

## artículo original

# Agua ozonizada, antecedentes, usos en medicina y bases preclínicas

**Gregorio Martínez Sánchez**

Pharm. Dr., Ph.D., Freelance, Ancona, Italia

### Palabras clave

*agua ozonizada,  
ozono,  
solución ozonizada,  
ozonoterapia*

### Resumen

El uso de agua ozonizada ( $O_3W$ ) está ganando importancia en la medicina. En el  $O_3W$  el ozono está presente en el agua en forma de disolución, es decir, en su forma molecular ( $O_3$ ). En esta revisión abarcó la información bibliográfica sobre el uso general del  $O_3W$  en medicina y las evidencias preclínicas que lo sustentan. La búsqueda incluyó una revisión de artículos científicos en la base de datos MEDLINE y Zotero ISCO3, entre los años 1980-2018. Los descriptores utilizados fueron: agua ozonizada, soluciones ozonizadas. Se localizaron las principales fuentes de información (artículos originales). Las principales indicaciones del  $O_3W$  incluyen el control de infecciones locales: úlcera crural, úlceras de decúbito, micosis, infecciones micóticas, herpes simple y herpes zóster, quemaduras, también quemaduras sobre infectadas, lavado intraoperatorio, lesiones e infecciones oculares, cicatrices quirúrgicas (cicatrización: primaria o secundaria), edemas de origen traumático o bacteriano. Además, el  $O_3W$  también se aplica debido a sus efectos antiinflamatorios y analgésicos, así como a sus propiedades activadoras de tejidos en lesiones agudas y crónicas con y sin infección. El  $O_3W$  también se usa en forma de lavados intraoperatorios (desinfección), como desinfectante de las manos del cirujano, en medicina dental (incluida la desinfección de herramientas y agua), lavados en condiciones como la candidiasis y la enfermedad periodontal, en desinfección de conductos radiculares primarios y particularmente en cirugía oral. El  $O_3W$  también puede desempeñar un papel importante en el control de la contaminación de las líneas de agua de la unidad dental como un potente desinfectante. El  $O_3W$  además puede ser ingerido en casos de gastritis o carcinoma gástrico, o irrigado en la inflamación crónica intestinal o vesical. En balneoterapia, el  $O_3W$  burbujeaba en baños de agua tibia, estimula la circulación local y desinfecta, por lo cual es útil en el tratamiento de las varices, los trastornos circulatorios periféricos y las afecciones dermatológicas (eccema, úlceras). La evidencia preclínica apoya el uso del  $O_3W$  en medicina y muestra la importancia de su uso en la práctica médica diaria...

**Abreviaturas:**

SIDA, síndrome de inmunodeficiencia adquirida  
ARE, elemento de respuesta antioxidante  
BHY, células epiteliales orales humanas  
CHX, digluconato de clorhexidina  
COX-2, ciclooxigenasa-2  
CBP, proteína de unión a CREB  
DUWL, desinfección de agua de líneas de agua de unidades dentales  
ECM, matriz extracelular  
EDTA, ácido etilendiaminotetraacético  
GSH, glutatión reducido  
HDAC3, histona desacetilasa 3  
HGF-1, fibroblasto gingival humano  
HAT, histona acetil transferasas  
HO1, hemo-oxigenasa-1  
HNE, hidroxinonenal  
ICAM, molécula de adhesión intracelular  
IKK, I $\kappa$ B cinasa  
Keap1, proteína 1 asociada a ECH de tipo Kelch  
iNOS, óxido nítrico sintasa inducible  
LSP, lipopolisacárido  
SARM, *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina  
NETosis, una nueva forma de muerte programada de neutrófilos que resulta en la formación de trampas extracelulares de neutrófilos (NET)  
Nrf2, factor nuclear 2 relacionado con eritroide  
NF- $\kappa$ B, factor nuclear kappa potenciador de la cadena ligera de células B  
O3SS, solución salina ozonizada  
O<sub>3</sub>W, agua ozonizada  
PMN, leucocitos polimorfonucleares  
SOD, superóxido dismutasa  
TNF- $\alpha$ , factor de necrosis tumoral- $\alpha$ .

**Sugerencia sobre cómo citar este artículo:**

Martínez Sánchez, Gregorio. (2019). Agua ozonizada, antecedentes, usos en medicina y bases preclínicas. *Ozone Therapy Global Journal*. Vol. 9, nº 1, pp 5-31

## Introducción

Las aplicaciones industriales del ozono aprovechan sus propiedades antisépticas que lo han hecho muy útil en la desinfección del agua, tanto para su purificación como para el tratamiento de aguas residuales (Fig. 1). Es más efectivo que el cloro y también elimina los virus que pueden sobrevivir en presencia de altas concentraciones de cloro. En octubre de 1893, en Holanda (Ousbaden), se inventó y realizó el primer sistema de tratamiento de agua con ozono, que actualmente se extiende a más de 3 000 municipios, que incluye algunas grandes ciudades, en todo el mundo.<sup>1</sup>

En 1902, el diccionario práctico de medicina de Londres contenía algunas notas de J.H Clark, quien describió con entusiasmo el uso de agua ozonizada ( $O_3W$ ), llamada *Oxygenium*, en el tratamiento de la anemia, el cáncer, la diabetes, la gripe, la intoxicación por morfina y en el afta. El dentista suizo E.A Fish (1899-1966) fue el primer médico que intuyó los enormes beneficios del ozono en el tratamiento local. Trató a sus pacientes con ozono y  $O_3W$  desde 1932 con buenos resultados en casos de pulpitis gangrenosa con una simple inyección de gas. Uno de los pacientes que trató, fue el Dr. E. Payr (1871-1946) que comprendió de inmediato la utilidad del ozono y estaba muy entusiasmado con su aplicación en la cirugía general. En 1935, el Dr. Payr publicó un trabajo de 290 páginas titulado *Ozone Treatment in Surgery* y lo presentó en la 59ª Reunión de la Sociedad Alemana de Cirugía.

En términos de purificación de agua y tratamientos de aguas residuales, el uso del ozono también es importante en el tratamiento del agua utilizada en el entorno médico. Durante la última década, las infecciones nosocomiales se han vuelto comunes debido a que la resistencia de los patógenos a los antibióticos se ha incrementado hasta un punto en el que ya no hay un medicamento eficaz para algunas cepas. Estudios recientes sugieren que la contaminación ambiental juega un papel importante en las infecciones asociadas a la atención médica y en la transmisión no conocida de patógenos nosocomiales durante los brotes, de manera esporádica. Varios patógenos pueden persistir en el medio ambiente durante períodos prolongados y servir como vehículos de transmisión y diseminación en el entorno hospitalario. La transmisión cruzada de estos patógenos puede ocurrir a través de las manos de los trabajadores de la salud, quienes se contaminan directamente por el contacto con el paciente o indirectamente al tocar superficies contaminadas. Con menos frecuencia, un paciente podría ser colonizado por el contacto directo con una superficie contaminada.<sup>2</sup> Este es un problema complejo, en parte debido al uso extensivo de antibióticos en alimentos para animales y al uso inadecuado de estos por los pacientes. El  $O_3W$ , debido a su alto potencial antimicrobiano podría eliminar las bacterias resistentes<sup>3</sup> y, como consecuencia, se podrían evitar varios miles de muertes cada año.<sup>4</sup>

A pesar del uso extendido del cloro, 4 500 millones de personas (6 de cada 10 personas del mundo) no tienen acceso a un saneamiento adecuado del agua (Fig. 2).<sup>5</sup> Desafortunadamente, el cloro tiene características organolépticas insatisfactorias y está siendo ampliamente sustituido por el ozono en todo el mundo. El ozono es un desinfectante de agua potable más potente, capaz de inactivar varios patógenos humanos, Ej. hasta 63 bacterias diferentes (*Salmonella*, *Shigella*, *Vibrio*, *Campylobacter jejuni*, *Yersinia enterocolitica*, *Legionella*, *Staphylococcus aureus*,<sup>6</sup> entre otras), 15 virus (polio, echo, virus Coxsackie, entre otros), 25 hongos y esporas de moho (*Aspergillus*, *Penicillium*, *Trichoderma*, entre otros), varias variedades de levadura y hasta 13 patógenos fúngicos (*Alternaria*, *Monilinia*, *Rhizopus*, entre otros). Más recientemente, debido a la contaminación del agua subterránea con material fecal, el problema de la desinfección se ha vuelto más complejo, ya que los protozoos enquistados, como *Giardia lamblia*, *Cryptosporidium parvum* oocysts y helmintos (*Ascaris suum* y *Ascaris lumbricoides*), requieren un tiempo mucho más prolongado de contacto con el ozono que las bacterias y los virus.<sup>4</sup> Cada año *Cryptosporidium spp.* causa brotes de enfermedad, que pueden ser fatales para pacientes ancianos y enfermos inmunocomprometidos.<sup>7</sup>

Podemos definir el *agua ozonizada* como el agua obtenida después de la *ozonización* del agua (proceso de burbujeo de ozono en el agua). Durante la ozonización del agua no hay reacción química entre el ozono y el agua pura. La única reacción química tiene lugar entre el ozono y el material orgánico, inorgánico o biológico presente en el agua. La solubilidad del ozono en el agua dependerá de diferentes variables como: pH, temperatura, contenido de sales y otros. La vida media del ozono en el agua también depende de esas variables.

El tratamiento del agua doméstica<sup>8</sup> y las aguas residuales<sup>9</sup> también es una aplicación importante del ozono. Se estima que hoy en día, más de 1 100 plantas de tratamiento de agua en todo el mundo utilizan el ozono para la desinfección. El ozono se ha utilizado para la purificación del agua antes que el cloro y solo su alto costo ha dificultado su aplicación más amplia.<sup>10</sup> Sin embargo, según los estudios realizados por Grob y el Zurich Water Supply con agua del lago de Zurich tratada con ozono, el proceso de ozonización resultó más rentable y el de mejor efecto, es decir, sin la formación de sustancias tóxicas o carcinógenas, comparado con otros agentes tradicionales. La oxidación previa y / o intermedia con ozono seguramente será la forma más correcta de desinfectar el agua en el futuro inmediato.<sup>11</sup> La industria química y farmacéutica también usa el ozono para tratar el agua residual, como agente blanqueador,<sup>12</sup> y otras aplicaciones.

La industria alimentaria y la industria agrícola también emplearon con éxito  $O_3W$ . Por ejemplo: la ozonización del agua utilizada para el lavado evitó que las frutas se contaminaran con residuos de pesticidas. Se demostró que la aplicación del proceso de ozonización como parte del tratamiento posterior a la cosecha de las manzanas puede ser beneficiosa para la calidad de la fruta.<sup>13</sup> Una toxina alimentaria *Patulin*, puede estar presente en el jugo de pera y especialmente en el jugo de manzana, esta toxina puede destruirse por la acción del ozono.<sup>14</sup> Además, el efecto del agua ozonizada en *Xanthomonas oryzae pv. Oryzae*, una bacteria que puede estar presente en la semilla y que causa la enfermedad del tizón de las hojas en Paddy (*Oryza sativa*) fue objeto de estudio. Lavar las semillas de arroz con  $O_3W$  ayudaría a controlar la plaga bacteriana del arroz, que representa la enfermedad más grave de este cereal en Asia.<sup>15</sup> Además, lavar los tomates (*Lycopersicon esculentum* Mill) con  $O_3W$  1 mg/L por 15 min, logra una desinfección adecuada.<sup>16</sup> Sin embargo, en el caso de rodajas de tomates, se recomienda lavar con 0,4 mg/L de  $O_3W$  solo durante 3 min.<sup>17</sup>

La inactivación de la *Salmonella* mediante el lavado con  $O_3W$  también se demostró en los tomates, lechugas y cebollinos. El aumento de la temperatura y un bajo pH mejoraron la eficacia de inactivación en los tomates y las lechugas, pero no en los cebollinos. En estos tipos de procesos se deben tener en cuenta los ajustes que sean más apropiadas para cada tipo de producto.<sup>18</sup>

El ozono facilita la extracción de algunos metales pesados del suelo utilizando ácido tetra amino tetra cético (EDTA). El EDTA forma compuestos de coordinación fuertes, solubles en agua con algunos metales pesados (Pb, Zn) lo que permite que se disuelvan y puedan eliminarse de suelos contaminados. Si el suelo contaminado se irriga con  $O_3W$ , la eficacia de la extracción de Pb, [Am](#) y Pu aumenta de 11,0 a 28,9%,<sup>19</sup> 43,5%<sup>20</sup> y 50,7%<sup>20</sup> respectivamente.

En la acuicultura, el  $O_3W$  puede ser utilizada para facilitar la descomposición de materia orgánica. El ozono también se añade a los sistemas de recirculación para reducir las concentraciones de nitrito<sup>21</sup> mediante su conversión en nitrato. Si las concentraciones de nitrito en el agua son altas, estos se acumulan en la sangre y tejidos de los peces, donde interfiere con el transporte de oxígeno (que provoca la oxidación del grupo hemo de hemoglobina de ferroso ( $Fe^{2+}$ ) a férrico ( $Fe^{3+}$ ), haciendo la hemoglobina incapaz de unirse al  $O_2$ ).<sup>22</sup> A pesar de estos efectos positivos aparentes, el uso de ozono en sistemas de recirculación se ha relacionado con la reducción de la concentración de yodo biodisponible en los sistemas de agua salada, dando como resultado los síntomas de deficiencia de yodo tales como el bocio y disminución del crecimiento en larvas del lenguado senegalés (*Solea senegalensis*).<sup>23</sup>

El agua de mar ozonizada se utiliza para la desinfección de huevos contaminados con nodavirus. El nodavirus es un virus letal y de transmisión vertical que causa la mortalidad en los peces. Los huevos del eglefino (*Melanogrammus aeglefinus*) no deben ser tratados con

altas concentraciones de ozono, a concentraciones adecuadas estos se desinfectan y no eclosionan ni se afectan.<sup>24</sup>

El O<sub>3</sub>W también se utilizada con éxito en la desinfección de agua potable, agua de alta pureza para industrias de productos farmacéuticos y piscinas.<sup>25,26</sup> El uso de agua de mar ozonizada para reducir y eliminar los patógenos bacterianos en las instalaciones de maricultura y extender la vida útil de los alimentos marinos se ha demostrado. Después del tratamiento, los restos de *Vibrio* y la enfermedad del camarón fueron eliminados, el agua de mar ozonizada disminuyó el tiempo requerido para la muda normal de camarones y el ciclo de crecimiento total se redujo en tres días frente al grupo control que empleó agua no ozonizada.<sup>27</sup>

## Aplicaciones generales en medicina

Las principales aplicaciones médicas del O<sub>3</sub>W son: se utiliza para el lavado de heridas, áreas quirúrgicas, úlceras y para eliminar el pus y limpiar áreas necróticas. Como enjuague bucal para la periodontitis, gingivitis, para el lavado de cavidades durante las operaciones quirúrgicas. Por ingestión se utiliza en el tratamiento de las úlceras gástricas, *Helicobacter pylori*,<sup>28</sup> *Giardia lamblia* o gastritis.

Las principales aplicaciones del O<sub>3</sub>W se centran en el área de la odontología. Estas aplicaciones se apoyan en estudios preclínicos. Un estudio examinó el efecto del O<sub>3</sub>W en microorganismos orales y la placa dental. Casi no se detectaron microorganismos después del tratamiento con O<sub>3</sub>W (4 mg/L) durante 10 s. Cuando la placa dental experimental fue expuesta a O<sub>3</sub>W, el número de *S. mutans* viables disminuyó notablemente. El O<sub>3</sub>W inhibió la acumulación de placa dental experimental *in vitro*. Después de que las muestras de placa dental humana fueron expuestas al O<sub>3</sub>W *in vitro*, casi no se detectaron células bacterianas viables. Estos resultados sugieren que el O<sub>3</sub>W debería ser útil en la reducción de las infecciones causadas por microorganismos orales en la placa dental.<sup>29</sup>

Un estudio *in vitro* examinó el efecto del O<sub>3</sub>W contra las infecciones en la dentina bovina causadas por *Enterococcus faecalis* y *Streptococcus mutans*. Después de la irrigación con O<sub>3</sub>W, la viabilidad de *E. faecalis* y *S. mutans* que invaden el canal del diente disminuyó significativamente. En particular, cuando el espécimen se irrigó con sonicación, el O<sub>3</sub>W tenía casi la misma actividad antimicrobiana que el hipoclorito de sodio al 2,5% (NaOCl). El estudio también comparó la citotoxicidad frente a fibroblastos de ratón (L-929) entre el O<sub>3</sub>W y NaOCl. La actividad metabólica de los fibroblastos fue alta cuando las células se trataron con O<sub>3</sub>W, mientras que disminuyó significativamente cuando las células se trataron con NaOCl al 2,5%.<sup>30</sup>

El O<sub>3</sub>W fue eficaz en la reducción de la carga bacteriana tanto de la placa (después de 24 h de exposición) como en muestras de saliva total, pero no la elimina por completo. Además, no hubo un efecto estadísticamente significativo del enjuague con O<sub>3</sub>W en la tasa de flujo salival, calcio salival y la concentración de proteínas. Como consecuencia se pudo establecer que el enjuague con O<sub>3</sub>W puede ser un complemento eficaz para el cepillado de los dientes y la limpieza con hilo dental para mantener la placa y la carga bacteriana salival bajo control.<sup>31</sup> Adicionalmente, en la biopelícula que contiene *Actinomyces naeslundii*, *Streptococcus mutans* y *Lactobacillus paracasei* el O<sub>3</sub>W mostró actividad antimicrobiana equivalente a la de la clorhexidina.<sup>32</sup>

Un estudio comparó la eficacia antimicrobiana del O<sub>3</sub>W y la minociclina frente a cultivos microbianos mixtos después de su adhesión inicial a la superficie de los dientes. Los dientes se incubaron en suspensión de saliva que contenía cepas de referencia de *Streptococcus mitis*, *Fusobacterium nucleatum*, *Actinomyces naeslundii albicans* y *Candida sp.* Los dientes se sumergieron en O<sub>3</sub>W o en solución de minociclina. La solución salina estéril sirvió como control. Los microorganismos adherentes se resuspendieron, se diluyeron, se cultivaron, y se analizaron estadísticamente los resultados. En comparación con el grupo control, el O<sub>3</sub>W mostró una reducción significativa de las cuatro cepas, mientras que la minociclina fue eficaz sólo en dos de las cepas ensayadas.<sup>33</sup>

La evaluación *in vitro*, ha demostrado la actividad antibacteriana del O<sub>3</sub>W contra microorganismos asociados a enfermedades tales como abscesos, bacteriemia, endocarditis y osteomielitis, y en microorganismos resistentes a fármacos.<sup>34</sup> Una reducción significativa de microorganismos como *Staphylococcus aureus*,<sup>35-37</sup> *Pseudomonas aeruginosa*,<sup>36,37</sup> *Enterococcus faecalis*,<sup>36</sup> *Candida albicans*,<sup>38</sup> fue encontrada. Sin embargo, un estudio demostró que la irrigación de los canales radiculares humanos infectados con O<sub>3</sub>W, 2,5% NaOCl, 2% de clorhexidina y la aplicación de ozono gaseoso durante 20 min no fue suficiente para inactivar *E. faecalis*.<sup>39</sup> Por otra parte, un estudio del efecto del O<sub>3</sub>W, O<sub>3</sub>W con ultrasonificación, NaOCl y clorhexidina en canales de la raíz primaria de humanos contaminados por *E. faecalis*, proporcionó evidencia de su efecto antibacteriano en condiciones *in vitro*, pero NaOCl mostró los mejores efectos.<sup>40</sup>

La desinfección del agua de agua de la unidad dental (DUWL) usando ozono también fue estudiar con excelentes resultados. Cuando los métodos de desinfección con ozono se compararon con los que emplean peróxido de hidrógeno / iones plata, los mejores resultados se obtuvieron con el uso del ozono, en particular, frente a *Pseudomonas aeruginosa*.<sup>41</sup> Además, un estudio de cepas de *Acanthamoeba*, aisladas de DUWL muestra altos niveles de desinfección *in vitro* mediante la aplicación de ozono como desinfectante.<sup>42</sup>

Un estudio analizó la actividad bactericida y fungicida del O<sub>3</sub>W e incluyó también cepas bacterianas resistentes a múltiples fármacos. El propósito fue valorar la aplicación del O<sub>3</sub>W durante el proceso intraoperatorio, para favorecer la protección de los tejidos contra la infección por bacterias patógenas. El O<sub>3</sub>W después de 30 s era útil para matar casi todas las células de las cepas bacterianas y de levadura ensayadas (se analizaron y aislaron 60 cepas clínicas). La acción eficaz contra las esporas de *Aspergillus brasiliensis* requirió un tiempo de exposición más largo que las necesaria en el caso de células bacterianas o células vegetativas de levaduras.<sup>43</sup>

El efecto del O<sub>3</sub>W en la remineralización de caries creadas artificialmente también se investigó usando fluorescencia láser y microscopía de luz polarizada en un estudio *in situ*. Los resultados mostrados que el O<sub>3</sub>W se puede utilizar para remineralizar las lesiones de caries incipientes, y mejora el potencial remineralizante de la nano-hidroxiapatita, evitando de este modo que el diente entre en el ciclo de restauración repetitivo.<sup>44</sup>

Debido a las propiedades antisépticas del O<sub>3</sub>W, se ha estudiado su eficacia en el tratamiento de heridas. Un estudio *in vivo* en ratas diabéticas, mostró que las heridas irrigadas con O<sub>3</sub>W se apreció hemorragia difusa y el aumento de neoformación de vasos sanguíneos. No hubo diferencias estadísticamente significativas en la neoformación de hueso trabecular. Después de siete y 14 días, el número de osteoclastos fue mayor en los grupos tratados con O<sub>3</sub>W en comparación con los tratados con agua pura.<sup>45</sup> El uso de O<sub>3</sub>W también se extienden a la queratomicosis<sup>46</sup> y la dermatitis por contacto.<sup>47</sup>

El efecto de la solución salina ozonizada en (O3SS) ha sido también ensayado *in vitro*<sup>48</sup> e *in vivo*<sup>49</sup> utilizando cepas de *Mycobacterium tuberculosis*. Se encontró que la O3SS ejerce efectos bactericidas y bacteriostáticos; sus efectos se extienden a cepas multirresistentes. Además, se investigó el potencial anti-biopelícula oral de O3SS contra las biopelículas de *Staphylococcus aureus*, un microorganismo comúnmente implicado en infecciones de heridas. Los resultados mostraron una reducción del 99 % en el número de bacterias después de 15 min de exposición. Estos hallazgos sugieren que la O3SS puede ser adecuada como una terapia adyuvante para para la irrigación de heridas y en la desinfección.<sup>50</sup>

El mecanismo de acción de O3SS es complejo y está mediado por hidroxialquenal (HNE) y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y la activación de las vías de Nrf2. Un estudio *in vitro* que utilizó queratinocitos humanos en cultivo apoya esta hipótesis. El estudio incluyó diferentes dosis no tóxicas de O3SS que abarcaron desde 2 µM a 300 µM. Los resultados mostraron que O3SS es capaz de mejorar en la curación de heridas *in vitro* mediante la estimulación de la proliferación celular.<sup>51</sup>



## Efecto desinfectante del agua ozonizada. Soporte preclínico

El efecto desinfectante del O<sub>3</sub>W es una consecuencia directa de la presencia de ozono disuelto en el agua. Diferentes variables como: pH, el contenido de iones, la temperatura del agua, el tiempo de exposición y la concentración de ozono puede impactar en el efecto germicida. Por ejemplo, una concentración de ozono de 0,1 mg/L puede tener un bajo impacto en el control de bacterias de la cavidad oral,<sup>31</sup> sin embargo con el uso de 8 mg/L se llega a mejores resultados.<sup>36</sup> Aunque se han observado los efectos inhibidores del ozono sobre los organismos patógenos desde finales del siglo XIX, los mecanismos de estas acciones aún no se han dilucidado de manera satisfactoria. El ozono es un germicida potente, del cual se necesitan sólo unos pocos microgramos para hacer evidente sus efectos. A bajas concentraciones, el ozono inactiva rápidamente virus, bacterias coliformes, *Staphylococcus aureus*, *Aeromonas hydrophilia*, y muchos otros microorganismos.<sup>52</sup>

### *Inactivación de Virus por acción del ozono*

Los virus son parásitos a nivel genético, agrupados en diferentes familias sobre la base de su estructura, tipo de genoma nucleico y modo de replicación. Muchos viriones contienen una cubierta de fosfolípidos con glicoproteína, que encierra el nucleocápside que contiene ácidos nucleicos (ADN o ARN) y proteínas estructurales (que incluyen enzimas).

Los virus que contienen lípidos son sensibles al tratamiento con éter, disolventes orgánicos variados, y ozono, lo que indica que la alteración o pérdida de lípidos conduce al deterioro de su capacidad infectiva. Los virus que contienen lípidos en su estructura externa incluyen los *Herpes viridae* una gran familia que agrupa el Simplex, varicela-zoster, citomegalovirus y virus de Epstein-Barr; *Paramyxo viridae* (paperas, sarampión); la *Orthomyxo viridae* (influenza); la *Rhabdo viridae* (rabia); y la *Retro viridae* (VIH). El virus del VIH tiene una envoltura exterior formada por una doble capa de lípidos atravesada por proteínas de varios tipos que fijan dos moléculas de ARN.<sup>53</sup>

Muchos de los virus anteriores tienen ciclos de vida complejos y estrategias replicativas diversas, que se inician con la unión a las células hospederas, la penetración (excluyendo la envoltura viral), la síntesis de componentes moleculares, y la liberación de nuevas generaciones de viriones al medio a través de la lisis celular. Muchos virus crónicos tienen fases de latencia que se alternan con fases de viremia, cuando las partículas virales se vierten al torrente sanguíneo.

Los virus difieren en su susceptibilidad a la destrucción por el ozono. La resistencia del virus de la polio tipo 2 fue de 40 veces la de coxsackie AS,<sup>54,55</sup> y en un experimento que usó un reactor de flujo continuo en condiciones controladas de laboratorio, se encontró que la resistencia relativa en orden descendente fue: polio virus de tipo 2, echovirus tipo 1, virus de la polio tipo 1, virus coxsackie tipo B5, echovirus tipo 5, virus coxsackie tipo A9. En agua pura, donde la solubilidad del ozono es máxima y a temperatura ambiente, *Echovirus* tipo 29 se inactiva en un minuto, el virus de la polio tipo 1 en dos, el tipo 3 en tres y el tipo 2 en siete minutos.<sup>55</sup>

El mecanismo de inactivación enteroviral por el ozono se investigó utilizando como modelo el poliovirus 1 (Mahoney). Se observó que el ozono altera dos de las cuatro cadenas de polipéptidos presentes en la envoltura de proteína viral del poliovirus 1. Sin embargo, la alteración de la envoltura proteica no deteriora significativamente la adsorción del virus o altera la integridad de la partícula viral. El daño a la ARN después de la exposición al ozono se demostró mediante el análisis de la velocidad de sedimentación. Se concluyó que el daño al ácido nucleico viral es la principal causa de inactivación por ozono del polio virus 1.<sup>54</sup> La velocidad de inactivación del enterovirus<sup>56</sup> es más rápida que para *E. coli*, tiene lugar en concentraciones relativamente pequeñas de ozono, y está influenciada por el pH, la temperatura, y la presencia de compuestos orgánicos en el microambiente. Sobre la base de las mediciones de las constantes de velocidad (segundo orden) de la inactivación viral por el ozono, durante la exposiciones a ozono en el tratamiento de agua y aguas residuales, se considera el ozono como un desinfectante muy eficaz para el control de virus.<sup>57</sup>

Profundizando en los mecanismos antivirales del ozono, un estudio analizó la exposición del virus de la polio 1<sup>54</sup> a 0,21 mg/L de ozono a un pH de 7,2. Después de 30 s el 99 % de los virus fueron inactivados (perdió su capacidad de replicarse dentro de las células hospederas), pero su integridad estructural se mantuvo. El análisis de los componentes virales mostró daño a cadenas de polipéptidos y proteínas de la envoltura, lo que podría resultar en el compromiso de la capacidad de fijación. Además, la ruptura del RNA de cadena simple en dos partes, que compromete la replicación. Otros investigadores<sup>58</sup> en experimentos similares, concluyeron que durante la ozonización, es la cápside viral la que sufre daños. Sin embargo, la *polio viridae* (familia de los *picorna virus*) contiene cuatro proteínas estructurales que encapsulan una sola cadena de ARN y están desprovistos de lípidos (Fig. 3).

El virus Norwalk y otros calicivirus humanos (norovirus) son los principales agentes de la gastroenteritis, y el agua es una ruta importante de transmisión. En un esfuerzo por controlar los virus Norwalk en el agua potable, se determinó su reducción por desinfección con ozono a escala de laboratorio. Mediante el ensayo de la transcriptasa inversa-PCR (RT) para virus se cuantificaron los virus presentes. Otros dos virus entéricos, poliovirus 1 y MS2 colifago, se incluyeron en la comparación, y los efectos se ensayaron mediante ensayos de infectividad, así como por RT-PCR. Los efectos del ozono sobre los virus se determinaron utilizando una dosis de 0,37 mg de ozono / L a pH 7 y 5 °C durante un máximo de 5 min. Sobre la base de dos ensayos de RT-PCR, las reducciones del número de virus Norwalk fueron  $> 3 \log_{10}$  en un tiempo de contacto de 10 s, y fueron similares a las reducciones de los otros dos virus determinados por los mismos métodos de ensayo.<sup>59</sup>

La inactivación de rotavirus de simio SA-11 y rotavirus humano tipo 2 (Wa) por el ozono se comparó a 4 °C. Aunque la cepa humana era claramente más sensible, ambos tipos de virus se inactivaron rápidamente con concentraciones de ozono de 0,25 mg/L o mayores en todos los intervalos de pH ensayados. La comparación de la actividad antiviral del ozono con el de cloro en experimentos paralelos indicó poca diferencia significativa en la eficiencia para la inactivación del rotavirus, cuando se utilizaron los agentes desinfectantes en concentraciones de 0,25 mg / L o mayores.<sup>60</sup>

Hay evidencias de la inactivación de otros virus por ozono como: hepatitis A virus,<sup>61</sup> papilomavirus (VPH),<sup>62</sup> adenovirus, el norovirus, sapovirus, parechovirus, virus de la hepatitis E, astrovirus, pecovirus, picobirnavirus, parvovirus, gokushovirus,<sup>63</sup> virus Coxsackie B5 (CVF, CVEnv1, y CVEnv2), adenovirus humano (HAdV), echovirus, bacteriófagos (MS2, Q $\beta$ , T4, y  $\Phi$ 174),<sup>57</sup> bacteriófago lambda<sup>64</sup> virus de la gripe H5N1 / H1N1 humanos,<sup>65</sup> virus del herpes simple tipo 1 (HHV-1, cepa McIntyre), la estomatitis vesicular virus Indiana (VSIV), virus vaccinia (VACV, la cepa Elstree), adenovirus de tipo 2 (HAdV-2), y la cepa PR8 de la influenza A virus (FLUAVA / PR / 8/34 / H1N1; FLUAV),<sup>66</sup> entre otros.

#### *Efectos bactericidas del ozono*

La explicación más acertada para explicar los efectos bactericidas de ozono se centra en la interrupción de la integridad de la membrana a través de la peroxidación de fosfolípidos y lipoproteínas. Hay evidencia sobre su interacción con proteínas,<sup>67</sup> enzimas<sup>68</sup> y DNA<sup>68,69</sup> (Fig. 4).

La envoltura celular de los microorganismos Gram negativos tales como *E. coli* está constituida por un sistema complejo, formado por una membrana citoplásmica interna de fosfolípidos y proteínas que se invaginan en el citoplasma, una capa de peptidoglicano, y una membrana externa de polímeros (e.j. polisacáridos). Las células Gram positivas tienen una menor complejidad en su envoltura, están formadas por tres capas que incluyen una capa media de peptidoglicano.

En un estudio se investigó el efecto del ozono en *E. coli*,<sup>69</sup> y se encontró evidencia de la penetración del ozono en la membrana celular. Se detectó que reacciona con sustancias citoplásmicas y convierte el ADN de plásmido circular cerrado a abierto, lo que presumiblemente disminuye la eficiencia de la proliferación bacteriana. Es de destacar que los organismos superiores tienen mecanismos enzimáticos para volver a estabilizar los daños al DNA y ARN, que podría proporcionar una explicación parcial del por qué, en el tratamiento clínico con ozono a dosis prescritas, el ozono parece ser tóxico para los organismos que infectan y no para el paciente.<sup>70</sup>

*Vibrio parahaemolyticus* es una bacteria de la misma familia de las que causan el cólera. Vive en agua salada y salobre y causa enfermedades gastrointestinales en los seres humanos. La contaminación con *V. parahaemolyticus*, causa graves enfermedades transmitidas por alimentos, y se ha convertido en un problema de salud global. Un estudio evidenció que bajas concentraciones de ozono en agua (menos de 0,125 mg/L), las membranas celulares bacterianas de *V. parahaemolyticus* permanecen intactas, y el ozono se detoxifica por enzimas antioxidantes intracelulares (por ejemplo, superóxido dismutasa y catalasa). Con altas concentraciones de ozono en agua (más de 1 mg/L), las membranas celulares se dañaron. El daño se midió mediante la variación del grado de electro negatividad periférica en la superficie celular y la concentración de lactato deshidrogenasa (LDH) liberada en el espacio extracelular. También se consideraron en el estudio el análisis ultraestructural de las células por microscopía electrónica de transmisión. Cuando el O<sub>3</sub>W penetró en las células a través de las membranas, inactivó las enzimas, inhibió casi todos los genes, y degradó el material genético (ADN y ARN), que eventualmente fueron las causas que condujeron a la muerte celular.<sup>68</sup>

*Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) pertenece a la flora normal de la piel, mucosa y nasofaringe de varias especies animales, incluido el hombre. También está asociado a enfermedades tales como abscesos, bacteriemia, endocarditis y osteomielitis, además de mostrar resistencia a múltiples fármacos. El O<sub>3</sub>W es capaz de inactivar esta bacteria.<sup>35,36,50</sup> Además, el tratamiento de infecciones por *S. aureus*, en particular la cepa resistente a la meticilina de *Staphylococcus aureus* (MRSA), que constituye un reto en la práctica clínica. Un estudio mostró que el 100% *S. aureus* y 100% MRSA fueron eliminados por O<sub>3</sub>W (1,5 mg / L) en 1 min de exposición.<sup>6</sup>

Otras bacterias que muestran sensibilidad al tratamiento con ozono son: *Mycobacterium smegmatis*,<sup>71</sup> *Tuberculosis micobacteriana*,<sup>48</sup> *Enterococcus faecalis*,<sup>36,40,72</sup> *Legionella pneumophila*, *Streptococcus faecalis*, *Streptococcus mutans*,<sup>29</sup> *Pseudomonas aeruginosa*,<sup>36,37,73</sup> *Helicobacter pylori*,<sup>74</sup> *Salmonella typhimurium*,<sup>75</sup> *Lactobacillus paracasei*,<sup>32</sup> *Porphyromonas gingivalis*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*,<sup>76</sup> *Actinomyces Naeslundii*, *Streptococcus mitis* y *Fusobacterium nucleatum*.<sup>64</sup>

#### *Efectos fungicidas del ozono*

El ozono posee efectos fungicidas, a través de mecanismos poco conocidos. En un estudio, la inhibición del crecimiento de células de *Candida utilis* con ozono dependía en gran medida de las fases de su crecimiento, Las células más sensibles eran aquellas en fases iniciales de desarrollo.<sup>77</sup> Además, con el aumento en la dosis de ozono, los lípidos neutros (esteroles) y fosfolípidos que contienen nitrógeno (fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, y esfingomielina) se modificaron en una mayor medida.<sup>78</sup> Se ha propuesto que la acción antifúngica del ozono consiste principalmente en dañar las estructuras celulares de superficie.<sup>79</sup>

Curiosamente, en otro estudio,<sup>80</sup> diferentes dosis de ozono pueden estimular (1-2 x 10<sup>8</sup> moléculas de O<sub>3</sub> / célula) o inhibir la respiración (1 x 10<sup>9</sup> moléculas de O<sub>3</sub> / célula) y la reproducción de la levadura *C. utilis*. Los cambios observados se mantuvieron durante varias horas después del tratamiento con ozono. Estos efectos duales se explicaron por el posible reordenamiento estructural de las membranas celulares inducido por el ozono. Además, dosis bajas de ozono estimularon el crecimiento y desarrollo de la *Monilia fructigen* y *Phytophthora infestans*, mientras que dosis más altas eran inhibitoras.<sup>81</sup>

La pared celular de los hongos es multicapa y se compone de aproximadamente 80 % de carbohidratos y 20 % de proteínas y glicoproteínas. La presencia de numerosos enlaces disulfuro lo hacen blanco para la inactivación oxidativa por ozono (Fig. 5). El ozono tiene la capacidad de difundir a través de la pared de hongos, entrar en su citoplasma y dañar las funciones celulares vitales.<sup>82</sup> También se ha examinado el efecto inhibitor del ozono sobre la germinación de esporas, la producción de las esporas y la producción de biomasa en dos especies de *Aspergillus*.<sup>83</sup>

Los dermatofitos se clasifican en tres géneros: *Epidermophyton*, *Microsporum* y *Trichophyton*. Ellos tienen la capacidad de invadir el tejido queratinizado para producir una infección cutánea conocida como dermatofitosis. El ozono es eficaz para eliminar hongos queratinófilos dermatofitos como *Trichophyton rubrum* y *Trichophyton mentagrophytes*; dos organismos comúnmente aislados como agente etiológico en pacientes con onicomicosis y tinea pedis.<sup>84</sup> Además, otro estudio demostró que *Microsporum gypseum* y *Microsporum canis* fueron los más susceptibles al tratamiento con ozono, mientras que *Trichophyton interdigitale* y *Trichophyton mentagrophytes* eran relativamente resistentes.<sup>82</sup>

Los resultados de un experimento, que incluyó diversos métodos de tratamiento de aguas en las piscinas, evidenciaron que *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton mentagrophytes* y *Candida albicans*, pueden sobrevivir al menos 123 días en agua clorada a una temperatura entre 28-30 ° C, al menos 18 días en O<sub>3</sub>W a 34-35 ° C, y al menos 25 días en las tuberías de agua a temperatura ambiente de 23-25 ° C.<sup>85</sup>

*C. albicans* es un hongo patógeno multirresistente emergente que representa una fuente importante de enfermedades en los seres humanos y genera altos costos de salud en todo el mundo. Este hongo se encuentra con frecuencia en diferentes sitios anatómicos de personas sanas y podría inducir infecciones sistémicas y superficiales en condiciones ambientales óptimas. La candidiasis invasiva, es una infección nosocomial importante con altas tasas de morbilidad y mortalidad en niños hospitalizados. Representa una fuente importante de infecciones prolongadas en la unidad de cuidados intensivos, sobre todo en pacientes inmunodeprimidos o de edad avanzada.<sup>86</sup> El ozono fue altamente efectivo para eliminar *C. albicans*,<sup>38,64,87</sup> pero al parecer induce resistencia a la anfotericina B.<sup>87</sup> Sin embargo, el protocolo de desinfección combinado con clorhexidina puede actuar en sinergia, y promover la eliminación completa de *C. albicans*.<sup>88</sup> Además, la combinación de O<sub>3</sub>W y ultrasonificación tuvo un fuerte efecto en la viabilidad de *C. albicans* que se adhieren a las placas de resina acrílica.<sup>38</sup>

## Cicatrización de heridas y el efecto antiinflamatorio del agua ozonizada. Evidencias preclínicas

Aunque la terapia con ozono se aplica ampliamente durante la cicatrización de heridas, se sabe poco sobre los mecanismos celulares que intervienen en este proceso (Fig. 6). Un estudio *in vitro* evaluó la curación de heridas y el potencial antimicrobiano del ozono en fibroblastos (L929) y queratinocitos de la línea celular (HaCaT). Se demostró que el ozono (solución salina fosfato- tamponada, ozonizada con 8, 4, 2, 1, 0,5 y 0,25  $\mu\text{g/mL}$  de ozono), no mostró citotoxicidad para las líneas celulares. Además, aumentó considerable la migración de fibroblastos en las células tratadas con solución ozonizada a la concentración de 8  $\mu\text{g} / \text{mL}$ .<sup>89</sup> Por otra parte, un estudio que empleó queratinocitos humanos, evaluó el efecto de diferentes dosis no tóxicas de solución salina ozonizada (desde 0,096 hasta 0,144)  $\mu\text{g/mL}$ , en un modelo de herida *in vitro*. Los resultados mostraron que la solución salina ozonizada es capaz de mejorar la cicatrización de heridas *in vitro* mediante la estimulación de la proliferación celular [dosis óptima de 10  $\mu\text{M}$  (0,48  $\mu\text{g/mL}$ )]. Además, las vías de Nrf2 también se activaron, lo que se demostró determinado su translocación al núcleo y la expresión del gen para la enzima hemoxigenasa 1 (HO1). Se sugirió que el efecto de la solución salina ozonizada en la cicatrización de heridas es el resultado de la combinación de diferentes mediadores, de los que HNE y  $\text{H}_2\text{O}_2$  juegan un papel clave.<sup>51</sup> La liberación de factores de crecimiento por el ozono a partir de plaquetas<sup>90</sup> es otro mecanismo que probablemente facilita la cicatrización de heridas. Se ha demostrado que el  $\text{O}_3\text{W}$  induce la neoformación de los vasos sanguíneos y la migración de osteoclastos, sin afectar la neoformación del hueso. Estos efectos se estudiaron en un modelo animal en ratas.<sup>45</sup>

El efecto antiinflamatorio de  $\text{O}_3\text{W}$  es también un factor importante en la cicatrización de heridas. Un estudio, evaluó los efectos antiinflamatorios de  $\text{O}_3\text{w}$  en un modelo de inflamación experimental. En  $\text{O}_3\text{W}$  en dosis de 10  $\mu\text{g/mL}$  se inyectó por vía intraperitoneal en ratones, a los cuales se les indujo inflamación aguda con un lipopolisacárido (LPS). Los resultados mostraron que la inyección intraperitoneal de  $\text{O}_3\text{W}$  disminuyó las concentraciones de factor de necrosis tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) y aumentó la actividad de la superóxido dismutasa (SOD). Los resultados sugieren que  $\text{O}_3\text{W}$  tiene propiedades antiinflamatorias y es una opción terapéutica potencial para la inflamación aguda.<sup>91</sup>

Un estudio dirigido a desarrollar un agente antimicrobiano que no cause daño a la pulpa dental evaluó la expresión de cicloxigenasa 2 (COX-2), IL-6 y TNF-alfa y p38 inducida por LPS, en la línea celular de odontoblastos de rata, KN-3. La activación se suprimió notablemente cuando el LPS se trató previamente con O<sub>3</sub>W. El estudio sugiere que las células odontoblásticas exhiben respuestas inflamatorias contra LPS y que el O<sub>3</sub>W tiene la capacidad de reducir la respuesta inflamatoria inducida por LPS a través de su inhibición directa.<sup>92</sup>

Además, el efecto antiinflamatorio de O<sub>3</sub>W está muy relacionado con la señalización / transcripción del sistema NF-κB, un importante regulador de la inflamación. Un estudio demostró que la actividad de NF-κB en células orales estimuladas con TNF y en tejido de ligamento periodontal de superficies de la raíz de los dientes, se inhibió después de la incubación con medio ozonizado. Bajo este tratamiento, se impidió la proteólisis del factor IκB alpha, la expresión de citocinas, y la transcripción κB-dependiente. Los aminoácidos ozonizados parecen ser los principales componentes inhibidores del medio.<sup>93</sup>

El mecanismo de acción de O<sub>3</sub>W implica una interacción dual con los factores nucleares Nrf2 y las vías de NF-κB (Fig. 7). El estímulo oxidativo de activación Nrf2 mediado por O<sub>3</sub> puede conducir a la producción de enzimas antioxidantes y enzimas citoprotectoras tales como SOD, catalasa, glutatión reductasa (GPx), HO-1 y oxidorreductasa NADPH quinona (NQO1) y aumento de la síntesis de glutatión reducido (GSH), NADPH y los transportadores de múltiples fármacos. Al unirse el Nrf2 al elemento de respuesta antioxidante (ARE) en el ADN, se inicia la síntesis de estas proteínas para mantener el equilibrio redox celular. Normalmente Nrf2 está unido a un elemento represor en el citoplasma, la proteína Kelch-like ECH-asociada 1 (Keap1) y se encuentra unida a ubiquitina, lo cual conduce a la degradación proteasomal. Sin embargo, durante el daño oxidativo, los grupos sulfhídrico de Keap1 se oxidan, y provocan la alteración en conformación de Keap1, y por lo tanto se libera Nrf2, que luego se une con elementos del genoma junto con pequeñas proteínas Maf.

NF-κB es otro factor de transcripción regulador del equilibrio redox, que participan en la inflamación, la función inmune, el crecimiento celular y la apoptosis. p65 es una proteína Rel con eficiencia de transactivación mientras que la proteína asociada p50 no posee actividad transcripcional. El estrés oxidativo puede causar la activación de la quinasa IκB (IKK). La activación de IKK provoca la fosforilación de inhibidor de NF-κB, IκB. Una vez fosforilado IκB se dirige a la ruta de la con poli-ubiquitinación que conduce a su degradación proteasomal. Este proceso da como resultado la liberación de NF-κB, que luego migra hacia el núcleo y se une con la región κ del genoma. Con la ayuda de otros coactivadores y las histonas acetiltransferasa (HAT), NF-κB hace posible la transcripción de mediadores proinflamatorios tales como interleucina-6 (IL-6), TNF-α, COX-2, interleucina-1 (IL-1), moléculas de adhesión intracelular (ICAM) y la enzima óxido nítrico sintasa (iNOS).



Estas dos vías tienen un mecanismo regulatorio de inhibición recíproco a través de interacciones proteína-proteína o a través de los efectos de mensajeros secundarios. La vía Nrf2 inhibe la activación de la vía de NF- $\kappa$ B mediante el aumento de las defensas antioxidantes y de la expresión de HO-1, que neutraliza eficientemente ERO y desintoxica los oxidantes y por lo tanto, reduce la activación de NF- $\kappa$ B mediada por ERO. La vía Nrf2 también inhibe la ruta del NF- $\kappa$ B a nivel transcripcional, mediante la prevención de la degradación de I $\kappa$ B- $\alpha$ . Del mismo modo, NF- $\kappa$ B a nivel transcripcional reduce la activación Nrf2 al reducir la transcripción de genes ARE, disminuye la unión a proteínas (CBP) CREB libre al competir con Nrf2 por el dominio CH1-KIX de CBP. NF- $\kappa$ B también mejora el reclutamiento de histona deacetilasa 3 (HDAC3) a la región ARE mediante la unión a Mafk y por lo tanto interfiere con la facilitación de la transcripción de Nrf2.

Por otra parte, se ha estudiado el efecto cicatrizante del O<sub>3</sub>W en la úlcera gástrica. O<sub>3</sub>W (1,2  $\mu$ g / mL, p.o.) en modelos de úlceras gástricas inducidas por el estrés, promueve una reducción significativa en la incidencia de tipos de úlceras I, II y III ( $p < 0,05$ ).<sup>94</sup>

Se han estudiado, además, de los efectos antitumorales del O<sub>3</sub>W utilizando un modelo de ratón portador de un tumor y los controles normales. La administración local de O<sub>3</sub>W (208 mM) no se asoció con ningún efecto perjudicial en los tejidos normales. Por otra parte, la administración local de O<sub>3</sub>W (20,8; 41,6; 104 o 208 mM) directamente en el área de necrosis inducida por el tejido tumoral, inhibió la proliferación de células tumorales. Estos resultados indican que O<sub>3</sub>W no afecta a los tejidos normales y sólo daña el tejido tumoral mediante la inducción de necrosis selectiva. Sobre la base de estos resultados, se sugirió que la administración de O<sub>3</sub>W es un complemento o alternativa segura y sencilla con potencial para ser aplicada en los tratamientos antineoplásicos actuales.<sup>95</sup>

La seguridad de la aplicación de O<sub>3</sub>W también fue probada en tejido epitelial humano (BHY) y las células de fibroblasto gingival (HGF-1). El estudio investigó si el ozono gaseoso ( $4 \cdot 10^6$ )  $\mu$ g/ m<sup>3</sup> y el O<sub>3</sub>W (1,25 a 20  $\mu$ g / mL) tenían efectos citotóxicos sobre BHY y HGF-1 en comparación con antisépticos conocidos [digluconato de clorhexidina (CHX) 2 %, 0,2 %; hipoclorito de sodio (NaOCl) al 5,25 %, 2,25 %; peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3 %], durante un 1 min, y en comparación con metronidazol, aplicado por 24 h. Se encontró que el ozono gaseoso tenía efectos tóxicos en ambos tipos de células. No se observaron signos citotóxicos para O<sub>3</sub>W. CHX (2 %, 0,2 %) fue altamente tóxico para las células BHY, y ligeramente (2 %) no tóxicos (0,2 %) a las células HGF-1. NaOCl y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> provocaron una disminución notable de la viabilidad celular (BHY, HGF-1), mientras que el metronidazol generaba toxicidad ligera sólo a las células BHY. Estos resultados permitieron concluir que el O<sub>3</sub>W tuvo una biocompatibilidad, superior al de los antisépticos ensayados.<sup>96</sup>

## **Conflicto de intereses:**

El autor no declara conflictos de intereses.

## **Agradecimientos:**

El autor agradece el apoyo del Dr. Frank ShalleMBERGER en la corrección gramatical del manuscrito (versión en inglés). El autor también expresa su gratitud al Dr. Fadi Sabbah y al Dr. Carlos Nogales por su estímulo para escribir sobre este tema. Este manuscrito será parte del libro "Agua ozonizada. Una guía práctica para profesionales de la salud" de los autores: Fadi Sabbah, Carlos Nogales y Gregorio Martínez-Sánchez.



Figura I.1. Resumen de los usos industriales y médicos del agua ozonizada.

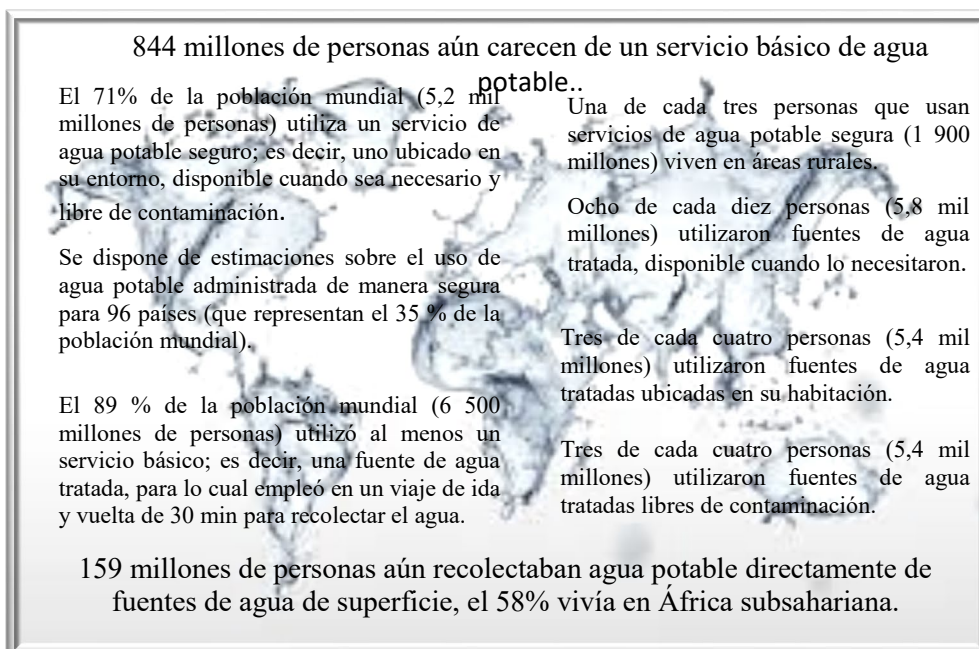
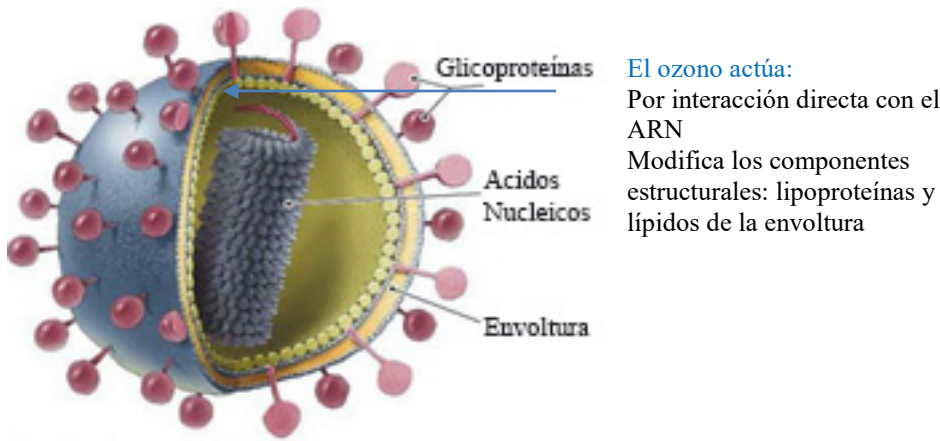
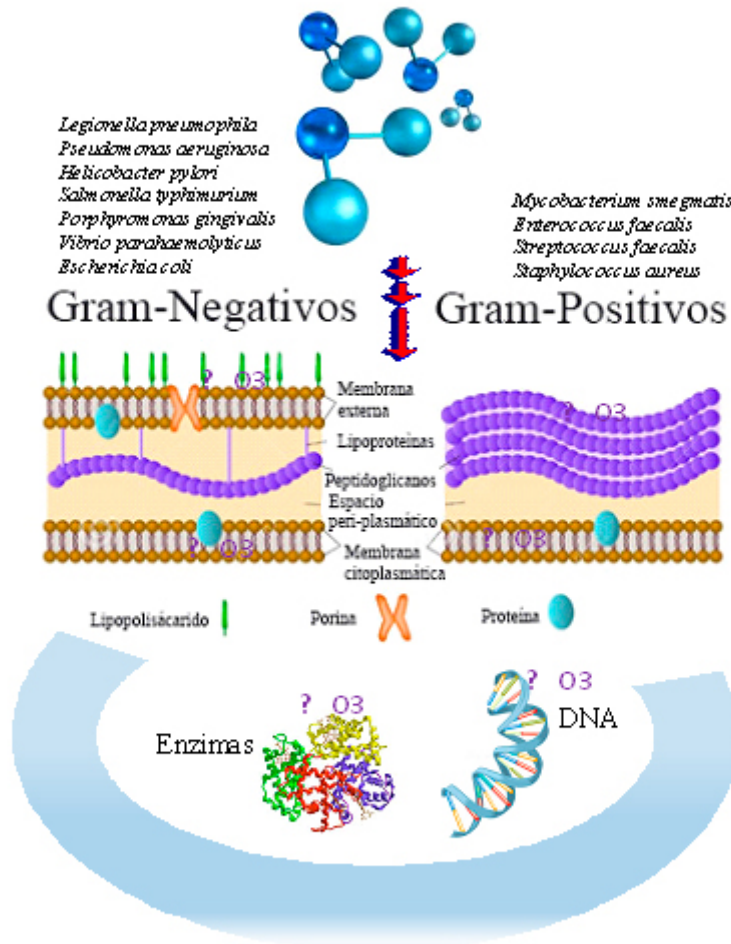


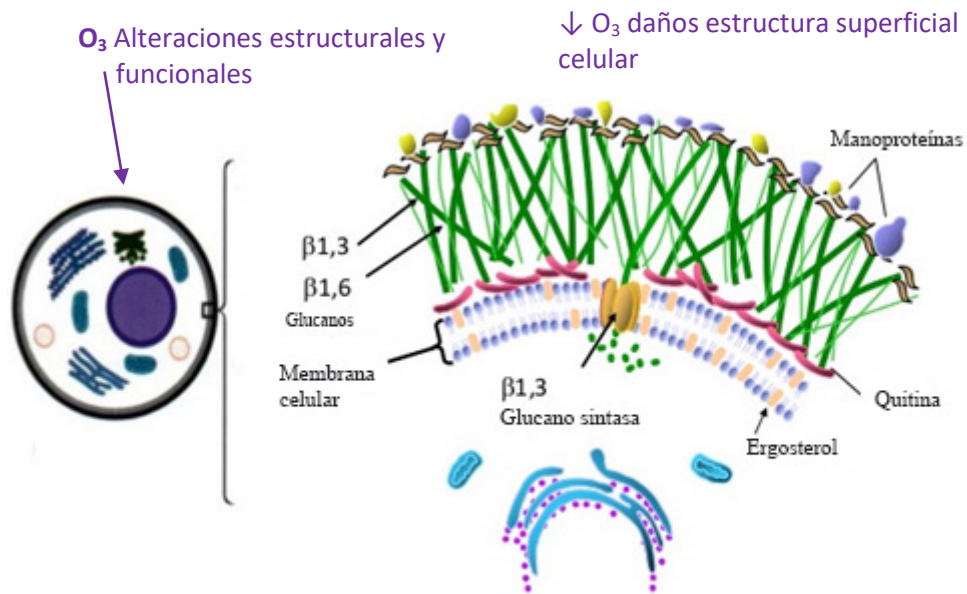
Figura 2. Indicadores globales para el agua potable en 2015 según el Programa de monitoreo conjunto de la OMS / UNICEF para el suministro de agua 2017.<sup>5</sup>



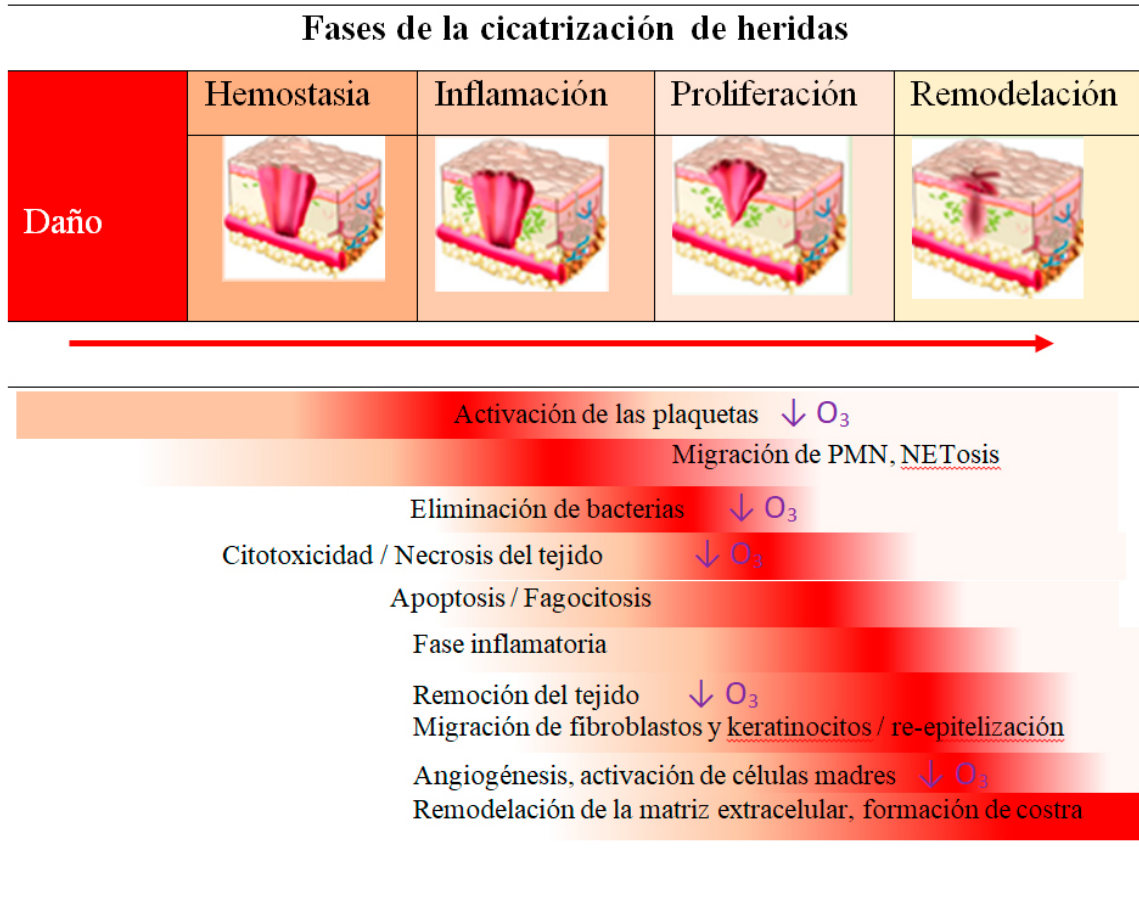
**Figura 3.** Posibles puntos de la interacción del ozono con los virus. El ejemplo muestra una representación de una partícula de virus de la gripe (virus de ARN).



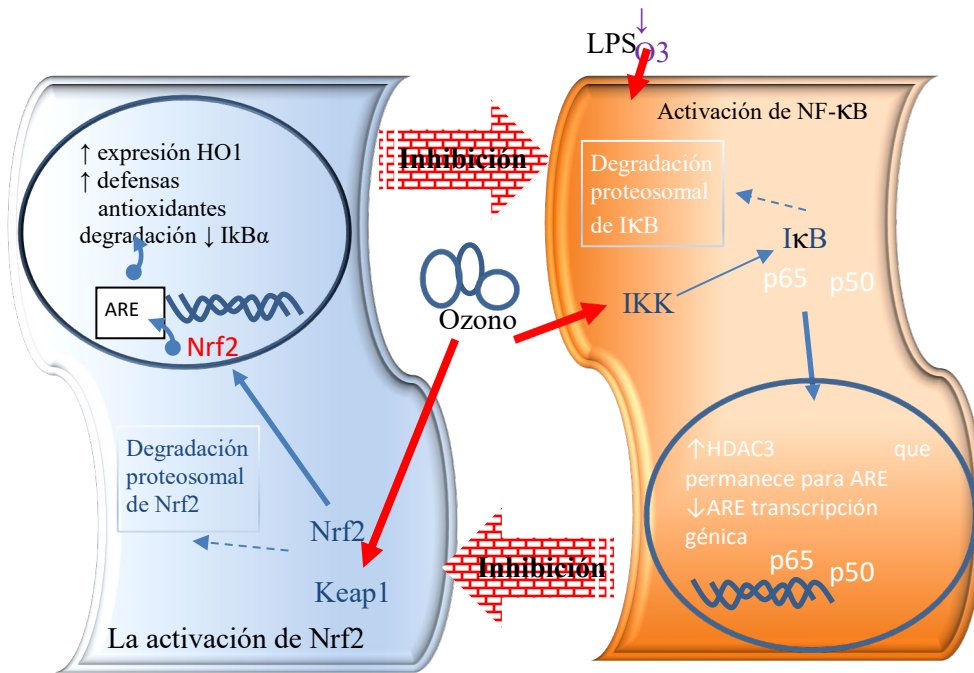
**Figura 4.** Esquema del mecanismo de interacción del ozono con las bacterias. El ozono altera la integridad de la membrana a través de la peroxidación de los fosfolípidos, las lipoproteínas y el peptidoglicano. Inactiva las enzimas, inhibe casi todos los genes y degrada el material genético, interrumpiendo la actividad normal de las bacterias.



**Figura 5.** Representación del mecanismo principal implicado en la interacción del ozono con los hongos. Modificado de: Introducción a la Micología Médica (2001).<sup>97</sup>



**Figura 6.** La función del ozono en las diferentes etapas de la cicatrización de heridas. Una vez lesionado el tejido se establece la hemostasia a través de la coagulación. A continuación, hay infiltración de células del sistema inmune encargadas de limpiar la herida de los microbios, evitando así la infección y dejando espacio para la granulación. Los fibroblastos, células epiteliales, queratinocitos y células endoteliales, proliferarán y migran a la zona de la herida para volver a poblar el lugar de la lesión, lo que facilita el cierre de la herida. Por último, los procesos de regeneración y aclaramiento, regulan el desarrollo de la formación de cicatrices. Leyenda: PMN, leucocitos polimorfonucleares; NETosis, forma de muerte programada de neutrófilos que resulta en la formación de trampas extracelulares de neutrófilos (TNE); ECM, matriz extracelular. ↓O<sub>3</sub>, punto de intervención de ozono. Modificado de Pei-Hui *et al.* (2018).<sup>98</sup>



**Figura 7.** Representación del mecanismo antiinflamatorio del agua ozonizada mediada por la interacción con las vías Nrf2 y NF-κB. Leyenda: HO-1, hemo-oxigenasa-1; ARE, elemento de respuesta antioxidante; Keap1, Kelch-like proteína ECH asociada; IKK, IκB cinasa; CBP, CREB proteína de unión; HDAC3, histona deacetilasa 3. Nrf2, factor nuclear eritroide relacionado con el factor 2; NF-κB, factor nuclear κ promotor de cadena ligera de células B; LPS, lipopolisacárido (Modificado de Veera Ganesh Y. *et al*).<sup>99</sup>

## Bibliografía

1. *Emerging therapies: ozone. What the patient should know and how the doctor must act.* [computer program]: Aracne Editrice, Roma; 2012.
2. Suleyman G, Alangaden G, Bardossy AC. The Role of Environmental Contamination in the Transmission of Nosocomial Pathogens and Healthcare-Associated Infections. *Curr Infect Dis Rep.* Apr 27 2018;20(6):12.
3. Terao R, Terao C, Mori K, Matsui M. Technical Note: 100% Ozone-treatment System of Bath Water. *Ozone: Science & Engineering.* 2010;25(4):345-349.
4. Bocci V, ed *Ozone: A new medical drug.* ISBN-10: 9048168058. ISBN-13: 978-9048168057. Netherlands: Springer; 2010.
5. WHO, INICEF. *Progress on drinking water, sanitation and hygiene: 2017 update and SDG baselines.* Geneva 2017.
6. Song M, Zeng Q, Xiang Y, et al. The antibacterial effect of topical ozone on the treatment of MRSA skin infection. *Mol Med Rep.* Feb 2018;17(2):2449-2455.
7. Adamu H, Petros B, Zhang G, et al. Distribution and clinical manifestations of Cryptosporidium species and subtypes in HIV/AIDS patients in Ethiopia. *PLoS Negl Trop Dis.* Apr 2014;8(4):e2831.
8. Demir F, Atguden A. Experimental Investigation on the Microbial Inactivation of Domestic Well Drinking Water using Ozone under Different Treatment Conditions. *Ozone Science & Engineering.* 2016;38(1):25-35.
9. Schneider W, Rump HH. Experiments for Waste Water Treatment with OZONE in Combination with Adsorption Procedures. *Ozone Science & Engineering.* 2008;4(1):3-14.
10. Diamant BZ. Recent Development in the Role of Ozone in Water Purification and its Implications in Developing Countries. *Ozone Science & Engineering.* 1980;2(3):241-250.
11. Schalekamp M. Pre- and intermediate Oxidation Of Drinking Water With Ozone, Chlorine and Chlorine Dioxide. *Ozone Science & Engineering.* 1986;8(2):151-186.
12. Archibald F, Roy-Arcand L. The use of ozone to decolorize residual direct paper dyes in kraft paper machine whitewater. *Ozone Science & Engineering.* 1997;19(6):549-565.
13. Sadło S, Szpyrka E, Piechowicz B, Antos P, Józefczyk R, Balawejder M. Reduction of Captan, Boscalid and Pyraclostrobin Residues on Apples Using Water Only, Gaseous Ozone, and Ozone Aqueous Solution. *Ozone: Science & Engineering.* 2016;39(2):97-103.
14. Cataldo F. Ozone Decomposition of Patulin—A Micotoxin and Food Contaminant. *Ozone Science & Engineering.* 2008;30(3):197-201.
15. Mohan N, Patel K, Padmanabhan K, Ananthi S. Ozone for Plant Pathological Applications. *Ozone: Science & Engineering.* 2014;27(6):499-502.
16. Bataller-Venta M, Cruz-Broche SS, Fernández-Torres I, et al. Ozone Application for Postharvest Disinfection of Tomatoes. *Ozone Science & Engineering.* 2010;32(4):361-371.
17. Aguayo E, Escalona V, Silveira AC, Artes F. Quality of tomato slices disinfected with ozonated water. *Food Sci Technol Int.* Apr 2014;20(3):227-235.
18. Xu W, Wu C. Different efficiency of ozonated water washing to inactivate Salmonella enterica typhimurium on green onions, grape tomatoes, and green leaf lettuces. *J Food Sci.* Mar 2014;79(3):M378-383.
19. Lestan D, Hanc A, Finzgar N. Influence of ozonation on extractability of Pb and Zn from contaminated soils. *Chemosphere.* Nov 2005;61(7):1012-1019.
20. Plaué JW, Czerwinski KR. The influence of ozone on ligand-assisted extraction of 239Pu and 241Am from rocky flats soil. *Radiochim. Acta.* 2003;91(6-2003):309-313.
21. Noble AC, Summerfelt ST. Diseases encountered in rainbow trout cultured in recirculating systems. *Annual Review of Fish Diseases.* 1996;6:65-92.
22. Ferreira O, de Costa OT, Ferreira S, Mendonca F. Susceptibility of the Amazonian fish, Colossoma macropomum (Serrasalminae), to short-term exposure to nitrite. *Aquaculture.* 2004;232:627-636.
23. Ribeiro ARA, Ribeiro L, Saele Ø, Hamre K, Dinis MT, Moren M. Iodine-enriched rotifers and Artemia prevent goitre in Senegalese sole (Solea senegalensis) larvae reared in a recirculation system. *Aquaculture Nutrition.* 2009;17(3):248-257.
24. Buchan K, Martin-Robinchaud D, Benfey TJ, MacKinnon A, Boston L. The efficacy of ozonated seawater for surface disinfection of haddock (Melanogrammus aeglefinus) eggs against piscine nodavirus. *Aquacultural Engineering.* 2006;35:102-107.
25. Masschelein WJ. Belgian Experiences in the Ozonization of Water. *Ozone Science & Engineering.* 1984;7(4):327-350.
26. Steinbrüchel A, Rice RG, Spangenberg R. First Year Operation Report of the Corona Discharge Ozone Swimming Pool Water Treatment Systems at the Peck Aquatic Facility, Milwaukee, Wisconsin. *Ozone Science & Engineering.* 1989;13(4):463-478.
27. Blogoslawski WJ, Stewart ME. Some Ozone Applications in Seafood. *Ozone Science & Engineering.* 2011;33(5):368-373.



28. Fedorov AA, Gromov AS, Sapronenok SV, Kurochkin V, Zhernakova ZM. [Ozone therapy in gastroduodenal pathology associated with *Helicobacter pylori*]. *Vopr Kurortol Fizioter Lech Fiz Kult*. Nov-Dec 2006(6):34-37.
29. Nagayoshi M, Fukuizumi T, Kitamura C, Yano J, Terashita M, Nishihara T. Efficacy of ozone on survival and permeability of oral microorganisms. *Oral Microbiol Immunol*. Aug 2004;19(4):240-246.
30. Nagayoshi M, Kitamura C, Fukuizumi T, Nishihara T, Terashita M. Antimicrobial effect of ozonated water on bacteria invading dentinal tubules. *J Endod*. Nov 2004;30(11):778-781.
31. Sadatullah S, Mohamed N, Razak F. Qualitative analyses of the antimicrobial effect of ozonated water on supragingival plaque and salivary microbes. *Ann Med Health Sci Res*. Jul 2014;4(4):526-531.
32. Kollmuss M, Kist S, Obermeier K, Pelka AK, Hickel R, Huth KC. Antimicrobial effect of gaseous and aqueous ozone on caries pathogen microorganisms grown in biofilms. *Am J Dent*. Jun 2014;27(3):134-138.
33. Zimmermann D, Waltimo T, Filippi A. Ozonized Water in Dental Traumatology - A Preliminary Study on the Treatment of Avulsed Teeth, in Vitro. *Ozone: Science & Engineering*. 2012;34(6):484-488.
34. Onouchi T. A study on the bactericidal action of aqueous solution of O<sub>3</sub> in dentistry. *J Nihon Univ Sch Dent*. Dec 1965;7(4):200-208.
35. Velano HE, do Nascimento LC, de Barros LM, Panzeri H. [In vitro assessment of antibacterial activity of ozonized water against *Staphylococcus aureus*]. *Pesqui Odontol Bras*. Jan-Mar 2001;15(1):18-22.
36. Nogales CG, Ferreira MB, Lage-Marques JL. Comparison of the Antimicrobial Activity of Three Different Concentrations of Aqueous Ozone on *Pseudomonas Aeruginosa*, *Staphylococcus Aureus*, and *Enterococcus Faecalis* - in Vitro Study. *Revista Española de Ozonoterapia*. 2014;4(1):9-15.
37. Bialoszewski D, Pietruczuk-Padzik A, Kalicinska A, et al. Activity of ozonated water and ozone against *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Med Sci Monit*. Nov 2011;17(11):BR339-344.
38. Arita M, Nagayoshi M, Fukuizumi T, et al. Microbicidal efficacy of ozonated water against *Candida albicans* adhering to acrylic denture plates. *Oral Microbiol Immunol*. Aug 2005;20(4):206-210.
39. Estrela C, Estrela CR, Decurcio DA, Hollanda AC, Silva JA. Antimicrobial efficacy of ozonated water, gaseous ozone, sodium hypochlorite and chlorhexidine in infected human root canals. *Int Endod J*. Feb 2007;40(2):85-93.
40. Goztas Z, Onat H, Tosun G, Sener Y, Hadimli HH. Antimicrobial effect of ozonated water, sodium hypochlorite and chlorhexidine gluconate in primary molar root canals. *Eur J Dent*. Oct 2014;8(4):469-474.
41. Filippi A. Water Disinfection of Dental Units using Ozone – Microbiological Results after 11 Years and Technical Problems. *Ozone Science & Engineering*. 2002;24(6):479-483.
42. Hikal W, Zaki B, Sabry H. Evaluation of Ozone Application in Dental Unit Water Lines Contaminated with Pathogenic *Acanthamoeba*. *Iran J Parasitol*. Jul-Sep 2015;10(3):410-419.
43. Bialoszewski D, Bocian E, Bukowska B, Czajkowska M, Sokol-Leszczynska B, Tyski S. Antimicrobial activity of ozonated water. *Med Sci Monit*. Sep 2010;16(9):MT71-75.
44. Samuel SR, Dorai S, Khatri SG, Patil ST. Effect of ozone to remineralize initial enamel caries: in situ study. *Clin Oral Investig*. Jun 2016;20(5):1109-1113.
45. Frascino AV, Mantesso A, Correa L, Deboni MC. Aqueous-ozone irrigation of bone monocortical wounds in hyperglycemic rats. *Acta Cir Bras*. May 2013;28(5):327-333.
46. Xiao CW, Jing XM, X. S, et al. The experimental study of keratomycosis treated by Ozone solution. *Chinese Journal of Practical Ophthalmology*. 2004;12.
47. Qin G, Huang J, Pan Y, et al. [Topical ozone application: An innovative therapy for infantile atopic dermatitis]. *Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban*. Feb 28 2018;43(2):163-167.
48. Belianin, II, Safonova SG. [In vitro bactericidal action of dissolved ozone on different strains of *Mycobacterium tuberculosis*]. *Probl Tuberk*. 1999(2):48-49.
49. Belianin, II, Nikolaeva GM, Martynova LP. [Action of dissolved ozone on *mycobacterium tuberculosis* and alveolar macrophages in experimental tuberculosis]. *Probl Tuberk*. 1997(1):56-59.
50. Al-Saadi H, Potapova I, Rochford ET, Moriarty TF, Messmer P. Ozonated saline shows activity against planktonic and biofilm growing *Staphylococcus aureus* in vitro: a potential irrigant for infected wounds. *Int Wound J*. Oct 2016;13(5):936-942.
51. Valacchi G, Sticozzi C, Zanardi I, et al. Ozone mediators effect on "in vitro" scratch wound closure. *Free Radic Res*. Aug 3 2016:1-25.
52. Lohr A, Gratzek J. Bactericidal and paracitocidal effects of an activated air oxidant in a closed aquatic system. *J Aquatic Aquat Sci* 1984;4(41):1-8.
53. Albertini A, Bressanelli S, Lepault J, Gaudin Y. Structure and working of viral fusion machinery. *Curr Top Membr*. 2011;68:49-80.
54. Roy D, Wong PK, Engelbrecht RS, Chian ES. Mechanism of enteroviral inactivation by ozone. *Appl Environ Microbiol*. Mar 1981;41(3):718-723.
55. Roy D, Engelbrecht R, Chian E. Comparative inactivation of six enteroviruses by ozone. *Am Water Works Assoc J*. 1982;74(12):660-664.
56. Ivanova OE, Bogdanov MV, Kazantseva VA, Gabrilevskaia LN, Kodkind G. [Inactivation of enteroviruses in sewage with ozone]. *Vopr Virusol*. Nov-Dec 1983;28(6):693-698.

57. Wolf C, von Gunten U, Kohn T. Kinetics of Inactivation of Waterborne Enteric Viruses by Ozone. *Environ Sci Technol.* Feb 20 2018;52(4):2170-2177.
58. Riesser V, Perrich J, Silver B, McCammon J. Possible mechanism of poliovirus inactivation by ozone, in Forum on Ozone Disinfection. *Proceedings of the International Ozone Institute.* 1977;Syracuse, NY:186-192.
59. Shin GA, Sobsey MD. Reduction of Norwalk virus, poliovirus 1, and bacteriophage MS2 by ozone disinfection of water. *Appl Environ Microbiol.* Jul 2003;69(7):3975-3978.
60. Vaughn JM, Chen YS, Lindburg K, Morales D. Inactivation of human and simian rotaviruses by ozone. *Appl Environ Microbiol.* Sep 1987;53(9):2218-2221.
61. Hall R, Sobsey M. Inactivation of hepatitis A virus and MS2 by ozone and ozone-hydrogen peroxide in buffered water. *Wat. Sci. Technol.* 1993;27:371-378.
62. Peirone C, Mestre VF, Medeiros-Fonseca B, et al. Ozone therapy prevents the onset of dysplasia in HPV16-transgenic mice-A pre-clinical efficacy and safety analysis. *Biomed Pharmacother.* Aug 2018;104:275-279.
63. Wang H, Sikora P, Rutgersson C, et al. Differential removal of human pathogenic viruses from sewage by conventional and ozone treatments. *Int J Hyg Environ Health.* Apr 2018;221(3):479-488.
64. Komanapalli IR, Lau BH. Inactivation of bacteriophage lambda, Escherichia coli, and Candida albicans by ozone. *Appl Microbiol Biotechnol.* Jun 1998;49(6):766-769.
65. Lenes D, Deboosere N, Menard-Szczebara F, et al. Assessment of the removal and inactivation of influenza viruses H5N1 and H1N1 by drinking water treatment. *Water Res.* Apr 2010;44(8):2473-2486.
66. Murray BK, Ohmine S, Tomer DP, et al. Virion disruption by ozone-mediated reactive oxygen species. *J Virol Methods.* Oct 2008;153(1):74-77.
67. Mudd JB, Leavitt R, Ongun A, McManus TT. Reaction of ozone with amino acids and proteins. *Atmos Environ.* Nov 1969;3(6):669-682.
68. Feng L, Zhang K, Gao M, et al. Inactivation of Vibrio parahaemolyticus by aqueous ozone. *J Microbiol Biotechnol.* Jun 6 2018.
69. Ishizaki K, Sawadaishi D, Miura K, Shinriki N. Effect of ozone on plasmid DNA of Escheria coli in situ. *Water Res.* 1987;21(7):823-828.
70. Cech TR. RNA as an enzyme. *Sci Am.* 1986;255(5):64-75.
71. Seki M, Ishikawa T, Terada H, Nashimoto M. Microbicidal Effects of Stored Aqueous Ozone Solution Generated by Nano-bubble Technology. *In Vivo.* Jul-Aug 2017;31(4):579-583.
72. Bitter K, Vlassakidis A, Niepel M, et al. Effects of Diode Laser, Gaseous Ozone, and Medical Dressings on Enterococcus faecalis Biofilms in the Root Canal Ex Vivo. *Biomed Res Int.* 2017;2017:6321850.
73. Martinelli M, Giovannangeli F, Rotunno S, Trombetta CM, Montomoli E. Water and air ozone treatment as an alternative sanitizing technology. *J Prev Med Hyg.* Mar 2017;58(1):E48-E52.
74. Orta de Velasquez MT, Yanez Noguez I, Casasola Rodriguez B, Roman Roman PI. Effects of ozone and chlorine disinfection on VBNC Helicobacter pylori by molecular techniques and FESEM images. *Environ Technol.* Mar 2017;38(6):744-753.
75. Song WJ, Sung HJ, Kang DH. Inactivation of Escherichia coli O157:H7 and Salmonella Typhimurium in apple juices with different soluble solids content by combining ozone treatment with mild heat. *J Appl Microbiol.* Jan 2015;118(1):112-122.
76. Hayakumo S, Arakawa S, Takahashi M, Kondo K, Mano Y, Izumi Y. Effects of ozone nano-bubble water on periodontopathic bacteria and oral cells - in vitro studies. *Sci Technol Adv Mater.* Oct 2014;15(5):055003.
77. Matus V, Nikava A, Prakopava Z, Konyew S. Effect of ozone on the survivability of Candida utilis cells. *Vyestsi AkadNauuk Bssr Syer Biyal Navuk.* 1981;0(3):49-51.
78. Matus VK, Martynova MA, Skorynko EV, Melnikova AM, Konev SV. Different modes of ozone-induced lipid oxidation in Candida utilis yeast cells and isolated membrane preparations. *Membr Cell Biol.* 1999;13(1):59-67.
79. Konev SV, Matus VK, Mel'nikova AM, Rudenok AN. [Action of ozone on the membrane-dependent functions of Candida utilis yeast cells]. *Mikrobiologiya.* Mar-Apr 1982;51(2):220-223.
80. Mel'nikova AM, Kaler GV, Babich GV, Romanov SL, Matus VK. [The conflicting action of low and high doses of ozone on the reproductive capacity and respiratory activity of Candida utilis yeast cells]. *Zh Obshch Biol.* Nov-Dec 1989;50(6):815-818.
81. Matus V, Lyskova T, Sergienko I, Kustova A, Grigortsevich T, Konev V. Fungi; growth and sporulation after a single treatment of spores with ozone. *Mikol Fitopatot.* 1982;16(5):420-423.
82. Ouf SA, Moussa TA, Abd-Elmegeed AM, Eltahlawy SR. Anti-fungal potential of ozone against some dermatophytes. *Braz J Microbiol.* Jul-Sep 2016;47(3):697-702.
83. Antony-Babu S, Singleton I. Effect of ozone on spore germination, spore production and biomass production in two Aspergillus species. *Antonie Van Leeuwenhoek.* Nov 2009;96(4):413-422.
84. Gupta AK, Brintnell W. Ozone gas effectively kills laboratory strains of Trichophyton rubrum and Trichophyton mentagrophytes using an in vitro test system. *J Dermatolog Treat.* Jun 2014;25(3):251-255.
85. Fischer E. [How long do dermatophytes survive in the water of indoor pools?]. *Dermatologica.* Oct 1982;165(4):352-354.

86. Dadar M, Tiwari R, Karthik K, Chakraborty S, Shahali Y, Dhama K. *Candida albicans* - Biology, molecular characterization, pathogenicity, and advances in diagnosis and control - An update. *Microb Pathog*. Apr 2018;117:128-138.
87. Zargarán M, Fatahinia M, Zarei Mahmoudabadi A. The efficacy of gaseous ozone against different forms of *Candida albicans*. *Curr Med Mycol*. Jun 2017;3(2):26-32.
88. Noites R, Pina-Vaz C, Rocha R, Carvalho MF, Goncalves A, Pina-Vaz I. Synergistic antimicrobial action of chlorhexidine and ozone in endodontic treatment. *Biomed Res Int*. 2014;2014:592423.
89. Borges GA, Elias ST, da Silva SM, et al. In vitro evaluation of wound healing and antimicrobial potential of ozone therapy. *J Craniomaxillofac Surg*. Mar 2017;45(3):364-370.
90. Valacchi G, Bocci V. Studies on the biological effects of ozone: 10. Release of factors from ozonated human platelets. *Mediators Inflamm*. 1999;8(4-5):205-209.
91. Azuma K, Mori T, Kawamoto K, et al. Anti-inflammatory effects of ozonated water in an experimental mouse model. *Biomed Rep*. Sep 2014;2(5):671-674.
92. Noguchi F, Kitamura C, Nagayoshi M, Chen KK, Terashita M, Nishihara T. Ozonated water improves lipopolysaccharide-induced responses of an odontoblast-like cell line. *J Endod*. May 2009;35(5):668-672.
93. Huth KC, Saugel B, Jakob FM, et al. Effect of aqueous ozone on the NF-kappaB system. *J Dent Res*. May 2007;86(5):451-456.
94. Cardoso CC, Carvalho JC, Ovando EC, Macedo SB, Dall'Aglio R, Ferreira LR. Action of ozonized water in preclinical inflammatory models. *Pharmacol Res*. Jul 2000;42(1):51-54.
95. Kuroda K, Azuma K, Mori T, et al. The Safety and Anti-Tumor Effects of Ozonated Water in Vivo. *Int J Mol Sci*. Oct 22 2015;16(10):25108-25120.
96. Huth KC, Jakob FM, Saugel B, et al. Effect of ozone on oral cells compared with established antimicrobials. *Eur J Oral Sci*. Oct 2006;114(5):435-440.
97. Merch. *Introduction to Medical Mycology*: Merch & Co., Inc; 2001.
98. Lin PH, Sermersheim M, Li H, Lee PHU, Steinberg SM, Ma J. Zinc in Wound Healing Modulation. *Nutrients*. Dec 24 2017;10(1).
99. Ganesh Yerra V, Negi G, Sharma SS, Kumar A. Potential therapeutic effects of the simultaneous targeting of the Nrf2 and NF-kappaB pathways in diabetic neuropathy. *Redox Biol*. Aug 1 2013;1:394-397.

1.