

## Efectos protectores de la Ozonoterapia en el daño renal y hepático en la Diabetes Mellitus Tipo 2

### Protective effects of Ozone therapy on Diabetes Mellitus type 2 renal and hepatic damage

José Luis Calunga Fernández<sup>a</sup>, Zullyt Zamora Rodríguez<sup>b</sup>, Benjamin Arenas Falcón<sup>c</sup>, Silvia Menéndez Cepero<sup>a</sup>, Liliana García Hernández<sup>a</sup>, Illinois Villena Mayeta<sup>a</sup> Mao Rzepka García<sup>d</sup>.

<sup>a</sup> Centro Medico De la Salud Integral México-Cuba.

<sup>b</sup> Centro Nacional De Investigaciones Científicas De Cuba (CNIC).

<sup>c</sup> Consultorio Peruano Cubano (XAGYO3).

<sup>d</sup> Colegio Mexicano de Ozonoterapia y Medicina Bio Oxidativa.

**Recibido:** 10 de agosto de 2020;

**Aceptado:** 14 de octubre de 2021;

#### RESUMEN

La Diabetes Mellitus tipo 2 cursa con grandes complicaciones graves como lo son la insuficiencia renal crónica, la hepatopatía, la neuropatía diabética y la enfermedad cerebrovascular relacionadas con una disfunción metabólica que conlleva a un estado de inflamación crónica en estos pacientes. Con el objetivo de evaluar la influencia de la ozonoterapia rectal como terapia complementaria en pacientes con diabetes Mellitus Tipo 2, se realizó un ensayo observacional en 38 pacientes con Diabetes Mellitus tipo 2. Los pacientes fueron distribuidos aleatoriamente en dos grupos, el primer grupo recibió tratamiento convencional (Metformina, Glibenclámda y vitaminas del complejo B) y ozonoterapia rectal y al segundo (Convencional) se le prescribió solamente tratamiento convencional. Se realizaron determinaciones en sangre de glicemia, hemoglobina glicosilada, LDL-colesterol, VLDL-colesterol y triglicéridos, además se les midió marcadores de daño hepático, de daño renal y la escala DNA-4 de dolor neuropático, al inicio y al finalizar las 20 sesiones de ozonoterapia rectal. El grupo de pacientes que recibió ozonoterapia rectal más el tratamiento convencional mostró disminución significativa ( $p < 0,05$ ) los valores de glicemia, hemoglobina glicosilada, VLDL-colesterol, triglicérido, LDL-colesterol con respecto al grupo con tratamiento convencional. La ozonoterapia rectal, redujo significativa los marcadores de daño hepático y renal al igual que la escala de dolor DN4, con respecto al grupo que solamente recibió tratamiento convencional. La aplicación complementaria de Ozonoterapia rectal mostró un efecto protector sobre la función metabólica, hepática y renal en pacientes portadores de Diabetes Mellitus tipo 2, además mostró un cierto carácter analgésico mediante la reducción del dolor en dicha enfermedad.

**Palabras claves:** Diabetes Mellitus tipo 2, Ozonoterapia, glicemia, función renal, función hepática, dolor.

#### ABSTRACT

Diabetes Mellitus Type 2 presents with major serious complications such as chronic kidney failure, liver disease, diabetic neuropathy, cerebrovascular disease created by metabolic dysfunction that leads to a state of chronic inflammation in these patients. With the objective of evaluating the influence of rectal ozone therapy as complementary therapy in patients with Type 2 diabetes Mellitus. 38 patients suffering Diabetes Mellitus Type 2 were selected and randomly divided into two groups. The first group (Ozone) received conventional treatment plus rectal ozone therapy and the second (Conventional) only received conventional treatment. Blood glucose, glycosylated hemoglobin, LDL-cholesterol, VLDL-cholesterol and triglycerides were measured in blood, markers of liver and kidney damage and the DNA-4 scale of neuropathic pain were measured at the beginning and at end of treatments with rectal ozone therapy. The group of patients who received rectal ozone therapy plus conventional treatment showed a significant decrease in glycemc, glycated hemoglobin, VLDL-cholesterol, triglyceride, LDL-cholesterol values compared to the group with conventional treatment. It reflected significant improvement in the liver and kidney damage markers as well as the levels of the DNA-.4 pain scale, compared to the group that only received conventional treatment. The complementary application of rectal ozone therapy showed a protective effect on metabolic, liver and kidney function in patients with Type 2 Diabetes Mellitus, and also showed a certain analgesic character by reducing pain in said disease.

**Keywords:** Diabetes Mellitus type 2, Ozonotherapy, glycemc, renal function, hepatic function, pain.

## INTRODUCCION

La Diabetes Mellitus tipo 2 (DM tipo 2) es una de las enfermedades con mayor impacto socio-sanitario, dada su elevada prevalencia, su morbilidad por complicaciones crónicas y la alta mortalidad de este trastorno endocrino-metabólico que afecta severamente la salud y el bienestar social de los pacientes que la padecen (Gutierrez & Roura, 2017).

La DM Tipo 2 cursa con grandes complicaciones graves como son: la retinopatía, la hiperlipidemia, la hepatopatía, la neuropatía periférica, la nefropatía diabética y la enfermedad cerebrovascular, la enfermedad coronaria y el pie diabético, todas estas alteraciones están vinculadas a la hiperglicemia mantenida. Se describen cuatro procesos asociados a la hiperglicemia crónica y tienen que ver con la patogénesis de las complicaciones diabéticas, estos son: glucosilación no enzimática, la desviación de la glucosa a la vía de los polioles, la activación de la proteína quinasa C y el consecuente estrés oxidativo (Paez *et al*, 2016).

Dentro de las múltiples complicaciones de la DM-Tipo 2 anteriormente mencionadas, la nefropatía diabética, la hiperlipidemia, la hepatopatía, el estrés oxidativo y la polineuropatía se hacen de difícil manejo terapéutico y en un gran porcentaje los pacientes no responden de forma satisfactoria a la terapia convencional, este hecho refleja la necesidad de buscar terapias complementarias con el objetivo de mejorar la calidad de vida de estos pacientes portadores de DM-Tipo 2 (Paez *et al*, 2016).

Atendiendo a este planteamiento, la Ozonoterapia la cual ha mostrado efectos biológicos beneficiosos como: el incremento del metabolismo del oxígeno, la protección endotelial, su efecto antiinflamatorio, la estimulación del sistema antioxidante endógeno, su efecto germicida de amplio espectro, su acción como modulador del sistema inmune y la actividad neuroprotectora de la ozonoterapia reportado a nivel clínico como preclínico (Martínez *et al*, 2012; Bocci *et al*, 2009; Martínez *et al*, 2005; Menéndez *et al*, 2008; García *et al*, 2005), hacen de este proceder terapéutico un potencial complemento de otras terapias convencionales.

Diversos estudios, reportados en la literatura, evidencian los efectos beneficiosos de la ozonoterapia en la diabetes mellitus tanto a nivel preclínico como en ensayos clínicos, algunos de estos son: mejor control de la glicemia, disminución del estrés oxidativo, disminución de los productos avanzados de la glicosilación de proteínas e incremento de los niveles de óxido nítrico (Martínez *et al*, 2005; Menéndez *et al*, 2008; García *et al*, 2005).

Por lo anteriormente expuesto se propone que la ozonoterapia podría tener un papel importante en el mejoramiento de la calidad de vida de pacientes con DM Tipo 2. Atendiendo a esto, se realizó un estudio clínico observacional con el objetivo de valorar los efectos de la ozonoterapia rectal sobre marcadores de daño renal, daño hepático y escala de dolor neuropático en pacientes portadores de DM Tipo 2.

### **Materiales y Métodos.**

Se realizó un estudio clínico simple ciego, en 38 pacientes con diagnóstico de Diabetes Mellitus Tipo 2 (DM-Tipo 2) de 1 a 5 años de evolución según criterios de Asociación Americana de Diabetes (ADA) y la Organización Mundial de la Salud (OMS) (ADA, 2018). Se incluyeron pacientes masculinos ambulatorios que llegaron al Centro Médico de la Salud Integral México-Cuba, durante el periodo entre enero 2016 a enero 2020 de edades entre 40 y 65 años, previa firma del consentimiento informado, firmado en una planilla titulada Acta de Consentimiento para el estudio. Este estudio fue aprobado por el Consejo Científico y el Comité de Ética del Centro Médico de la Salud Integral México-Cuba, en acuerdo con la Declaración de Helsinki (Manzini, 2000).

El ensayo tuvo una duración de 4 años, entre la inclusión de los pacientes y su evaluación al finalizar los tratamientos.

**Criterios de Inclusión:** Pacientes con Diabetes Mellitus Tipo 2 masculinos con diagnóstico de Neuropatía Periférica Diabética (tipo neuropatía distal simétrica según clasificación de la neuropatía diabética) entre 1 y 2 años de evolución para lo cual llevaban tratamiento con Metformina, Glibenclamida y vitaminas del complejo B, como tratamiento de base (Goicolea, 2006). Estos pacientes además portaban Hipertensión Arterial para la cual llevaban tratamiento con Inhibidores del sistema de renina-angiotensina-aldosterona (IECAs) y con bloqueadores de receptores de angiotensina 1 (BRA1)

**Criterios de exclusión:** pacientes con enfermedades crónicas descompensadas o malignas con actividad, embarazo y puerperio, cirugía mayor, traumatismo reciente, pacientes psiquiátricos, diabéticos insulino dependiente, diabéticos con hepatitis de origen viral, con hepatitis autoinmune, con hepatopatía alcohólica, con insuficiencia hepática, con valores de creatinina en sangre mayores a 1.5 miligramos por decilitros (1.5 mg/dl), pacientes diabéticos con hipertensión grado 2, grado 3 (Clasificación actual de la Hipertensión arterial) o en crisis hipertensiva Reboussin et al, 217).

**Criterios de salida:** Entre los criterios de salida se consideraron la salida voluntaria del estudio, el no cumplimiento del tratamiento, la aparición de enfermedad aguda de etiología infecciosa u de otra causa, la aparición de reacciones adversas moderadas o severas que causen modificaciones en el tratamiento o por causa de fallecimiento del paciente.

Los pacientes con DM-Tipo 2 fueron divididos en dos grupos de estudio-tratamiento:

**Grupo Ozono:** 20 pacientes, recibieron tratamiento convencional más la ozonoterapia rectal por vía rectal, cada 24 h de lunes a viernes, completando dos ciclos de 25 y 20 sesiones (Clavo *et al*, 2015).

**Grupo Convencional:** Constituido por 18 pacientes que recibieron solamente tratamiento convencional específico para la diabetes mellitus y su tratamiento base de la neuropatía diabética y de enfermedades asociadas como la hipertensión, los que se describen a continuación:

Esquema de Tratamiento convencional (Goicolea, 2006; Reboussin *et al*, 2017; Clavo *et al*, 2015; Sánchez *et al*, 2012; Roessler, 2016). -Metformina de 500 mg más Glibenclamida 5 mg (control de la DM-Tipo 2), Gabapentina de 300 mg y complejo vitamínico B (mejora de la neuropatía diabética) y para el control de la presión arterial (Mata, 2008), el enalapril o bloqueadores de receptor de Angiotensina II (AT1).

### **Esquema terapéutico de ozonoterapia rectal.**

La ozonoterapia se aplicó por vía rectal a niveles de dosis de 7 y 8 miligramos, con una frecuencia de una sesión diaria de lunes a viernes, 5 sesiones cada semana.

La primera semana (5 sesiones), se aplicó 35 mg/L de concentración de ozono y 200 mL de volumen de la Mezcla Ozono/Oxígeno (MOO), para una dosis de 7 mg. Las otras cuatro semanas (20 sesiones), se les aplicó una concentración de 40 mg/L de concentración con 200 mL de volumen para una dosis de 8 mg.

### **Proceder para la aplicación de la ozonoterapia:**

El Ozono se obtuvo de un equipo generador de ozono de uso médico (Ozomed Mini-Plus, CNIC, Habana, Cuba). La MOO generada del equipo se extrajo con una jeringa de 50 ml y

se aplicó por vía rectal empleando sonda Nelaton calibre 10, previo cálculo de la dosis mediante la concentración y el volumen de la MOO.

### **Mediciones a realizar**

#### **Variables de efectividad primaria**

Estas variables fueron determinadas y evaluadas para ambos grupos (Convencional y Ozono) a los mismos tiempos, es decir al inicio del tratamiento con Ozonoterapia y 3 semanas después de haber finalizado dicho tratamiento (2 meses).

#### **Determinaciones bioquímicas:**

Como variables de control metabólico se realizaron: los niveles de glicemia, hemoglobina glicosilada, triglicéridos, colesterol LDL, colesterol VLDL (Jasso *et al*, 2015).

**Marcadores de daño hepático:** Transaminasas (TGP-TGO), gammaglutamil transferasa (GGT), fosfatasa alcalina (FAL), albumina en sangre y recuento de plaquetas (Cequera *et al*, 2014)

**Marcadores de daño renal:** microalbuminuria de 24 horas, examen general de orina, niveles sanguíneos de creatinina (Lopez *et al*, 2018).

Todas las variables bioquímicas fueron determinadas siguiendo las técnicas descritas en Manual de Prácticas para el Laboratorio de Hematología (Rios & Vidal, 2017)

Nivel subjetivo de dolor neuropático: Se determinó mediante el cuestionario DN4 de valoración cualitativa del dolor. Cuestionario validado internacionalmente, que permite obtener valores cualitativos de 1 hasta el 10 (Herrera *et al*, 2018).

Todas estas variables bioquímicas incluyendo el dolor neuropático fueron medidas en ambos grupos al inicio y a las tres semanas del último tratamiento con Ozonoterapia.

Se debe destacar que todas las evaluaciones tanto clínica como bioquímicas se realizaron a ciegas, sin conocer al grupo de tratamiento al que pertenecía el paciente.

#### **Análisis Estadístico.**

Se emplearon los estadígrafos media y la desviación estándar para cada grupo y variables, se utilizó el análisis de Varianza (ANOVA) el Test de homogeneidad (Barlett-Box) para la comparación entre medias de los dos grupos se empleó la t de Student para muestras no dependientes y para la comparación en el grupo se utilizó la prueba t de Student para muestras dependientes con significación estadística  $p < 0.05$ . Además, para la comparación de proporciones entre dos o más muestras se utilizó el test de chi cuadrado ( $X^2$ ) de Pearson.

### **RESULTADOS**

Los 38 pacientes con diagnóstico de Diabetes Mellitus Tipo 2 (DM-Tipo 2) incluidos en el estudio, tuvieron una distribución de acuerdo a la edad, historia previa (antecedentes de hipertensión arterial, daño renal y enfermedad cardiovascular), tiempo de evolución de la enfermedad y esquemas de tratamientos de base 1 y 2 en los grupos de estudio, homogénea (Tabla 1).

**Tabla 1.** Características generales de la muestra de pacientes incluidos en el estudio, según edad, historia previa, tiempo de evolución de la enfermedad y esquemas de tratamientos de base en ambos grupos.

<b>Características Generales</b>	<b>Grupo Convencional N (%)</b>	<b>Grupo Ozono N (%)</b>
Edad (años) 40-50	6 (33%)	7 (35%)
50-60	8 (44%)	10 (50%)
≥ 60	4 (22%)	3 (15%)
APP: HTA	15 (83%)	17 (85%)
Daño Renal	13 (72%)	15 (75%)
Enfermedad Cardiovascular	0 (0%)	0 (0%)
Tiempo de Evolución de la enfermedad (años). X±SD	2.78±0.6	3.05±0.8
Esquema de Tratamiento 1	10 (55.5%)	12 (60%)
Esquema de Tratamiento 2	8 (44%)	8 (40%)

*Leyenda: HTA: Hipertensión Arterial, APP: antecedentes patológicos personales, Daño Renal: micro albuminuria de 24 horas patológica y elevación patológica de creatinina en sangre. Esquema de tratamiento 1: Metformina + glibenclamida + gabapentina + complejo vitamínico B + Termisaltan de 40 mg. Esquema de tratamiento 2: Metformina + glibenclamida + gabapentina + complejo vitamínico B + Enalapril de 20 mg. Para la variable Tiempo de Evolución de la enfermedad X es el valor de la media y SD es la desviación estándar. NO existió diferencias significativas para  $p > 0.05$  con la prueba de  $\chi^2$  para la comparación entre ambos grupos para las variables observadas.*

La evaluación de la influencia de la ozonoterapia sobre las variables de control metabólico (Glicemia Basal, triglicérido, colesterol LDL, colesterol VLDL y Hemoglobina Glicosilada), se muestra en la **Tabla 2**. Ambos grupos reflejan un elevado valor de glicemia basal por encima del rango de valores normales, sin embargo, el grupo tratado complementariamente con ozonoterapia rectal, experimentó una reducción significativa  $p < 0,05$  de dicha variable al finalizar las aplicaciones de Ozono, con respecto al valor inicial. Dichos valores disminuidos de glicemia basal causada por el tratamiento con ozono rectal, no lograron estar dentro de los valores de referencias. Los niveles sanguíneos de triglicéridos, LDL-colesterol, VLDL-colesterol y hemoglobina glicosilada, tuvo un comportamiento similar, donde en el grupo convencional a pesar de recibir el tratamiento convencional no alcanzo variaciones significativas. Sin embargo, el grupo de paciente tratados con ozono rectal, redujeron de forma significativa los niveles de triglicéridos, LDL-colesterol, VLDL-colesterol y hemoglobina glicosilada, con respecto al inicio del estudio. Todos los valores obtenidos en los pacientes con ozonoterapia, se encuentran dentro del intervalo de valores de referencias para cada una de las variables metabólicas analizadas.

**Tabla 2.** Evolución de variables de control metabólico (Glicemia Basal, triglicérido, colesterol LDL, colesterol VLDL y Hemoglobina Glicosilada) en ambos grupos al inicio y final del estudio.

Parámetros	Grupo Convencional		Grupo Ozono		Valores Referencia
	Inicio MED± DE	Final MED± DE	Inicio MED± DE	Final MED± DE	
Glicemia Basal	255±28 <sup>a</sup>	247±42 <sup>a</sup>	261±57 <sup>a</sup>	130±22 <sup>b</sup>	55-99 mg/dL
Triglicéridos	258±78 <sup>a</sup>	251±67 <sup>a</sup>	248±70 <sup>a</sup>	104±38 <sup>b</sup>	<150 mg/dL
LDL- Colesterol	140±43 <sup>a</sup>	137±41 <sup>a</sup>	143±37 <sup>a</sup>	64.8±18 <sup>b</sup>	< 100mg/dL
VLDL- Colesterol	62.4±11 <sup>a</sup>	58.5±15 <sup>a</sup>	60.5±17 <sup>a</sup>	35.7±9 <sup>b</sup>	< 35mg/L
Hb Glicosilada (Hb-A1C)	12.5± 1.8 <sup>a</sup>	10.4±2.2 <sup>a</sup>	13.6±2.7 <sup>a</sup>	6.4±0.8 <sup>b</sup>	<5.7% normal 5.7-6.4% D. Control >6.5% DM tipo-2

Los datos representan los valores medios  $\pm$  error estándar de la media. Leyenda: D. Control: débil control metabólico de la DM-Tipo 2. Letras diferentes: diferencias significativas con respecto al inicio del tratamiento  $p < 0.05$ .

El análisis del comportamiento de marcadores de daño hepático en pacientes con diagnóstico de DM 2 tratados con ozonoterapia rectal y tratamiento convencional, se muestran en la Tabla 3. El grupo de pacientes tratados solamente con tratamiento convencional, alcanzaron al final de la intervención terapéutica, una reducción significativa de los valores de transaminasas (TGP-TGO), gammaglutamil transferasa (GGT), fosfatasa alcalina (FAL), albumina en sangre y recuento de plaquetas. Ambos grupos de pacientes diabéticos mostraron cifras patológicas de estos marcadores al inicio del estudio, llamando la atención el valor bajo del recuento de plaquetas. Al finalizar el estudio el grupo convencional mantuvo niveles patológicos altos de TGP, TGO, GGT, FAL, así como una disminución de la albumina a nivel sanguíneo y del recuento de plaquetas. El grupo de pacientes que recibió tratamiento con Ozonoterapia Rectal alcanzó niveles fisiológicos de albumina en sangre, redujo significativamente las cifras patológicas de TGP, TGO, GGT, FAL y la normalización del recuento de plaquetas, en comparación con los valores iniciales.

**Tabla 3.** Evolución de marcadores de daño hepático: transaminasa (TGP-TGO), gammaglutamil transferasa (GGT), fosfatasa alcalina (FAL), albumina en sangre y recuento de plaquetas en ambos grupos al inicio y finalizar el estudio.

Parámetros	Convencional		Ozono		Valores de referencias
	Inicio MED± DE	Final MED± DE	Inicio MED± DE	Final MED± DE	
Albumina	2.7±0.02 <sup>a</sup>	2.8±0.08 <sup>a</sup>	2.6±0.04 <sup>a</sup>	4.5±0.6 <sup>b</sup>	3.5-5.2 g/dL
TGO	55.5±10 <sup>a</sup>	56.7±15 <sup>a</sup>	60.8±19 <sup>a</sup>	27.6±8 <sup>b</sup>	< 40 U/L
TGP	63.7±11 <sup>a</sup>	61.8±12 <sup>a</sup>	65.5±18 <sup>a</sup>	40.4±10 <sup>b</sup>	<41 U/L
GGT	120.8±31 <sup>a</sup>	118.7±40 <sup>a</sup>	122.7±36 <sup>a</sup>	72.3±23 <sup>b</sup>	8-61 U/L
FAL	160.5±48 <sup>a</sup>	158.7±47 <sup>a</sup>	161.4±52 <sup>a</sup>	58.9±12 <sup>b</sup>	40-130 U/L
Plaquetas	132±42 <sup>a</sup>	140±38 <sup>a</sup>	133±44 <sup>a</sup>	160±51 <sup>b</sup>	150-500 μL

Los datos representan los valores medios ± error estándar de la media. Leyenda: TGO: Transaminasa Glutámico Oxalacetico, TGP: transaminasa glutámico pirúvico, GGT: gammaglutamil transferasa, FAL: fosfatasa alcalina. Letras diferentes: representan diferencias significativas.  $p < 0,05$ . entre el inicio y el final de cada grupo de tratamiento. Letras iguales: no hay diferencias significativas entre el inicio y el final de cada grupo de tratamiento.

En cuanto al comportamiento de los marcadores de daño renal (microalbuminuria de 24 horas, niveles sanguíneo de creatinina y examen general de orina), se obtuvo que el grupo convencional mantuvo cifras patológicas altas de microalbuminuria de 24 horas, creatinina plasmática, presencia de glucosa en muestra de orina (glucosuria), proteínas (proteinuria) y cuerpos cetónicos (cetonuria) al finalizar el estudio sin cambio significativo con respecto al inicio del estudio. Por otra parte, al analizar el comportamiento de estos marcadores de daño renal en el grupo de pacientes que recibió tratamiento con ozonoterapia rectal, se evidenció una reducción significativa ( $p < 0,05$ ) de la microalbuminuria de 24 horas y de los niveles sanguíneos de creatinina, además en este grupo se evidenció una disminución significativa ( $p < 0,05$ ) de la proteinuria, la glucosuria y la cetonuria respectivamente. (Tabla 4 y 5).

**Tabla 4.** Evolución de Micro albuminuria de 24 horas y niveles sanguíneo de creatinina al inicio y final del estudio para ambos grupos.

Parámetros	Convencional		Ozono		Valores de Referencias
	Inicial MED± DE	Final MED± DE	Inicial MED± DE	Final MED± DE	
Micro alb (24 horas)	52.5±11 <sup>a</sup>	48.8±15 <sup>a</sup>	54.4±13 <sup>a</sup>	35.5±9 <sup>b</sup>	30-300 mg/24 horas
Creatinina (mg/dL)	1.48±0.02 <sup>a</sup>	1.45±0.03 <sup>a</sup>	1.46±0.04 <sup>a</sup>	0.83±0.03 <sup>b</sup>	0.70-1.2

Los datos representan los valores medios ± error estándar de la media. Micro alb: microalbuminuria. Letras diferentes: diferencias significativas para  $p < 0.05$ .

**Tabla 5.** Evolución de indicadores de daño renal (proteínas, glucosa y cetonas) en orina al inicio y final del estudio para ambos grupos.

Parámetros	Convencional		Ozono		Valores de referencia (mg/dL)
	Inicio MED± DE	Final MED± DE	Inicio MED± DE	Final MED± DE	
Proteínas	23.4±8 <sup>a</sup>	20.5±5 <sup>a</sup>	21.8±7 <sup>a</sup>	12.5±3 <sup>b</sup>	Negativo o < 10
Glucosa	830±97 <sup>a</sup>	788±95 <sup>a</sup>	810±104 <sup>a</sup>	34.7±11 <sup>b</sup>	Negativo mg/dL
Cetonas	148±38 <sup>a</sup>	140±42 <sup>a</sup>	145±51 <sup>a</sup>	54±12 <sup>b</sup>	Negativo o < 5

Los datos representan los valores medios ± error estándar de la media. Las comparaciones se realizaron mediante el ensayo estadístico T de Student. Letras diferentes significan diferencias significativas  $p < 0.05$ .

Referente a la evolución de la escala para el dolor neuropático DNA-4 ambos grupos mostraron cifras altas al inicio de nuestro estudio, al finalizar en el grupo convencional, se evidencia una tendencia a la disminución del dolor, pero esta no fue significativa ( $p < 0,05$ ), con respecto a los valores de dolor iniciales al tratamiento convencional. Sin embargo, el grupo de pacientes que recibió tratamiento complementario con Ozonoterapia rectal, si mostró una disminución significativa ( $p < 0,05$ ) en la escala del dolor neuropático al finalizar el tratamiento, con respecto al inicio del tratamiento y al grupo convencional. Tabla 6.

**Tabla 6.** Comportamiento de la escala de dolor al inicio y finalizar el estudio para ambos grupos.

Parámetros	Convencional		Ozono		Dolor neuropático
	Inicio MED± DE	Final MED± DE	Inicio MED± DE	Final MED± DE	
Escala de Dolor Neuropático DN4	8.40±0.6 <sup>a</sup>	7.6±0.7 <sup>a</sup>	8.7±0.8 <sup>a</sup>	3.6±0.2 <sup>b</sup>	≤ 4 puntos

Los datos representan los valores medios ± error estándar de la media. Leyenda: Letras diferentes: diferencias significativa  $p < 0.05$ . analizado mediante un ensayo de ANOVA.

## DISCUSIÓN

Los pacientes diabéticos que integró el universo de estudio mostraron al inicio del mismo una disfunción metabólica caracterizada por el incremento de la glicemia basal, hemoglobina glicosilada, triglicéridos, LDL-colesterol y VLDL colesterol (Tabla 2), reflejándose en estos pacientes una condición proinflamatoria. Se reporta que esta condición proinflamatoria en pacientes portadores de DM-Tipo 2, desencadena la activación del factor transcripcional  $\text{NF}\kappa\beta$ , el cual está relacionado con la expresión génica de citocinas proinflamatorias tales como factor de necrosis tumoral-alfa ( $\text{TNF}\alpha$ ), interleucinas 1, 6 y 18 (IL-1, IL-6 e IL-18) (Gutiérrez *et al*, 2017), estas citocinas son capaces de inhibir la expresión génica y la translocación del transportador de glucosa 4 (GLUT 4) desde el citosol a la membrana celular creándose la resistencia a la insulina, con la consecuente disminución de la captación de glucosa sanguínea y desorden a nivel del metabolismo lipídico, como el incremento de LDL-colesterol, triglicéridos y VLDL-colesterol (Gutiérrez *et al*, 2017; Díaz & Luna, 2016; Carrasco *et al*, 2013).



Por otra parte, al finalizar el estudio se demostró que los pacientes que recibieron tratamiento con ozonoterapia rectal, mostraron control metabólico de la enfermedad, reflejado mediante la disminución significativa de la glicemia basal, la hemoglobina glicosilada, los triglicéridos, la LDL-colesterol y la VLDL-colesterol, estos resultados concuerdan con lo ya reportado por otros autores referente a los efectos beneficiosos de la ozonoterapia rectal en la Diabetes Mellitus (Calunga *et al*, 2015; Schwartz *et al*, 2019). Debemos señalar que, aunque la ozonoterapia redujo los niveles de hemoglobina glicosilada los pacientes, mantuvieron un control metabólico débil de su enfermedad.

Considerando, la acción inmunomoduladora de la ozonoterapia evidenciada por otros autores, mediante la inhibición de citocinas pro inflamatorias como el TNF  $\alpha$  (Zamora *et al*, 2005; Hui *et al*, 2008), consideramos que sería una de las acciones que podrían estar favoreciendo la acción beneficiosa de la ozonoterapia en los pacientes de nuestro estudio. Así, la inhibición del TNF $\alpha$  podría atenuarse la resistencia a la insulina, mejorando las funciones periféricas de esta hormona y por esta vía la ozonoterapia mejoraría la sensibilidad a la insulina en tejidos metabólicos como el hígado, músculo y tejido adiposo, de ser así, disminuye la glicemia basal, el flujo de ácidos grasos al hígado, niveles sanguíneos de triglicéridos, VLDL-colesterol, LDL-colesterol y la hemoglobina glicosilada, resultados observados en pacientes que recibieron la ozonoterapia (Tabla 2). Cuando se disminuyen los niveles de VLDL, se reducen también su catabolismo intravascular y de esta forma se restringe la formación de LDL (Cuevas & Alonso, 2016).

Es ampliamente reportado que el paciente portador de DM-Tipo 2 desarrolla estrés oxidativo (EO) (Takayanagi *et al*, 2011; Martínez *et al*, 2005). El EO se caracteriza por la excesiva y liberación formación de especies reactivas del oxígeno (EROS), existen estudios que expresan que las EROS son capaces de inactivar proteínas importantes para la función del receptor de insulina como la cinasa Akt (o PKB proteína cinasa B) esto provoca el bloqueo de la translocación del GLUT-4 del citosol a la membrana celular y la no incorporación de la glucosa al interior de la célula (Takayanagi *et al*, 2011).

Es reconocido el papel de la ozonoterapia en la activación de los sistemas antioxidantes endógenos (Martínez *et al*, 2005; Martínez *et al*, 2020; Menéndez *et al*, 2008). La ozonoterapia incrementa los niveles del factor transcripcional nuclear eritroide Nrf2, el cual promueve la expresión génica de enzimas antioxidantes como la catalasa (CAT), superóxido dismutasa (SOD), glucosa 6 fosfato deshidrogenasa (G6PD) entre otras, sugiriendo que esta acción farmacológica de la ozonoterapia, podría encontrarse involucrada en las acciones beneficiosas observadas en los pacientes con DM2 incluidos en el estudio. La estimulación de enzimas antioxidantes atenuarían el EO y de cierta forma no se alteraría la función de la Akt, ni tampoco la translocación del transportador GLUT-4 a la membrana de la célula disminuyendo de esta manera la resistencia a la insulina y la disfunción metabólica (disminución de glicemia basal, de hemoglobina glicosilada, triglicéridos, VLDL-colesterol, LDL-colesterol), resultado observado en los pacientes tratados con ozonoterapia rectal al finalizar el estudio (Tabla 2 (Martínez *et al*, 2020; Menéndez *et al*, 2008; Re L *et al*, 2014; Galie *et al*, 2019).

En cuanto, al restablecimiento de los niveles de los marcadores de daño hepático transaminasas (TGP-TGO), gammaglutamil transferasa (GGT), fosfatasa alcalina (FAL), albumina en sangre y recuento de plaquetas, se observó mejoría significativa de estos parámetros al finalizar el estudio en el grupo de ozonoterapia (tabla 3). Resultados similares, han sido descritos por otros autores, evidenciando la acción hepatoprotectora de la

ozonoterapia sistémica (Calunga *et al*, 2015; Ajamieh *et al*, 2005; Adali *et al*, 2019). La DM-tipo 2 es causa de daño hepático debido entre otros aspectos a la liberación descontrolada de ácidos grasos libres (AGL) que, junto a la disfunción mitocondrial, la resistencia a la insulina y el EO estimulan la catepsina B, proteasa lisosómica que activa al factor de transcripción nuclear NF- $\kappa$ B, estableciendo una inflamación crónica a nivel hepático, que se determinó mediante el incremento de los marcadores de daño hepático (Llorenç, 2015).

La acción hepato-protectora evidenciada por a la ozonoterapia en este estudio, se sugiere está asociada en parte, por la inhibición de citocinas proinflamatorias, de indicadores de EO (Delgado *et al*, 2017) y por el incremento de niveles tisulares y sanguíneos de citocinas antiinflamatorias como el factor transformador de crecimiento beta (TGF- $\beta$ ) y la citocina 10 (IL-10) (Menéndez *et al*, 2008). Este efecto antiinflamatorio de la ozonoterapia podría explicarnos de cierta manera, la mejoría de la función hepática obtenida en los pacientes tratados con ozonoterapia rectal (Martínez *et al*, 2020; Menéndez *et al*, 2008).

Recientemente, se reportan evidencias de que la ozonoterapia reduce niveles de NLRP3 inflammasoma (complejo proteico activador de caspasa-1, citocinas proinflamatorias y procesos inflamatorios crónicos), este efecto atenuaría el estado inflamatorio hepático y mejoraría la función de este órgano en los pacientes diabéticos tratados con ozonoterapia, reflejándose este hecho en la evolución de los marcadores de daño hepático observada en estos pacientes (Wang *et al*, 2018; Kelley *et al*, 2019).

La ozonoterapia, redujo la microalbuminuria de 24 horas, la creatinina plasmática, la proteinuria, la glucosuria y la cetonuria en los pacientes con DM2. Desde la década de los 90 la literatura médica viene reportando los efectos beneficioso de la ozonoterapia sobre el daño renal (Hui *et al*, 2008; Calunga *et al*, 2004; Calunga *et al*, 2009), es bien demostrado que los productos avanzados de la glicosilacion de proteína (AGE) presentes en la DM-tipo 2 son capaces de lesionar la estructura química de la membrana basal glomerular (hipuran sulfato, sialoproteína, carga polianionica) y provocar proteinuria, uno de los efectos estudiados de la ozonoterapia es la disminución a nivel sanguíneo y a nivel renal de los AGE (Martínez *et al*, 2005; Ajamieh *et al*, 2005; Calunga *et al*, 2004; Calunga *et al*, 2009), este efecto pudiera explicar la disminución de la microalbuminuria de 24 horas al final del estudio observada en los pacientes que recibieron ozonoterapia (tabla 4).

Estudios previos han mostrado que la ozonoterapia incrementa niveles de óxido nítrico (NO) en pacientes diabéticos (Calunga *et al*, 2015; Schwartz *et al* 2019; Martínez *et al*, 2005; Menéndez *et al*, 2008). Esto es importante ya que al aumentar el NO en pacientes diabéticos se produciría vasodilatación con caída de la resistencia vascular, de esta forma se disminuiría la presión intraglomerular, la presión hidráulica transcápilar reduciéndose la micro y macroalbuminuria, efecto observado en los pacientes que recibieron ozonoterapia al finalizar el estudio (Tabla 4 y 5).

Considerando, el efecto antiinflamatorio de la ozonoterapia mediado por la inhibición de citocinas proinflamatorias (TNF $\alpha$ , IL-1, IL-6 (Zamora *et al*, 2005; Hui *et al*, 2008; Calunga *et al*, 2019; Roche *et al*, 2017), este efecto pudiera estar actuando en la disminución de la creatinina en sangre al finalizar el estudio en los pacientes que recibieron la ozonoterapia, consideramos, que con la inhibición de citocinas proinflamatorias, no se activarían las moléculas de adhesión intercelular, no se dañaría el endotelio vascular, permitiendo el flujo sanguíneo hacia los riñones, este efecto con el incremento de los niveles ON en estos pacientes ya reportado le confiere un carácter vasodilatador a la ozonoterapia mejorando el flujo sanguíneo renal, la presión de filtración, la tasa de filtrado glomerular con aumento de la filtración de creatinina, disminuyendo está en

sangre tal como se observa en la Tabla 4. El efecto nefroprotector de la ozonoterapia ha sido demostrado y reportado por estudios preclínicos (Hui *et al*, 2008; Menéndez *et al*, 2008; Calunga *et al*, 2004; Calunga *et al*, 2009; Calunga *et al*, 2019; Calunga *et al*, 2013), los que se constatan en el presente estudio clínico.

La evolución de la cetonuria en los pacientes tratados con ozono al finalizar el estudio se explica por lo anteriormente expuesto, la ozonoterapia disminuyó niveles de LDL-colesterol, hemoglobina glicosilada, VLDL-colesterol, glicemia basal y triglicéridos este efecto provocaría disminución de AGL en sangre con la consecuente disminución de la captación hepática y la transformación de estos AGL a cuerpos cetónicos por la enzima carnitilpalmitoil transferasa, de esta forma disminuyen los cuerpos cetónicos en sangre y su aclaramiento plasmático (Gutiérrez *et al*, 2017; Cuevas & Alonso, 2016). La disminución de la glucosuria en pacientes que recibieron ozonoterapia al finalizar el estudio, pensamos que se debe a los efectos de la ozonoterapia en la disminución de la hiperglicemia basal mediado por la atenuación de la resistencia a la insulina previamente comentada (Tabla 5).

Adicionalmente la ozonoterapia fue capaz de disminución de la escala del dolor neuropático DNA-4 en pacientes (Tabla 6).

Entre los mecanismos que dañan al nervio periférico en la DM-Tipo 2, podemos destacar la acción de los productos avanzados de la glicosilación de proteínas (AGE), al unirse con sus receptores (RAGE) a nivel de la mielina causando daño mielínico, la Ozonoterapia disminuye niveles de AGE, de cierta forma este efecto protege la mielina y la integridad del nervio periférico. El incremento de las EROS dañando lípidos de membrana, la oclusión de la vasa-nervorum, el incremento de la vía del poliol con activación de enzima aldosa reductasa. La ozonoterapia tiene efecto antiinflamatorio previamente comentado (Peirone *et al*, 2018; Wanh *et al*, 2018; Leon *et al*, 2016), disminuye actividad de aldosa reductasa, disminuye AGE, modula niveles sanguíneos y tisulares de NO, disminuye E.O (Martínez *et al*, 2005; Menéndez *et al*, 2008), todos estos efectos pudieran estar actuando en la disminución del dolor en los pacientes que recibieron tratamiento con ozono al finalizar el estudio (Tabla 6).

## CONCLUSION

La ozonoterapia rectal puede ser utilizada como terapia complementaria al tratamiento convencional de pacientes con DM tipo 2, pues mejoró los parámetros metabólicos, marcadores de daño hepático y renal, incluyendo la escala de dolor neuropático.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adali, Y., Eroglu, H.A., Makav, M., & Guvendi, G.F. (2019). Efficacy of Ozone and Selenium Therapy for Alcoholic Liver Injury: An Experimental Model. *In Vivo*, 33, 763–769.
- Ajamieh HH, Berlanga J, Merino N, Sánchez G, Carmona A, et al. (2005). Role of protein synthesis in the protection conferred by ozone-oxidative-preconditioning in hepatic ischaemia/reperfusion. *Transpl Int*, 18 (5), 604-612.
- American Diabetes Association. Classification and Diagnosis of Diabetes. *Diabetes Care* 2017;40 (Suppl 1):S11-S24.
- Bocci, V., Borrelli, E., Travagli, V., & Zanardi, I. (2009). The Ozone Paradox: Ozone Is a Strong Oxidant as Well as a Medical Drug. *Medicinal Research Reviews*, 29 (4), 646 - 682.
- Calunga, J. L., Trujillo, Y., Menéndez, S., Zamora, Z., Alonso, Y., Merino, N. et al. (2009). Ozone oxidative postconditioning in acute renal failure. *Journ. Pharma and Pharmacol*, 61, 1–7.
- Calunga, J.L., Bello, M., Chaple, M., Barber, E., Menéndez, S., & Merino, N. (2004). Ozonoterapia en la glomerulonefritis tóxica experimental por adriamicina. *Rev Cub Invest Biomed*, 23(3), 139-143
- Calunga, J.L., Menéndez, S., & Zamora, Z. (2019). Ozone Therapy On Rats Submitted To Subtotal Nephrectomy: Role Of Interleukin 6 And Antioxidant System. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas*, 38 (1),1-10.
- Calunga, J.L.F., & Menéndez, S.C. (2013). Protective Effects of Ozone Therapy in Renal Damage. Renal Failure Prevention, Causes and Treatment. Colin Andrew Hutchison Editor by Nova Science Publishers. ISBN: 978-1-62618-779-5 (e-Book), 37-54.
- Calunga, J.L.F., Arenas, B.F., León, R.S., et al. (2015). Presentación de un caso de pie diabético neuro-infeccioso tratado con ozonoterapia. *Revista CENIC Ciencias Biológicas*, 46 (2), 195-202.
- Carrasco, N.F., Galgani, F.J.E., & Reyes, J.M. (2013). Síndrome de resistencia a la insulina. Estudio y manejo. *Revista Médica Clínica Las Condes*, 24 (5), 827-837.
- Cequera, A.M., & García de León MC. (2014). Biomarcadores para fibrosis hepática, avances, ventajas y desventajas, *Revista de Gastroenterología de México*, 79(3), 187-199.
- Clavo, B., Santana, N.R., Llontop, P., Dominga, G., Ceballo, D., Mendez. Ch., et al. (2015). Ozone Therapy in the Management of Persistent Radiation-Induced Rectal Bleeding in Prostate Cancer Patients. *Evidence Based Complementary and Alternative Medicine*, 3, 2-7.
- Cuevas, A. M., & Alonso, R.K. (2016). Dislipidemia Diabética. *Revista Médica Clínica Las Condes*, 27, 152-159.
- Delgado, L.R., Riera, R.M., Mesta, F., Hernandez. M.Y., Barrios, J.M., Martínez SG., & Aldalaien, S.M. (2017). Medical Ozone promotes Nrf2 phosphorylation reducing oxidative stress and proinflammatory cytokines in multiple sclerosis patients. *European Journal of Pharmacology*, 811,148-154.
- Díaz, L.C., & Luna, D.P. (2016). Productos Finales de la Glicación Avanzada en la Enfermedad Cardiovascular como complicación de la Diabetes. *Revista de Medicina e Investigación*, 4 (1), 52-57.
- Galie M, Covi V, Tabaracci G, Malatesta M. (2019). The Role of Nrf2 in the Antioxidant Cellular Response to Medical Ozone Exposure. *Int. J. Mol. Sci*, 20, 40-09.
- García, S.J.D., Menéndez, S., Antich, C., García, R.M.C., Peña, C.A., & Saad, P.H. (2005). Neuroprotección con Ozono en la Terapia: nuevos hallazgos en la isquemia cerebral Experimental. *Revista CENIC-Ciencias Químicas*, 36, 20-30.
- Goicolea, I. (2006) Algoritmo diagnóstico y terapéutico de la neuropatía diabética. *Endocrinol Nutr*, 53(Supl 2),31-3.

- Gutiérrez, C.R., Roura, A.G., & Olivares, J.A.R. (2017). Mecanismos Moleculares de la Resistencia a la Insulina: Una Actualización. *Gac Med Mex*, 153, 214-28.
- Gutiérrez, R.C., & Roura, A.G. (2017). Mecanismos Moleculares de la Resistencia a la Insulina: Una Actualización. *Gac Med Mex*, 153, 214-28.
- Herrero, M.T.V., Delgado, S.B., Bandrés, F.M., Ramírez-Iñiguez de la Torre, M.V., & Capdevila, L.G. (2018). Valoración del dolor. Revisión comparativa de escalas y cuestionarios. *Rev Soc Esp Dolor*, 25(4), 228-236.
- Hui, C., Bianzhi, X., & Xiuheng, L. (2008). Ozone oxidative preconditioning inhibits inflammation and apoptosis in a rat model of renal ischemia/reperfusion injury. *Eur J Pharmacol*, 581, 306-314.
- Jasso HLE, Villena AP, Guevara XL. (2015). Control metabólico en pacientes diabéticos ambulatorios de un hospital general. *Rev Med Hered*, 26, 167-172.
- Kelley, N., Jeltema, D., Duan, Y., et al (2019). The NLRP3 Inflammasome: An Overview of mechanisms of Activation and Regulation. *Int J Mol Sci*, 13, 3328.
- León, O.S.F., Viebahn, R.H., López, G.C., et al. (2016). Medical ozone increases methotrexate clinical response and improves cellular redox balance in patients with rheumatoid arthritis. *European Journal of Pharmacology*, 789, 313-318.
- Llorenç, C.R., (2015). Diabetes mellitus e hígado graso no alcohólico. *Diabetes Práctica*, 6 (2), 49-96.
- López-Heydeck, S.M., López-Arriaga, J.A., Montenegro-Morales, L.P., Cerecero, Aguirre. P., & Vázquez-de Anda, G.F. (2018). Análisis de laboratorio para el diagnóstico temprano de insuficiencia renal crónica. *Rev Mex Urol*, 78(1), 73-90.
- Manzini, J.L. (2000). Declaración de Helsinki: Principios éticos para la Investigación médica sobre sujetos humanos. *Acta Bioethica*, 2, 321-334.
- Martínez, G.S., Al Dalain, S.M., Menéndez, S., Re, L., Giuliani, A., Candelario, E., et al. (2005). Therapeutic efficacy of ozone in patients with diabetic foot. *European Journal of Pharmacology*, 523, 151-161.
- Martínez, G.S., Delgado, L.R., Díaz, A.B., Pérez, G.D., Re, L. (2012). Effects of Ozone Therapy on haemostatic and oxidative stress index in coronary artery disease. *European Journal of Pharmacology*, 691, 156-162.
- Martínez, G.S., Mohammed, S., Menéndez, S., Guilliani, A., & León. O.S. (2005) Ozone Treatment Reduces Blood Oxidative Stress and Pancreas Damage in a Streptozotocin-Induced Diabetes Model in Rats. *Acta Farm. Bonaerense*, 24 (4), 491-7.
- Martínez, G.S., Schwartz, A. & Di Donna, V. (2020). Potential Cytoprotective Activity of Ozone Therapy in SARS-CoV-2/COVID-19. *Antioxidants*, 9 (389), 2-12.
- Mata MC. (2008). Metformina y diabetes mellitus tipo 2. *Aten Primaria*, 40(3), 147-53.
- Menéndez, S., Gonzalez, R., Ledea, O., Hernández, F., Leon, O.S., & Diaz, M.G. (2008). Ozono Aspectos Básicos y aplicaciones Clínicas. 1era Ed. CNIC.1, 2 y 3: 5-107. 2.
- Paez, J.A., Ruiz, M.A., Masmela, K.M., Parada, Y.A., Peña, C.A., et al. (2016). Complicaciones crónicas de la diabetes mellitus: visión práctica para el médico de atención primaria. *Revista Cuarzo-Fundación Universitaria Juan N. Corpas*, 22 (1), 15-25.
- Peirone, C., Mestre, V.F., Fonseca, M.B., Colaco, B., Pires, M.J., Martins, T., et al. (2018). Ozone therapy prevents the onset of dysplasia in HPV16-transgenic mice-A pre-clinical efficacy and safety analysis. *Biomed. Pharmacother*, 104, 275-279.
- Re L, Martínez GS, Bordicchia M, Malcangia G et al, (2014). Is ozone pre-conditioning effect linked to Nrf2/EpRE activation pathway in vivo? A preliminary result. *European Journal of Pharmacology*, 742, 158-162.
- Reboussin, D.M., Allen, N.B., Griswold, M.E., Guallar, E., Hong, Y., Lackland, D.T., et al. (2017). Guideline for the Prevention, Detection, Evaluation, and Management of High Blood

- Pressure in Adults: A Report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Clinical Practice Guidelines. *J Am Coll Cardiol*, 1097(17), 41517-8.
- Rios, G.O., & Vidal, P.M. (2017). Manual de Prácticas para el Laboratorio de Hematología. Universidad Nacional Autónoma de México, pp 1-234.
- Roche, D.L., Romo, R.M., Mesta, F., Matos, H.Y., Barrios, J.M., Martínez, S.G., & Al-Dalain, S.M. (2017). Medical ozone promotes Nrf2 phosphorylation reducing oxidative stress and pro-inflammatory cytokines in multiple sclerosis patients. *Eur. J. Pharmacol*, 811, 148–154.
- Roessler, E.B. (2016). Manejo de la Hipertensión Arterial en Diabetes Mellitus. *Rev. Med. Clín. Condes*, 27 (2), 204-212.
- Sánchez, V.C., González, C.H., Aguilar, A.G., Torres, A., & Gutiérrez, R. (2012). Tratamiento del dolor neuropático con gabapentina en combinación con vitaminas B1 y B12. Estudio observacional prospectivo. *Revista de Endocrinología y Nutrición*, 20 (2), 67-73.
- Schwartz, A., Rivera, H.G., & Blanche, B.T. (2019). Ozonoterapia en el tratamiento del pie diabético neuroinfeccioso. Reporte de caso. *Ozone Therapy Global Journal*, 9 (1), 125-133.
- Takayanagi, R., Inoguchi, T., Ohnaka, K. (2011). Clinical and experimental evidence for oxidative stress as an exacerbating factor of diabetes mellitus. *J Clin Biochem Nutr*, 48 (1), 72-77.
- Wang, J., Wu, M., Lin, X., Li, Y., & Fu, Z. (2018). Low-Concentration Oxygen/Ozone Treatment Attenuated Radiculitis and Mechanical Allodynia via PDE2A-cAMP/cGMP-NF-κB/p65 Signaling in Chronic Radiculitis Rats. *Pain Res. Manag. Dec.* 13, 5192814.
- Wang, Z., Zhang, A., Meng, W., Wang, T., Li, D., Liu, Z., et al. (2018). Ozone protects the rat lung from ischemia-reperfusion injury by attenuating NLRP3-mediated inflammation, enhancing Nrf2 antioxidant activity and inhibiting apoptosis. *European Journal of Pharmacology*, 835, 82-93.
- Zamora, Z., Borrego, A., Orlay, Y., Delgado, R., & González, R. (2005). Effects of ozone oxidative preconditioning on TNF alfa release and antioxidant prooxidant intracellular balance in mice during endotoxic shock. *Mediat Inflamm*, 1, 16–22.