducción de la angiogénesis y la inhibición de la apoptosis. Ambos presentan la característica común de ser dependientes de la generación de Especies Reactivas de Oxígeno (ERO). La angiogénesis o neovascularización es un proceso que se considera regulado por algunos factores de crecimiento como serían el factor de crecimiento endotelial (EGF); el factor transformante del crecimiento alfa (TGF $\alpha$ ); el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) y el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF). Estos factores angiogénicos son inducidos por varios tipos de estrés, entre ellos, el oxidativo.<sup>22</sup>

Las células tumorales producen ERO, incluyendo peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) y anión superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) que se ha demostrado están involucrados en el proceso de neovascularización tumoral, así como en la apoptosis, inducida esta última por translocación del p53 y activación de NF- $\kappa$ B y AP-1.

Las células cancerosas para poder crecer y tener espacio en el tejido secretan diversas enzimas con diversas funciones para su supervivencia, entre las que destacan:

1. Hialuronidasa: rompe las cadenas poliméricas del cemento intercelular con objeto de poder expandirse.
2. Colagenasa: disuelve fibrillas del colágeno intercelular.



3. Enzima angiogénica: favorece el crecimiento de vasos sanguíneos para aportar más sangre y azúcar al tumor para la fermentación anaeróbica.
4. Enzima telomerasa: asegura que durante la replicación los telómeros de las cadenas de ADN se mantengan intactos, permitiéndoles replicarse miles de veces.
5. También bloquean los sitios receptores de linfocitos T, provocando fallos en el sistema inmune.
6. El fallo del metabolismo del oxígeno conduce a una producción deficiente de enzimas antioxidantes, dando lugar al establecimiento de estrés oxidativo permanente en el tejido tumoral.

Algunos estudios preclínicos *in vitro* e *in vivo* evidencian la efectividad del ozono sobre células tumorales, mostrando una citotoxicidad selectiva sobre células tumorales y potenciador de la efectividad de la quimioterapia, como al emplear el 5-fluoracilo.<sup>23</sup>

Bernardino Clavo y colaboradores publicaron en el 2004 los resultados de un estudio, el cual fue realizado en pacientes con tumores avanzados de cabeza y cuello donde sugieren que la aplicación conjunta de Ozonoterapia con radioterapia pudiera tener algunos efectos benéficos, postulando que dichos efectos podrían ser debidos al incremento de la oxigenación en las regiones tumorales.<sup>26,27</sup>

A continuación se muestra un interesante estudio cubano que correlacionan efectos benéficos del ozono en paciente con cáncer.<sup>28</sup>

Se realizó un ensayo clínico en 70 pacientes con adenocarcinoma prostático en estadios A y B de la enfermedad (encapsulados), según la clasificación de Whitmore Jewet. Se dividió la muestra en 2 grupos. Grupo 1, cobalto más ozonoterapia (Co+O<sub>3</sub>), en el cual 35 pacientes recibieron ozono por vía rectal a una dosis de 10 mg (50 mg/L y 200 ml de gas), con una secuencia de 6 veces por semana, durante las 6 semanas que duró el tratamiento con cobalto. Grupo 2, también formado por 35 pacientes que recibieron exclusivamente cobalto (Co). Los resultados finales evidenciaron menor ocurrencia de reacciones adversas en el grupo con ozono, incrementándose el número de pacientes en este grupo que no interrumpió el tratamiento. En este mismo grupo se constató que no hubo complicaciones las primeras 2 semanas de tratamiento, las cuales aparecieron en las últimas 2 semanas, no interrumpiendo el mismo un 49% de los pacientes. En contraparte en el grupo de cobalto ya desde las primeras semanas aparecieron complicaciones y sólo el 14% de los pacientes no interrumpió el tratamiento, con diferencias significativas entre ambos grupos ( $p < 0,05$ ). La radiodermatitis fue la complicación que más estuvo presente. Se reportó que tuvieron una sobrevivencia de 10 años entre el 90 y 100% de los pacientes tratados con cobaltoterapia más ozono para el estadio A y entre un 50 y 60% para el estadio B.

Al final del tratamiento se encontró que las concen-

traciones de antígeno prostático (PSA), fueron menores o iguales a 10 ng/mL, en el 92% de los casos del grupo Co+O<sub>3</sub>, mientras que el que recibió Co, sólo fue un 52%, con diferencias significativas en ambos grupos. El número de pacientes que disminuyó el antígeno prostático (PSA) por debajo de 4ng/mL fue de 60% y 20% para el grupo Co+O<sub>3</sub>, y Co respectivamente, con diferencias significativas en ambos grupos. Se alcanzaron concentraciones de PSA superiores a 10 ng/mL (intervalo normal) entre 8.5 y 48.5% para los grupos Co+O<sub>3</sub> y Co respectivamente ( $p < 0,05$ ).

La evolución clínica de los pacientes a los 6 meses de terminado el tratamiento demostró que existía un control clínico de la enfermedad en ambos grupos ascendente en un 88 y 80% de los casos, en los grupos Co+O<sub>3</sub> y Co, respectivamente. Todo esto hace pensar que el tratamiento combinado de cobaltoterapia y ozono puede presentar una opción terapéutica para lograr un tratamiento con menor número de complicaciones, que libera a los enfermos de las secuelas (impotencia y aproximadamente el 10 al 15% presenta cierto grado de incontinencia urinaria) propias de la cirugía radical prostática.

Se ha postulado que la ozonoterapia sistémica aplicada, ya sea por Autohemoterapia mayor o mediante insuflación rectal, a concentraciones adecuadas produce ciertas cantidades de ERO y particularmente de peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) que actúa como molécula de señalización crucial para producir respuestas bioquímicas e inmunológicas.<sup>29</sup>

Este estímulo oxidativo mediado por el ozono conduce a un estrés oxidativo transitorio que finalmente induce a la regularización del sistema enzimático de defensas antioxidantes sin efectos adversos, estimulando el incremento de las enzimas antioxidantes celulares superóxido dismutasa (SOD), glutatión peroxidasa (GSH-Px) capaces de inhibir el estrés oxidativo crónico.<sup>30</sup>

Se han asimismo postulado varios mecanismos para explicar la mejoría del flujo sanguíneo y oxigenación mediados por ozonoterapia. Destacan la disociación de la curva de oxihemoglobina hacia la derecha, que conduce a una mayor liberación de oxígeno a los tejidos, secundario a una disminución del pH en los eritrocitos, con un aumento en la producción de 2,3 Difosfo Glicerato, una mejoría de flexibilidad de los eritrocitos que conduce a una reducción de la viscosidad sanguínea y reducción de la resistencia vascular por liberación de óxido nítrico y sustancias vasoactivas. Si además de lo anterior, las aplicaciones continuas de ozono durante varios meses son capaces de inducir nuevas generaciones de "eritrocitos superdotados" con incremento en el contenido de 2,3-DPG, de las enzimas antioxidantes, así como una elevación de la glucosa 6 fosfato deshidrogenasa (G6PD), esto puede posibilitar una profunda modificación de las actividades funcionales conduciendo a los tejidos tumorales de un estado hipóxico a normóxico. **Si esto pasa, cambiará dramáticamente el microambiente tumoral llevando a las células neoplásicas a un estado inactivo o muy vulnerable.**<sup>30</sup>

Sobre el sistema inmunológico el ozono actúa como

un moderado inductor de citoquinas debido a que la generación de peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) cruza libremente la membrana y activa en el citoplasma el NFkB que llevará a la transcripción de ácido ribonucleico mensajero (ARN m) de varias citoquinas. Debido a que la producción de varias interleucinas (ILs), factor de necrosis tumoral alfa (TNF $\alpha$ ) e interferones (INFs), es muy pequeña y transitoria, es probable que la inducción ocurra vía estimulación de una membrana lectina. De hecho, bajo las mismas condiciones experimentales, el uso de un mitógeno como fitohemaglutinina (PHA) que persistentemente activa una cascada de proteína cinasa, permite la síntesis de citoquinas en cantidades 1,000 veces mayores que cuando se administra ozono. De la misma manera, el índice de proliferación de células sanguíneas mononucleares (BMC) escasamente se incrementa después de exposición sanguínea al ozono.

Ha llevado años de investigaciones entender como trabaja el ozono, y como una pequeña activación de células sanguíneas mononucleares (BMC) puede resultar útil en pacientes inmunodeprimidos. Una vez que regresa a su microambiente esta célula activada puede estimular células vecinas, llevando poco a poco a la regulación del sistema inmune, de manera semejante a como se producen los "eritrocitos superdotados". Un aspecto interesante de resaltar es la posibilidad que durante la exposición de la sangre del paciente al ozono ex vivo, las células neoplásicas circulantes (de mama, próstata, estomago y colon) sean oxidadas y se transformen potencialmente en una vacuna.<sup>30</sup>

Es interesante hacer notar que es bastante común en la mayoría de los pacientes durante el tratamiento de ozonoterapia por hepatitis crónica o enfermedades vasculares, reporten una sensación placentera de euforia y bienestar. **Este efecto debe tomarse en cuenta, ya que la mayoría de los pacientes con cáncer están depletados de energía.** Bocci también refiere que no es difícil considerar que un cambio en el balance homeostático está ligado a una respuesta multi-orgánica que podría positivamente influenciar el estado fisiológico general del paciente y por lo tanto su respuesta inmune. El efecto placebo no se ha determinado aún, debido a que un pequeño incremento del cortisol puede mejorar el estado anímico del paciente y levantar y propiciar una respuesta psico-neuro-inmune cuyo significado no debe subestimarse.<sup>30</sup>

Muy importante también es subrayar que la reducción quirúrgica de la masa tumoral es esencial, ya que grandes masas tumorales o extensas metástasis perpetúan el estado anérgico y disminuyen las posibilidades de curación. Los tumores deben ser extirpados en su totalidad o ser removidos quirúrgicamente al máximo. Si hay metástasis presentes el asunto se vuelve más complejo. En estos casos se utiliza ampliamente quimioterapia cuyos resultados mixtos, aunado a que sus efectos secundarios deterioran de manera importante la calidad de vida de los pacientes. La ozonoterapia no es un procedimiento capaz de curar neoplasias, pero sí un medio para estabilizar su

progresión, particularmente en pacientes ancianos, quienes son muy susceptibles a los terribles efectos secundarios de la quimioterapia.

Las modificaciones moleculares e inmunológicas de eritrocitos y leucocitos, aunado a la adaptación al estrés oxidativo crónico nos hacen ver que la ozonoterapia puede modificar profundamente la bioquímica y funcionalidad de eritrocitos y leucocitos para formar un ambiente hostil al desarrollo de células cancerosas, haciendo notar que una mejoría de los parámetros inmunológicos no necesariamente es paralela a una respuesta clínica completa y a una sobrevida prolongada.<sup>30</sup>

Bocci en su último libro, *Ozone a New Medical Drug*<sup>31</sup> considera que las indicaciones más adecuadas de ozonoterapia en cáncer son las siguientes:

- a) En pacientes con enfermedad residual mínima después de una cirugía exitosa.
- b) En combinación, ya sea con quimioterapia o radioterapia en pacientes inoperables o ya tratados quirúrgicamente, ya que no está contraindicado y debido a que la mejoría de la oxigenación tisular puede potenciar tanto la quimioterapia como a la radioterapia.
- c) La Ozonoterapia además, puede reducir los efectos secundarios comunes de estos tratamientos oncológicos y conducir al paciente a una mejor tolerancia terapéutica y a mejores resultados.

Destaca también que pocas sesiones de tratamientos no son efectivas, ya que si se quiere cambiar radicalmente la población de eritrocitos, o inducir un "choque terapéutico", se debe programar un ciclo intensivo de tratamiento, de por lo menos seis meses, seguido de terapias de mantenimiento a muy largo plazo.

### Comentarios del autor

Hoy en día a pesar del rápido avance de la quimioterapia antineoplásica, con la aparición de nuevas y más efectivos fármacos con novedosos mecanismos de acción y posibilidades terapéuticas prometedoras, persisten múltiples mecanismos del huésped sin entender, que llevan a que los tumores malignos más comunes en los adultos sean resistentes a la mayoría de los agentes antineoplásicos disponibles, volviendo por tanto muy complejo el tratamiento de este grupo de enfermedades.

Por tanto se puede considerar que ante los pobres resultados clínicos que se obtienen con los tratamientos convencionales, sobre todo en pacientes mayores de 50 años, con cáncer en etapas avanzadas, aunado a los severos estragos que ocasionan los efectos secundarios de la quimio y radioterapia, que como bien sabemos conducen a un importante deterioro de la calidad de vida, consideramos que la estrategia terapéutica en la actualidad debe incluir enfoques multifactoriales modernos que refuercen al sistema inmunológico, cuya disfunción previa permitió la aparición de estas patologías y que al mismo

tiempo ataquen simultáneamente varias de las vías metabólicas que han sido modificadas en las células cancerosas sin lesionar las células normales.

Precisamente es a este nivel, que la Ozonoterapia puede ser de gran utilidad como un importante tratamiento complementario dado que sus propiedades biológicas y farmacológicas actúan precisamente mejorando la oxigenación en tejidos tumorales, el metabolismo celular, modula también el estrés oxidativo y la inmunosupresión que presentan, así como el desbalance hormonal. Todas estas modificaciones fisiológicas pueden conducir a los pacientes con cáncer no una curación de esta enfermedad tan compleja, pero sí a reducir la progresión de la enfermedad y en el mejor de los casos a inactivación de la misma mientras el paciente este bajo estos tratamientos de manera prolongada.

Mi experiencia clínica en Ozonoterapia data del año 2000 a la fecha. En estos años he atendido alrededor de 70 pacientes con diversos tipos de tumores cancerosos que acuden a mi consulta privada a sabiendas que no soy oncólogo, desesperados y solicitando ayuda por el deterioro producido por la enfermedad y por las complicaciones de los tratamientos oncológicos convencionales que están siguiendo. Aunque los resultados clínicos con el ozono se van dando poco a poco, según se va restableciendo el metabolismo del oxígeno, el sistema Redox y el sistema inmunológico, es muy gratificante profesionalmente constatar que la mayoría de los pacientes ven disminuir o desaparecer los molestos síntomas que los

aquejan como: náuseas, vómitos, evacuaciones diarreas, falta de energía, insomnio, neuroparesias y dolor, entre otros síntomas comunes en este tipo de pacientes, al tiempo que se restablecen las funciones digestivas, se revierte la caquexia, ganan peso y restablecen sus niveles de energía y sus patrones de sueño.

En pacientes con dolor severo por el proceso tumoral o sus metástasis, el dolor poco a poco se reduce considerablemente, por lo que se hace más fácil manejarlos farmacológicamente, mejoran su calidad de vida, permitiéndoles, en la mayoría de los casos, llevar una vida prácticamente normal y se alarga la sobrevida más allá de los pronósticos habituales.

Es importante también destacar que muchas veces los pacientes acuden buscando ayuda en etapas terminales y con un gran deterioro biológico. En estos casos la Ozonoterapia tiene muy poco que ofrecerles por el severo fallo multisistémico que presentan, lo mismo ocurre con enfermos y familiares impacientes que buscan en la Ozonoterapia un resultado mágico instantáneo, que no le exigen a la medicina oncológica convencional y abandonan el tratamiento antes de que puedan manifestarse sus efectos descritos.

Se puede concluir que la ozonoterapia puede ser una terapia coadyuvante de gran utilidad para el manejo de los pacientes con cáncer que debería ser correctamente evaluada por la oncología clásica en base a estudios científicos, casi imposibles de llevar a cabo por los médicos que a nivel privado ejercen la Ozonoterapia.

---

## BIBLIOGRAFÍA:

1. Cáncer. Wikipedia. La enciclopedia libre. <http://es.wikipedia.org/wiki/C%C3%A1ncer>\_ Actualizado: 14/5/2010. Consultado el 2/05/2010
2. Cáncer. <http://www.doctorweb.org/enfermedades-a-z/c/cancer> Actualizado: 29/5/2010 Consultado el 2/05/2010.
3. ¿Qué es el cáncer? Asociación Española Contra el Cáncer. <http://www.todocancer.com/ESP/Informacion+Cancer/El+cáncer/Que+es+el+cancer.htm> Actualizado: 10/3/2009. Consultado el 2/05/2010.
4. Iparraguirre Murrieta, IE y Jacinto Narvaez, JM. Cáncer. <http://www.monografias.com/trabajos65/cancer/cancer.shtml> Consultado el 2/05/2010.
5. Klaunig, JE, Xu Y, Isenberg JS, et al. The role of oxidative stress in chemical carcinogenesis. *Environmental Health Perspectives Supplements Volume 106, Number S1, February 1998.* <http://ehp.niehs.nih.gov/members/1998/Suppl-1/289-295klaunig/full.html> Consultado el 4 de mayo de 2010.
6. Konigsberg F.M., Radicales Libres y Estrés Oxidativo. Aplicaciones Médicas., Editorial .El Manual Moderno, México, 2008 p.347-357
7. Copeland ES: Free radicals in promotion-a chemical pathology study section workshop. *Cancer Res.* 1983; 43:5631-5637
8. Slaga TJ, Di Giovanni J, Wingberg LD et AL: Skin carcinogenesis: characteristics, mechanisms and prevention. *Prog Clin Biol Res* 1995; 391:1-20
9. Oberley T.D. Oxidative damage and cancer. *Am.J.of Pathol.* 2002; 160:403-408
10. Warburg O. On the origin of cancer cells. *Science* 24 February 1956:123;3191:309 – 314
11. Laguna J., Piña E. Bioquímica de Laguna. 6ª Edición., Editorial El Manual Moderno, México, 2007, p. 404
12. Maxwell PH, Pugh CW, Ratcliff PJ. Activation of the HIF pathway in cancer. *Curr Opin Genet Dev* 2001; 11(3):293-9
13. Jass JR, Talbot IC. Molecular and cellular biology of pre-malignancy in the gastrointestinal tract. *Baillieres Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2001;15(2);175-89
14. Semenza GL. HIF-1 and human disease: One highly involved factor. *Genes Dev.* 2000;14:1983-91.
15. Semenza GL. Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat Rev Cancer.* 2003;3:721-32.
16. Wang GL, Semenza GL. Purification and characterization of hypoxia-inducible factor 1. *J Biol Chem.* 1995;270:1230-7.
17. Kimbro KS, Simons JW. Hypoxia-inducible factor in human breast and prostate cancer. *Endocrine Related Cancer.* 2006;13:739-49.

18. Stroka DM, Burkhardt T, Desbaillets I, Wenger RH, Neil DA, Bauer C, et al. HIF-1 is expressed in normoxic tissue and displays an organ-specific regulation under systemic hypoxia. *FASEB J.* 2001; 15:2445-53
19. Keysar SB et al. Hypoxia/reoxygenation-induced mutations in mammalian cells detected by the flow cytometry mutation assay and characterized by mutant spectrum. *Radiat Res.* 2010 Jan;173(1):21-6.
20. Fraga A. et al. Hipoxia tumoral. Papel del factor inducible por hipoxia. *Actas Urol Esp V 33 n.9 Madrid oct. 2009.* [http://scielo.isciii.es/scielo.php?pid=S0210-48062009000900003&script=sci\\_arttext](http://scielo.isciii.es/scielo.php?pid=S0210-48062009000900003&script=sci_arttext) Consultado el 14/5/2010
21. Brown JM, Giaccia AJ. The unique physiology of solid tumors: opportunities (and problems) for cancer therapy. *Cancer Res.* 1998;58:1408-16.
22. Menéndez, S et al. Ozono. Aspectos Básicos y Aplicaciones Clínicas. Centro de Investigaciones del Ozono., Ciudad de la Habana, Cuba, Edit. CENIC 2008, p.141-206
23. Hernandez F, Menendez S, Wong R. Decrease of blood cholesterol and stimulation of antioxidative response in cardiopathy patients treated with endovenous ozone therapy. *Free Radic Biol Med* 1995;19:115-9.
24. Barber E, Menendez S, Leon OS, Barber MO, Merino N, Calunga JL. et al. Prevention of renal injury after induction of ozone tolerance in rats submitted to warm ischemia. *Mediators Inflamm* 1999;8:37-41.
25. Peralta C, Leon OS, Xaus C, Prats N, Jalil EC, Planell ES, et al. Protective effect of ozone treatment on the injury associated with hepatic ischemia-reperfusion: antioxidant-prooxidant balance. *Free Radic Res* 1999;31:191-6.
26. Clavo B. et al. Ozonotherapy for tumor oxygenation: a pilot study. [http://www.ossigenoozono.it/English/Scientific%20Publications/ozone\\_therapy\\_for\\_tumor.htm](http://www.ossigenoozono.it/English/Scientific%20Publications/ozone_therapy_for_tumor.htm) Consultado el día 5/05/2010
27. Clavo B. et al. Adjuvant ozone therapy in advanced head and neck tumors: A comparative study: <http://www.o3center.org/Articles/AdjuvantOzonotherapyinAdvancedHeadandNeckTumors.pdf> Consultado el día 15/05/2010
28. Borrego, L et al. Ozono más cobaltoterapia en pacientes con adenocarcinoma prostático. *Revista CENIC Ciencias Biológicas* 1998, 29(3):137-140
29. Bocci V. Ozonotherapy as a possible biological response modifier in cancer. *Forsch Komplementärmed Research in Complementary Medicine*, 1998; 5:54-60
30. Bocci V. Oxygen-Ozone Therapy. A Critical Evaluation. AH Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 2002; p. 303-314
31. Bocci V. A New Medical Drug. AA Springer Publishers, 2005, p. 173.



# OZONOTERAPIA EN LA PARÁLISIS CEREBRAL

## Hospital Pediátrico Provincial. Sancti Spíritus

### 2006-2009

**Dra. Agne E. Díaz, Dra. Yusimit Fraga\*, Dra. Migdiala Soria\*\*, Dr. Maikel Gómez.\*\***

\*Hospital Pediátrico Provincial "José Martí Pérez". Cuba

\*\*Hospital General "Camilo Cienfuegos". Cuba

#### Resumen

Queda mucho por investigar sobre el proceso de maduración y desarrollo del Sistema Nervioso, pero dadas las propiedades biológicas del ozono, se supone que sea de utilidad en el mejoramiento de la calidad de vida del paciente con Parálisis Cerebral. Debido a esto se decidió realizar este pre-experimento con diseño de pre-prueba y post-prueba, con un solo grupo, en el Hospital Pediátrico Provincial de Sancti Spíritus en el período de junio 2006-diciembre 2009, con el objetivo de determinar la utilidad de la ozonoterapia en el tratamiento de la Parálisis Cerebral. La población estuvo constituida por los pacientes remitidos a la consulta de ozonoterapia, conformándose el grupo de estudio por 43 pacientes. Las variables analizadas fueron: patrón de sueño y de alimentación, ganancia de peso y respuesta clínica del estado inmunológico. La vía de administración fue la rectal; se utilizaron concentraciones entre 15-18- 20-25 mcg/ml, los volúmenes variaron según la edad y peso del paciente. Se indicaron ciclos de 20 sesiones, cada 3 meses, a completar 4 durante un año. Los pacientes fueron evaluados clínicamente antes y después de cada ciclo. El grupo de estudio estuvo conformado por el mayor número en el grupo de 1 a 5 años. Las variables dependientes analizadas, mostraron significativa mejoría al concluir el tratamiento con ozono. En cuanto a la variabilidad del peso corporal, el mayor porcentaje fue ascendente. El grupo de menores de un año presentó mejor respuesta respecto la espasticidad. No se recogió en ningún caso evento adverso.

**Palabras claves:** ozonoterapia, Parálisis Cerebral.

#### Introducción

La parálisis cerebral (PC) es un término descriptivo que históricamente se emplea para agrupar con objetivos terapéuticos, epidemiológicos y administrativos, diversos desórdenes motores y posturales causantes de limitación en la actividad, atribuidos a trastornos no progresivos que ocurrieron en el cerebro en desarrollo, durante la etapa fetal o infantil temprana (1, 2). Su prevalencia se encuentra entre 1,5 y 3 por cada 1 000 nacidos vivos, y se clasifica ha-

bitualmente en congénita o adquirida, de acuerdo al momento de ocurrencia del daño cerebral (3-7).

Los síndromes motores se manifiestan por alteraciones de la postura, de los movimientos voluntarios y reflejos, lo que conduce al desarrollo de una minusvalía física importante. Estos pacientes también presentan, en diferentes grados, otras alteraciones del neurodesarrollo (convulsiones, retraso psicomotor y del lenguaje, trastornos del aprendizaje, atención y conducta). Las manifestaciones clínicas varían en su expresión según la edad de concepción, etiología y localización de las lesiones o anomalías. (8)

Las patologías asociadas con la PC se producen por igual antes, durante o después del parto. Aproximadamente el 35% de las que ocurren durante el parto se deben a hipoxia-isquemia (HI), pero solamente entre el 12 y el 23% desarrollan PC moderada y grave (9,10). Aquellos neonatos mayores de 34 semanas de gestación que desarrollen PC de tipo cuadriplejía espástica o discinética debido a HI durante el parto, deben presentar las siguientes evidencias:

1. Acidosis metabólica durante el parto en el feto o en la sangre arterial del cordón umbilical, o periférica al nacer (pH < 7, déficit de bases > 16 mM/L).
2. Encefalopatía moderada o grave en las primeras 24 h de vida.

Otros factores que apoyan el diagnóstico de encefalopatía neonatal debido a HI durante el parto son:

1. La presencia durante el parto de un evento hipóxico centinela (ruptura del útero, desprendimiento de la placenta, prolapso del cordón, embolismo de líquido amniótico, transfusión fetal debido a vasos previos o hemorragia fetal-materna).
2. Deterioro rápido y sostenido de la frecuencia cardíaca fetal durante el evento hipóxico centinela en un feto con ritmo cardíaco previo normal.
3. Puntuación de Apgar de 0 a 6 durante más de 5 minutos.
4. Afectación temprana de otros órganos.
5. Evidencias en la resonancia magnética (RM)

de HI cerebral temprana –edema cerebral temprano entre 6-12 horas y, principalmente, a los 4 días de edad en la mayoría de los casos a término (11).

A pesar de los adelantos médicos en los campos de la medicina obstétrica y perinatal, desdichadamente, no existe tratamiento preventivo, ni curativo para la PC. Por tanto, la imposibilidad de evitar las lesiones cerebrales irreversibles en los recién nacidos con encefalopatía hipóxico-isquémica y mejorar las alteraciones clínicas de los pacientes con PC, ha motivado el desarrollo de esta investigación para evaluar la eficacia y seguridad de la ozonoterapia, como tratamiento alternativo en el manejo integral del paciente con Lesión Estática del SNC, teniendo como base los estudios preclínicos y clínicos realizados en diversas patologías donde el fenómeno de isquemia/reperusión ha estado presente y se han obtenido resultados beneficiosos, siendo posible, dadas las propiedades biológicas del ozono, que su empleo en pacientes con Parálisis Cerebral redunde en mejor calidad de vida para los mismos.

### Objetivos

#### General:

⇒ Evaluar la utilidad de la Ozonoterapia en la Parálisis Cerebral.

#### Específicos:

⇒ Determinar la mejoría clínica que se establece con la Ozonoterapia en cuanto: patrón de alimentación, ganancia de peso, patrón de sueño, estado inmunológico y espasticidad.

⇒ Describir y cuantificar los eventos adversos.

### Material y Método

**Tipo de estudio:** Pre-experimento con diseño de preprueba y postprueba, con un solo grupo.

La **población** estuvo constituida por los pacientes con diagnósticos de PC, que fueron remitidos a consulta de Ozonoterapia y el **grupo de estudio** los que cumplieron con los criterios de inclusión y no cumplieron los de exclusión.

**Criterios de inclusión:** Diagnóstico de PC, padres que dieron consentimiento informado.

**Criterios de exclusión:** Desnutrición severa, anemia, trastornos plaquetarios, los que recibieron menos de 15 sesiones del tratamiento por ciclos o que no completaron los 4 en un año.

#### Operalización de las variables:

- variable independiente: Utilización de la Ozonoterapia

- variables dependientes: patrón de sueño, patrón de alimentación, ganancia de peso, respuesta clínica del estado inmunológico.

Se utilizó equipo OZOMED mini. El ozono médico se administró por la vía rectal.

Se emplearon concentraciones entre 15-18-20-25 mcg/ml, los volúmenes de acuerdo a la edad y peso del

paciente. Se indicaron ciclos de 20 sesiones, cada 3 meses, a completar 4 ciclos en un año.

Fueron evaluados clínicamente antes y después de cada ciclo, se tuvieron en cuenta la respuesta a patrón de alimentación, ganancia de peso corporal, patrón de sueño, respuesta clínica del estado inmunológico.

### Resultados y Discusión:

En la Tabla I, se describe la composición del grupo de estudio, se constató que la mayoría de los casos, en un porcentaje de 41.9, se encontraban en la edad comprendida entre 1 y 5 años, seguido de los menores de un año presentes en un 23.2%. Es muy importante tener en cuenta que mientras más tempranamente se inicie el tratamiento, mejores serán los resultados a obtener, ya que se evita el tener que enfrentar secuelas irreversibles que entorpecerán la evolución de la enfermedad.

Tabla I.

Distribución según sexo y edad del grupo de estudio.  
Hosp. Ped. Prov. S.Sptus. 2006-2009.

| Grupo de edad | Sexo M | Sexo F | Total | %    |
|---------------|--------|--------|-------|------|
| Menor 1 año   | 6      | 4      | 10    | 23,2 |
| 1-5 años      | 10     | 8      | 18    | 41,9 |
| 6-10 años     | 3      | 5      | 8     | 18,6 |
| 11-15 años    | 2      | 1      | 3     | 7,0  |
| Mayor 15 años | 3      | 1      | 4     | 9,3  |
| Total         | 24     | 19     | 43    | 100  |

Fuente: Historia Clínica del paciente.

La Tabla II, muestra el comportamiento de las variables dependientes del estudio antes y después del tratamiento; en el caso del patrón de alimentación ineficaz presente en el 53.4% de los casos, descendió hasta el 9.3%, siendo muy positivo el resultado, dado fundamentalmente por el aumento del apetito, mostrando los niños mayor avidez por los alimentos. El patrón de sueño alterado también mostró mejorías evidentes, presente en un 27.9%, antes del tratamiento y luego sólo persistió en 3 pacientes, para un 6.9%.

Estos pacientes se caracterizan por presentar cuadros recidivantes de Infecciones Respiratorias y digestivas, producto de cierto debilitamiento de su estado inmunológico y por las características específicas que poseen, como trastornos en el tono muscular, incapacidad para deambular, de eliminar secreciones respiratorias, entre otras que los hacen muy susceptibles a padecer estas complicaciones; antes del tratamiento el 69.7% mostraban antecedentes clínicos de estado inmunológico deficiente y después del tratamiento, se constató una activación en la respuesta inmunológica dado que sólo persistía en el 18.6%.

*Tabla II.  
Comportamiento de variables dependientes antes  
y después de la Ozonoterapia (4 ciclos).  
Hosp. Ped. Prov. S.Sptus. 2006-2009.*

| Variables dependientes analizadas | Antes de la Ozonoterapia n=43 | Después de la Ozonoterapia n=43 |
|-----------------------------------|-------------------------------|---------------------------------|
| Patrón de alimentación ineficaz   | 23 (53.4%)                    | 4 (9.3%)                        |
| Patrón de sueño alterado          | 12 (27.9 %)                   | 3 (6.9%)                        |
| Estado inmunológico deficiente    | 30 (69.7%)                    | 8 (18.6%)                       |

Fuente: Historia Clínica del paciente.

El comportamiento de la variabilidad del peso corporal al concluir los ciclos de Ozonoterapia se expone en la Tabla III, donde el mayor porcentaje, mostró un aumento de peso corporal condicionado por estimulación del apetito, y mantenimiento prolongado de estado de salud óptimo; sólo el 15.2% presentó variabilidad de peso estacionario y el 9.0% disminuyó de peso, coincidiendo con los pacientes que no mostraron buena respuesta al tratamiento. No se tomaron en cuenta los menores de un año ya que en esta edad el aumento gradual de peso es una respuesta fisiológica al crecimiento y desarrollo, por lo que no resultó ser objetivo de análisis el comportamiento del peso corporal en este grupo de edad.

*Tabla III.  
Comportamiento de variabilidad del peso corporal  
al concluir los ciclos de Ozonoterapia.  
Hosp. Ped. Prov. S.Sptus. 2006-2009.*

| Variabilidad del Peso corporal (kgs) | número | porcentaje |
|--------------------------------------|--------|------------|
| aumento                              | 25     | 75,8%      |
| estacionario                         | 5      | 15,2%      |
| disminuido                           | 3      | 9,0%       |
| Total                                | 33     | 100%       |

\* Se tomaron en cuenta, sólo a los niños mayores de 1 año.

La Tabla IV, muestra el comportamiento de la espasticidad al finalizar el tratamiento. Se conformaron 3 grupos cuantitativamente idénticos, pero de edades diferentes, observándose una mejor respuesta en los de edades más tempranas. Uno de los elementos que más afecta la capacidad funcional del niño portador de una P.C, es la espasticidad, comportamiento motor desordenado, caracterizado por un incremento del tono y de la reflectividad que resulta presente en las lesiones de primera neurona, el cual es secundario a alteraciones neurofisiológicas, bioquímicas o estructurales de la corteza, especialmente en

las áreas relacionadas con el acto motor voluntario. En el caso particular de la espasticidad del niño portador de una P.C. se consideró que el factor más eficaz en el tratamiento resultó ser el inicio precoz de las acciones terapéuticas. Actuar eficientemente en ese momento permite neutralizar en la mayoría de los casos el curso de la misma, incluso anularla. Los objetivos fundamentales en el tratamiento son los siguientes:

- Incrementar la capacidad funcional del individuo, y su independencia.
- Prevenir la aparición de complicaciones secundarias, como las deformidades articulares, retracciones tendinosas, úlceras por presión, espasmos, escoliosis.
- Garantizar el máximo grado de integración social.

*Tabla IV.  
Comportamiento de la espasticidad versus edad,  
en pacientes tratados con ozonoterapia.  
Hosp. Ped. Prov. S.Sptus. 2006-2009.*

| Grupo de edad  | Presencia de espasticidad antes de la Ozonoterapia n=8 | Presencia de espasticidad después de la Ozonoterapia n=8 |
|----------------|--|--|
| Menor de 1 año | 8  | 1  |
| 1-5 años       | 8  | 3  |
| 6 y más        | 8  | 6  |

Fuente: Historia Clínica del paciente.

La ocurrencia de eventos adversos se expresan en la Tabla V. Como puede verse en este estudio, no se recoge la ocurrencia de eventos adversos durante el tratamiento; es muy conocido que la ozonoterapia es un tratamiento inocuo, más cuando se utiliza en dosis adecuadas y por vías seguras, en este caso la vía sistémica utilizada resultó ser la rectal, la indicada en pacientes pediátricos, la cual resulta ser muy segura y eficaz.

*Tabla V.  
Eventos adversos durante el tratamiento con Ozonoterapia.  
Hosp.Ped. Prov. S.Sptus. 2006-2009*

| Eventos Adversos | número | porcentaje |
|------------------|--------|------------|
| Ligeros          | 0      | 0          |
| Moderados        | 0      | 0          |
| Severa           | 0      | 0          |
| No eventos       | 43     | 100%       |
| Total            | 43     | 100%       |

## Conclusiones:

- El grupo de estudio estuvo conformado mayoritariamente por el grupo de niños de 1 a 5 años.
- Las variables dependientes analizadas; patrón de sueño, patrón de alimentación y respuesta clínica del estado inmunológico, mostraron significativa mejoría al concluir el tratamiento con ozono.
- En cuanto a la variabilidad del peso corporal, el mayor porcentaje presentó aumento de peso.
- El grupo de menores de un año presentó mejor re-

spuesta ante la espasticidad.

- No se recogió en ningún caso evento adverso.

## Recomendaciones:

- Realizar un experimento con un mayor número de casos
- Resulta muy útil y factible la incorporación de la Ozonoterapia como tratamiento coadyuvante en la rehabilitación del niño con Parálisis Cerebral para alcanzar una mejor calidad de vida.

## Bibliografías:

1. Bax M, Goldstein M, Rosenbaum P, Leviton A, Paneth N, Dan B, et al. Proposed definition and classification of cerebral palsy, April 2005. *Dev Med Child Neurol.* 2005;47(8):574-6.
2. Robaina-Castellanos G, Riesgo-Rodríguez S, Robaina-Castellanos MS. Evaluación diagnóstica del niño con parálisis cerebral. *Rev Cubana Pediatr.* 2007;79(2). Disponible en: [http://bvs.sld.cu/revistas/ped/vol79\\_02\\_07/ped07207.htm](http://bvs.sld.cu/revistas/ped/vol79_02_07/ped07207.htm), [acceso 15 junio 2007]
3. Clark SL, Hankins GD. Temporal and demographic trends in cerebral palsy – Fact and fiction. *Am J Obstet Gynecol.* 2003;18(3):628-33.
4. Himmelmann K, Hagberg G, Beckung E, Hagberg B, Uvebrant P. The changing panorama of cerebral palsy in Sweden. IX. Prevalence and origin in the birth-year period 1995-1998. *Acta Paediatr.* 2005;94(3):287-94.
5. Surveillance of Cerebral Palsy in Europe (SCPE). Prevalence and characteristics of children with cerebral palsy in Europe. *Dev Med Child Neurol.* 2002;44(9):633-40.
6. Surveillance of Cerebral Palsy in Europe (SCPE). Surveillance of cerebral palsy in Europe: a collaboration of cerebral palsy surveys and registers. *Dev Med Child Neurol.* 2000;42(12):816-24.
7. Robaina-Castellanos GR, Riesgo-Rodríguez S, Robaina-Castellanos MS: Definición y clasificación de la parálisis cerebral: ¿un problema ya resuelto? *Rev Neurol.* 2007;45(2):110-17.
8. Papazian O, Alfonso I. Tratamiento de la parálisis cerebral. *Rev Neurol* 1997; 25: 728-39.
9. Blair E, Stanley FJ. Intrapartum asphyxia: a rare cause of cerebral palsy. *J Pediatr* 1988; 112: 515-9.
10. Nelson KB, Grether JK. Potentially asphyxiating conditions and spastic cerebral palsy in infants of normal birth weight. *Obstet Gynecol* 1998; 179: 507-13.
11. MacLennan A. A template for defining a causal relation between acute intrapartum events and cerebral palsy: international consensus statement. *BMJ* 1999; 319: 1054-9.
12. Kuban KCK, Leviton A. Cerebral palsy. *N Engl J Med* 1994;330: 188-95.
13. Santamaria JP, Williams ET, Desautels, DA. Hyperbaric oxygen therapy in pediatrics. *Advances in Pediatrics* 1995; 42: 335-66.
14. Tibbles PM, Edelsberg JJS. Htperbaric-oxygen therapy. *New England J Med* 1996; 334: 1642-8.
15. Astrup J, Siesjo BK, Simon L. The ischemic penumbra. *Stroke* 1981;12: 723-5.
16. Ajamieh HH, Mene´ndez S, Marti´nez-Sa´nchez G, Candelario-Jalil E, Re L, Giuliani A, Ferna´ndez OSL. Effects of ozone oxidative preconditioning on nitric oxide generation and cellular redox balance in a rat model of hepatic ischaemia-reperfusion. *Liver International* 2004; 24: 55-62.
17. Peralta C., León O.S., Xaus C. Et al. Protective effect of ozone treatment on the injury associated with hepatic ischemia-reperfusion: antioxidant-prooxidant balance. *Free Rad. Res.* 31:191-196, 1999.
18. Barber E., Menéndez S., León O.S. et al. Prevention of renal injury after induction of ozone tolerance in rats submitted to warm ischaemia. *Mediators of Inflammation* 8:37-41, 1999.
19. Al-Dalain S.M., Martínez G., Candelario-Jalil E., Menéndez S., Re L., Giuliani A., León O.S. Ozone treatment reduces markers of oxidative and endothelial damage in an experimental diabetes model in rats. *Pharmaceutical Research*, 44(5):391-396, 2001.
20. Candelario E., Mohammed-Al-Dalain S., León O.S., Menéndez S., Pérez G., Merino N., Sam S. Oxidative preconditioning affords protection against carbon tetrachloride-induced glycogen depletion and oxidative stress in rats. *J. Appl. Toxicol.*, 21, 297-301, 2001.
21. Barber E., Menéndez S., Barber M.O., Merino N. y Calunga J.L. Estudio renal funcional y morfológico en riñones de ratas pretratadas con ozono y sometidas a isquemia caliente. *Rev. CENIC Ciencias Biológicas* 29(3):178-180, 1998.
22. Calunga J.L., Menéndez S., Barber E., Merino N., Cruz E. Ozone biological response in kidneys of rats submitted to warm ischemia. *Ozone Science & Engineering*, 2003 (in press).
23. Barber E., Menéndez S., León O.S., Barber M.O., Merino N., Calunga J.L., Cruz E. and Bocci V. Prevention of renal injury after induction of ozone tolerance in rats submitted to warm ischemia. *Mediators of Inflammation.* 8:37-41, 1999.
24. Montero T, Menéndez S., Hurtado J. Multiple organ injury evolution in an experimental model of burn mice treated with ozone therapy and aloe b. *Proceedings of the 15th Ozone World Congress. Lille, France. Medical Therapy Conference*, 291-302, 2001.



# PREVENCIÓN DEL ICTUS CON LA APLICACIÓN DE OZONOTERAPIA: ESTUDIO PILOTO

**Autores: Dra. Vivian Borroto Rodríguez\***

Especialista en Medicina Familiar  
Master en Medicina Bioenergética y Natural

**Luis Izquierdo Pérez\*\***

Licenciado en Estadística Matemática  
Investigador Agregado

**Luisa B. Lima Hernández\***

Licenciada en Bioquímica  
Especialista en Nutrición Humana  
Master en Medicina Bioenergética y Natural  
Investigadora Titular y Profesora

**Colaboradores: Roosevelt Cambara Peña\***

Lic. en Enfermería

\* Centro Nacional de Medicina Natural y Tradicional de la República de Cuba, Ciudad de la Habana, Cuba

\*\*Centro de Investigación – Producción de vacunas y sueros. Instituto Finlay

**Palabras clave:** Ictus, ozonoterapia, prevención, hipertensión

## RESUMEN

Las enfermedades cerebrovasculares (ECV), constituyen uno de los problemas de salud más importantes en todos los países desarrollados y también en Cuba. En la atención primaria de salud se desarrollan las acciones de promoción y prevención, modificaciones de estilo de vida de la población e incremento de la pesquisa activa en los individuos en riesgo, estando todos los esfuerzos dirigidos hacia la prevención de las enfermedades cerebrovasculares, actuando fundamentalmente en el control de los factores de riesgo. En el Servicio de Calidad de Vida del Centro Nacional de Medicina Natural y Tradicional en el periodo comprendido desde enero de 2007 hasta diciembre de 2009, se hizo un seguimiento de 120 pacientes con diferentes factores de riesgos (edad, diabetes mellitus, hipertensión, dislipidemias, cardiopatías) con el objetivo de determinar el efecto de la ozonoterapia en el control de los factores de riesgo del ictus. La muestra se dividió aleatoriamente en dos grupos de 60 individuos. A los pacientes del grupo de estudio se les aplicaron 20 sesiones de ozono rectal de lunes a viernes durante 4 semanas, ascendiendo paulatinamente la dosis cada 5 sesiones. Este ciclo se repitió cada tres meses hasta completar cuatro ciclos. Además recibían la terapia convencional establecida para estas patologías. Al grupo control solo se le aplicó la terapia convencional. A todos se les realizó una evaluación de los parámetros bioquímicos y clínicos antes del tratamiento y cada tres meses después de cada ciclo. Los resultados obtenidos demostraron que los pacientes que

recibieron tratamiento con ozonoterapia se mantuvieron más estables desde el punto de vista clínico y bioquímico que el grupo control y no presentaron ninguna complicación cerebro vascular ni eventos adversos al tratamiento.

## INTRODUCCIÓN

La enfermedad cerebrovascular (ECV) es una de las principales causas de mortalidad y de morbilidad en todo el mundo. Según la OMS, se considera la tercera causa de muerte y la primera de invalidez en la población adulta en el orbe. Mientras la mayoría de los países desarrollados muestran tasas estables de mortalidad por ECV, los países en desarrollo incrementan sus tasas anuales de prevalencia y mortalidad; 4,5 millones de los 10 millones de muertos anuales por ECV pertenecen a los países no industrializados. Se sabe también que hasta un tercio de los pacientes que sobreviven quedan con secuelas invalidantes, y hasta un 25% presentarán después del ictus un deterioro cognitivo en mayor o menor grado.<sup>1-4</sup>

En la atención primaria de salud se desarrollan las acciones de promoción y prevención, modificaciones de estilo de vida de la población e incremento de la pesquisa activa en los individuos en riesgo, estando todos estos esfuerzos dirigidos hacia la prevención de las enfermedades cerebro vasculares, actuando fundamentalmente en el control de los factores de riesgo.<sup>5</sup>

En el Servicio de Calidad de Vida del Centro Nacional de Medicina Natural y Tradicional se realizó un estudio de

pilotaje en el período comprendido desde enero de 2007 a diciembre de 2009, donde se hizo un seguimiento de 120 pacientes con uno o más factores de riesgo (edad, diabetes, hipertensión, dislipemias, cardiopatías) con el objetivo de determinar el efecto de la ozonoterapia en el control de estas patologías y en el futuro poder realizar un proyecto de investigación tomando como base los resultados que se obtuvieran en el presente trabajo.

### DISEÑO METOLÓGICO DE LA INVESTIGACIÓN

La muestra se dividió aleatoriamente en dos grupos de 60 individuos cada uno. A los pacientes del grupo de estudio se les aplicaron 20 sesiones de ozono rectal, de lunes a viernes durante 4 semanas, ascendiendo paulatinamente la dosis cada 5 sesiones. Este tratamiento se repitió cada tres meses hasta completar cuatro ciclos. Además recibían la terapia convencional establecida para estas patologías.

Al grupo control solo se le aplicó la terapia convencional.

A continuación se muestra el esquema de tratamiento para ambos grupos y las dosis de ozono empleadas:

- Grupo 1 control: Recibió el tratamiento específico establecido para cada patología o factor de riesgo incluyendo, medicamentos, orientaciones generales y educativas.

Los pacientes con hipertensión fueron tratados con (diuréticos e hipotensores), los diabéticos fueron tratados con hipoglicemiantes orales (Glibenclamida o Merformina) los que presentaban hiperlipemias, fueron tratados con estatinas (Simvastatina), los que padecían cardiopatía isquémica fueron tratados con antiagregantes, bloqueadores beta, estatinas y bloqueadores del sistema renina-angiotensina-aldosterona con inhibidores de la enzima de conversión de angiotensina (IECA) o antagonistas de los receptores de la angiotensina II (ARA-II).

- Grupo 2 de estudio con ozono: Recibió tratamiento con ozonoterapia: 20 sesiones por vía rectal usando una dosis escalonada y ascendente de la siguiente manera:

#### DOSIS DE OZONO UTILIZADA

- 100 cc a una concentración de 25µg/ml  
5 sesiones Primera semana
- 150 cc a una concentración de 30µg/ml  
5 sesiones Segunda semana
- 150 cc a una concentración de 35µg/ml  
5 sesiones Tercera semana
- 200 cc a una concentración de 40µg/ml  
5 sesiones Cuarta semana

#### CARACTERIZACIÓN DE LA MUESTRA

La selección de los pacientes para su inclusión en cada grupo fue realizada al azar. Se encontró una mediana de la edad de 67 años para el grupo control y de 66.5 para el grupo ozono, (tabla Ia) siendo por tanto una muestra ho-

mogénea, confirmando que la edad es el factor de riesgo no modificable más significativo de padecer Ictus, coincidiendo con la bibliografía revisada.<sup>6</sup>

La distribución por sexo fue de 67 mujeres para un 55,8% y de 53 hombres para un 44.2%. (Tabla Ib).

Entre los factores de riesgo predominó la hipertensión arterial (HTA) en ambos grupos de tratamiento estudiados, control y ozono, con 56.6% y 60% respectivamente; seguidos por la diabetes mellitus con 28.3% en la muestra control y 26.6 % en el grupo ozono; después por las hiperlipemias con un 18.3 % en el grupo control y 16.6% en el grupo ozono y las cardiopatías con 15% en el control y 16.6% en el ozono. (Tabla Ic)

La presencia de estas patologías se fundamentó en lo siguiente:

La hipertensión arterial se definió como la elevación persistente de la presión arterial por encima de 140/90 mmHg.

La diabetes mellitus se definió por cifras de glucemia basal mayor de 126 mg/dL al menos en dos ocasiones, o por la toma de hipoglucemiantes orales o empleo de Insulina.

La dislipemia, por cifras documentadas de lipoproteínas de baja densidad (LDL) mayores de 160 mg/dL o lipoproteínas de alta densidad (HDL) menores de 30 mg/dL, Se define hipercolesterolemia cuando la concentración de colesterol en plasma es > 240 mg/dl y la hipertrigliceridemia cuando la concentración de triglicéridos es > 200 mg/dl.

La cardiopatía isquémica (CI), por el hecho de haber presentado episodios documentados de angina de pecho o infarto de miocardio.

Para evaluar la percepción de mejoría del paciente, se recogieron a través de encuestas, las referencias del paciente en cuanto a su consideración sobre si mejoraba ostensiblemente de los síntomas primarios después de los tratamientos; mejoría de su calidad de vida en cuanto a disponibilidad y capacidad para realizar actividades físicas e intelectuales que no podía hacer antes del tratamiento; mejoría en la calidad del sueño y rendimiento en sus labores.

### ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados obtenidos fueron comparados a través del Test de Fisher aplicando el paquete estadístico Fisher's Exact Test for Count Data y por cálculos de los intervalos de confianza para proporciones.

### RESULTADOS

La totalidad de la población estudiada, así como las afecciones que presentaban y el número de ellos que se mejoró con los tratamientos recibidos aparece reportado en la tabla II.

Al analizar la evolución de los pacientes en el tiempo que duró el estudio, se encontró lo siguiente: En los hipertensos se pudo observar una curva de la tensión arterial

más estable en un por ciento mayor de los pacientes tratados con ozono que en el grupo control, siendo esta diferencia de un 15.8%. Cuando se aplicó el Test de Fisher se obtuvo una  $p=0.2219$ , resultado no significativo, quizás debido a que el tamaño de la muestra era pequeño.

En el caso de los pacientes diabéticos se pudo observar que la curva glucémica era más estable en un por ciento mayor en el grupo tratado con ozono, con una diferencia de 22.1% por encima del grupo control. Sin embargo al aplicar el Test de Fisher se obtuvo un valor de  $p=0.2818$ , el cual resultó no significativo, lo que pudiera estar influido como en el caso de la hipertensión, por el pequeño tamaño de la muestra.

Los niveles de triglicéridos regresaron a la normalidad en un 90% de los pacientes tratados con ozono y en un 72% de los pacientes del grupo control con una diferencia de un 17.3 % a favor del grupo ozono respecto al control. Se les aplicó el Test estadístico de Fisher y se obtuvo una  $p=0.5865$ , la cual no muestra diferencia significativa entre los dos grupos, al igual que en los dos casos analizados anteriormente.

Los pacientes con cardiopatía isquémica mejoraron sus síntomas, tales como las crisis de dolor precordial, las que disminuyeron en más del 50% en su intensidad y frecuencia; la capacidad para realizar actividades físicas, con una tolerancia mayor para realizar las labores diarias que requieren de un moderado esfuerzo, considerablemente más en el grupo tratado con ozono que en el grupo control; mejorando el 100% de los pacientes tratados con ozono y el 55.5% en el grupo control, para una diferencia de un 44.5 % a favor del grupo ozono. En este caso cuando se aplicó el Test de Fisher se obtuvo una  $p=0.03$  con una alta significación estadística, aun cuando la muestra era pequeña.

Al evaluar la percepción de mejoría del paciente se observó por las encuestas realizadas, que todos los pacientes tratados con ozono (100%) refirieron una mejoría ostensible de sus síntomas, se favoreció su calidad de vida en cuanto a disponibilidad y capacidad para realizar actividades físicas e intelectuales, lo cual no podían hacer antes del tratamiento; hubo también una mejoría en la calidad del sueño y en el rendimiento de sus labores, mientras que solo un 25% los pacientes del grupo control percibieron dichos beneficios. En este caso al aplicar el Test de Fisher se encontró una  $p=2.249e-05$ , lo que implica que hay una diferencia altamente significativa entre el grupo tratado con ozono y el control, a favor del primero.

En el período en que se le realizó el seguimiento a los pacientes, se presentaron en el grupo control tres casos con isquemias transitorias (5,5 %,) (tabla IV) lo cual coincide con la bibliografía que señala que entre el 70-80 % de todas las ECV son isquémicas.<sup>7</sup>

Al aplicar el método estadístico Fisher's Exact Test for Count Data, se obtuvo una  $p\text{-value} = 0.2443$ . En este caso no se detectaron diferencias significativas mediante esta prueba estadística entre los dos grupos.

Los intervalos del 95% de confianza para la proporción de pacientes con isquemias transitorias se solapan. Para el

grupo control la estimación fue 5% y el intervalo estuvo entre [1.7% - 13.7%] mientras que para el grupo ozono fue 0% y su correspondiente intervalo [0% - 6.0%]. Indicando que con estos resultados es imposible establecer con gran seguridad que el grupo 2 es mejor que el 1, aunque las medianas sugieren que con más pacientes esto pudiera detectarse.

En la caracterización de los pacientes que presentaron isquemias transitorias se puede observar que todos presentaban tres o más factores de riesgos, incluyendo la edad, pues los tres pacientes pasaban de 70 años y además ninguno de ellos recibió tratamiento con ozono.

## DISCUSIÓN

Un factor importante no modificable que predispone a la aparición enfermedades cerebrovasculares específicamente el ictus es la edad, de manera directamente proporcional a la cantidad de años, debido a los cambios fisiológicos que aparecen con la edad avanzada, La edad es el factor de riesgo más frecuente de las enfermedades cerebrovasculares, y se duplica la incidencia de las mismas cada 10 años, después de los 55 años de edad. Los enfermos que han padecido un accidente cerebrovascular, según la bibliografía revisada, presentan entre 7 y 10 % de riesgo de padecer otro, y es la edad el factor de riesgo mayor, en el 1er año después del primer ACV; las personas mayores de 65 años tienen un riesgo 7 veces mayor a morir de ACV.<sup>6</sup>

También en estos grupos etarios se presentan con frecuencia otros factores modificables, pudiendo coincidir más de una de estas patologías en un mismo paciente, incrementándose la posibilidad de presentar complicaciones como el ictus,<sup>2</sup> lo que hace pensar que es importante realizar un trabajo de prevención y seguimiento de estos grupos etarios, que además resultan mayoritarios en casi todos los países.

En la caracterización de los pacientes que presentaron ataques de isquemia transitoria (AIT) según riesgo, se puede ver que de los tres casos afectados el 100% eran hipertensos, la diabetes se presentó en 66,6 %, al igual que la cardiopatía, y la hiperlipemia en un 33,3 %. También se pudo constatar que en los casos que presentaron AIT el 66,6 % padecían cuatro de los factores de riesgo y el 44.4% presentaban tres de los factores de riesgos analizados. Esto indica un efecto aditivo de varios factores que potencializa el riesgo de padecer ictus, lo cual se ha referido en otros estudios.<sup>4</sup>

En cuanto a la hipertensión arterial, se impone un control de las cifras tensionales elevadas, encaminado a la prevención de sus efectos en los órganos dianas, para evitar las complicaciones que ello provoca. En este estudio se pudo observar un 15.8% de pacientes mejorados con ozono por encima del grupo control, aunque por el tamaño de la muestra no se encontró una diferencia estadísticamente significativa al realizar la comparación; no obstante en la práctica un mayor número de pacientes mejoraron esta patología en el grupo con ozono que en

el control, lo que pudiera deberse a que el ozono tiene un efecto protector celular, y además actúa sobre el flujo sanguíneo y la oxigenación de los tejidos, ejerciendo un efecto directo sobre el funcionamiento de la célula endotelial, aspectos determinantes, no solo en la prevención de las enfermedades cerebrovasculares, sino en la recuperación de pacientes afectados por ictus.<sup>5</sup>

Referente a la diabetes, en este estudio se pudo ver que mejoraron mayor cantidad de pacientes en el grupo con ozono (75%) que en el grupo control (52.2%), a pesar de que por el reducido tamaño de muestra no se pudo demostrar estadísticamente que esta diferencia fuera significativa. Se sabe que la hiperglucemia a través de diferentes vías favorece un estrés oxidativo que se relaciona con las complicaciones vasculares de la diabetes,<sup>6</sup> se ha visto que la ozonoterapia puede reducir los valores de glucemia hasta normalizarlos por un efecto en la susceptibilidad de la insulina,<sup>7</sup> por lo que se infiere la importancia que esto significa en la prevención del ictus en el paciente diabético, además de sus efectos beneficiosos sobre el metabolismo celular y de estimulación de los mecanismos endógenos para enfrentar el estrés oxidativo crónico y mantenido que sufren estos pacientes.<sup>8</sup>

Al analizar los pacientes con hiperlipemias se comprobó que un 90% de los tratados con ozono normalizaron sus cifras de colesterol y triglicéridos, mientras que en el grupo control se normalizaron estas cifras en el 72.2%, o sea un 17.3% menos que en el primero, lo que parece indicar que la ozonoterapia ha sido efectiva para estabilizar estos valores de la química sanguínea. Resultados semejantes han sido descritos en otras investigaciones realizadas por otros autores,<sup>9-11</sup> aunque en el presente estudio no fue posible determinar que dicha diferencia fuera estadísticamente significativa.

En el grupo control durante el tiempo que duró el estudio se presentaron tres casos de ataques de isquemia cerebral transitoria (un 5% de la muestra), que como se sabe predispone a la aparición de ictus con más frecuencia y al compararlo con el grupo tratado con ozono se ve que en el mismo no se presentó ningún caso. Esto pudiera ser respaldado por los efectos biológicos del ozono, que favorece la oxigenación cerebral con una mayor producción energética, también por el mejoramiento de las propiedades hemorreológicas de la sangre, facilitando una mejor irrigación cerebral y con la propiedad de ceder más fácilmente el oxígeno a la célula, además de la estimulación de los sistemas de defensa antioxidante, disminuyendo los daños que pudieran ocasionar las especies reactivas de oxígeno cuando no son controladas.<sup>12</sup>

También puede ser determinante el efecto antiagregante plaquetario del ozono demostrado en otros estudios realizados.<sup>13</sup>

En los pacientes con cardiopatía isquémica crónica, donde hubo una diferencia altamente significativa entre los dos grupos de tratamiento, a favor del tratado con ozono, puede tenerse en cuenta que durante los últimos años se ha observado que la inflamación es un mecanismo clave de la aterogénesis y de la progresión rápida de la en-

fermedad arterial coronaria. Cuando el estímulo inflamatorio es persistente o se repite continuamente se producirá una inflamación crónica, que puede llegar a destruir el tejido y/o producir la pérdida de la funcionalidad del órgano afectado.

Además se sabe que hay un vínculo entre inflamación y trombosis, influyéndose de forma recíproca.<sup>14</sup> Las células endoteliales estimuladas por citocinas, producen sustancias procoagulantes como el factor Von Willebrand, factor tisular y los inhibidores 1 y 2 del activador del plasminógeno. Las células inflamatorias activadas sintetizan moléculas que modulan la cascada trombótica.

Se sabe que la inflamación en las placas ateroscleróticas puede estar desencadenada, mantenida e incrementada por múltiples factores, como la presencia de LDL oxidadas, incremento de la concentración de radicales superóxido, macrófagos activados, linfocitos activados, incremento de IL-1, IL-6, IFN- $\gamma$  Lp(a).<sup>15</sup>

Al utilizar el ozono por vía rectal, a dosis terapéutica, se obtiene una mejoría en el metabolismo del oxígeno y la circulación sanguínea y una estimulación de los sistemas de defensa antioxidantes, entre otros efectos.<sup>12,16-25</sup> Por tanto, se estará actuando endógenamente sobre la aterogénesis y también en la progresión rápida de la enfermedad arterial coronaria, disminuyendo la aparición de complicaciones. Estudios en modelos animales han demostrado que la aplicación rectal de ozono tiene un efecto protector del endotelio vascular,<sup>26</sup> así como una acción reguladora de las concentraciones de óxido nítrico endógeno,<sup>27</sup> descrito como factor relajante derivado del endotelio.<sup>28</sup> El ozono al tener una acción directa sobre los glóbulos rojos, mejora sus propiedades reológicas, aumentando su capacidad de transporte de oxígeno, así como su superficie de intercambio. Hay un aumento de su elasticidad, lo que les permitirá una mayor penetración a través de los capilares sanguíneos.<sup>12,16-22</sup> Todo ello mejora el intercambio de sustancias entre la sangre circulante y los tejidos corporales, aumentando la presión parcial de oxígeno y la oxigenación de los tejidos, de esta forma se previenen los eventos isquémicos.<sup>12</sup>

El ataque isquémico transitorio (AIT) se define como la disfunción cerebral focal o monocular con una duración de los síntomas menor de 24 horas, causada por una insuficiencia vascular debida a trombosis o embolismo arterial, asociada a enfermedad arterial, cardíaca o hematológica.<sup>29</sup> Su incidencia anual en la población española varía según los estudios<sup>30-32</sup> de 35 a 280 casos por 100.000 habitantes; la media de dicha incidencia es similar a la descrita en EE.UU., de 64 casos por 100.000 habitantes.<sup>33</sup> Aproximadamente el 15% de los pacientes que han sufrido un infarto cerebral refiere haber presentado previamente un AIT.<sup>34</sup> Tras un primer episodio de AIT, el 10,5% de los pacientes sufre un ictus en los siguientes 90 días, la mitad de los cuales lo hacen en las primeras 48 horas.<sup>35</sup> A largo plazo, la principal causa de muerte en estos pacientes es la enfermedad cardíaca isquémica.<sup>36</sup> A los 10 años, más del 40% de los pacientes con un AIT ha presentado un infarto de miocardio, un infarto cerebral, o bien ha muerto por una

causa vascular.<sup>37</sup> Estas cifras permiten considerar el conjunto de pacientes que han presentado un AIT como un grupo de alto riesgo,<sup>38</sup> en el que es necesaria una adecuada prevención para disminuir la incidencia de nuevos episodios vasculares graves. Estos tratamientos podrían optimizarse si se conociera el perfil clínico del paciente con AIT, el cual tiene un mayor riesgo de presentar recurrencia vascular. Por lo que se puede considerar de gran importancia el tratamiento de las diferentes patologías o factores de riesgos para evitar la aparición de estos ataques transitorios y por ende disminuir la incidencia del ictus, lo cual puede lograrse en alguna medida con la aplicación de la ozonoterapia.

El hecho de que los el 100% de los pacientes tratados con ozono tuvieron una percepción de mejoría, con una significación estadística a su favor al compararla con el grupo control, puede deberse a la acción de la ozonoterapia sobre el metabolismo del oxígeno, con su consecuente aumento en la obtención de ATP, así como al favorecer las vías metabólicas óptimas para el mejor funcionamiento del metabolismo celular.

### CONCLUSIONES

En el grupo tratado con ozonoterapia no se presentaron episodios de isquemias transitorias. El grupo tratado con ozono tuvo un mayor por ciento de pacientes mejorados, que el grupo tratado con los esquemas convencio-

nales para cada patología analizada. La cardiopatía isquémica tuvo una respuesta muy favorable al tratamiento con ozono, con una mejoría de los síntomas y de la calidad de vida del paciente muy superior a los que recibieron los tratamientos convencionales, diferencia que fue estadísticamente significativa. Hubo un por ciento mayor de pacientes portadores de hipertensión arterial, diabetes e hiperlipemia que mejoraron cuando recibieron el tratamiento con ozono adicionalmente al tratamiento convencional, que los que recibieron solo este último, pero la diferencia detectada no fue significativa estadísticamente.

No se reportaron eventos adversos con el uso de la ozonoterapia.

### RECOMENDACIONES

Se recomienda el uso de la ozonoterapia como coadyuvante en pacientes con patologías que constituyen factores de riesgo de padecer ictus.

Se recomienda, el tratamiento con ozonoterapia como coadyuvante en pacientes con cardiopatías isquemias, a las dosis descritas en este estudio.

Utilizar la ozonoterapia en la Atención Primaria de Salud para prevenir los accidentes vasculares encefálicos y favorecer una mejor calidad de vida de la población.

Realizar un estudio con una muestra mayor y con un seguimiento por más tiempo.

### Bibliografías:

1. Barba R, Martínez-Espinosa S, Rodríguez-García E, Pondal M, Vivancos J, Del Ser T. Poststroke dementia: clinical features and risk factors. *Stroke* 2000; 31: 1494-501.
2. Wolfe C. The impact of stroke. *Br Med Bull* 2000; 56: 275-86
3. Madureira S, Guerreiro M, Ferro JM. Dementia and cognitive impairment three months after stroke. *Eur J Neurol* 2001; 8: 621-7.
4. González M, De La Hoz F. Mortalidad por enfermedades cardiovasculares. Colombia 1990-1999. Informe Quincenal Epidemiológico Nacional 2002; 224:17-43.
5. Buergo C, Verdura S; Resumed Programa Nacional de Prevención y Control de la Enfermedad Cerebrovascular en Cuba 2000; 13(4):174-81
6. F. Purroy-García, et al; Factores clínicos predictores de la aparición de episodios vasculares tras un ataque isquémico transitorio *angiología* 2004; 56 (5): 491-503
7. Davies P M. Pasos a seguir. Tratamiento integrado de pacientes con hemiplejía. 2. ed. Ciudad de La Habana: Editorial Ciencias Médicas; 2006, p.16- 20.
8. León OS., Menéndez S., Merino N. et al. "Ozone oxidative preconditioning: a protection against cellular damage by free radicals", *Mediators of Inflammation*, 7:289-294 (1998).
9. Hernández F. "La ozonoterapia y la peroxidación de los lípidos. Relaciones y efectos en la aterosclerosis", *Revista CENIC Ciencias Biológicas*, 24(1-2-3):25-29 (1993).
10. Hernández, F., Menéndez S. and Wong, R. "Decrease of blood cholesterol and stimulation of antioxidative response in cardiopathy patients treated with endovenous ozone therapy", *Free. Radic. Biol. Med.*, 19(1):115-119 (1995).
11. Rodríguez BR., Menéndez S., Quesada X., Vecino C. y Herrera F. "Utilización de la ozonoterapia en el tratamiento de las hiperlipidemias", *Revista CENIC Ciencias Biológicas*, 20(1-2-3):153-156 (1989).
12. Menéndez S, González R, Ledea OE, Hernández F, León OS, Díaz M. Ozono. Aspectos básicos y aplicaciones clínicas. La Habana, Cuba: Editorial CENIC; 2008:10-320.

13. Díaz A, García M, Piña C, Menéndez S; Efecto del ozono sobre la activación plaquetaria en pacientes tratados con ozonoterapia: Informe preliminar; Rev Cubana Invest. Biomed 2001; 20(1);45-7
14. Loscalzo J. The relation between atherosclerosis and thrombosis. *Circulation* 1992;86 (Supl 3):95-99.
15. Mehta JL, Saldeen TGP, Rand K. Interactive role of infection, inflammation and traditional risk factors in atherosclerosis and coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol* 1998;31:1.217-1.225.
16. Menéndez S. Introducción y desarrollo de la ozonoterapia en Cuba. *Rev FIOOT (México)* No. 3, 2009 (en prensa).
17. Calunga JL, Trujillo Y, Menéndez S, Zamora Z, Alonso Y, Merino N et al. Ozone oxidative postconditioning in acute renal failure. *J Pharm Pharmacol* 2009;61:1-7.
18. Menéndez S, Cepero J, Borrego L. Ozone therapy in cancer treatment: State of the art. *Ozo-Sci Eng* 2008;30:398-404.
19. León OS, Menéndez S, Merino N, Castillo R, Sam S, Pérez L et al. Ozone oxidative preconditioning: a protection against cellular damage by free radicals. *Med Inflamm* 1998;7:289-94.
20. Hernández F, Menéndez S, Wong R. Decrease of blood cholesterol and stimulation of antioxidative response in cardiopathy patients treated with endovenous ozone therapy. *Free Radical Bio Med* 1995;19(1):115-9.
21. Al-Dalain SM, Martínez G, Menéndez S, Re L, Giuliani A, Candelario-Jalil E et al. Therapeutic efficacy of ozone medical treatments in patients with diabetic foot. *Eur J Pharmacol* 2005;523:151-61.
22. Zamora Z, Borrego A, López O, Delgado R, González R, Menéndez S et al. Effects of ozone oxidative preconditioning on TNF- release and antioxidant-prooxidant intracellular balance in mice during endotoxic shock. *Mediat Inflamm* 2005;1;16-22.
23. Bocci V. Ozone. A new medical drug. AA Dordrecht, The Netherlands: Springer Publishers, 2005:1-28.
24. Ajamieh HH, Menéndez S, Martínez-Sánchez G, Candelario-Jalil E, Re L, Giuliani A et al. Effects of ozone oxidative preconditioning on nitric oxide generation and cellular redox balance in a rat model of hepatic ischaemia-reperfusion. *Liver Int* 2004;24:55-62.
25. Quiñones M, Menéndez S, Gómez M, Díaz W, Eng L, Vecino C. Ozonoterapia en el tratamiento de las úlceras de miembros inferiores causadas por insuficiencia venosa crónica. *Revista CENIC Ciencias Biológicas (Cuba)* 1989;20(1-2-3):76-81.
26. Friman M, Walter D, Eng L, Menéndez S, Gómez M. Efecto del ozono en las células endoteliales circulantes en ratas. *Rev CENIC Ciencias Biológicas (Cuba)* 1989;20(1-2-3):25-8.
27. Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 1980;288;373-6.
28. Nobis U, Pries AR, Cokelet GR, Gaehtgens P. Radial distribution of white cells during blood flow in small tubes. *Microvasc Res* 1985;29:295-304.
29. Arboix A, Díaz A, Pérez-Sempere A, Álvarez-Sabín J. Ictus: tipos etiológicos y criterios diagnósticos. *Neurología* 2002; 17 (Supl 3): 3-12.
30. Matías-Guiu J, Oltra A, Falip R, Galiano L. Occurrence of transient ischemic attacks in Alcoi: Descriptive epidemiology. *Neuroepidemiology* 1994; 13: 34-9.
31. López-Pousa S, Vilalta J, Llinás J. Incidencia de la enfermedad vascular cerebral en España: estudio en un área rural de Girona. *Rev Neurol* 1995; 123: 1081-6.
32. Sempere AP, Duarte J, Cabezas C, Clavería LE. Incidence of transient ischemic attacks and minor ischemic strokes in Segovia, Spain. *Stroke* 1996; 27: 667-71.
33. Ovbiagele B, Kidwell CS, Saver JL. Epidemiological impact in the USA of a tissuebased definition of TIA. *Stroke* 2003; 34: 919-24.
34. National Stroke Association. TIA/mini strokes: public knowledge and experience –Roper Starch worldwide survey. Roper Starch Worldwide; 2000.
35. Johnston SC, Gress DR, Browner WS, Sidney S. Short-term prognosis after emergency department diagnosis of TIA. *JAMA* 2000; 284: 2901-6.
36. Heyman A, Wilkinson WE, Hurwitz BJ, Haynes CS, Utley CM, Rosati RA, et al. Risk of ischemic heart disease in patients with TIA. *Neurology* 1984; 34: 626-30.
37. Clark TG, Murphy MFG, Rothwell PM. Long term risks of stroke, myocardial infarction, and vascular death in 'low risk' patients with non-recent transient ischemic attack. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2003; 74: 577-80.
38. Álvarez-Sabín J. Accidente isquémico transitorio ¿diagnóstico en régimen de hospitalización o ambulatorio? *Rev Neurol* 1997;25: 1104-9.

## ANEXOS

TABLA I a: CARACTERIZACION DE LA MUESTRA POR GRUPOS ETARIOS

| Grupos etarios | Grupo control | Grupo ozono | total |
|----------------|---------------|-------------|-------|
| 15 a 30        | 1             | 1           | 2     |
| 31 a 46        | 6             | 6           | 12    |
| 47 a 62        | 14            | 13          | 27    |
| 63 a 78        | 28            | 25          | 53    |
| Más de 78      | 11            | 15          | 26    |
| Total          | 60            | 60          | 120   |
| Mediana        | 67            | 66,5        |       |

Fuente: Historia Clínica

TABLA I b: CARACTERIZACION DE LA MUESTRA POR SEXO

| Grupos  | Femenino | %    | Masculino | %    |
|---------|----------|------|-----------|------|
| Control | 33       | 55   | 27        | 45   |
| Ozono   | 34       | 56,6 | 26        | 43,4 |
| Total   | 67       | 55,8 | 53        | 44,2 |

Fuente: Historia Clínica

TABLA I c: CARACTERIZACION DE LA MUESTRA POR PATOLOGIA

| Patología    | Grupo control |      | Grupo ozono |      | Total |      |
|--------------|---------------|------|-------------|------|-------|------|
|              | A             | %    | A           | %    | A     | %    |
| Hipertensión | 34            | 56,6 | 36          | 60   | 70    | 58,3 |
| Diabetes     | 17            | 28,3 | 16          | 26,6 | 33    | 27,5 |
| Hiperlipemia | 11            | 18,3 | 10          | 16,6 | 21    | 17,5 |
| Cardiopatías | 9             | 15   | 10          | 16,6 | 19    | 15,8 |

Fuente: Historia Clínica

Leyenda - A: Número de pacientes afectados con cada una de estas patologías

TABLA II: PACIENTES TOTALES Y MEJORADOS EN TODAS LAS PATOLOGIAS ESTUDIADAS

| Patología    | Grupo control |           |             | Grupo ozono |           |             | A Favor del ozono | P         |
|--------------|---------------|-----------|-------------|-------------|-----------|-------------|-------------------|-----------|
|              | A             | M         | %           | A           | M         | %           | Diferencia %      |           |
| Hipertensión | 34            | 22        | 64,7        | 36          | 29        | 80,5        | 15,8              | 0.2219 NS |
| Diabetes     | 17            | 9         | 52,9        | 16          | 12        | 75          | 22,1              | 0.2818 NS |
| Hiperlipemia | 11            | 8         | 72,7        | 10          | 9         | 90          | 17,3              | 0.5865 NS |
| Cardiopatías | 9             | 5         | 55,5        | 10          | 10        | 100         | 44,5              | 0.03 S*   |
| <b>Total</b> | <b>71</b>     | <b>44</b> | <b>61,9</b> | <b>72</b>   | <b>60</b> | <b>83,3</b> | <b>21,4</b>       |           |

Fuente: Historia Clínica

Leyenda - A: Afectados M: Mejorados

Diferencia (%): Diferencia entre el % de mejorados del grupo con Ozono y el grupo Control

P: Significación estadística

NS: No significativo  $p \geq 0.05$ S\*: Significativo  $p \leq 0.05$

TABLA III: PERCEPCION DE MEJORIA POR EL PACIENTE

| Percepción de mejoría          | Grupo control |    |    |    |    | Grupo ozono |    |   |    |     |
|--------------------------------|---------------|----|----|----|----|-------------|----|---|----|-----|
|                                | A             | NM | %  | M  | %  | A           | NM | % | M  | %   |
| Todos los pacientes estudiados | 60            | 45 | 75 | 15 | 25 | 60          | 0  | 0 | 60 | 100 |

Fuente: Historia Clínica

Leyenda - A: Afectados M: Mejorados NM: No mejorados

%: Por ciento de mejorados y no mejorados de los 60 pacientes estudiados en cada grupo.

$P = 2.249e-05 < 0.01$  altamente significativo

TABLA IV: INCIDENCIA DE ISQUEMIAS TRANSITORIAS POR GRUPOS DE TRATAMIENTOS

| GRUPOS        | Número de muestra | Esquemas transitorias |            |
|---------------|-------------------|-----------------------|------------|
|               |                   | Incidencia            | Por ciento |
| Grupo Control | 60                | 3                     | 5          |
| Grupo Ozono   | 60                | 0                     | 0          |

Fuente: Historia Clínica

$P = 2443 > 0.05$  no significativo.

TABLA V: CARACTERIZACION DE LOS PACIENTES QUE PRESENTARON ISQUEMIAS TRANSITORIAS

| RIESGOS           | INCIDENCIA |            |            |             |
|-------------------|------------|------------|------------|-------------|
|                   | Paciente 1 | Paciente 2 | Paciente 3 | %           |
| Hipertensión      | x          | x          | x          | 8,8         |
| Diabetes Mellitus | -          | x          | x          | 11,7        |
| Hiperlipemia      | x          | -          | x          | 18,1        |
| Cardiopatías      | x          | -          | x          | 22,2        |
| Edad              | 72         | 76         | 79         | 7,6         |
| Sexo              | F          | M          | M          | F=1,6 M=3,3 |

Fuente: Historia Clínica

Leyenda - F: Femenino M: Masculino %: Por ciento presentó de la muestra que presentaba cada patología que presento ataques de isquemia transitoria.



## HAS OXYGEN-OZONETHERAPY A FUTURE IN MEDICINE?

V. Bocci<sup>1,\*</sup>, I. Zanardi<sup>2</sup>, V. Travagli<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Physiology, <sup>2</sup>Department of Pharmaceutical Chemistry and Technology, University of Siena, Italy

\* Corresponding author: Velio Bocci, MD, Emeritus Professor of Physiology at the University of Siena, Italy Department of Physiology, University of Siena, Via Aldo Moro 2, 53100 Siena, Italy

Phone: +39 (0)577 234226; Fax: +39 (0) 577 234219; E-mail: bocci@unisi.it

### ABSTRACT

This review aims to focus attention on the bio-oxidative therapy from the very beginning to date. While ultraviolet blood irradiation is now hardly performed, oxygen-ozone therapy, after an empirical stage, has grown to be precise and safe. Meantime, there is a renewed interest in the infusion of a dilute solution of hydrogen peroxide in infectious diseases antibiotic-resistant.

On a parallel line of research, hyperbaric oxygen therapy has been already accepted by official medicine for the treatment of specific diseases. Meantime it is unfortunate that, owing to quacks' interest in using ozonated physiologic saline and in claiming to "cure" type-2 diabetes in 20 days with the unprecise rectal ozone administration, ozone therapy is losing hope to be acknowledged as a valid therapeutic approach.

### INTRODUCTION

The first idea of using ultraviolet blood irradiation (UBI), also known as biophotonic therapy or photophoresis for exploiting its bactericidal and tissue-stimulating effects on the disfiguring lupus vulgaris was born in the genial mind of Niels Ryberg Finsen (Nobel Prize for Medicine in 1903) [1]. Like all Nordish people, he loved the light and sunshine and he treated his own disease bathing in the sun. Most importantly he was able to successfully promote this therapy in tuberculosis.

In the 1920s, UBI was popularized by Emmet Knott [2] by treating severe infections but it fell out of use after the power of antibiotics and because Schwartz et al. [3] judged the procedure too empirical. UBI was and is still partly considered useful for pathogen reduction, increase tissue oxygenation, and induction of antioxidant enzymes as well as activation of the immune system.

Another type of bio-oxidative therapy was proposed by Dr. I.N. Love working in St. Louis (USA) when, in 1888, published a paper entitled "Hydrogen peroxide as a remedial agent" [4]. After almost a century, in 1993 Dr. C.H. Farr promoted the use of intravenous administration of a dilute solution (0.03-0.15%) of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in several illnesses, but it hardly became known because Werhly and

Steinbarth [5] had proposed to collect blood in a special quartz ampoule and to expose it for a short time to UV light in the presence of pure oxygen followed by re-infusion into the donor. This method was a re-edition of UBI and it had been mostly criticized because the ampoule had to be sterilized each time for avoiding the risk of viral cross-infections. Unfortunately, such a drawback has occurred in several occasions [6,7]. Moreover, UBI remains an uncertain procedure because one never knows the irradiation efficiency due to progressive decay of the UV source and the variable time of irradiation with a possible damage of blood cells.

Luckily, by the 1970's the physicist Joachim Hansler invented a reliable ozone generator for medical use and Hans Wolff [8] realized the need to expose blood to a mixture of oxygen-ozone in a dispensable, ozone-resistant glass bottle. Wolff deserves the credit for having developed the new type of bio-oxidative therapy in the safe form of ozonated autohemotherapy (AHT).

After three decades, the concept of ozone therapy remains valid because the most recent ozone generators incorporate an UV photometer able to precisely monitor the ozone concentration in real-time. However, as it will be discussed later, the correct procedure is not accepted by all ozonetherapists and several pejorative modifications have been introduced. This is not surprising because in the medical field, drugs and methodologies undergo recurrences. While UBI is hardly used, infusion of a diluted solution of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> has come back to light owing to antibiotic resistance and because H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> has a milder antioxidant potential of 1,78 V compared to ozone, with E° = +2,076V. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> is a physiological molecule considered essential for the cell life and also because during the "oxidative burst" is produced for inactivating pathogens [9].

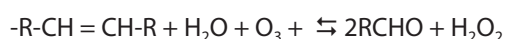
### THE ACTUAL STATE OF ART OF OZONE THERAPY

It is unpleasantly surprising that in the field of complementary medicine oxygen-ozonotherapy is not even mentioned because it is a recent development but mostly because it has no sponsors. Although the development of this topic has clearly shown to be well

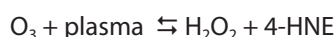
within the classical biochemistry and pharmacology, in contraposition to homeopathy, acupuncture, aromatherapy, Ayurveda and Chinese medicine, it remains unknown. On the other hand there is an ample literature and knowledge of ozone toxicity for the pulmonary system. Indeed as ozone has strong oxidizing properties, it seems paradoxical that this gas may display beneficial effects. Although this appears paradoxical, it has been proven true [10]. On the basis of this synthesis:



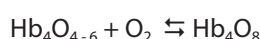
and the fact that the reaction is reversible, it has been shown that ozone readily dissolved in the blood water, releases its energy into hematic components, hence into the body during the reinfusion procedure into the blood donor. Ozone is about ten-fold more soluble in water than oxygen [11,12] and all the basic chemical reactions have been clarified during the last decade [10,13-18]. The therapeutic range has been precisely defined to be within ozone concentrations of 20 (0.42  $\mu\text{M}$ ) - 80 (1.68  $\mu\text{M}$ )  $\mu\text{g}/\text{mL}$  of gas (pure  $O_2$ : 95% and  $O_3$ : 5%) per mL of human blood. Owing to the potent antioxidant capacity of blood due to its hydrophilic, lipophilic and cellular enzymes, a small part of the ozone dose dissolved in the water of plasma is instantly quenched by free antioxidants (mainly uric acid, ascorbic acid and albumin) while the bulk of ozone reacts with polyunsaturated fatty acids (PUFA) mostly present in the three hydrophobic tasks of albumin [19].



Thus the potential energy of ozone is finally transferred into two fundamental messengers such as hydrogen peroxide as a ROS and aldehydic molecules of which 4-hydroxynonenal (4-HNE) is the quantitative relevant lipid oxidation product (LOPs):



Thanks to the high ozone reactivity these biochemical reactions occur in a few seconds and in fact within the canonical five minutes of mixing an average 200 mL of human blood ex vivo in a sterile glass bottle with the 200 mL corresponding volume of the gas mixture ( $O_2+O_3$ ), ozone is totally exhausted while oxygen is solubilized in plasma and fully oxygenates hemoglobin:



Blood oxygenation is useful, but it has only a little practical relevance because hyperoxygenated-ozonated blood is reinfused via venous route into the donor during the next 20 minutes and it is abundantly diluted with venous blood. Therefore ozone represents the medical drug while the oxygen is only necessary for generating ozone.

Which is the fate of  $\text{H}_2\text{O}_2$  and 4-HNE?  $\text{H}_2\text{O}_2$ , being unionized, rapidly enters into all blood cells and the

chemical gradient between plasma-cells is about 10% of the extracellular concentration [20-22]. In other words, when the highest ozone concentration is mixed with blood, depending upon the modest interindividual variability of antioxidant potency (1.28-1.83 mmol/L plasma) [23] the highest  $\text{H}_2\text{O}_2$  concentration measured in plasma is 40-50  $\mu\text{M}$  [24] and therefore inside the cells is at most 4-5  $\mu\text{M}$ . This sudden inflow of this small amount of  $\text{H}_2\text{O}_2$  inside blood cells is the stimulus necessary to activate a series of biochemical reactions as follows:

a) in the erythrocytes: activation of glycolysis with increase of ATP and 2,3-diphosphoglycerate. Functionally, the oxyhemoglobin sigmoid curve shifts to the right and increases the release of oxygen at the tissue level. The erythrocytes mop up most of the  $\text{H}_2\text{O}_2$  and promptly reduce it to water by catalase, thioredoxin, GSH-peroxidase and reduced glutathione (GSH). The sudden formation of GSSG alters the GSH/GSSG ratio but the cell quickly correct it by either extruding some glutathione-disulphide or by reducing it via GSH reductase at the expense of either ascorbic acid or thioredoxin. This important recycling process occurs in about three minutes [25,26]. Alternatively, activation of glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH) provides reducing power and activates glycolysis.

b) in the leukocytes: neutrophil phagocytic activity is enhanced. Inside monocytes and lymphocytes,  $\text{H}_2\text{O}_2$  activates a tyrosin-kinase with consequent phosphorylation of I $\kappa$ B, one of the trimeric components at rest of the NF- $\kappa$ B [27,28]. The phosphorylated I $\kappa$ B detaches from the trimer and it is broken down in the proteasome. The remaining heterodimer p50-p65 is transferred into the nucleus where it can activate about 100 genes. Of great significance it is the final release of some cytokines (IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$  and IL-8) and of some acute-phase proteins [10];

c) in the platelets: in relation to the ozone concentration, we have measured release of PDGF-AB, TGF $\beta$ -1 and IL-8 [29]. Growth factors have a specific relevance in enhancing ulcer's healing.

It must be said that the  $\text{H}_2\text{O}_2$  concentration in the cells (2-5  $\mu\text{M}$ ) is the minimal necessary to switch on cellular responses and it probably lasts few seconds as GSH-Px and catalase promptly reduce it to  $\text{H}_2\text{O}$ . An ozone concentration below 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  gas per ml of blood is most likely totally quenched by the hydrosoluble antioxidants and therefore no biological effects can be elicited and, at the best, the procedure has only a placebo effect. In plasma, the  $\text{H}_2\text{O}_2$  half-life is less than 1 minute and it is absent during blood reinfusion. On the other hand, among a variety of LOPs, 4-HNE remains fairly stable. A small part is broken down at once by enzymes such as GSH-S-transferases and aldehyde dehydrogenase [30] but the bulk forms an adduct with the -SH group of Cys34 present in domain-I of albumin. Furthermore, eleven nucleophilic residues (Lys199 and His146) can also bind up eleven 4-HNE molecules. Thus, owing to the high albumin amount (about 125 g intravascular and 160 g extravascular) the bound alkenals undergo a great dilution

in the body fluids implying a most important loss of toxicity.

An interesting aspect is that albumin can transfer 4-HNE to ALL body tissues, from liver to endocrine glands and the CNS. Thus 4-HNE-Cys adducts can be released at many sites and inform a variety of cells of a transient, acute oxidative stress. At submicromolar or picomolar levels, 4-HNE can act as a well-known signaling molecule [31] able to activate the synthesis of  $\gamma$ -glutamate cysteine ligase,  $\gamma$ -glutamyl transferase,  $\gamma$ -glutamyl transpeptidase, HSP-70, heme-oxygenase-I (HO-1), and antioxidant enzymes such as SOD, GSH-peroxidase, catalase and, last but not least important, G6PDH, a critical enzyme electron-donor during erythropoiesis in the bone marrow. There is a wide consensus on the relevance of the induction of protective molecules during small but repeated oxidative stress [32-38]. In other words, the concept that a precisely controlled oxidative stress can strengthen the antioxidant defenses is well accepted today and represents a conditioning or adaptation effect. At the time of ozonated blood infusion, 4-HNE-Cys adduct can also act on the vast expanse of endothelial cells and enhance the production of NO. This crucial mediator on its own or as a nitrosothiol, with trace of CO released with bilirubin via HO-1 activity allows vasodilation, thus improving tissue oxygenation in ischemic tissues. H<sub>2</sub>S is another potentially toxic molecule that, when released in trace amounts, becomes another important physiological mediator like NO and CO [39,40].

Another very interesting aspect observed in 67-78 years old subjects affected by the dry form of age-related macular degeneration (ARMD) is that a majority of them report a feeling of euphoria and a sense of wellness and physical energy throughout the ozonotherapy cycle of 14-16 treatments lasting about two months [41]. Whether these feelings are simply due to faith in the medical treatment (the power of the mind!), i.e. the power of the placebo effect [42] or is caused by the generated ozone messengers able to modify or improve the hormonal secretion is not yet known. Unfortunately, lack of funds has always prevented to perform a study in normal volunteers where, before and after ozonotherapy, the complete hormonal pattern and cycling in the plasma throughout the 24 hours could have been determined. This study would be very informative and helpful to understand why the patients experiment a feeling of well-being. This may be due to improved oxygenation or/and enhanced secretion of hGH, cortisol, and DHEA. Patients with arthrosis pain have also reported a marked improvement and less pain that may be due to release of ACTH-cortisol or to a limited stimulation of COX-2 with enhanced release of prostacyclin (PGI<sub>2</sub>). It is also possible that LOPs reaching the hypothalamic area improve the release of neurotransmitters such as serotonin, dopamine, and endorphins as it has been observed after an intense physical exercise [43-45].

It is important to note that neither acute nor chronic toxicity has been ever observed during or after ozone therapy. Several studies [17,19,46] performed to evaluate

possible hematochemical biochemical enzymatic modifications have clearly demonstrated that ozone concentrations of 20-80 (even up 160)  $\mu\text{g/mL}$  of gas per mL of blood do not damage blood cells or other components. Indeed during the ozonation process no more than 35 % of the total antioxidant capacity is oxidized and it is noteworthy that is reconstituted during the next twenty minutes in vitro and in a shorter time in vivo [47]. Is it possible that ozone can oxidize the phospholipids and cholesterol of the cell membrane? The demonstration that the negative electric charge of the erythrocytic membrane is unmodified even after ozonation at 80  $\mu\text{g/mL}$  ozone per ml of blood excludes this possibility. It is well known that blood cell membranes are always shielded by a cloud of albumin molecules able to prevent any ozone attack that it has been suggested by some Authors, who claim to have noticed an increased flexibility (or an enhanced filterability) of erythrocytes after ozonation. These sort of claims have been mentioned before during UBI and, if correct, may have been due to excessive irradiation and oxidation or may well have happened during ozonation of saline-washed erythrocytes [48]. Unfortunately too many artificial experiments performed with saline-washed cells totally deprived of the plasmatic antioxidants have led to wrong conclusions [49]. Moreover the validity of an objective biochemical analysis carried out last century on UBI by practitioners remains doubtful.

#### **A BRIEF COMMENT REGARDING THE EFFICACY AND SAFETY OF ADMINISTRATION PROCEDURES**

Of the several procedures currently used for ozone administration on the basis of previous data it is suggested to use either the classical major ozonated autohemotherapy [14] or the quasi-total body exposure to oxygen-ozone (QTBE) [50]. This second approach is very appealing because with the ozonotherapist's guidance can be done at home at any time. With the exception of the neck and head (to absolutely prevent ozone inhalation) all the remaining body surface (about 1.4-1.5 m<sup>2</sup>) becomes in contact with a final concentration of 0.5-0.9  $\mu\text{g/mL}$  within a tightly closed ozone resistant cabinet where the temperature via a thermostat can be regulated between 30-42 °C and 100% relative humidity. This ozone concentration is about 30-fold lower than the one used in the topical treatment of skin ulcers [51]. The subject is comfortably seated inside almost nude and with her/his wet skin surface. This is important because ozone immediately reacts with sweat and lipids normally secreted by sebaceous glands. The skin, while is fairly sensitive to high level of ozone [52-55], it tolerates well environmentally realistic level. The QTBE has also the advantage to avoid venipuncture that is sometimes difficult to perform in women.

The extracorporeal blood ozonation within an ozone-resistant gas exchange device has limited value because it is invasive (two venipuncture with G16 needles), more

complex and expensive. It can be used only in patients at the risk of either amputation or after a stroke or a heart infarction. On the other hand the rectal insufflation of gas is easy to perform, practically risk-free but it is unreliable because the effective ozone dose acting on the luminal content remains uncertain. Moreover in Europe not all patients accept this procedure.

#### WHICH ARE THE PATHOLOGIES MORE SUITABLE TO BE TREATED WITH OZONETHERAPY?

Clinical results so far available have been objectively discussed elsewhere [56] showing that ozonotherapy is often more useful than orthodox treatments in a **first category** of diseases such as:

a) osteomyelitis, pleural empyema, abscesses with fistulae, infected wounds, bed sores, chronic ulcers, diabetic foot and burns.

b) advanced ischaemic diseases (hind-limb ischemia and heart ischemia, possibly also stroke, when the patients arrive too late for thrombolysis).

c) age-related macular degeneration (atrophic form) because orthodox ophthalmology does not provide a meaningful treatment.

d) orthopaedic diseases and localized osteoarthritis.

e) chronic fatigue syndrome and fibromyalgia.

f) dentistry regarding primary root carious lesions, particularly in children.

g) stomatology for chronic or recurrent infections in the oral cavity.

For these pathologies ozone is a real "wonder" drug.

In a **second category** of diseases including:

a) acute and chronic infectious diseases, particularly due to antibiotic or chemoresistant bacteria, virus and fungi (hepatitis, hiv-aids, herpetic infections and herpes zoster, papillomavirus infections, onychomycosis and candidiasis, giardiasis and cryptosporidiosis) ozonotherapy represent only a useful support because neither ozone, nor H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> reach the concentration where free pathogens are protected by plasma antioxidants [57]. Intracellular viruses are inaccessible

b) cancer-related fatigue, ozone therapy, associated with orthodox treatments, may accelerate and improve the outcome. However so far ozonotherapy has been unable to "cure" cancer.

There is a **third category** of serious diseases such as:

a) autoimmune diseases (multiple sclerosis, rheumatoid arthritis, crohn's disease, psoriasis).

b) senile dementias.

c) pulmonary diseases (emphysema, asthma, chronic obstructive pulmonary disease, idiopathic pulmonary fibrosis and acute respiratory distress syndrome).

d) skin diseases (psoriasis and atopic dermatitis).

e) metastatic cancer.

f) severe sepsis and multiple organ dysfunction, where the combination of orthodox treatments and ozone therapy, at least on theoretical ground, may be helpful but real clinical evidence is lacking. Anecdotal data

are encouraging but in most cases achieved by using several types of therapy.

Whether ozone therapy with the advantages of low cost and no adverse effects, may equal the efficacy of current conventional treatments remains to be explored. However, how and when will we be able to perform these investigations standing the actual situation of total disinterest of Health Authorities, lack of specific sponsors and the overwhelming power of pharmaceutical industries, which are only interested in pursuing their objectives. Ironically, it is possible that less developed countries with minimal budgets may have an interest in performing pilot trials that can give us precious informations regarding the usefulness of ozone therapy.

A **fourth category** of diseases such as retinitis pigmentosa, sudden hearing loss and tinnitus where ozone therapy does not yield real therapeutic results must be mentioned. However when ozonotherapy is applied for compassionate reasons, especially in young patients or patients in the acute phase, may yield some benefit that, even temporary, helps anguished patients.

In Table 1 tentative guidelines regarding ozone concentrations within the therapeutic window to be used in different pathologies with the classical ozonated AHT, at least twice weekly are reported. Ozone concentrations are slowly upgraded no more than 5 µg/ml at a time, to achieve the adaptation to oxidative stress in 2-3 weeks.

Table 1 - Proposed O<sub>3</sub> concentrations (µg/ml of gas per ml of blood) in different pathologies

| Pathology             | Initial | Final |
|-----------------------|---------|-------|
| infectious diseases   | 20-25   | 70    |
| vascular diseases     | 20      | 40-50 |
| degenerative diseases | 20      | 30-40 |
| respiratory diseases  | 15      | 30-40 |
| autoimmune diseases   | 20-40   | 80    |
| metastatic tumours    | 25      | 70-90 |

The examination of the table indicates that: firstly, the idea "more is better" is not always appropriate for ozone and its concentration must be calibrated in relation to the effector and target cells; secondly, the frequency of treatment depends on the type and stage of the disease: from daily to two per week, until necessary and thirdly, the urgent need of further clinical experimentation with appropriate controls to generate definitive clinical data.

Clinical trials are demanding enterprises that require a concerted effort by official medicine and government authorities because the permission of Ethical Committees is indispensable. A simple but valid randomized study in 100 patients with a control arm (50) using the best orthodox therapy and the experimental arm (50) using well-performed ozone therapy plus the basic therapy even if it is not too expensive, still requires about € 150.000 for

covering insurance, hospital fees, materials and laboratory plus clinical exams. National Health authorities, which are always complaining about the increasing costs of medical assistance, could have an economical advantage if ozonotherapy was widespread and organized in a systematic way in all public hospitals. Although hard data to support this contention are not available, it is likely that the benefit of ozone therapy does outweigh its cost, particularly for the above mentioned first category of diseases. In a public hospital, as an example, ten nurses, under the supervision of an ozonotherapist could easily perform the therapy in about 15 patients per hour. As things are today, it is depressing to realize that ozone therapy will not be applied in public hospitals for years to come, thus depriving many patients of the possibility of restoring their health. On the other hand, some Countries have so many patients and so few resources for treating them that physicians are apparently forced to use procedures such as the infusion of ozonated saline or indiscriminately the rectal insufflation to everyone. This is a very poor compromise because it hinders a real medical progress.

#### MAY OXYGEN OZONETHERAPY HAVE A FUTURE IN MEDICINE?

This is an awkward question that needs an objective discussion because all ozonotherapists must understand that ozonotherapy is objected and whenever possible obstructed. Moreover in most countries there are three or more Ozonotherapy Associations fighting for supremacy. This is simply ridiculous and inadmissible because simply due to either a different medical speciality or petty commercial interests relative to ozone generators and ancillary materials. This disunity prevents pursuing the fundamental interest of performing valid clinical trials, which are essential for progress. Unless we are able to provide convincing evidence that ozonotherapy is not a panacea but it is useful in some diseases, ozonotherapy will remain in limbo.

In countries with small resources such as Cuba and surprisingly in the Russian Federation, it has been established to use in all patients either the rectal insufflation or the infusion of ozonated saline, respectively. They have presented clinical results such as the "cure in diabetic patients with only twenty daily treatments (10 mg daily for twenty sessions) or excellent results in all diseases with the infusion of few bottles of ozonated saline. This ozonated saline solution, although cheap and quick to deliver, at low ozone concentrations acts as a placebo or it can be toxic. Foksinski et al. [58], after the infusion of 500 mL of ozonated saline, detected 8-oxodeoxyguanosine, a typical oxidative DNA marker, in lymphocytes of atherosclerotic patients. If this was not enough there are some physicians still delivering the gas mixture intravenously with the risk of oxygen embolism and patient's death. Other ozonotherapists, for stinginess, use potentially toxic plastic bags instead of the safe, ozone-resistant glass bottles. Any time this happens ozone therapy loses any possibility to be seriously considered.

Official medicine that is not also free of mishaps owing to the urgency of recovering money spent by big pharmaceuticals, follows the rule of the Helsinki regulations and often achieves valid clinical results.

On this basis, the danger of jeopardizing ozone therapy is high and all ozonotherapists must understand this risk and try to follow only well-established guidelines.

#### CONCLUDING REMARKS

Various types of bio-oxidative therapy have been proposed but today the classical ozone therapy or/and infusion of a dilute solution of hydrogen peroxide appear the safest and useful provided that they are correctly performed. All ozonotherapists must now realize that the future of these procedures depends upon the demonstration achieved by valid clinical trials that they are efficacious and without side-effects. Ineffective compromises will hinder for ever the acceptance of bio-oxidative therapy by official medicine.

---

#### REFERENCES

1. Møller KI, Kongshøj B, Philipsen PA, Thomsen VO, Wulf HC. How Finsen's light cured lupus vulgaris. *Photodermatol Photoimmunol Photomed* 2005;21:118-24.
2. Knott EK. Development of ultraviolet blood irradiation. *Am J Surg* 1948;76:165-71.
3. Schwartz SO, Kaplan SO, Stengle J, Stevenson FL, Vincenti M. Ultraviolet irradiation of blood in man; studies of sixty-eight patients. *J Am Med Assoc* 1952;149:1180-3.
4. Love IN. Peroxide of hydrogen as a remedial agent. *Am Med Assoc* 1888; X: 262-265.
5. Wehrli F, Steinbart H. Erfahrungen mit der Haematogenen Oxydations-Therapie (HOT). *Ars Medici* 1954;10:44-51.
6. Gabriel C, Blauhut B, Greul R, Schneeweis B, Roggendorf M. Transmission of hepatitis C by ozone enrichment of autologous blood. *Lancet* 1996;347:541.
7. Webster GJ, Hallett R, Whalley SA, Meltzer M, Balogun K, Brown D, Farrington CP, Sharma S, Hamilton G, Farrow SC, Ramsay ME, Teo CG, Dusheiko GM. Molecular epidemiology of a large outbreak of hepatitis B linked to autohaemotherapy. *Lancet* 2000;356:379-84.
8. Wolff H. Das medizinische Ozon. Theoretische Grundlagen, therapeutische Anwendungen (Gebundene Ausgabe). Verlag für Medizin, Heidelberg, 1979.

9. Forman HJ. Hydrogen peroxide: The good, the bad and the ugly. In: Valacchi G, Davis P, Eds. *Oxidants in biology*. The Netherlands: Springer; 2008. pp 1-17.
10. Bocci V, Borrelli E, Travagli V, Zanardi I. The ozone paradox: ozone is a strong oxidant as well as a medical drug. *Med Res Rev* 2009;29:646-82.
11. Battino R, Rettici TR, Tominaga T. The solubility of oxygen and ozone in liquids. *J Phys Chem Ref Data* 1983;12:163-78.
12. Alborzfar M, Escande K, Allen SJ. Removal of 3,4-dichlorobut-1-ene using ozone oxidation. *Water Res* 2000;34:2963-70.
13. Pryor WA, Squadrito GL, Friedman M. The cascade mechanism to explain ozone toxicity: The role of lipid ozonation products. *Free Radical Biol Med* 1995;19:935-41.
14. Bocci V. *Ozone. A new medical drug*. 1st edition. Springer, Dordrecht, The Netherlands, 2005.
15. Bocci V. Scientific and medical aspects of ozone therapy. State of the art. *Arch Med Res* 2006;37:425-35.
16. Bocci V, Aldinucci C. Biochemical modifications induced in human blood by oxygenation/ozonation. *J Biochem Mol Toxicol* 2006;20:133-8.
17. Travagli V, Zanardi I, Silviotti A, Bocci V. A physicochemical investigation on the effects of ozone on blood. *Int J Biol Macromol* 2007;41:504-11.
18. Bocci V, Zanardi I, Michaeli D, Travagli V. Mechanisms of action and chemical-biological interactions between ozone and body compartments: a critical appraisal of the different administration routes. *Curr Drug Ther* 2009;4:159-73.
19. Travagli V, Zanardi I, Bernini P, Nepi S, Tenori L, Bocci V. Effects of ozone blood treatment on the metabolite profile of human blood. *Int J Toxicol* 2010, in press. DOI: 10.1177/1091581809360069
20. Antunes F, Cadenas E. Estimation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> gradients across biomembranes. *FEBS Lett* 2000;475:121-6.
21. Stone JR, Collins T. The role of hydrogen peroxide in endothelial proliferative responses. *Endothelium* 2002;9:231-8.
22. Stone JR, Yang S. Hydrogen peroxide: A signaling messenger. *Antioxid Redox Signal* 2006;8:243-70.
23. Miller NJ, Rice-Evans C, Davies MJ, Gopinathan V, Milner A. A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clin Sci* 1993;84:407-12.
24. Valacchi G, Bocci V. Studies on the biological effects of ozone: 11. Release of factors from human endothelial cells. *Mediat. Inflamm* 2000;9:271-6.
25. Mendiratta S, Qu ZC, May JM. Erythrocyte ascorbate recycling: antioxidant effects in blood. *Free Radic Biol Med* 1998;24:789-97.
26. Mendiratta S, Qu ZC, May JM. Enzyme-dependent ascorbate recycling in human erythrocytes: role of thioredoxin reductase. *Free Radic Biol Med* 1998;25:221-8.
27. Sen R, Baltimore D. Inducibility of kappa immunoglobulin enhancer-binding protein Nf-kappa B by a posttranslational mechanism. *Cell* 1986;47:921-8.
28. Baeuerle PA, Henkel T. Function and activation of NF-kappa B in the immune system. *Annu Rev Immunol* 1994;12:141-79.
29. Valacchi G, Bocci V. Studies on the biological effects of ozone: 10. Release of factors from ozonated human platelets. *Mediat. Inflamm* 1999;8:205-9.
30. Awasthi YC, Ansari GA, Awasthi S. Regulation of 4-hydroxynonenal mediated signaling by glutathione S-transferase. *Methods Enzymol* 2005;401:379-407.
31. Poli G, Schaur RJ, Siems WG, Leonarduzzi G. 4-hydroxynonenal: a membrane lipid oxidation product of medicinal interest. *Med Res Rev* 2008;28:569-631.
32. Takahashi Y, Takahashi S, Yoshimi T, Miura T, Mochitate K, Kobayashi T. Increases in the mRNA levels of  $\gamma$ -glutamyltransferase and heme oxygenase-1 in the rat lung after ozone exposure. *Biochem Pharmacol* 1997;53:1061-4.
33. Dianzani MU. 4-Hydroxynonenal and cell signalling. *Free Radic Res* 1998;28:553-60.
34. Cheng JZ, Sharma R, Yang Y, Singhal SS, Sharma A, Saini MK, Singh SV, Zimniak P, Awasthi S, Awasthi YC. Accelerated metabolism and exclusion of 4-hydroxynonenal through induction of RLIP76 and hGST5.8 is an early adaptive response of cells to heat and oxidative stress. *J Biol Chem* 2001;276:41213-23.
35. Yang YS, Sharma R, Sharma A, Awasthi S, Awasthi YC. Lipid peroxidation and cell cycle signaling: 4-hydroxynonenal, a key molecule in stress mediated signaling. *Acta Biochim Pol* 2003;50:319-36.
36. Petersen DR, Doorn JA. Reactions of 4-hydroxynonenal with proteins and cellular targets. *Free Radic Biol Med* 2004;37:937-45.
37. Poole LB, Karplus PA, Claiborne A. Protein sulfenic acids in redox signaling. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2004;44:325-47.
38. Markovitch D, Tyrrell RM, Thompson D. Anticipation of subsequent demanding exercise increases the expression of haem oxygenase-1 mRNA in human lymphocytes. *Stress* 2008;11:79-82.
39. Nakao A, Sugimoto R, Billiar TR, McCurry KR. Therapeutic antioxidant medical gas. *J Clin Biochem Nutr* 2009;44:1-13.
40. Calabrese EJ. Getting the dose-response wrong: why hormesis became marginalized and the threshold model accepted. *Arch Toxicol* 2009;83:227-47.
41. Bocci V. *Retinal degenerative disorders. Ozone. A new medical drug*. 1st edition. Springer, Dordrecht, The Netherlands, 2005. pp 132-144.
42. Benson H, Friedman R. Harnessing the power of the placebo effect and renaming it "remembered wellness". *Annu Rev Med* 1996;47:193-9.
43. Viru A, Tendzegolskis Z. Plasma endorphin species during dynamic exercise in humans. *Clin Physiol* 1995;15:73-9.
44. Hilbert JE, Sforzo GA, Swensen T. The effects of massage on delayed onset muscle soreness. *Br J Sports Med* 2003;37:72-5.
45. Michaud K, Matheson K, Kelly O, Anisman H. Impact of stressors in a natural context on release of cortisol in healthy adult humans: a meta-analysis. *Stress* 2008;11:177-97.
46. Travagli V, Zanardi I, Bocci V. A realistic evaluation of the action of ozone on whole human blood. *Int J Biol Macromol* 2006;39:317-20.

47. Bocci V, Valacchi G, Corradeschi F, Aldinucci C, Silvestri S, Paccagnini E, Gerli R. Studies on the biological effects of ozone: 7. Generation of reactive oxygen species (ROS) after exposure of human blood to ozone. *J Biol Regul Homeost Agents* 1998;12:67-75.
48. Goldstein BD, Balchum OJ. Effect of ozone on lipid peroxidation in the red blood cell. *Exp Biol Med* 1967;126:356-358.
49. Cataldo F, Gentilini L. Chemical kinetics measurements on the reaction between blood and ozone. *Int J Biol Macromol* 2005;36:61-5.
50. Bocci V, Borrelli E, Valacchi G, Luzzi E. Quasi-total-body exposure to an oxygen-ozone mixture in a sauna cabin. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol* 1999;80:549-54.
51. Werkmeister H. Dekubitalgeschwüre und die Behandlung mit der Ozon-Unterdruckbegasung In: Viebahn-Hänsler R, Knoch HG, Eds. *Ozon-Handbuch. Grundlagen. Prävention. Therapie.* Ecomed, Landsberg, 2001. pp. V-7.1 1-V-7.1 22.
52. Thiele JJ, Traber MG, Tsang K, Cross CE, Packer L. In vivo exposure to ozone depletes vitamins C and E and induces lipid peroxidation in epidermal layers of murine skin. *Free Radic Biol Med* 1997;23:385-91.
53. Thiele JJ, Traber MG, Polefka TG, Cross CE, Packer L. Ozone-exposure depletes vitamin E and induces lipid peroxidation in murine stratum corneum. *J Invest Dermatol* 1997;108:753-7.
54. Thiele JJ, Hsieh SN, Briviba K, Sies H. Protein oxidation in human stratum corneum: susceptibility of keratins to oxidation in vitro and presence of a keratin oxidation gradient in vivo. *J Invest Dermatol* 1999;113:335-9.
55. Valacchi G, van der Vliet A, Schock BC, Okamoto T, Obermuller-Jevic U, Cross CE, Packer L. Ozone exposure activates oxidative stress responses in murine skin. *Toxicology* 2002;179:163-70.
56. Bocci V. *Ozone. A new medical drug.* 2nd edition. Springer, Dordrecht, The Netherlands, 2010.
57. Burgassi S, Zanardi I, Travagli V, Montomoli E, Bocci V. How much ozone bactericidal activity is compromised by plasma components? *J Appl Microbiol* 2009;106:1715-21.
58. Foksinski M, Bialkowski K, Skiba M, Ponikowska I, Szmurlo W, Olinski R. Evaluation of 8-oxodeoxyguanosine, typical oxidative DNA damage, in lymphocytes of ozone-treated arteriosclerotic patients. *Mutat Res* 1999;438:23-7.



## EFFECT OF OZONE THERAPY ON REDOX STATUS IN EXPERIMENTALLY INDUCED ARTHRITIS

**M.Nabil.Mawsouf\***, **Maha.M. El-Sawalhi\*\***, **G. Martínez-Sánchez\*\*\***, **Hebatalla A. Darwish\*\***  
and **Amira A. Shaheen\*\***, **L. Re\*\*\*\***

\*Ozone Therapy Unit, National Cancer Institute, Cairo University, Egypt

\*\*Biochemistry Department, Faculty of Pharmacy, Cairo University, Egypt

\*\*\*CEIEB-IFAL, University of Havana, Cuba

\*\*\*\*Pharmacology, D.I.S.M.A.R., University of Ancona, Italy

### Correspondence

Prof. Lamberto Re, Pharmacology, D.I.S.M.A.R.,

University of Ancona,

Via Breccie Bianche, 60128 Ancona,

Italy

Mail: lambertore@univpm.it.

Phone: 071731076

Fax: 071731347

### Abstract

Controlled ozone administration has been shown to promote an adaptation to oxidative stress by increasing endogenous antioxidant systems. In the present study, the effects of O<sub>2</sub>/O<sub>3</sub> administration either prophylactically or therapeutically on the alterations of oxidant status in adjuvant-induced arthritis in rats have been studied. Seven groups of rats were used: 1) normal control group; 2) control arthritic group (21 days); 3) prophylactic ozone group: arthritic rats received fifteen intra-rectal applications of O<sub>2</sub>/O<sub>3</sub> at 0.5, 0.7 and 1 mg/kg b.w. in a 5-6 mL volume starting one day before adjuvant inoculation and continued as five applications/week over 21 days; 4) oxygen group: received oxygen (vehicle of ozone) in a similar schedule to group 3; 5) control arthritic group (24 days); 6) therapeutic-ozone group: arthritic rats received 10 intra-rectal applications of O<sub>2</sub>/O<sub>3</sub> at 0.5, 0.7 and 1 mg/kg b. w. in a 5-6 mL volume daily for 10 days starting fourteen days after adjuvant inoculation; 7) oxygen-treated group: received oxygen in a similar schedule of group 6. The effect of O<sub>2</sub>/O<sub>3</sub> administration was assessed by measuring: blood glutathione (GSH), erythrocyte glutathione peroxidase and catalase activities, serum levels of protein thiols (PrSH), malondialdehyde (MDA) and nitrite/nitrate (NO<sub>2</sub>/NO<sub>3</sub>), as well as serum ceruloplasmin activity (CP). The present study showed that adjuvant-induced arthritis in rats caused a significant (p<0.05) reduction in blood GSH, serum PrSH levels and erythrocyte antioxidant enzyme activities accompanied by a significant (p<0.05) increase in serum levels of MDA, NO<sub>2</sub>/NO<sub>3</sub> and CP activity. Ozone administration either prophylactically or

therapeutically normalize blood GSH, serum PrSH and MDA levels and restored erythrocyte antioxidant enzyme activities. However ozone did not significantly (p>0.05) modify serum NO<sub>2</sub>/NO<sub>3</sub> level in induced rat but significant (p<0.05) increase CP activity. So it could be concluded that O<sub>2</sub>/O<sub>3</sub> oxidative preconditioning / postconditioning effectively modulate the antioxidant/oxidant balance associated with adjuvant arthritis model in rats.

**Key words:** Ozone, oxidative preconditioning, oxidative postconditioning experimental arthritis

### Introduction

Ozone therapy as a complementary medical approach has been known for more than four decades. The main areas where that kind of treatment could be useful include resistant infectious diseases, autoimmune diseases, neurodegenerative diseases, orthopedic pathologies and vascular disorders<sup>1</sup>. With the advent of precise medical ozone generator, currently ozone therapy have been marked with growing recognition of the use of appropriate and judicious doses making this therapy useful with valuable biological effects<sup>2</sup>. The use of calculated, standardized ozone doses has been found to induce a transient acute oxidative stress condition which is not deleterious but is capable of eliciting a multiple useful biological responses. The effect could be seen in activation of antioxidant defense system, improvement of circulation, oxygen delivery, and trophic processes in tissues as well as enhancement of autocoids, growth factors and cytokine release<sup>3</sup>.



Several experimental studies have demonstrated that controlled ozone administration could bring about a state of ozone oxidative preconditioning (O<sub>3</sub>OP) or adaptation to oxidative stress, preventing the damage caused by reactive oxygen species (ROS) generated in various experimental models. These include; carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity<sup>4</sup>, hepatic ischemia-reperfusion injury<sup>5</sup>, cisplatin-induced acute renal failure<sup>6</sup>, chronic renal failure induced by subtotal nephrectomy<sup>7</sup> and streptozotocin-induced diabetes in rats<sup>8</sup>. More recently is also demonstrated that the oxidative postconditioning can be cytoprotective in different experimental model of diseases<sup>9,10</sup>. Experimental arthritis induced by adjuvant is an experimental model of systemic inflammatory autoimmune disease that shares many features with human rheumatoid arthritis. It involves most of the joints and associated tissues<sup>11</sup>. Although the etiology of rheumatoid arthritis is not fully elucidated, autoimmune destruction of the affected tissues plays a pivotal role in the incidence and progression of the diseases<sup>12</sup>.

In addition excessive generation of free radicals and formation of lipid peroxide in target tissues of inflammation are, also, considered as the most common factors implicated in tissue damage in rheumatoid arthritis<sup>13</sup> and experimental arthritis<sup>14</sup>. Thus, a state of oxidative preconditioning such that achieved with controlled ozone therapy may potentially be able to readjust the redox imbalance in adjuvant arthritis and attenuate the progression of the disease.

The aim of the current work was to investigate the role of ozone, as prophylactic or therapeutic agent, in correcting the redox imbalance and the biochemical changes associated with adjuvant-induced arthritis in rats.

### Materials and Methods

**Animals:** Adult male albino rats of Wistar strain, 200-250 g weight were obtained from Egyptian Organization for Biological Products and Vaccines (Cairo, Egypt). Rats were housed in plexiglass cages, maintained in an air-filtered and temperature-conditioned (20 °C - 22 °C) room with a relative humidity of 50 % - 52 % and under an artificial light/dark cycle of 12 h. Animals were fed with standard laboratory chow and water *ad libitum*. Procedures involving animals and their care were conducted in conformity with the institutional guidelines that are in compliance with national and international (EEC Council Directive 86/ 609, OJL 358, 1, 12 December 1987; *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*, US National Research Council, 1996) laws and policies.

**Chemicals:** Complete Freund's adjuvant (Difco laboratories, Detroit, USA) was used for induction of arthritis in rats. It consists of 0.05% heat killed *Mycobacterium butyricum* suspended in mineral oil. All other chemicals were of analytical pure grade supplied from Sigma-Aldrich St. Louis (USA).

**Ozone generation:** Ozone was generated just before applied by ozone generator system [EXT120-T] (Longevity-

resovces Inc., Canada – ETL approved for proven quality and safety). Ozone obtained from medical grade oxygen represented about 0.4-0.5 % (1 µg/mL – 120 µg/mL) of the gas mixture. The ozone concentration was measured by using a build-in UV spectrophotometer at 254 nm.

### Experimental design

**Induction of adjuvant arthritis:** It was induced in rats by a single subcutaneous injection of 0.25 mL of complete Freund's adjuvant into the palmar surface of the right hind foot pad<sup>15</sup>. The peak of adjuvant polyarthritis was reached after 14 days from adjuvant inoculation.

### Ozone treatment

Ozone was given by intra-rectal application using 20 mL silicone-coated disposable syringe and rectal catheter. Fixed volumes of the O<sub>3</sub>/O<sub>2</sub> mixture were administered according to the animal weight so as to reach a final O<sub>3</sub> dose. This route of administration was considered as most useful and easy procedure in rats<sup>16</sup>.

For studying the prophylactic or therapeutic effects of ozone on the adjuvant arthritis model, the arthritic rats were divided equally into six groups of eight rats each. The first (prophylactic O<sub>3</sub>/O<sub>2</sub> group) received 15 intra-rectal applications of O<sub>3</sub>/O<sub>2</sub> over three weeks starting one day before adjuvant inoculation. O<sub>3</sub>/O<sub>2</sub> mixture was given as five applications per week. It was started with a relatively low dose of ozone as 0.5 mg/kg b.w./day in the first week, increased to 0.7 mg/kg b.w./day in the second week and ended with 1 mg/kg b. w./day in the third week. The volume of O<sub>3</sub>/O<sub>2</sub> mixture administered was 5-6 mL/rat according to the animal weight. The second arthritic group received oxygen only (as a vehicle for ozone) in a similar schedule to the first group. The third group of arthritic rats was kept without treatment throughout 21 days and served as a control (arthritic 21 days) for the above two groups. The fourth arthritic group (therapeutic ozone group) received 10 intra-rectal applications of O<sub>3</sub>/O<sub>2</sub> mixture starting fourteen days after adjuvant inoculation. The treatment was started by a daily dose of 0.5 mg/kg b.w. for 3 days, followed by 0.7 mg/kg b.w. for another 3 days and ended with one mg/kg b.w. for 4 days. The volume of O<sub>3</sub>/O<sub>2</sub> mixture administered was 5-6 mL/rat according to the animal weight. The fifth arthritic group received oxygen only 14 days after adjuvant inoculation in a similar way to the fourth group. The sixth arthritic group was kept without treatment throughout 24 days and served as a control (arthritic 24 days) for the fourth and fifth groups. A group of normal rats left without any treatment and served as a control (non arthritic) group for all the above groups. All the groups were kept under the same conditions during the whole experiment.

At the end of the experimental periods, the animals were sacrificed and the blood was collected in heparinized and non-heparinized tubes, an aliquot of heparinized blood was used to assay glutathione (GSH)<sup>17</sup>. Another

aliquot of heparinized blood was lysed directly in ice cold distilled water (5% v/v) and used for the determination of catalase activity (CAT; EC 1.11.1.6)<sup>18</sup>. The remaining heparinized blood was centrifuged for 10 min at 3000 g for the separation of red cells used to measure the glutathione peroxidase activity (GPx; EC 1.11.1.9)<sup>19</sup>. On the other hand the non-heparinized blood was allowed to clot and the separated serum were used for the estimation of malondialdehyde (MDA)<sup>20, 21</sup>; protein thiols (PrSH)<sup>22</sup> and nitrite/nitrate (NO<sub>2</sub>/NO<sub>3</sub>) levels<sup>23</sup> as well as ceruloplasmin (CP) activity<sup>24</sup>.

### Statistical Analysis

Initially the OUTLIERS preliminary test for detection of error values was applied as a first step in the statistical analysis. After this, the homogeneity of variance test (Bartlett-Box) was used. Values are given as means  $\pm$  SD. The level of statistical significance was taken at  $p < 0.05$ , using one way ANOVA followed by Tukey-Kramer's multiple comparisons test to judge the difference between various groups. The SPSS software package version 10, 2000 was used for all statistical analyses.

### Results

Blood antioxidant levels in arthritic rats subjected to prophylactic and therapeutic intra-rectal application of ozone: The results for these parameters are shown in table 1 and 2. Data demonstrated that 21 or 24 days after adjuvant inoculation, arthritic rats exhibited a significant ( $p < 0.05$ ) reduction in blood GSH and serum PrSH levels. The reduction was extended, also, to include GPx and CAT activities as compared to the normal values.

Intra-rectal application of O<sub>3</sub>/O<sub>2</sub> as prophylactic therapy (table 1), caused a significant ( $p < 0.05$ ) elevation in blood GSH, serum PrSH, erythrocyte GPx and CAT activities as compared to the values present in arthritic animals. In the same way, therapeutic intra-rectal application of O<sub>3</sub>/O<sub>2</sub> mixture (table 2) successfully restored these blood antioxidants to levels approaching or exceeding the normal values.

Serum levels of MDA and NO<sub>2</sub>/NO<sub>3</sub> as well as CP activity in arthritic rats subjected to prophylactic or therapeutic intra-rectal application of ozone: As indicated in table 3 and 4, adjuvant-induced arthritis caused a significant ( $p < 0.05$ ) increase in serum levels of MDA, NO<sub>2</sub>/NO<sub>3</sub> and CP activity after both 21 or 24 days of adjuvant inoculation. These data, demonstrated that prophylactic intra-rectal application of O<sub>3</sub>/O<sub>2</sub> mixture (table 3) normalize serum MDA level of arthritic induced rats, but failed to exert any change in serum NO<sub>2</sub>/NO<sub>3</sub> level of these rats. Meanwhile, O<sub>3</sub>/O<sub>2</sub> pretreatment provided a further elevation of serum CP activity to a level exceeding the arthritic values. Therapeutic intra-rectal application of O<sub>3</sub>/O<sub>2</sub> mixture (table 4) caused a significant ( $p < 0.05$ ) reduction in serum MDA level to approach the normal value, together with further elevation of CP activity than the arthritic levels. Meanwhile

serum NO<sub>2</sub>/NO<sub>3</sub> of arthritic rats was not significantly changed in response ozone treatment.

The results clearly showed that intra-rectal application of O<sub>2</sub> (as a vehicle of O<sub>3</sub>) in prophylactic and therapeutic treatment did not affect any of the measured parameters compared to the values of arthritic rats.

### Discussion

The involvement of ROS in chronic inflammatory conditions such as rheumatoid arthritis and adjuvant induced-arthritis is well documented. ROS once generated provoke deleterious effects on various cellular components, among which are membrane lipids that are extensively subjected to peroxidation. Aggravation of arthritis was reported to be associated with enhancement of lipid peroxidation<sup>25</sup>.

In the present study, overproduction of ROS in adjuvant arthritis model leads to a considerable oxidant stress as indicated by a high serum level of MDA, a marker of lipid peroxidation, as well as consumption of blood antioxidants such as GSH and PrSH. The marked increase in serum MDA was observed in arthritic rats in line with our results; in arthritic rats model<sup>26-28</sup>, and in rheumatoid arthritis patients<sup>29</sup>. Increased lipid peroxide in arthritic rats is exacerbated by the decline in blood antioxidants. Similar results about GSH were reported in arthritic rats model and rheumatoid arthritis patients respectively<sup>30, 31</sup>. In the same line, a marked decrease in GSH concentration was observed in the joint articular cartilage of arthritic rats<sup>32</sup>. The reduction of GSH might be attributed to the increased consumption for counteracting oxidative stress during inflammation. Increased oxidative stress was reported to enhance the formation and efflux of glutathione disulfides<sup>33</sup>. Moreover, the observed reduction in serum PrSH is in line with previous studies<sup>30, 34</sup>. Such reduction could be attributed to the excessive consumption by peroxide<sup>35</sup> and/or to a low serum albumin reported in other studies, since the greatest majority of serum SH (85-90%) are found in albumin<sup>36</sup>.

In the current investigation, the decline in blood antioxidants was, also, extended to include erythrocyte GPx and CAT activities. The observation is consistent with previous manuscript<sup>26, 27</sup>. A defective antioxidant enzyme machinery had been observed in erythrocytes of rheumatoid arthritis patients<sup>37</sup> and in liver, kidney and heart of adjuvant arthritic rats<sup>38</sup>. The increased production of superoxide anion, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and hydroxyl radicals demonstrated by Ramprasath *et al.* (2005)<sup>39</sup> might be responsible for inhibition of GPx and CAT activities.

The role of NO and other reactive nitrogen species in inflammation has not been conclusively established. However, evidences for the implication of NO in the process of inflammation and that NOS inhibitors possess potential anti-inflammatory effects have been presented<sup>40, 41</sup>.

The present results revealed a significant ( $p < 0.05$ ) increase in serum NO level in arthritic rats (measured as total NO<sub>2</sub>/NO<sub>3</sub>). Such result is in line with previous

reports<sup>27, 41</sup> in arthritic rats and in rheumatoid arthritis patients<sup>42</sup>. The over expression of iNOS in arthritis might result from increased production of IL-1 and other pro-inflammatory cytokines characteristic of that disease<sup>40</sup>.

Moreover, a major systemic event that happens in the rat following the induction of inflammation is the marked change in the level of serum CP, an acute phase protein<sup>43</sup>. In the present study, a marked elevation in serum CP activity was observed. Such elevation is consistent with previous observations<sup>30, 34</sup> in arthritic rats. The increase in serum CP activity might be due to increase in its hepatic synthesis triggered by increased secretion of IL-1, epinephrine and glucocorticoids<sup>44</sup>. Furthermore, such an increase in CP activity has been reported to have a role in down regulating the inflammatory mediators and inhibiting the lipid peroxidation<sup>43</sup>.

In the present study, prophylactic intra-rectal application of O<sub>2</sub>/O<sub>3</sub> to arthritic rats over three weeks exerted protective effects on some important blood antioxidants (GSH, PrSH, GPx and CAT) and preserved them to pre-arthritic values (table 1). The present data, demonstrated that therapeutic intra-rectal application of O<sub>2</sub>/O<sub>3</sub> for 10 days after development of adjuvant arthritis attenuated the reduction in blood antioxidants and restored the levels of these defense constituents to values close to or above the normal ones (table 2). Moreover, these stimulant effects of O<sub>2</sub>/O<sub>3</sub> therapy on blood antioxidants were accompanied by a decrease in serum MDA level to reach the normal levels (tables 3 and 4). These positive experimental observations could be explained at the light of the ozone abilities to up-regulate the antioxidant system, a state reached under controlled use of O<sub>2</sub>/O<sub>3</sub><sup>45</sup>. Ozone post or preconditioning is analogous to other phenomena such as ischemic preconditioning<sup>46</sup>, thermal preconditioning<sup>47</sup>, chemical preconditioning<sup>48</sup>, ischemic preconditioning<sup>10, 49</sup>. All of these processes have in common that a repeated and controlled stress is able to provide protection against a prolonged and severe stress.

A point that should not be overlooked is that O<sub>3</sub> adaptation caused by judicious use of O<sub>3</sub> is due to the fact that O<sub>3</sub>, instantaneously reacts with biomolecules generating ROS, among which are H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and lipid peroxidation products (LOP). These molecules can elicit the up-regulation of antioxidant enzymes such as SOD, GPx, GSH-reductase and CAT. In bone marrow cells, particularly during erythropoiesis, submicromolar concentrations of LOP can up-regulate the synthesis of antioxidant enzymes<sup>2</sup>. Interestingly, Iles and Liu<sup>50</sup> have demonstrated that some LOP by inducing the expression of glutamate cysteine ligase cause an intracellular increase of GSH. These aforementioned findings might account for

the generation of biochemically improved erythrocytes during prolonged O<sub>3</sub> therapy. Erythrocytes have been shown to respond to O<sub>3</sub> therapy with activation of glycolysis and pentose phosphate pathway<sup>51</sup>.

In the current study, up-regulation of erythrocytes GPx and CAT by O<sub>2</sub>/O<sub>3</sub> might be responsible for the preservation of blood GSH and serum PrSH from oxidation by ROS in arthritic rats. Furthermore, the reported activation of pentose phosphate pathway might play a role in restoring GSH level from its oxidized form.

On the other hand, prophylactic and therapeutic rectal applications of O<sub>2</sub>/O<sub>3</sub> therapy provided further elevation of serum CP activity than the arthritic levels (tables 3 and 4). That effect could be explained on the basis that O<sub>3</sub> acts as a mild enhancer of immune system through activation of gene/regulatory nuclear factor kappa B (NF-κB) by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, one of the major decomposition products of O<sub>3</sub>. Activation of that transcription factor switches on some genes that are responsible for the synthesis of several proteins, among which are the acute phase reactants and numerous interleukins<sup>52</sup>. The increased CP activity might reflect improved antioxidant status of animals subjected to O<sub>3</sub> therapy. Moreover, O<sub>3</sub>-induced increase in CP activity could be beneficial to prevent against oxidative stress observed in adjuvant-induced arthritic rats.

In the present study, the remarkable enhancement of antioxidant status of arthritic rats has provided a protection against ROS and suppressed the process of lipid peroxidation leading to normalization of serum MDA level. Another point which should be considered in is the inability of O<sub>3</sub> therapy to change the serum level of NO than was raised the arthritic induced rats; such effect might be related to the stimulatory effect of O<sub>3</sub> on blood GSH. It has been stated that NO readily reacts with GSH and other cysteine containing compounds forming S-nitrosothiols with half lives of 5-50 min, in contrast to the very short half-life of NO<sup>53</sup>. Thus, formation of S-nitrosothiols in response to O<sub>3</sub> therapy may allow more pharmacological effects at distant sites.

## Conclusions

It can be concluded that O<sub>2</sub>/O<sub>3</sub> pre or postconditioning effectively improved the antioxidant/oxidant imbalance associated with adjuvant arthritis in rats. These results potentially support the use of ozone therapy as a complementary medical approach in rheumatoid arthritis. However, further studies are needed to verify the benefit of O<sub>3</sub> therapy in rheumatoid arthritis at biochemical and clinical levels.

Table 1.

Blood antioxidant levels in arthritic rats subjected to prophylactic intra-rectal application of O<sub>3</sub>/O<sub>2</sub> mixture.

| Groups  | GSH mg/dL                    | PrSH $\mu$ mol/L               | GPx (nmoles NADPH/min/gHb)    | CAT ( $\mu$ moles H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /min/gHb) |
|---|------------------------------|--------------------------------|-------------------------------|---|
| Normal Control  | 23.9 $\pm$ 1.16 <sup>a</sup> | 346.6 $\pm$ 15.3 <sup>a</sup>  | 274.4 $\pm$ 17.4 <sup>a</sup> | 124.5 $\pm$ 16.7 <sup>a</sup>                             |
| Arthritic (21 days)   | 19.3 $\pm$ 2.39 <sup>b</sup> | 276.5 $\pm$ 26.4 <sup>b</sup>  | 175.7 $\pm$ 27.3 <sup>b</sup> | 87.6 $\pm$ 15.34 <sup>b</sup>                             |
| Arthritic pretreated with: O <sub>2</sub>                         | 19.9 $\pm$ 1.56 <sup>b</sup> | 280.7 $\pm$ 24.2 <sup>b</sup>  | 191.6 $\pm$ 25.2 <sup>b</sup> | 94.6 $\pm$ 9.07 <sup>b</sup>                              |
| Arthritic pretreated with: O <sub>3</sub> /O <sub>2</sub> mixture | 23.4 $\pm$ 1.27 <sup>a</sup> | 333.3 $\pm$ 65.04 <sup>a</sup> | 244 $\pm$ 16.3 <sup>a</sup>   | 130.7 $\pm$ 18.3 <sup>a</sup>                             |

Legend: Data are expressed as mean of (7) observations  $\pm$  SD; Values with non-identical superscripts are significantly different  $p < 0.05$  / within the same set. Reduced glutathione, GSH; protein thiols, PrSH; glutathione peroxidase, GPx; catalase, CAT.

Table 2.

Blood antioxidant levels in arthritic rats subjected to therapeutic intra-rectal application of O<sub>3</sub>/O<sub>2</sub> mixture.

| Groups   | GSH mg/dL                    | PrSH $\mu$ mol/L              | GPx (nmoles NADPH/min/gHb)    | CAT ( $\mu$ moles H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /min/gHb) |
|--|------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|---|
| Normal Control   | 23.9 $\pm$ 1.16 <sup>a</sup> | 346.6 $\pm$ 15.3 <sup>a</sup> | 274.4 $\pm$ 17.4 <sup>a</sup> | 124.5 $\pm$ 16.7 <sup>a</sup>                             |
| Arthritic (24 days)  | 18.3 $\pm$ 3.19 <sup>b</sup> | 290.1 $\pm$ 13.9 <sup>b</sup> | 178.7 $\pm$ 39.9 <sup>b</sup> | 100.8 $\pm$ 8.1 <sup>b</sup>                              |
| Arthritic treated with: O <sub>2</sub>                         | 18.1 $\pm$ 2.2 <sup>b</sup>  | 295.7 $\pm$ 9.44 <sup>b</sup> | 193.7 $\pm$ 43.7 <sup>b</sup> | 104.1 $\pm$ 20.1 <sup>b</sup>                             |
| Arthritic treated with: O <sub>3</sub> /O <sub>2</sub> mixture | 24.6 $\pm$ 3.9 <sup>a</sup>  | 338.9 $\pm$ 17.9 <sup>a</sup> | 249.6 $\pm$ 15.4 <sup>a</sup> | 128.7 $\pm$ 8.8 <sup>a</sup>                              |

Legend: Data are expressed as mean of (7) observations  $\pm$  SD; Values with non-identical superscripts are significantly different  $p < 0.05$  / within the same set. Reduced glutathione, GSH; protein thiols, PrSH; glutathione peroxidase, GPx; catalase, CAT.

Table 3.

Serum levels of MDA, NO<sub>2</sub>/NO<sub>3</sub> and CP activity in arthritic rats subjected to prophylactic intra-rectal application of O<sub>3</sub>/O<sub>2</sub> mixture.

| Groups  | MDA nmol/mL                  | NO <sub>2</sub> /NO <sub>3</sub> nmol/mL | CP U/L                          |
|---|------------------------------|--|---------------------------------|
| Normal Control  | 3.62 $\pm$ 0.36 <sup>a</sup> | 23.2 $\pm$ 1.94 <sup>a</sup>             | 127.4 $\pm$ 17.04 <sup>a</sup>  |
| Arthritic (21 days)   | 4.83 $\pm$ 0.8 <sup>b</sup>  | 33.4 $\pm$ 4.4 <sup>b</sup>              | 210.6 $\pm$ 31.05 <sup>b</sup>  |
| Arthritic pretreated with: O <sub>2</sub>                         | 4.26 $\pm$ 0.49 <sup>b</sup> | 31.6 $\pm$ 5.28 <sup>b</sup>             | 217.9 $\pm$ 27.5 <sup>b</sup>   |
| Arthritic pretreated with: O <sub>3</sub> /O <sub>2</sub> mixture | 3.3 $\pm$ 0.51 <sup>a</sup>  | 35.7 $\pm$ 4.36 <sup>b</sup>             | 282.1 $\pm$ 42.4 <sup>b,c</sup> |

Legend: Data are expressed as mean of (7) observations  $\pm$  SD; Values with non-identical superscripts are significantly different  $p < 0.05$  / within the same set. Malondialdehyde, MDA; nitrite/nitrate NO<sub>2</sub>/NO<sub>3</sub>; ceruloplasmin activity CP.

Table 4.  
Serum levels of MDA and NO<sub>2</sub>/NO<sub>3</sub> as well as CP activity in arthritic rats subjected to therapeutic intra-rectal application of O<sub>3</sub>/O<sub>2</sub> mixture.

| Groups   | MDA nmol/mL  | NO <sub>2</sub> /NO <sub>3</sub> nmol/mL | CP U/L         |
|--|--------------|--|----------------|
| Normal Control   | 3.62 ± 0.36a | 3.43± 0.21a                              | 127.4 ± 17.04a |
| Arthritic (24 days)  | 4.7± 0.66b   | 33.4±6.29b                               | 199.1± 36.4b   |
| Arthritic treated with: O <sub>2</sub>                         | 4.12± 0.37b  | 29.7± 2.88b                              | 187.6 ± 22.6b  |
| Arthritic treated with: O <sub>3</sub> /O <sub>2</sub> mixture | 3.43± 0.21a  | 30.1± 3.95b                              | 252± 51.9c     |

Legend: Data are expressed as mean of (7) observations ± SD; Values with non-identical superscripts are significantly different  $p < 0.05$  / within the same set. Malondialdehyde, MDA; nitrite/nitrate NO<sub>2</sub>/NO<sub>3</sub>; ceruloplasmin activity CP.

## References

- Bocci, V. Biological and clinical effects of ozone. Has ozone therapy a future in medicine? *Br J Biomed Sci* 56, 270-9 (1999).
- Bocci, V. Ozone as Janus: this controversial gas can be either toxic or medically useful. *Mediators Inflamm* 13, 3-11 (2004).
- Bocci, V.A. Scientific and medical aspects of ozone therapy. State of the art. *Arch Med Res* 37, 425-35 (2006).
- Candelario-Jalil, E. et al. Oxidative preconditioning affords protection against carbon tetrachloride-induced glycogen depletion and oxidative stress in rats. *J Appl Toxicol* 21, 297-301 (2001).
- Ajamieh, H.H. et al. Effects of ozone oxidative preconditioning on nitric oxide generation and cellular redox balance in a rat model of hepatic ischaemia-reperfusion. *Liver Int* 24, 55-62 (2004).
- Borrego, A. et al. Protection by ozone preconditioning is mediated by the antioxidant system in cisplatin-induced nephrotoxicity in rats. *Mediators Inflamm* 13, 13-9 (2004).
- Calunga, J.L. et al. Ozone therapy on rats submitted to subtotal nephrectomy: role of antioxidant system. *Mediators Inflamm* 2005, 221-7 (2005).
- Al-Dalain, S.M. et al. Ozone treatment reduces markers of oxidative and endothelial damage in an experimental diabetes model in rats. *Pharmacol Res* 44, 391-6 (2001).
- Xia, Z., Gao, J. & Ancharaz, A. Protective effect of ischemic postconditioning on lung ischemia-reperfusion injury in rats and the role of heme oxygenase-1. *Chin J Traumatol* 12, 162-6 (2009).
- Balakumar, P., Rohilla, A., Singh, G., Singh, K. & Singh, M. Modulation of cardioprotective effect of ischemic pre- and postconditioning in the hyperhomocysteinemic rat heart. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 31, 71-9 (2009).
- Billingham, M. & Davies, E. Experimental models of arthritis in animals as screening tests for drugs to treat arthritis in man (eds. Vane, J. & Ferrira, S.) (Springer, Berlin, 1979).
- Rosenberg, A. *Bones, Joints and Soft tissues* (eds. Cotran, R., Kumar, V. & Collins, T.) (W.B. Saunders Company, Philadelphia London, Toronto, Tokyo, 1999).
- Wade, C.R., Jackson, P.G., Highton, J. & van Rij, A.M. Lipid peroxidation and malondialdehyde in the synovial fluid and plasma of patients with rheumatoid arthritis. *Clin Chim Acta* 164, 245-50 (1987).
- Yoshikawa, T., Tanaka, H. & Kondo, M. The increase of lipid peroxidation in rat adjuvant arthritis and its inhibition by superoxide dismutase. *Biochem Med* 33, 320-6 (1985).
- Piliero, S., Graeme, M., Sigg, E., Chines, G. & C, C.C. Action of anti-inflammatory agents upon blood and histopathological changes. *Life Sci* 5, 1057-1069 (1966).
- Gonzalez, R. et al. Reversion by ozone treatment of acute nephrotoxicity induced by cisplatin in rats. *Mediators Inflamm* 13, 307-12 (2004).
- Beutler, E., Duron, O. & Kelly, B.M. Improved method for the determination of blood glutathione. *J Lab Clin Med* 61, 882-8 (1963).
- Aebi, H. (ed.) *Methods of enzymatic analysis* (Verlag Chemie, Weinheim, 1974).
- Paglia, D.E. & Valentine, W.N. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med* 70, 158-69 (1967).
- Uchiyama, M. & Mihara, M. Determination of malondialdehyde precursor in tissue by thiobarbituric acid test. *Anal Biochem* 86 (1978).
- Yoshioka, T., Kawada, K., Shimada, T. & Mori, M. Lipid peroxidation in maternal and cord blood and protective mechanism against activated-oxygen toxicity in the blood. *Am J Obstet Gynecol* 135, 372-6 (1979).
- Koster, J., Biemond, P. & Gswaak, A. Intracellular and extracellular sulfhydryl levels in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 45 (1986).

23. Miranda, K.M., Espey, M.G. & Wink, D.A. A rapid, simple spectrophotometric method for simultaneous detection of nitrate and nitrite. *Nitric Oxide* 5, 62-71 (2001).
24. Schosinsky, K.H., Lehmann, H.P. & Beeler, M.F. Measurement of ceruloplasmin from its oxidase activity in serum by use of o-dianisidine dihydrochloride. *Clin Chem* 20, 1556-63 (1974).
25. Moodley, D., Mody, G., Patel, N. & Chuturgoon, A.A. Mitochondrial depolarisation and oxidative stress in rheumatoid arthritis patients. *Clin Biochem* 41, 1396-401 (2008).
26. Chamundeswari, D., Vasantha, J., Gopalakrishnan, S. & Sukumar, E. Free radical scavenging activity of the alcoholic extract of *Trewia polycarpa* roots in arthritic rats. *J Ethnopharmacol* 88, 51-6 (2003).
27. Ramprasath, V.R., Shanthi, P. & Sachdanandam, P. *Semecarpus anacardium* Linn. nut milk extract, an indigenous drug preparation, modulates reactive oxygen/nitrogen species levels and antioxidative system in adjuvant arthritic rats. *Mol Cell Biochem* 276, 97-104 (2005).
28. Agha, A.M., El-Khatib, A.S. & Al-Zuhair, H. Modulation of oxidant status by meloxicam in experimentally induced arthritis. *Pharmacol Res* 40, 385-92 (1999).
29. Gambhir, J.K., Lali, P. & Jain, A.K. Correlation between blood antioxidant levels and lipid peroxidation in rheumatoid arthritis. *Clin Biochem* 30, 351-5 (1997).
30. Fahim, A.T., Abd-el Fattah, A.A., Agha, A.M. & Gad, M.Z. Effect of pumpkin-seed oil on the level of free radical scavengers induced during adjuvant-arthritis in rats. *Pharmacol Res* 31, 73-9 (1995).
31. Chilies, C., Mulheron, M., McCrae, F., Reglinski, W. & Sturrock, R. Concentration and reactivity of the sulfhydryl group population on the membrane of intact erythrocytes in patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 40, 668-671 (1990).
32. Campo, G.M. et al. Efficacy of treatment with glycosaminoglycans on experimental collagen-induced arthritis in rats. *Arthritis Res Ther* 5, R122-31 (2003).
33. Eklow, L., Moldeus, P. & Orrenius, S. Oxidation of glutathione during hydroperoxide metabolism. A study using isolated hepatocytes and the glutathione reductase inhibitor 1,3-bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea. *Eur J Biochem* 138, 459-63 (1984).
34. Kheir-Eldin, A.A., Hamdy, M.A., Motawi, T.K., Shaheen, A.A. & Abd el Gawad, H.M. Biochemical changes in arthritic rats under the influence of vitamin E. *Agents Actions* 36, 300-5 (1992).
35. Hall, N.D., Maslen, C.L. & Blake, D.R. The oxidation of serum sulph-hydryl groups by hydrogen peroxide secreted by stimulated phagocytic cells in rheumatoid arthritis. *Rheumatol Int* 4, 35-8 (1984).
36. Thomas, J. & Evans, P.H. Serum protein changes in coal workers' pneumoconiosis. *Clin Chim Acta* 60, 237-47 (1975).
37. Imadaya, A., Terasawa, K., Tosa, H., Okamoto, M. & Toriizuka, K. Erythrocyte antioxidant enzymes are reduced in patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 15, 1628-31 (1988).
38. Vijayalakshmi, T., Muthulakshmi, V. & Sachdanandam, P. Salubrious effect of *Semecarpus anacardium* against lipid peroxidative changes in adjuvant arthritis studied in rats. *Mol Cell Biochem* 175, 65-9 (1997).
39. Ramprasath, V.R., Shanthi, P. & Sachdanandam, P. Effect of *Semecarpus anacardium* Linn. nut milk extract on rat neutrophil functions in adjuvant arthritis. *Cell Biochem Funct* 24, 333-40 (2006).
40. Jarvinen, T.A., Moilanen, T., Jarvinen, T.L. & Moilanen, E. Nitric oxide mediates interleukin-1 induced inhibition of glycosaminoglycan synthesis in rat articular cartilage. *Mediators Inflamm* 4, 107-11 (1995).
41. Gad, M.Z. & Khattab, M. Modulation of nitric oxide synthesis in inflammation. Relationship to oxygen-derived free radicals and prostaglandin synthesis. *Arzneimittelforschung* 50, 449-55 (2000).
42. Ueki, Y., Miyake, S., Tominaga, Y. & Eguchi, K. Increased nitric oxide levels in patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 23, 230-6 (1996).
43. Moak, S.A. & Greenwald, R.A. Enhancement of rat serum ceruloplasmin levels by exposure to hyperoxia. *Proc Soc Exp Biol Med* 177, 97-103 (1984).
44. Denko, C.W. Protective role of ceruloplasmin in inflammation. *Agents Actions* 9, 333-6 (1979).
45. Leon, O.S. et al. Ozone oxidative preconditioning: a protection against cellular damage by free radicals. *Mediators Inflamm* 7, 289-94 (1998).
46. Murry, C.E., Richard, V.J., Reimer, K.A. & Jennings, R.B. Ischemic preconditioning slows energy metabolism and delays ultrastructural damage during a sustained ischemic episode. *Circ Res* 66, 913-31 (1990).
47. Neschis, D.G. et al. Thermal preconditioning before rat arterial balloon injury: limitation of injury and sustained reduction of intimal thickening. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 18, 120-6 (1998).
48. Riepe, M.W. & Ludolph, A.C. Chemical preconditioning: a cytoprotective strategy. *Mol Cell Biochem* 174, 249-54 (1997).
49. Xiao, W.H., Cheng, J.S. & Yuan, Y.J. Spatial-temporal distribution of nitric oxide involved in regulation of phenylalanine ammoniolyase activation and Taxol production in immobilized *Taxus cuspidata* cells. *J Biotechnol* 139, 222-8 (2009).
50. Iles, K. & Liu, R.-M. Mechanisms of glutamate cysteine ligase (GCL) induction by 4-hydroxynonenal. *Free Radic Biol Med* 38, 547-556 (2005).
51. Bocci, V. Does ozone therapy normalize the cellular redox balance? Implications for therapy of human immunodeficiency virus infection and several other diseases. *Med Hypotheses* 46, 150-4 (1996).
52. Bocci, V. & Aldinucci, C. Biochemical modifications induced in human blood by oxygenation-ozonation. *J Biochem Mol Toxicol* 20, 133-8 (2006).
53. Pawloski, J.R., Hess, D.T. & Stamler, J.S. Export by red blood cells of nitric oxide bioactivity. *Nature* 409, 622-6 (2001).

# OXÍGENO-OZONOTERAPIA COMO COADYUVANTE EN EL TRATAMIENTO DE LAS INFECCIONES OSEAS

**Autor: Al. Iván Rodríguez Santallana** <sup>1</sup>

**Tutor: Dr. C Julio César Escarpanter Buliés** <sup>2</sup>

<sup>1</sup> Alumno de Sexto año de medicina.

<sup>2</sup> Doctor en Ciencias Médicas. Especialista de Segundo Grado en Ortopedia y Traumatología.

Profesor Auxiliar. Vicedirector Docente y de Investigaciones.

## RESUMEN

Se realiza un estudio basado en el tratamiento de las infecciones óseas combinando los métodos tradicionales con el uso de la ozonoterapia en sus diversas vertientes de aplicación. Se tomó una muestra de 22 pacientes portadores de osteomielitis crónica, tratados con los métodos habituales por más de seis meses y con historia de recidivas frecuentes y tiempos de remisión del cuadro supurativo por no más de seis meses a los que se les adicionó un tratamiento combinado con ozono local y sistémico. Los resultados obtenidos después de la asociación de la ozonoterapia son alentadores en un 73 % de los casos y ese resultado, unido a lo fácil de su obtención y a lo poco costoso de su uso nos hacen avalarlo como tratamiento coadyuvante en este tipo de complicación.

## INTRODUCCIÓN

Las infecciones óseas, aún hoy, constituyen un flagelo de muy difícil solución, a pesar de contarse con una amplia gama terapéutica para combatir las; estas osteomielitis son rebeldes y refractarias a múltiples intentos que se realizan para su curación <sup>1-2-3</sup>, todo debido entre otras causas, a la poca vascularidad que posee el sistema esquelético <sup>4</sup>, la pobre fagocitosis que en él se desarrolla y la dureza de su constitución que dificulta en grado sumo la perfusión de los fármacos, ya sea por vía sistémica como por vía local <sup>5</sup>; es de recordar que a veces las bacterias quedan encapsuladas años enteros en el hueso compacto y pueden reactivarse con un traumatismo o en una operación <sup>6</sup>; además, es sabido que el antibiótico controla la infección en áreas vascularizadas, pero no las esterilizan en áreas donde la vascularidad no tiene acceso.

## BASAMENTO TEÓRICO

El ozono es un gas incoloro en forma líquida, de color azul índigo, siendo un estado alotrópico del oxígeno y a la vez, una forma inestable de éste; está formado por una molécula triatómica de dicho elemento, por lo cual posee un mayor poder oxidativo que el oxígeno y una acción sobre los compuestos orgánicos mucho más selectiva, pudiendo reaccionar con algunos de ellos sin afectar a

otros <sup>7</sup>, su solubilidad en agua es 50 % superior a la del oxígeno y tiene un poder oxidativo y de reacción mucho más rápido; su olor característico y desagradable en condiciones atmosféricas específicas se menciona en la Odissea de Homero, pero no es hasta 1840 en que es descrito como tal por Cristian Shombein al asociar el olor producido por descargas eléctricas atmosféricas, con el de un gas que se formaba en la electrolisis del agua, al cual llamó ozono (que en griego quiere decir oloroso), siendo un gas altamente tóxico por vía respiratoria pues deteriora la membrana alveolar, que tiene un tiempo medio de vida de 40 minutos a 25° C, descomponiéndose a partir de ese momento en oxígeno, dependiendo su velocidad de descomposición de la temperatura ambiente hirviendo a los 110° C <sup>8-9-10</sup>.

Sus mecanismos de acción comprobados en múltiples trabajos realizados al efecto son: microbicida, bactericida, virucida, fungicida y parasiticida; invocándose a la luz de los conocimientos más actuales que en su reacción con los ácidos grasos insaturados de la membrana fosfolípida produce una serie de peróxidos hidrofílicos que estimulan la formación de sustancias desoxigenantes, actuando estas sobre la oxihemoglobina liberando oxígeno y por lo tanto produciendo un aumento del suplemento de este a los tejidos.

Como estimulador de la oxigenación tisular es capaz de activar los mecanismos oxidativos celulares de la glicólisis al actuar sobre los sistemas redox-glutation, activando el paso pentosa-fostato que incrementa la transformación de la glucosa <sup>11</sup>, por otro lado desagrega los eritrocitos haciéndolos más elásticos y permeables; tiene poder analgésico y antiinflamatorio, actuando como inmunomodulador según la dosis empleada, mejorando los estados anémicos y de la circulación sanguínea; siendo la teoría más aceptada en su acción contra las bacterias la de que el gas produce alteración de la membrana por ozonólisis de los ácidos grasos insaturados de la pared bacteriana.

Hoy en día la osteomielitis sigue siendo un reto y esta enfermedad o complicación de la ortopedia tiene componentes varios que hacen difícil su tratamiento. El ozono en su basamento teórico tiene propiedades que lo hacen útil en la terapéutica contra las infecciones y al contar en nuestro centro con un equipo productor de ozono de fa-

bricación cubana (marca OZOMED®<sup>12</sup> - Figura 1) capaz de producir el gas necesario para la instilación rectal y periloal (así como endovenosa), que también está diseñado para ozonizar el agua destilada convirtiéndola en agua ozonizada y existiendo la posibilidad de obtención de aceite de girasol ozonizado (OLEOZON®<sup>13</sup>) en el Centro de Investigaciones del Ozono (CI-OZONO) de Ciudad de la Habana, decidimos realizar un estudio para verificar el resultado de la aplicación del ozono en el tratamiento de la osteomielitis tratando de determinar su acción germicida basándonos en el hecho clínico de la mejoría de la supuración crónica del miembro afecto y colateralmente del estado general del paciente estableciendo en lo posible las formas de uso más efectivas para las infecciones óseas y a la vez contribuyendo al ahorro de medicamentos deficitarios en la red nacional de salud contribuyendo a abaratar en lo posible el tratamiento de la osteomielitis.

### OBJETIVOS

**General:** Verificar el resultado de la aplicación del ozono en el tratamiento de la osteomielitis

**Específicos:**

- Determinar su acción germicida en el tratamiento de las infecciones óseas.
- Determinar si su uso influye en una mejoría del estado general del paciente.
- Establecer en lo posible las formas de uso más efectivas para las infecciones óseas.
- Contribuir al ahorro de medicamentos deficitarios en la red nacional de salud.

### MATERIAL Y METODO

Se toma una muestra de 22 pacientes portadores de osteomielitis diafisaria, con varios años de evolución y tratamiento utilizando los diversos métodos por todos conocidos, con una historia de más de una operación previa, sin remisión de los síntomas o con recaídas frecuentes.

El tratamiento utilizado al diseñar la investigación ha sido el clásico de la osteomielitis que tradicionalmente tiene dos vertientes: la quirúrgica, realizando curetaje, sequestrectomía, perforaciones, fistulectomías, etc. y la clínica con antibioticoterapia local y sistémica además de las medidas de apoyo.

A esta terapéutica adicionamos tratamiento con ozonoterapia siguiendo el siguiente protocolo:

- Lavado local con agua ozonizada de las heridas toda vez que se realicen curaciones de fístulas o hueso expuesto, no utilizando otras soluciones al efecto y repitiéndolo hasta que se de por terminado el ciclo.
- Ozonoterapia sistémica utilizando la vía rectal a dosis de 20 mg/l (20 mcg/ml) de ozono, en 40 ml de oxígeno, por insuflación intrarrectal lenta, en días alternos (tres veces por semana) hasta completar diez sesiones y repetidas hasta tres veces.
- Ozonoterapia local o periloal directa (gas) inyectándolo alrededor de la lesión o dentro de ésta a dosis

de 10 mg/l (10 mcg/ml) de ozono, en 5 -10 ml de oxígeno, hasta dos veces por semana y repetido hasta tanto se entendiera necesario, pero nunca sobrepasando las 20 aplicaciones.

➤ Empaquetamiento con aceite de girasol ozonizado (OLEOZON®) de las heridas (quirúrgicas o no) para ocluir las mismas sustituyendo las otras pomadas utilizadas generalmente al efecto y manteniendo el régimen hasta tanto se mantuviera alguna herida abierta. Para evaluar los resultados nos basaremos en el siguiente patrón:

- RESULTADOS BUENOS: solución del cuadro de reactivación actual sin recidiva en 12 meses, con mejoría del cuadro general.
- REGULARES: mejoría del cuadro general y remisión del cuadro local agudo, recidiva en un período entre 6 y 12 meses.
- MALOS: mantenido el cuadro general y el cuadro local está igual o peor.

### RESULTADOS

**EDAD:** La muestra de 22 pacientes fue dividida para su estudio en cuatro grupos etéreos (Gráfico 1), correspondiendo la distribución mayoritaria al grupo de edades de entre 41 a 45 años con 13 pacientes (59 %) y en segundo lugar al grupo de entre 15 y 30 años con 7 pacientes (32 %), quedando para los dos grupos restantes un paciente percápita.

**SEXO:** El sexo masculino acaparó la mayoría de los pacientes (Gráfico 2) con 20 (81 %), quedando para el sexo femenino el resto de los casos (dos).

**ASIENTO DE LA LESION:** La infección asentó con mayor preferencia en la tibia (Gráfico 3) con 19 casos (86 %), correspondiendo dos pacientes al fémur (9 %) y uno a un metacarpiano.

**VARIEDAD DE OSTEOMIELITIS:** Como puede apreciarse en el gráfico 4, la variedad más observada fue la osteomielitis diafisaria con 12 pacientes (55 %), mientras que la cavernosa metafisaria ocupó el segundo lugar en frecuencia con 6 pacientes (25 %), para la diafo-metafisaria quedaron tres pacientes (14 %) y un paciente presentó una osteomielitis articular.

**TIEMPO DE EVOLUCION:** Con más de un año de evolución tuvimos 15 pacientes (68 %) como puede verse en el gráfico 5, en un tiempo de evolución de seis meses hasta un año se ubicaron 4 pacientes (18 %) y con menos de seis meses tuvimos tres casos (14 %).

**NUMERO DE OPERACIONES PREVIAS:** En el gráfico 6 podemos ver como la mayoría de los casos tuvieron como promedio una operación realizada previamente (8 pacientes-36 %), seis pacientes (27 %) tuvieron dos operaciones realizadas con anterioridad, 5 pacientes sufrieron tres operaciones promedio (23 %) y 3 casos (14 %) fueron operados en más de tres oportunidades antes del tratamiento con ozonoterapia.

**VARIEDAD DE OZONOTERAPIA UTILIZADA:** En el gráfico 7 podemos ver la frecuencia de utilización de la ozo-



noterapia en sus diferentes vertientes, la instilación rectal del gas fue utilizada en los 22 pacientes (100 %) como vía sistémica, en 20 casos se utilizó el oleozón (91 %), en 13 casos se realizó instilación local (59 %) y en 6 pacientes (27 %) se utilizó el agua ozonizada.

**APLICACIONES PROMEDIO DEL OZONO:** Las veces que fue aplicada la terapia con ozono en sus diferentes vertientes se observa en el gráfico 8, donde puede verse como el Oleozón se aplicó 20 veces como promedio, el agua ozonizada en 18 ocasiones, localmente se usó en 14 oportunidades como promedio y de forma rectal se aplicó 10 veces en la generalidad de los casos.

**EVOLUCION DE LA SUPURACION:** En la evolución de la supuración, los cambios pueden observarse en el gráfico 9 donde se ve que en 17 pacientes (72 %) hubo detención de ésta, en tres pacientes la supuración se mantuvo igual y en dos (9 %) la misma empeoró.

**MEJORIA DEL ESTADO GENERAL:** Podemos observar en el gráfico 10 como el estado general de los pacientes, casi siempre depauperado en una crisis de reactivación de un proceso infeccioso crónico, mejoró en la mayoría de ellos de forma ostensible (19 - 86 %), en tres mejoró discretamente (14 %) y en un paciente no hubo mejoría del mismo.

**PROBLEMAS DE LA OZONOTERAPIA:** Encontramos sólo dos tipos de problemas relacionados con las aplicaciones del ozono en general, éstas son el dolor local (en 11 pacientes - 50 %) y el ardor local a la perfusión en 12 pacientes (55 %); ambas cesaron inmediatamente después de terminada la sesión, generalmente relacionada con instilación local o perilocal (Gráfico 11). No se habla de complicaciones pues no encontramos ninguna que contraindique el método o que, dependiente de ella, se haya empeorado el cuadro local o general.

**RESULTADOS GENERALES DE LA OZONOTERAPIA:** Después de aplicado el patrón evaluativo al haber terminado las sesiones de aplicación de la mezcla de oxígeno-ozonoterapia obtuvimos los resultados siguientes: con resultados buenos tuvimos 16 pacientes, lo que da un 73 % de resultados favorables y con resultados regulares y malos tuvimos la misma proporción para cada uno (3 pacientes - 14 %) según puede verse en el gráfico 12.

## DISCUSION

En los resultados de cualquier tratamiento en cualquier enfermedad crónica de índole infecciosa, un resultado bueno en cifras superiores al 50 % de los casos es más que alentador; nótese que hablamos de una entidad en la cual la cronicidad se plantea que es de por vida en la mayoría de los pacientes aquejados de ella.

Llamada por Pasteur "forúnculo de los huesos" por producirse la inflamación en su componente conjuntivo-vascular 14 y a pesar de que el término osteomielitis implica inflamación del hueso, independientemente de que obedezca a gérmenes piógenos, tuberculosis, sífilis o virus específicos, la aceptación universal del término se aplica solamente a la infección por bacterias piógenas 15; fisio-

patológicamente el hueso se destruye por la acción de las enzimas proteolíticas, se necrosa por obstrucción de la corriente sanguínea, se descalcifica por inactividad e hipermia, se resorbe activamente por los osteoclastos y se reconstruye en forma activa por los osteoblastos.

El agente etiológico más frecuente es estafilococo dorado (80 % de los pacientes) y en segundo lugar el estreptococo 16 por lo cual se utilizan de preferencia los antibióticos bactericidas sobre los bacteriostáticos por ser aquellos más efectivos y se recomienda dentro de las medidas terapéuticas complementarias la transfusión con sangre fresca para combatir la anemia y la hipoproteínea.

Si por concepto el ozono tiene mayor poder oxidativo se infiere que su poder de oxigenación es mayor y si se acepta que una oxigenación adecuada es favorable para la solución de cualquier cuadro séptico, además de su gran poder germicida, se puede inferir que el uso de la ozonoterapia como tratamiento de la osteomielitis tiene un buen basamento teórico.

Este bagage teórico unido a los resultados favorables obtenidos preliminarmente en nuestro trabajo, nos hacen ser optimistas en cuanto a la utilización del ozono, en sus diversas formas de aplicación, como tratamiento coadyuvante de la osteomielitis y unido también a su bajo costo de empleo lo cual ha sido demostrado en otros estudios 17, nos permiten recomendarlo dentro de la gama terapéutica que puede ser utilizada a la luz de los conocimientos actuales en bien de tratar de mejorar en lo posible y si fuera posible también, resolver este flagelo de la traumatología ósea.

## CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en este trabajo son muy alentadores ya que los pacientes de nuestra muestra, portadores de osteomielitis y tratados anteriormente sólo por los métodos clásicos, no obtuvieron la mejoría encontrada después del tratamiento combinado con oxígeno-ozonoterapia.

El tratamiento sistémico (rectal) mejoró el estado general de los pacientes, siendo en modo alguno costoso y abarata, por tanto, los costos hospitalarios de esta entidad.

Puede ser aplicado en cualquier nivel de atención que posea los elementos indispensables y el entrenamiento del personal a utilizarlo.

El método no tiene complicaciones y los problemas observados son mínimos y no contraindican el método.

## BIBLIOGRAFIA

1. Evrad J. Infected pseudarthrosis of the femoral shaft. *Rev Clin Orthop* 1971; 57:527-546.
2. Cruz Velázquez V, Gómez Fernández N, Chacón A. La oxigenación hiperbárica en el tratamiento de la osteomielitis crónica refractaria. *Res Ortop* 2003.
3. Ceballos Mesa A, Balmaseda Manent R. La OHB en trauma severo de los miembros y osteomielitis. *Res Ortop* 2003.
4. Rhinelander F. Circulation of bone. *The biochemistry and physiology of bone*. Academic Press 1972; II:2-11.
5. D'Áubigne M. Infection in the treatment of ununited fractures. *Clin Orth Rel Res* 1961; 43:77-82.
6. Ilizarov G. Tratamiento de los defectos de los huesos de la pierna con el aparato de Ilizarov cuando existe una infección purulenta. Recomendaciones metodológicas. *Bol Min Salud Pub Kurgan*. 1978.
7. Wong R, Ceballos A, Menéndez S, Gómez M. Ozonoterapia analgésica. *Revista CENIC (Ciencias Biológicas)* 1989; 20(1,2,3):139-144.
8. Cross C. Oxidative damage to human plasma proteínas by ozone. *Free Radic Res Commun* 1992; 15(6):387-352.
9. Kleiman M. Effects of ozone on pulmonary fuction: the relationship of response to dose. *J Expo Care Environ Epidemiol* 1991; 1(3):309-325.
10. Hazucha F, Folinsbee L, Seal E. Effects of steady-state and variable ozone concentration profiles on pulmonary function. *Am Rev Respir Dis* 1992; 146(6):1487-1493.
11. Rokitsansky O. Clinical considerations and biochemistry of ozone therapy. *Hospitalis* 1982; 52:643-647.
12. OZOMED®. Generalidades técnicas del equipo. Monografía. CI-Ozono. Ciudad Habana. 2004.
13. OLEOZON®. Características generales. Monografía. CI-Ozono. Ciudad Habana. 2004.
14. Ceballos A. Fijación externa de los huesos. C. Habana. Edit Científico-Técnica 1983:121-135.
15. Turek S. Ortopedia: principios y aplicaciones. T-I. C. Habana. Edit Científico-Técnica 1982:251-261.
16. Alvarez R. Tratado de cirugía ortopédica y traumatológica. T-II. C. Habana. Edit Pueblo y Educación. 1985:297-302.
17. Escarpanter J. Resultados terapéuticos en la osteoartritis de la rodilla con infiltraciones de ozono. *Rev Cubana Invest Biomed* 1997; 16(2):125-133.

## FIGURAS



FIGURA 1: EQUIPO OZOMED DE FABRICACIÓN CUBANA.

GRÁFICOS

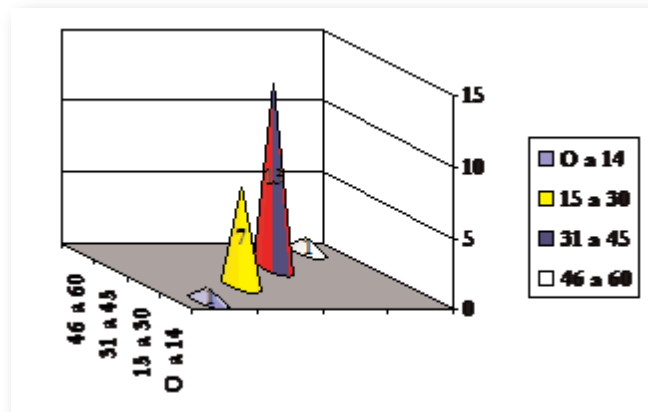


GRÁFICO 1: DISTRIBUCIÓN ETAREA

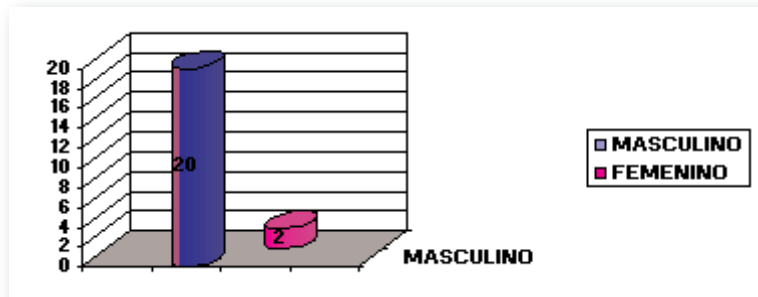


GRÁFICO 2: SEXO

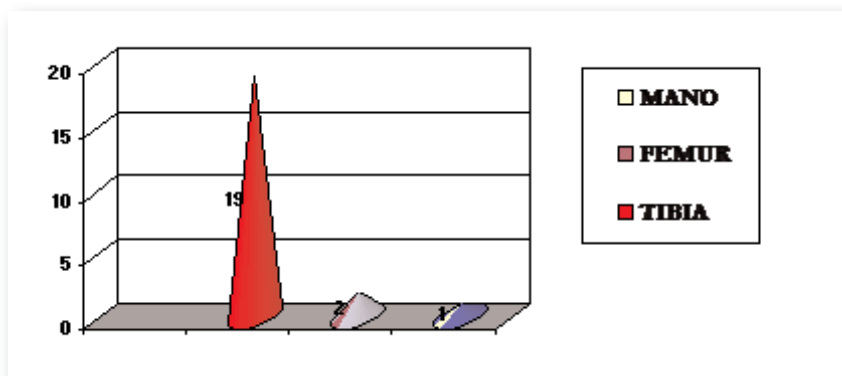


GRÁFICO 3: ASIENTO DE LA LESIÓN

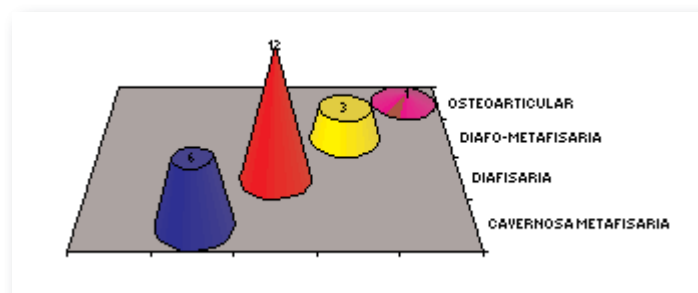


GRÁFICO 4: VARIEDAD DE OSTEOMIELITIS.

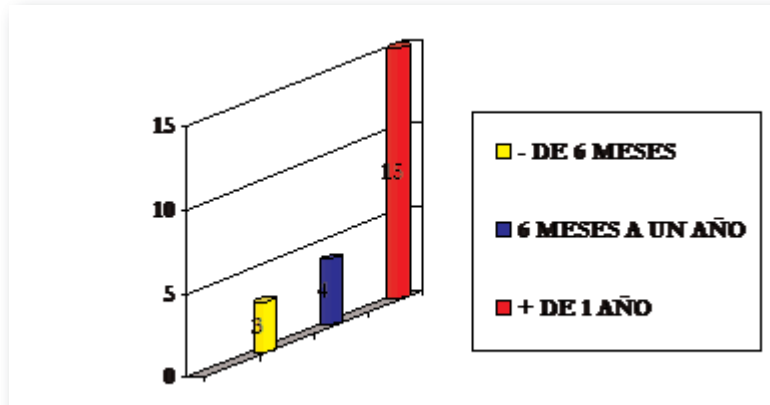


GRÁFICO 5: TIEMPO DE EVOLUCIÓN

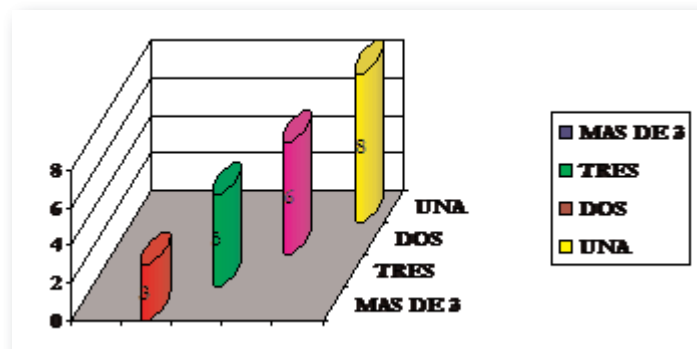


GRÁFICO 6: NÚMERO DE OPERACIONES PREVIAS.

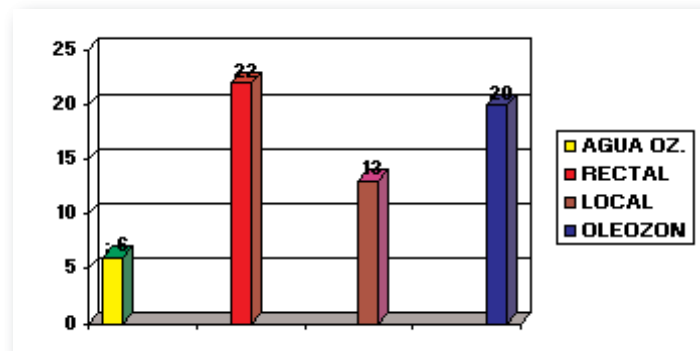


GRÁFICO 7: OZONOTERAPIA UTILIZADA.

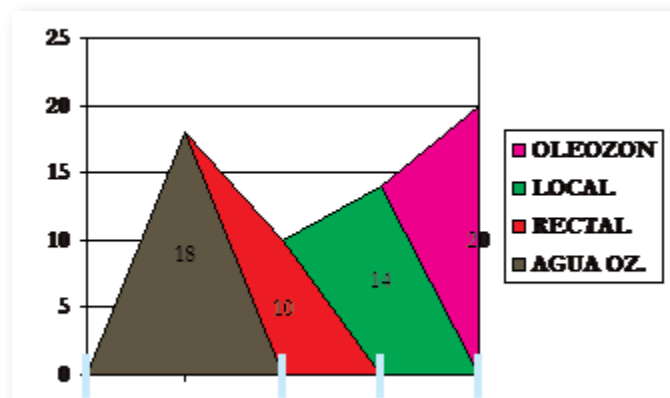


GRÁFICO 8: APLICACIONES PROMEDIO DE LA OZONOTERAPIA.

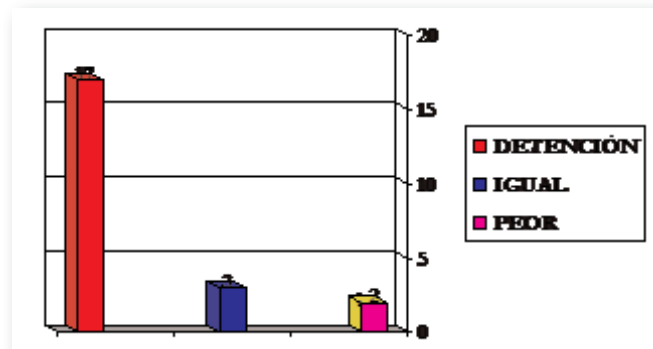


GRÁFICO 9: EVOLUCIÓN DE LA SUPURACIÓN

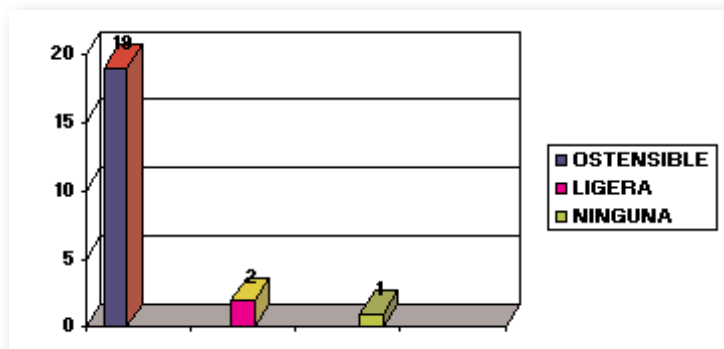


GRÁFICO 10: MEJORÍA DEL ESTADO GENERAL.

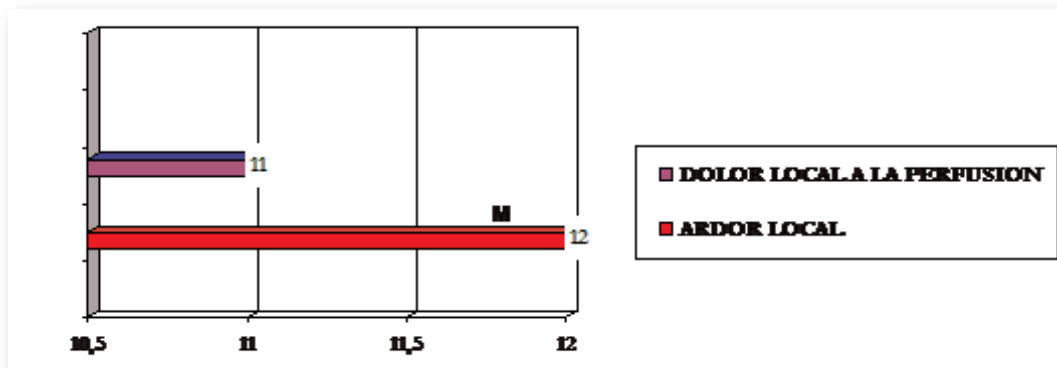


GRÁFICO 11: PROBLEMAS DE LA OZONOTERAPIA.

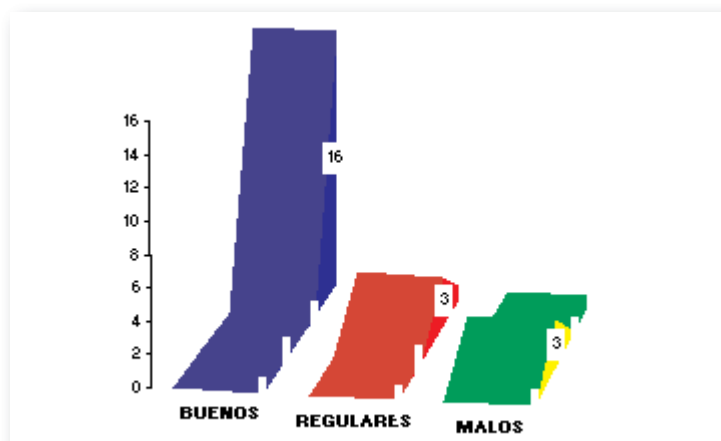


GRÁFICO 12: RESULTADOS GENERALES DE LA OZONOTERAPIA.



**[www.aepromo.org](http://www.aepromo.org)**

Casilla 46. Colegio de Médicos de Madrid  
Calle Santa Isabel , 51  
28012 Madrid (España)