



## EFFECTOS DEL OZONO EN LA REGENERACIÓN NERVIOSA EN RATAS. UNA REVISIÓN SISTEMÁTICA.

Effects of Ozone on Nerve Regeneration in Rats. A Systematic Review.

Abdías Cofré,<sup>1</sup> Gabriela Cofré,<sup>2</sup> Elías Figueroa.<sup>3</sup>

(1) Facultad de Medicina, Universidad de la Frontera, Temuco, Chile.

(2) Instituto de Odontostomatología. Facultad de Medicina, Universidad Austral de Chile, Valdivia, Chile.

(3) Departamento de Ciencias Químicas y Biológicas. Facultad de Recursos Naturales, Universidad Católica de Temuco, Temuco, Chile.

### Correspondencia:

Abdías Gabriel Cofré Morales Arica  
125, Población Selva Oscura.  
Victoria, Chile.  
a.cofre04@ufromail.cl

### Recibido:

24 de febrero de 2021

### Aprobado:

21 de marzo de 2021

### Conflictos de interés:

El autor declara no tener conflictos de interés.

Rev Estud Med Sur. 2021; 9(1):pag-pag

### DOI:

11111111111111111111111111111111

## RESUMEN

**ANTECEDENTES:** Agentes antioxidantes como el ozono se han utilizado previamente para tratar lesiones nerviosas. Este, en particular, presenta potencial como terapia neuroregenerativa no invasiva debido a su mecanismo de acción. Sin embargo, existen pocos estudios experimentales sobre ozonoterapia y su efecto sobre regeneración nerviosa periférica.

**OBJETIVO:** Evaluar los efectos de la ozonoterapia (TO) sobre lesiones nerviosas en ratas.

**MÉTODO:** Para esta revisión sistemática, se consideraron estudios publicados entre los años 2015 y el 15 de mayo del 2020 con las palabras clave Ozone AND "nerve regeneration", obtenidos de bases de datos como: Medline (Pubmed), SCOPUS, Web of Science, EMBASE, Clinical Key y Journal of Neurosurgery. La calidad metodológica se evaluó mediante la pauta ARRIVE.

**RESULTADOS:** De 38 resultados, se incluyeron 7 artículos de acuerdo a los criterios de inclusión. Estos comprenden entre 14 y 100 ratas como sujetos de prueba, en donde se evaluaron los efectos del ozono en la regeneración nerviosa dentro de un periodo de 7 y 90 días. Los siete estudios arrojaron resultados positivos sobre el tratamiento de lesiones nerviosas con ozono, dos estudios indicaron resultados superiores al utilizar ozono y metilprednisolona combinados.

**DISCUSIÓN:** Si bien la evidencia recabada fue limitada, la TO demostró capacidades neuroprotectoras y promotoras de regeneración nerviosa al contribuir con la creación de un microambiente favorable para este proceso, capeando los efectos del estrés oxidativo sobre el tejido. La TO complementada con metilprednisolona fue superior a la TO por sí sola, observándose una mayor respuesta antiinflamatoria y antioxidante, con menor índice de degeneración. Esto sugiere un posible potenciamiento de las cualidades neuroprotectoras de ambos tratamientos. Estos hallazgos indican la posibilidad de desarrollar terapias de regeneración nerviosa basadas en ozono en el futuro

**PALABRAS CLAVE:** Ozono; Metilprednisolona; Regeneración nerviosa; Agentes neuroprotectores

## ABSTRACT

**BACKGROUND:** Antioxidant agents such as ozone have previously been used to treat nerve damage. Ozone, in particular, has potential as a non-invasive neuroregenerative therapy due to its mechanism of action. However, there are few experimental studies on ozone therapy and its effect on peripheral nerve regeneration. **OBJECTIVE:** To evaluate the effects of ozone therapy (OT) on nerve injury in rats. **METHOD:** For this systematic review, studies published between 2015 and May 15, 2020 were considered with the keywords Ozone AND "nerve regeneration", obtained from databases such as: Medline (Pubmed), SCOPUS, Web of Science, EMBASE, Clinical Key and Journal of Neurosurgery. Methodological quality was assessed using the ARRIVE guideline. **RESULTS:** Out of 38 results, 7 articles were included according to the inclusion criteria. These comprised between 14 and 100 rats as test subjects, where the effects of ozone on nerve regeneration were evaluated within a period of 7 and 90 days. All seven studies yielded positive results on the treatment of nerve injuries with ozone, with two studies indicating superior results when using ozone and methylprednisolone in combination. **DISCUSSION:** Although the evidence collected was limited, OT demonstrated neuroprotective and nerve regeneration-promoting capabilities by contributing to the creation of a favorable microenvironment for this process, mitigating the effects of oxidative stress on the tissue. TO supplemented with methylprednisolone was superior to TO alone, with a greater anti-inflammatory and antioxidant response observed, with a lower rate of degeneration. This suggests a possible enhancement of the neuroprotective qualities of both treatments. These findings indicate the possibility of developing ozone-based nerve regeneration therapies in the future.

**KEYWORDS:** Ozone; Methylprednisolone; Nerve regeneration; Neuroprotective agents

## INTRODUCCIÓN

A pesar de que el sistema nervioso periférico (SNP) tiene una capacidad intrínseca de reparación y regeneración<sup>1,2</sup>, cuando se produce una lesión nerviosa, se genera estrés oxidativo como resultado de la producción de radicales libres de oxígeno (ROS)<sup>3</sup> que influyen en la regeneración nerviosa a través de la inducción, disfunción y muerte celular, degeneración axonal y neurodegeneración<sup>4</sup>, por lo que estudios in vivo han sugerido que la administración de sustancias antioxidantes podría reducir los niveles de ROS mediante la estimulación de mediadores<sup>5</sup>. Con el avance de la tecnología y evolución de las técnicas convencionales de regeneración nerviosa, se ha dado paso al uso de prácticas alternativas no invasivas como la terapia de ozono (O<sub>3</sub>)<sup>6</sup>, el cual resulta ser un poderoso oxidante con una vida media corta de 20 minutos a temperatura normal, descomponiéndose y dispersándose fácilmente en agua. El O<sub>3</sub> puede restringir los factores celulares inflamatorios, activar la ciclooxigenasa y disminuir la reacción de estrés a la oxidación histiocítica, aumentando la capacidad celular de resistir la oxidación y los radicales libres. También puede eliminar los radicales libres resultantes de la inflamación crónica, puede servir como analgésico y antiinflamatorio<sup>5,7</sup>. Este elemento se ha utilizado y estudiado en medicina y odontología durante mucho tiempo, aplicándose para alteración de metabolismo de

tumores, exterminación de patógenos, tratamiento de enfermedades oculares, ortopédicas, dermatológicas, infecciones, cirugía oral, maxilofacial e implantología<sup>8-10</sup>. Sin embargo, el terreno de la neuro-regeneración aún se mantiene bajo estudio, sobre todo en cabeza y cuello. Es por esto que se vuelve esencial encontrar una terapia no invasiva efectiva que le devuelva al paciente su calidad de vida, mitigando el dolor o los síntomas del daño nervioso. El objetivo de esta revisión es analizar el efecto de la ozonoterapia sobre la regeneración nerviosa periférica en ratas, usando como guía la siguiente pregunta clínica: En caso de daño a los nervios periféricos, el uso de terapias regenerativas en base a ozono comparadas con grupos control ¿Resulta una opción viable y eficaz para la regeneración nerviosa?

## MÉTODOS

Para efectos de esta revisión sistemática, se consideraron artículos que comprendían estudios in vivo publicados durante los últimos 5 años en idioma inglés mediante el acceso a bases de datos como Medline (Pubmed), SCOPUS, Web of Science, EMBASE, Clinical Key y Journal of Neurosurgery (JNS). La búsqueda se llevó a cabo de forma independiente y duplicada por dos revisores (A.C y G.C) entre los días 15 de junio y 29 de junio del 2020 bajo la estrategia: Ozone AND "nerve regeneration", ambos como términos MeSH unidos por el operador booleano AND, aplicando un filtro de 5 años, a excepción de la plataforma Clinical

Key en donde adicionalmente se añadió el filtro de artículos de revistas. Además, en la búsqueda efectuada en el JNS, sólo se hizo uso del término "Ozone" sin filtros. Se excluyeron aquellos artículos que no presentaron la palabra Ozone u Ozone Therapy en el título y aquellos que no lo abordaron como técnica regenerativa. En el proceso de selección participaron dos revisores y constó de 5 pasos. En primer lugar, se descartaron los artículos que se encontraban repetidos, seguido de la eliminación de artículos de acuerdo a la lectura de títulos, de abstracts y de texto completo que no considerarán a la terapia de ozono o que no abordarán la misma con fines neuroregenerativos. Por último, cada artículo restante se evaluó en cuanto a calidad metodológica según la pauta de chequeo ARRIVE exclusiva para la descripción de la investigación en animales. Las variables consideradas en este estudio se dividieron de la siguiente forma para su medición: Terapia de regeneración nerviosa en base a ozono como variable independiente definida como la aplicación de ozono de forma intraperitoneal y extraoral en sujeto de prueba. Y la regeneración nerviosa como variable dependiente descrita como la recuperación de la funcionalidad y citoarquitectura nerviosa. El nivel de riesgo de sesgo y validez de cada artículo se evaluó aplicando la pauta ARRIVE para escritura de ensayos clínicos durante la selección de estudios, siendo eliminados aquellos con deficiente metodología. No se realizaron análisis adicionales a parte de los ya descritos.

## RESULTADOS

De la búsqueda en las distintas bases de datos se

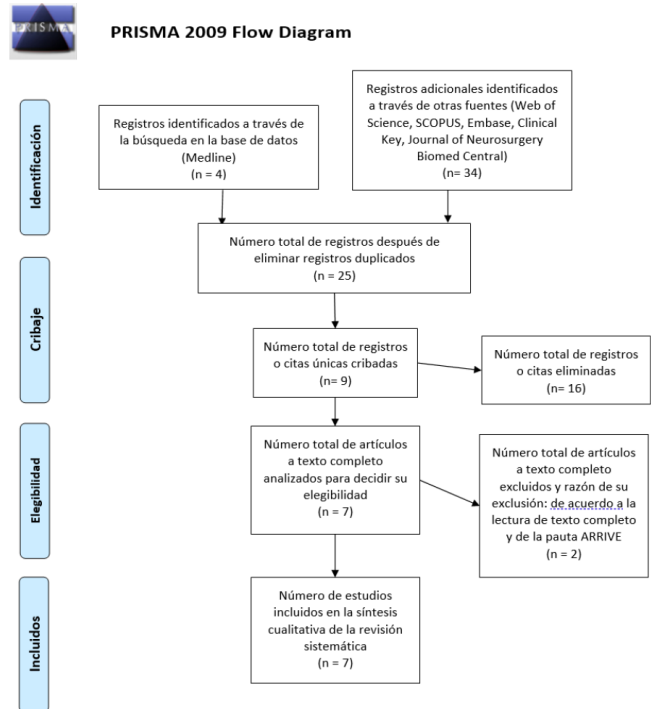


Figura 1.- Diagrama de flujo pauta PRISMA: Proceso de selección de los estudios incluidos.

obtuvieron 38 artículos, disminuyendo a 25 luego del descarte por duplicación. Posteriormente, se eliminaron por título 16 artículos obteniendo un total de 9 artículos. Ninguno de ellos fue eliminado por lectura de abstract pero si efectuó el descarte de 1 por lectura de texto completo. Finalmente se analizaron los 8 artículos restantes mediante la pauta ARRIVE, resultando en la eliminación de 1 artículo más. En total se utilizaron 7 artículos para el análisis del tema en cuestión [Figura 1].

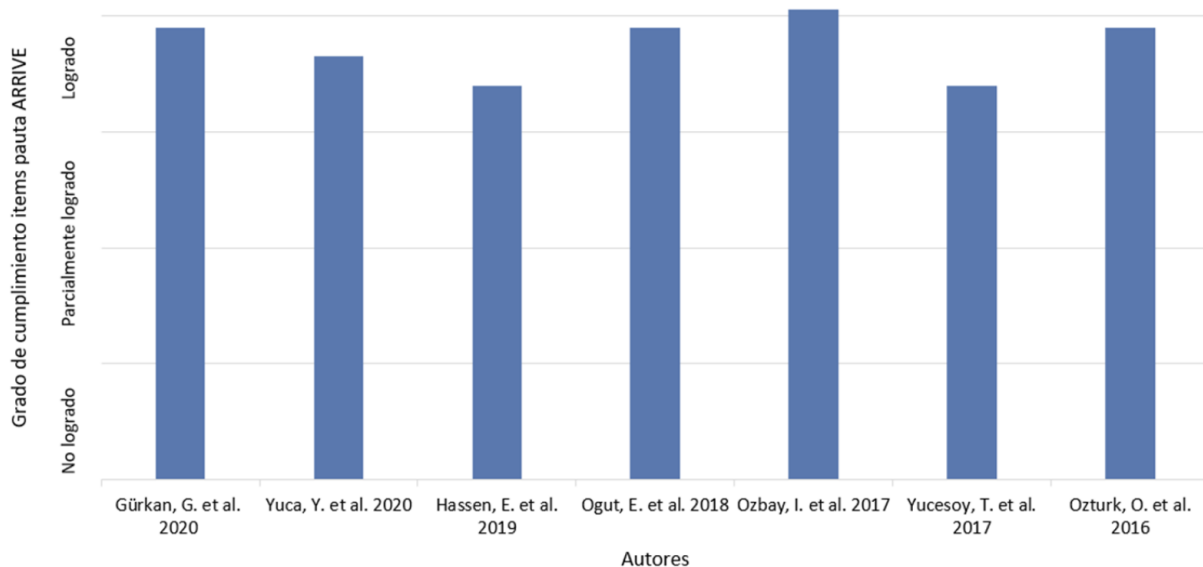


Figura 2.- Análisis de estudios seleccionados en base a pauta ARRIVE para estudios realizados en animales.

En la Figura 2 se expresa gráficamente la revisión en base a la pauta ARRIVE de los 7 artículos seleccionados, considerándolos adecuados para el desarrollo de esta investigación por cumplir ampliamente con los ítems mencionados en la guía, haciendo posible su reproducción y garantizando la validez de sus resultados.

Todos los estudios fueron realizados en animales con el objetivo de medir los posibles beneficios de la aplicación de la terapia basada en ozono en la regeneración nerviosa. Las características generales de estos artículos fueron resumidas en la tabla 1. Los aspectos relevantes de la metodología y resultados relacionados a la terapia de ozono de los estudios considerados se encuentran resumidos en la tabla 2.

## DISCUSIÓN

El propósito de este trabajo es realizar una revisión sistemática de estudios in vivo sobre el uso de terapia de ozono en el contexto de regeneración nerviosa periférica.

El daño nervioso periférico es una condición común, de variada etiología y severidad. En la actualidad, si bien

existen tratamientos que contribuyen a la recuperación y rehabilitación, pueden no ser lo suficientemente confiables o no asegurar una regeneración completa y adecuada<sup>11</sup>. Posterior a la lesión se produce un proceso degenerativo en el extremo distal de la fibra nerviosa, denominado como degeneración Walleriana. El extremo proximal de la fibra nerviosa es capaz de regenerarse y reestablecer su función. Las lesiones nerviosas periféricas se caracterizan por la presencia de desmielinización, degeneración, edema, y formación de tejido cicatricial o fibroso<sup>12</sup>. Asimismo, el proceso regenerativo funcional de las fibras nerviosas se ve afectado e inhibido por diversos factores, entre los que destacan la distancia desde el sitio del daño, tipo de lesión, la edad del individuo, inflamación postraumática y estrés oxidativo<sup>13-15</sup>. En este marco la presencia de un ambiente permisivo es deseable y beneficioso para estimular y promover la regeneración. Es por esta razón que la búsqueda de terapias alternativas o complementarias a tratamientos estándar se vuelve importante. Basados en los resultados entregados por la búsqueda realizada, se observa una cantidad muy limitada de literatura relacionada, con sólo 7 resultados en los últimos 5 años que responden la pregunta de investigación planteada, desde 2020. La poca literatura

Tabla 1.- Aspectos generales artículos seleccionados.

Autor	Revista	Año	Resumen
<i>Ozturk, O. et al.</i>	Acta Cir. Bras	2016	Este estudio evalúa los efectos histopatológicos de la terapia de ozono y ozono combinada con metilprednisolona sobre la regeneración de nervios isquiáticos de 40 ratas posterior a aplastamiento
<i>Yucesoy, T. et al.</i>	J Oral Maxillofac Surg	2017	Este estudio compara los efectos histológicos de la terapia de ozono versus terapia de foto-biomodulación sobre la regeneración de nervios mentonianos de 27 ratas
<i>Ozbay, I. et al.</i>	BJORL	2017	Este estudio evalúa mediante microscopía óptica y electrónica el efecto neuro-regenerativo de la terapia de ozono en nervios faciales de 14 ratas
<i>Ogut, E. et al.</i>	Kurume Med J	2018	Este estudio evalúa mediante una prueba de función motora y sensorial, junto con microscopía óptica y electrónica los efectos neuro-regenerativos de la terapia de ozono en nervios isquiáticos de 100 ratas
<i>Hassen, E. et al.</i>	EJH	2019	Este estudio evalúa los efectos regenerativos y neuro protectores de la terapia de ozono frente al aspartamo en los nervios isquiáticos de 30 ratas mediante microscopía de luz y electrónica, análisis morfométrico y de PCR en tiempo real
<i>Yuca, Y. et al.</i>	J Craniomaxillofac Surg	2020	Este estudio compara los efectos histológicos de la terapia de ozono versus terapia de laser de bajo nivel sobre la regeneración de nervios faciales de 30 ratas
<i>Gürkan, G. et al.</i>	J Neurosurg: Spine	2020	Este estudio evalúa los efectos neuro-regenerativos y neuroprotectores de la terapia de ozono frente a modelos de daño espinal de 31 ratas mediante estudios bioquímicos, histológicos y neurológicos

Tabla 2.- Aspectos relevantes de los estudios seleccionados en relación a la terapia de ozono.

Autor	Sujetos de prueba	Grupo de estudio	Tipo de lesión	Tratamiento	Tiempo de evaluación	Pruebas Realizadas	Resultados TO
Ozturk, O. <i>et al.</i> 2016	40 ratas Sprague-Dawley	4 grupos de 10 ratas cada uno	Presión del nervio isquiático por 30 segundos	Primer grupo: 20 mcg/ml/d de ozono intraperitoneal. Segundo grupo: 2 mg/kg/d de metilprednisona intraperitoneal. Tercer grupo: ambos tratamientos anteriormente mencionados. Cuarto grupo: solución salina isotónica (0.9%) administrada por vía intraperitoneal	14 días	Evaluación histomorfológica	TO+Metilprednisolona: presentó menores índices de degeneración-formación de tejido granulado perineural evidente-proliferación vascular perineural evidente-inflamación de tejido perineural evidente - menor atrofia de las células de Schwann
Yucesoy, T. <i>et al.</i> 2017	27 ratas wistar albinas	27 ratas repartidas en 3 grupos	Ligación del nervio mentoniano con saturación	Primer grupo: sin tratamiento. Segundo grupo: dosis de ozono equivalente al 75% de la potencia de un Ozonytron XL 7 veces cada 3 días en modo contacto de manera extraoral. Tercer grupo: tratamiento de fotobiomodulación con un OsseoPulse LED con una longitud de onda de 618-nm y una potencia de salida de 20 mW/cm <sup>2</sup> por 5 min/d en modo contacto de manera extraoral.	21 días	Evaluación histológica	Número de células de schwann considerablemente aumentadas-números de fascículos nerviosos en el área lesionada ligeramente mayores - áreas fasciculares próximas al área lesionada ligeramente aumentada
Ozbay, I. <i>et al.</i> 2017	14 ratas albinas Wistar	2 grupos de 7 ratas cada uno	Presión en tronco del nervio facial por 1 minuto	Primer grupo: ratas control recibieron 1.1mg/kg/d de solución salina intraperitoneal Segundo grupo: ratas recibieron 1.1 mg/kg/d de ozono intraperitoneal	30 días	Medición de estimulación nerviosa con monitor de integridad nerviosa, Evaluación patológica con microscopio óptico y electrónico.	Mejoría funcional mayor - menores índices de congestión vascular y de macrovacuolización - mayores índices de mielinización

**Tabla 2.**– Aspectos relevantes de los estudios seleccionados en relación a la terapia de ozono (*continuación*)

Ogut, E. <i>et al.</i> 2018	100 ratas <i>Rattus norvegicus</i> Wistar albinas	2 grupos de 20 ratas cada uno (grupo 1 y 2) y 2 grupos de 30 ratas cada uno (grupo 3 y 4)	Incisión sin daño nervioso en el grupo 2.  Corte transverso de los nervios isquiáticos a nivel posteromedial del miembro inferior en los grupos 3 y 4	Primer grupo: sin tratamiento. Segundo grupo: sin tratamiento. Tercer grupo: sin tratamiento. Cuarto grupo: dosis de ozono de 5ml con una concentración de 35-40 ug/ml intraperitoneal	56 días	Prueba de la función motora (Walking Track Analysis), prueba de la función sensorial (Pinch Test), análisis bioquímico, Evaluación patológica con microscopio óptico y electrónico.	Aumento de actividad de la glutathion peroxidasa - aumento de actividad superóxido dismutasa- aumento de actividad catalasa-aumento considerable de actividad del malondialdehído- mejoramiento de vainas nerviosas, grosor citoplasmático de células de Schwann y diámetros de axones remielinizados
Hassen, E. <i>et al.</i> 2019	30 ratas Wistar albinos	3 grupos de 10 ratas cada uno	Dosis de 250 mg/kg/d de aspartamo disuelto en 2 cc de agua destilada por tubo gástrico por 3 meses	Primer grupo: sin tratamiento. Segundo grupo: 250 mg/kg/d de aspartamo disuelto en 2cc de agua destilada por tubo gástrico. Tercer grupo: misma dosis de aspartamo + 1.1 mg/kg/d de ozono intraperitoneal.	Dosis de aspartamo administrada por 90 días (3 meses).  Ozono administrado por 30 días.	Evaluación histológica a través de: microscopía óptica, inmunohistoquímica, microscopía electrónica. Extracción de ARN, análisis de PCR en tiempo real y estudio morfométrico.	TO+Aspartamo:  Citoarquitectura del nervio isquiático relativamente normal- tinción moderadamente positiva para proteína básica de mielina- Netrina 1, ninjurina, factor neurotrófico derivado de cerebro, factor neurotrófico derivado de célula glial, Factor de crecimiento endotelial vascular, angiopoyetina 1 aumentados
Yuca, Y. <i>et al.</i> 2020	30 ratas wistar albinas	3 grupos de 10 ratas cada uno	Compresión del nervio facial izquierdo por 30 segundos	Primer grupo: Sin tratamiento. Segundo grupo: 4 J de energía con una potencia de salida de 100 mW/cm <sup>2</sup> y longitud de onda 850 nm por 32 s diarios por 21 días Tercer grupo: 2 ml de mezcla gaseosa de 97.5% oxígeno médico y 2.5 % ozono cada 2 días por 21 días insuflada intraperitonealmente	21 días	Evaluación histológica	Aumento significativo en el diámetro de las fibras nerviosas – tejido conectivo entre fibras nerviosas y grosor de epineuro normal- significativo aumento de axones mielinizados- aumento de regeneración de fibras nerviosas- mayor ramificación nerviosa observada- aumento significativo del diámetro de las fibras nerviosas- área de fibras nerviosas aumentada- significativo aumento del número de axones

**Tabla 2.-** Aspectos relevantes de los estudios seleccionados en relación a la terapia de ozono (*continuación*)

Gürkan, G. <i>et al.</i> 2020	31 ratas wistar albinas	5 grupos, un grupo de simulación con 3 ratas (grupo 1) y los otros cuatro con 7 ratas cada uno (grupo 2-5)	Al primer grupo solo se le realizó laminectomía. A los grupos restantes se le indujo trauma espinal adicional a la laminectomía	Grupo 1: Sin tratamiento.  Grupo 2: 0,5 ml de suero salino fisiológico 1 hora luego de la operación.  Grupo 3: 30mg/ kg de metilprednisolon a intraperitoneal 1 hora  Grupo 4: 60 ug/ ml de ozono a 0.7 mg/kg intraperitoneal  Grupo 5: 30 mg/ kg de metilprednisolon a intraperitoneal y 60 ug/ml de ozono a 0.7 mg/ kg intraperitoneal	7 días	Prueba de plano inclinado, Criterio de Drummond y Moore, Puntuación BBB,  Escala de Tarlov modificada. Análisis bioquímico y evaluación histopatológica.	Ozono: Puntajes "inclined plane angle" y escala Basso, Beattie y Breshnahan considerablemente aumentados- estatus oxidante total significativamente bajo  Ozono + metilprednisona: Niveles de IL-6 significativamente bajos- Niveles estatus antioxidante total altos
-------------------------------------	-------------------------------	--	--	--	--------	---	--

previa disponible puede deberse a que el uso de la terapia de ozono con fines neuro-regenerativos es un concepto reciente. Ozbay<sup>5</sup> menciona un umbral de estimulación promedio de 0.064 mA a los 30 días en células tratadas con terapia de ozono frente al umbral de estimulación promedio de 0.084 mA en el grupo control a los mismos 30 días; indicando una mejoría funcional en las células tratadas con TO. Estipulando, además, que la mejoría observada en el grupo control puede ser atribuida a recuperación nerviosa espontánea. Luego de los 30 días, se encontraron diferencias significativas en la fibrosis tisular, congestión vascular y la macrovacuolización, siendo estas menores en el grupo intervenido. Lo anterior es significativo para la correcta regeneración del nervio, disminuyendo la inflamación, edema y tejido cicatricial. Este último ha demostrado ser negativo para la correcta regeneración de tejido nervioso, promoviendo la adhesión de las fibras nerviosas a tejidos periféricos, disminuyendo su movilidad. Adicionalmente el tejido cicatricial disminuye la nutrición por difusión del tejido nervioso, inhibe la regeneración y produce isquemia asociada a daño irreversible<sup>16</sup>.

Similar a Ozbay<sup>5</sup>, Ogut<sup>17</sup> observó mejoramiento funcional significativo luego de la segunda y cuarta semana post operatoria en las ratas tratadas con terapia de ozono. Adicionalmente mediante evaluación bioquímica describe un aumento en la actividad de glutatión peroxidasa (GPx), superóxido dismutasa (SOD) y catalasa (CAT) en el grupo ozono con respecto al grupo control. Lo anterior se explica gracias a que el ozono, como un agente oxidante, permite generar un estrés oxidativo controlado. Este proceso es capaz de estimular respuestas antioxidantes adaptativas del tejido<sup>18</sup> otorgando así una protección frente al estrés oxidativo derivado de la inflamación. Ozbay<sup>5</sup> destaca también, la significativa disminución de malondialdehído (MDA) en el grupo ozono frente al grupo control. Al haber una lesión nerviosa por aplastamiento, se produce una interrupción en la transmisión mecánica y en la microvascularización del nervio. Al generarse la reperusión, se acumula oxígeno y nutrientes que favorecen la formación de radicales libres. Estos generan estrés oxidativo, que conduce a procesos nocivos para los tejidos como la peroxidación lipídica<sup>19,20</sup>. El MDA es un subproducto de este proceso, utilizado como marcador para evaluar el

impacto de terapias antioxidantes<sup>21</sup>. Histológicamente Ozbay<sup>5</sup> observó mayor cantidad de fibras células de Schwann en el grupo ozono en comparación al grupo control. Estas cumplen un rol importante en la regeneración nerviosa periférica, otorgando soporte y guía a los brotes axonales del extremo proximal<sup>22</sup>. Adicionalmente menciona mayor cantidad de fibras nerviosas mielinizadas y organelos citoplasmáticos en el grupo sometido a tratamiento con ozono. Por lo tanto, se observa que el ozono contribuye a la creación de un microambiente favorable para la regeneración nerviosa, capeando los efectos del estrés oxidativo sobre el tejido.

Dos de los siete estudios revisados complementaron la terapia de ozono con metilprednisolona, conocido agente inmunosupresor y antiinflamatorio<sup>23</sup>.

El uso de metilprednisolona como agente adyuvante se encuentra arraigado a evidencia relacionada a la supresión de la cascada inflamatoria en el sitio de la lesión, que ha demostrado ser beneficiosa para la regeneración de tejido nervioso<sup>24</sup>.

Ozturk, O. et al.<sup>25</sup> describe en el grupo con tratamiento combinado, menor atrofia de células de Schwann con respecto al grupo intervenido exclusivamente con ozono, aspecto fundamental para la regeneración neuronal. Adicionalmente se describe un menor índice de degeneración neuronal en comparación al grupo control y al grupo tratado con ozono.

No obstante, se destaca una mayor formación de tejido granular perineural en el grupo sometido a tratamiento mixto en comparación al grupo tratado sólo con terapia de ozono. La formación y persistencia de este tejido puede ocasionar efectos no deseados a largo plazo como parestesia y debilidad muscular<sup>26</sup>. Sin embargo, el grupo tratado con ozono presentó índices considerablemente superiores de infiltración de células inflamatorias intraneurales y perineurales en comparación al grupo sometido a tratamiento combinado. Gürkan, G. et al.<sup>27</sup> observó resultados similares con el tratamiento de ozono y metilprednisolona reportando una respuesta clínica superior y niveles de IL-6 considerablemente más bajos en el grupo tratado con la terapia combinada en comparación con el grupo tratado solo con ozono 7 días luego de las lesiones inducidas. Lo anterior puede atribuirse a las propiedades antiinflamatorias del fármaco<sup>28</sup>.

Gürkan, G. et al.<sup>27</sup> menciona, además, niveles de estatus antioxidante totales (TAS) y estatus oxidante total (TOS). TAS y TOS son parámetros utilizados para reflejar el efecto antioxidante total y el efecto global de

todos los oxidantes en plasma y en fluidos corporales respectivamente<sup>29</sup>. Se encontraron menores niveles de TOS en el grupo tratado exclusivamente con ozono comparado con el grupo tratado sólo con metilprednisolona, lo que indica que el ozono reduce el estrés oxidativo de una forma más eficiente que la metilprednisolona. El grupo con tratamiento combinado presentó los índices de TOS más bajos de todos los grupos. Asimismo, se observó en este grupo altos niveles de TAS, lo que sugiere un potenciamiento de las características antioxidantes del ozono<sup>30</sup> atribuidas a la metilprednisolona.

Este estudio determinó también la superioridad antiinflamatoria de la metilprednisolona en comparación al ozono, sin embargo, se observó un aumento de estas características en el tratamiento en conjunto, mismo resultado que obtuvo Ozturk et al.<sup>25</sup>

El tratamiento combinado también arrojó una tasa de apoptosis menor en comparación a los grupos tratados exclusivamente con ozono y metilprednisolona, indicando un efecto celular protector superior.

Otros dos estudios compararon la terapia de ozono con terapias de laser de bajo nivel en términos de regeneración nerviosa. Estas últimas han demostrado capacidad de acelerar y promover el proceso regenerativo de nervios periféricos<sup>31</sup>.

Yucesoy<sup>10</sup> observó un patrón de rehabilitación superior en los grupos tratados con ozono y fotobiomodulación que en el grupo control. Histológicamente destaca una mayor cantidad de células de Schwann en el extremo distal del nervio lesionado en el grupo tratado con terapia de ozono en comparación al grupo control, similar a lo descrito por Ozbay<sup>5</sup> y Ozturk, O. et al.<sup>25</sup> Lo anterior sugiere que la terapia de ozono promueve un ambiente favorable para la mantención de la glía en el sitio de la lesión, lo que a su vez permitiría una regeneración más efectiva<sup>32</sup>.

Yuca<sup>33</sup>, por otra parte, difiere de lo descrito por Yucesoy<sup>10</sup>, mencionando que la terapia de laser de baja intensidad no otorgó resultados significativos frente al grupo control. Esto puede deberse a factores como el tiempo de aplicación y la longitud de onda del láser que pueden afectar considerablemente los resultados<sup>34</sup>.

Histológicamente describe un aumento considerable en el diámetro de las fibras nerviosas, área del nervio, número de ramificaciones y número de axones en el grupo tratado con ozono en comparación al grupo tratado con láser y control. Lo anterior nos sugiere que la terapia de ozono puede ser más eficiente que terapias



laser de baja intensidad de 4 J de energía y una longitud de onda de 850 nm para el tratamiento de lesiones nerviosas y su regeneración.

En contraste con los estudios realizados por Ozturk<sup>25</sup> y Gürkan<sup>27</sup>, los autores mencionan que optaron por aplicar ozono intraperitoneal y no una ozonización mediante solución salina debido a que la Federación Mundial de Ozonoterapia (WFOT) publicó una declaración, informando que "la ozonización de la solución salina" introduce una cantidad muy baja de eliminación de ozono en el cuerpo e induce la generación de peligrosos derivados de cloro oxidado, que han demostrado mutagenicidad y toxicidad en informes clínicos<sup>35</sup>. Hassen<sup>36</sup> evaluó las propiedades neuroprotectoras y neuroregenerativas de la terapia de ozono, encontrando que esta ofrecía protección frente al daño neuronal inducido por aspartamo, un agente altamente cancerígeno en dosis elevadas<sup>37</sup>.

Histológicamente se observó mantención relativamente normal de la citoarquitectura local, fascículos nerviosos y axones, tanto mielinizados como no mielinizados del nervio isquiático, observando mayor tinción de proteína básica de mielina (MBP) en el grupo tratado con ozono frente al grupo control. Se ha descrito que la MBP cumple un rol importante en mantener la estructura de la vaina de mielina y su compactación<sup>38</sup> y es un marcador de células de Schwann utilizado comúnmente<sup>39</sup>. Adicionalmente el grupo tratado con ozono presentaba mayor índice de relación fibra/axón que el grupo tratado solo con aspartamo. Lo anterior sugiere que la terapia de ozono presenta propiedades neuroprotectoras sobre el tejido nervioso, vainas de mielina y células de Schwann del sitio de la lesión, contribuyendo así a la regeneración del tejido y a la preservación de su citoarquitectura funcional.

Niveles aumentados de factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) y angiopoyetina-1 fueron encontrados en el grupo tratado con ozono en comparación al grupo control y el tratado exclusivamente con aspartamo. Un estudio demostró que la administración de genes exógenos codificantes para factor de crecimiento vascular endotelial contribuía a mejorar la función nerviosa en modelos in vivo<sup>40</sup> y se ha demostrado que la revascularización derivada de la activación de la cascada VEGF-VEGFR es esencial para la regeneración nerviosa periférica<sup>41</sup>. Esto sugiere que la administración de terapia de ozono contribuye a la estimulación de vías que promueven la revascularización y preservación del tejido, con un impacto positivo en la regeneración.

Niveles de netrina y ninjurina también se encontraron aumentados en el grupo tratado con terapia de ozono con respecto al control y al grupo aspartamo. Según estudios recientes, la netrina juega un rol positivo en la promoción de la regeneración de tejido nervioso periférico y en la proliferación y migración de células de Schwann<sup>42</sup>. La ninjurina es un factor que contribuye a la neurogénesis bajo condiciones fisiopatológicas y cumple un rol importante en el proceso regenerativo de los nervios periféricos, particularmente en el proceso de mielinización<sup>43</sup>.

Se describe también una cantidad aumentada de factor neurotrópico derivado de cerebro (BDNF) y factor neurotrópico derivado de célula glial (GDNF) en el grupo tratado con ozono. El BDNF promueve el crecimiento y regeneración de neuritas y constituye uno de los objetivos de terapéuticos de diversos tratamientos pro-neuroregenerativos<sup>44</sup>. Si bien BDNF y el GDNF han demostrado capacidades neuroregenerativas individuales, su efecto es mucho mayor en conjunto, promoviendo regeneración y proliferación de brotes axonales, contribuyendo a mantener la citoarquitectura local<sup>45</sup>. Lo anterior suscita una clara respuesta regenerativa y protectora del tejido, estimulada y favorecida por la terapia de ozono. Si bien la evidencia relacionada a la efectividad del tratamiento de ozono en esta área es escasa y fue la principal limitación de nuestro estudio, la que se obtuvo nos entrega resultados positivos al respecto en cuanto a su uso no invasivo con fines terapéuticos. Los siete estudios incluidos entregaron resultados que denotan la eficacia de la terapia de ozono en términos de regeneración protección nerviosa en modelos animales con respecto a grupos control. Se sugiere por lo tanto realizar más estudios al respecto para ampliar y complementar el conocimiento disponible, utilizando métodos bioquímicos, inmunohistoquímicos y de microscopía electrónica de ser posible.

Actualmente el procedimiento sólo se ha realizado en ratones, por lo que la viabilidad de su realización y administración en humanos es un campo que queda por explorar. Sin embargo, se postula que el tratamiento con ozono puede ser un tratamiento alternativo seguro y efectivo para el daño nervioso, debido a sus efectos sobre el metabolismo del oxígeno, la energía celular y los mecanismos de defensa antioxidante expuestos por Ozbay<sup>5</sup>. Debido a esto, se sugiere evaluar y estudiar la realización de una terapia en un corto plazo después de ocurrida la lesión, con administración in situ<sup>18</sup>, considerando que concentraciones de ozono superiores

a 50 ug/ml podrían causar dolor o lesiones graves en el nervio periférico<sup>17</sup>. De esta manera, el ozono promueve la generación de agentes antioxidantes y síntesis de proteínas que disminuyen el estrés oxidativo favoreciendo la creación de un microambiente apropiado para el proceso de neuroregeneración y protección celular. Para estudios posteriores sugerimos que se realicen con tiempos de seguimiento más prolongados. Asimismo, y considerando la sinergia del ozono con la metilprednisolona en los estudios de Ozturk, O. et al.<sup>25</sup> y Gürkan, G. et al.<sup>27</sup>, se recomienda evaluar la terapia de ozono complementada con otros compuestos y/o fármacos que hayan demostrado efectividad neuroregenerativa y neuroprotectora, tales como la genisteína, gabapentina, zofenopril y dexametasona<sup>13,24,46</sup>. Adicionalmente se sugiere realizar estudios comparativos con tratamientos alternativos, como terapias de laser de bajo nivel, para dilucidar la efectividad comparada y contribuir a la estandarización de los protocolos y parámetros de tratamiento y administración.

## CONCLUSIÓN

Los datos recolectados sugieren que la terapia con ozono podría ser una opción viable y beneficiosa en la regeneración nerviosa en comparación a grupos control, sobre todo si es aplicada en estadios tempranos de la lesión, idealmente antes de que ocurra el restablecimiento de la microvascularización para minimizar el daño nervioso por estrés oxidativo. No aconsejando su administración por medio de solución salina o en dosis superiores a 50 ug/ml.

A pesar de que se ha comprobado el efecto antiinflamatorio del ozono, este es mucho menor en comparación a fármacos como la Metilprednisolona. Sin embargo, ambos se sinergizan añadiendo el beneficio del ozono contra el estrés oxidativo, brindando un ambiente favorable para la regeneración del nervio clínica e histológicamente. Sin embargo, se sugiere realizar más estudios al respecto que contengan evaluaciones funcionales e histopatológicas con periodos de seguimiento más prolongados.

## REFERENCIAS

1. Faroni A, Mobasser A, Kingham P, Reid A. Peripheral nerve regeneration: Experimental strategies and future perspectives. *Adv. Drug Deliv. Rev* [Internet] 2015 [consultado 2020 Jun 19]; 82-83:160-167. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0169409X14002737?via%3Dihub> DOI <https://doi.org/10.1016/j.addr.2014.11.010>
2. Sulaiman W, Gordon T. Neurobiology of Peripheral Nerve Injury, Regeneration, and Functional Recovery: From Bench Top Research to Bedside Application. *Ochsner Journal* [Internet] 2013 [consultado 2020 Ago 13]; 13 (1):100-108. Disponible en: [http://www.ochsnerjournal.org/content/13/1/100?utm\\_source=TrendMD&utm\\_medium=pc&utm\\_campaign=Ochsner\\_Journal\\_TrendMD\\_1](http://www.ochsnerjournal.org/content/13/1/100?utm_source=TrendMD&utm_medium=pc&utm_campaign=Ochsner_Journal_TrendMD_1)
3. Kim T, Yoon S., Lee W, Kim J, Shin J, Lee S, Lee S. Protective effect of GCSB-5, an herbal preparation, against peripheral nerve injury in rats. *J. Ethnopharmacol* [Internet] 2011 [consultado 2020 Ago 14]; 136(2):297-304. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0378874111002777?via%3Dihub> DOI [10.1016/j.jep.2011.04.037](https://doi.org/10.1016/j.jep.2011.04.037)
4. Hervera A, De Virgiliis F, Palmisano I, Zhou L, Tantardini E, Kong G, et al. Reactive oxygen species regulate axonal regeneration through the release of exosomal NADPH oxidase 2 complexes into injured axons. *Nat Cell Biol* [Internet] 2018 [consultado 2020 Ago 14]; 20(3):307-319. Disponible en: <https://www.nature.com/articles/s41556-018-0039-x> DOI [10.1038/s41556-018-0039-x](https://doi.org/10.1038/s41556-018-0039-x)
5. Ozbay I, Ital I, Kucur C, Akcilar R, Deger A, Aktas S, et al. Effects of ozone therapy on facial nerve regeneration. *BJORL* [Internet] 2017 [consultado 2020 Jun 15]; 83(2):168-175. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1808869416300453?via%3Dihub> DOI <https://doi.org/10.1016/j.bjorl.2016.02.009>
6. Smith N, Wilson A, Gandhi J, Vatsia S, Khan S. Ozone therapy: an overview of pharmacodynamics, current research, and clinical utility. *Med Gas Res* [Internet] 2017 [consultado 2020 Ago 16]; 7(3):212-219. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5674660/> DOI <https://doi.org/10.4103/2045-9912.215752>
7. Bocci V, Borrelli E, Travagli V, Zanardi I. The ozone paradox: ozone is a strong oxidant as well as a medical drug. *Med. Res. Rev.* [Internet] 2009 [consultado 2020 Ago 20]; 29(4):646-682. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19260079/> DOI [10.1002/med.20150](https://doi.org/10.1002/med.20150)
8. Saini R. Ozone therapy in dentistry: A strategic review. *J Nat Sci Biol Med* [Internet] 2011 [consultado 2020 Jun 20]; 2(2):151-153. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3276005/> DOI [10.4103/0976-9668.92318](https://doi.org/10.4103/0976-9668.92318)
9. Elvis A, Ekta J. Ozone therapy: A clinical review. *J Nat Sci Biol Med* [Internet] 2011 [consultado 2020 Ago 16]; 2(1):66-70.

Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3312702/> DOI 10.4103/0976-9668.82319

10. Yucesoy T, Kutuk N, Canpolat D, Alkan A. Comparison of Ozone and Photo-Biomodulation Therapies on Mental Nerve Injury in Rats. *J Oral Maxillofac Surg* [Internet] 2017 [consultado 2020 Jun 15]; 75(11):2323-2332. Disponible en: [https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0278-2391\(17\)30472-X](https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0278-2391(17)30472-X) DOI 10.1016/j.joms.2017.04.016

11. Menorca R, Fussel T, Elfar J. Peripheral Nerve Trauma: Mechanisms of Injury and Recovery. *Hand Clin* [Internet] 2013 [consultado 2021 Mar 9]; 29(3):317-330. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4408553/> DOI 10.1016/j.hcl.2013.04.002

12. Somay H, Emot ST, Uslu S, Orakdogan M, Meric ZC, Ince U, et al. The histological effects of ozone therapy on sciatic nerve crush injury in rats. *World Neurosurg* [Internet] 2017 [consultado 2021 Mar 9]; 105:702-708. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28587982/> DOI 10.1016/j.wneu.2017.05.161

13. Kalender A, Dogan A, Bakan V, Yildiz H, Gokalp M, Kalender M. Effect of Zofenopril on regeneration of sciatic nerve crush injury in a rat model. *J Brachial Plex Peripher Nerve Inj* [Internet] 2009 [consultado 2021 Mar 9]; 4,6. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2700796/> DOI 10.1186/1749-7221-4-6

14. Gordon T, Sulaiman O, Boyd JG. Experimental strategies to promote functional recovery after peripheral nerve injuries. *J Peripher Nerv Syst* [Internet] 2003 [consultado 2021 Mar 9]; 8(4):236-50. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14641648/> DOI 10.1111/j.1085-9489.2003.03029.x

15. Qian Y, Han Q, Zhao X, Song J, Cheng Y, Fang Z, et al. 3D melatonin nerve scaffold reduces oxidative stress and inflammation and increases autophagy in peripheral nerve

regeneration. *J Pineal Res* [Internet] 2018 [consultado 2021 Mar 9]; 65(4):e12516. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29935084/> DOI 10.1111/jpi.12516

16. Kahraman A, Kahveci R. Evaluating the effect of polytetrafluoroethylene and extractum cepae-heparin-allantoin gel in peripheral nerve injuries in a rat model. *Plast Surg (Oakv)* [Internet] 2015 [consultado 2021 Mar 9]; 23(1):9-14. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4364148/> DOI <https://doi.org/10.4172/plastic-surgery.1000902>

17. Ogut E, Yildirim F, Sarikcioglu L, Aydin M, Demir N. Neuroprotective Effects of Ozone Therapy After Sciatic Nerve Cut Injury. *Kurume Med J* [Internet] 2020 [consultado 2020 Jun 16]; 65(4):137-144. Disponible en: [https://www.jstage.jst.go.jp/article/kurumemedj/65/4/65\\_MS654002/\\_article](https://www.jstage.jst.go.jp/article/kurumemedj/65/4/65_MS654002/_article) DOI <https://doi.org/10.2739/kurumemedj.MS654002>

18. Clavo B, Rodríguez-Esparragón F, Rodríguez-Abreu D, Martínez-Sánchez G, Llontop P, Aguiar-Bujanda D, et al. Modulation of Oxidative Stress by Ozone Therapy in the Prevention and Treatment of Chemotherapy-Induced Toxicity: Review and Prospects. *Antioxidants (Basel)* [Internet] 2019 [consultado 2021 Mar 9]; 8(12):588. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6943601/> DOI 10.3390/antiox8120588

19. Yüce S, Cemal Gökçe E, İşkdemir A, Koç E, Cemil D, Gökçe A, et al. An experimental comparison of the effects of propolis, curcumin, and methylprednisolone on crush injuries of the sciatic nerve. *Ann Plast Surg* [Internet] 2015 [consultado 2020 Jun 25]; 74(6):684-692. Disponible en: [https://journals.lww.com/annalsplasticsurgery/Abstract/2015/06000/An\\_Experimental\\_Comparison\\_of\\_the\\_Effects\\_of.11.aspx](https://journals.lww.com/annalsplasticsurgery/Abstract/2015/06000/An_Experimental_Comparison_of_the_Effects_of.11.aspx) DOI 10.1097/SAP.0000000000000026

20. Yılmaz Z, Senoglu M, Kurutas E, Ciralik H, Ozbag D. Neuroprotective

effects of mannitol and vitamin C on crush injury of sciatic nerve; an experimental rat study. *J Neurol Sci* [Internet] 2012 [consultado 2020 Jul 2]; 28:538-551. Disponible en: [https://www.researchgate.net/publication/287015552\\_Neuroprotective\\_Effects\\_of\\_Mannitol\\_And\\_Vitamin\\_C\\_on\\_Crush\\_Injury\\_of\\_Sciatic\\_Nerve\\_An\\_Experimental\\_Rat\\_Study](https://www.researchgate.net/publication/287015552_Neuroprotective_Effects_of_Mannitol_And_Vitamin_C_on_Crush_Injury_of_Sciatic_Nerve_An_Experimental_Rat_Study)

21. Cherian D, Pete T, Narayanan A, Madhavan, S, Achammada S, Vynat G. Malondialdehyde as a Marker of Oxidative Stress in Periodontitis Patients. *J Pharm Bioallied Sci* [Internet] 2019 [consultado 2021 Mar 10]; 11(2):297-300. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6555357/> DOI 10.4103/JPBS.JPBS\_17\_19

22. Gonçalves N, Mohseni S, El Soury M, Ulrichsen M, Richner M, Xiao J, et al. Peripheral Nerve Regeneration Is Independent From Schwann Cell p75NTR Expression. *Front. Cell. Neurosci* [Internet] 2019 [consultado 2021 Mar 10]; 13:235. Disponible en: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fncel.2019.00235/full> DOI <https://doi.org/10.3389/fncel.2019.00235>

23. Ocejo A, Correa R. Methylprednisolone. *StatPearls* [Internet] 2020 [consultado 2020 Ago 23]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK544340/>

24. Ozbek Z, Aydin HE, Kocman AE, Ozkara E, Sahin E, Bektur E, et al. Neuroprotective Effect of Genistein in Peripheral Nerve Injury. *Turk Neurosurg* [Internet] 2017 [consultado 2021 Mar 10]; 27(5):816-822. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27759874/> DOI 10.5137/1019-5149.JTN.18549-16.1

25. Ozturk O, Tezcan A, Adali Y, Yildirim C, Aksoy O, Yagmurdu H, et al. Effect of ozone and methylprednisolone treatment following crush type sciatic nerve injury. *Acta Cir. Bras* [Internet] 2016 [consultado 2020 Jun 15]; 31(11):730-735.

Disponibile en: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0102-86502016001100730&lng=en&tlng=en](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-86502016001100730&lng=en&tlng=en) DOI <https://doi.org/10.1590/s0102-865020160110000005>

26. Meier R, Boddington S, Krug C, Acosta F, Thullier D, Henning T, et al. Detection of postoperative granulation tissue with an ICG-enhanced integrated OI-/X-ray System. *J Transl Med* [Internet] 2008 [consultado 2021 Mar 10]; 6:73. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2613387/#B3> DOI 10.1186/1479-5876-6-73

27. Gürkan G, Sayin M, Kizmazoglu C, Erdogan M, Yigitturk G, Erbak Y, et al. Evaluation of the neuroprotective effects of ozone in an experimental spine injury model. *J Neurosurg: Spine* [Internet] 2020 [consultado 2020 Jun 15]; 1-9. Disponible en: <https://thejns.org/spine/view/journals/j-neurosurg-spine/33/3/article-p406.xml> DOI <https://doi.org/10.3171/2020.2.SPINE191439>

28. Eker E, Cok O, Aribogan A, Arslan G. Management of Neuropathic Pain with Methylprednisolone at the Site of Nerve Injury. *Pain Med* [Internet] 2012 [consultado 2021 Mar 10]; 3:443-451. Disponible en: <https://academic.oup.com/painmedicine/article/13/3/443/1852083> DOI <https://doi.org/10.1111/j.1526-4637.2011.01323.x>

29. Aslan R, Kutlu R, Civi S, Tasyurek E. The correlation of the total antioxidant status (TAS), total oxidant status (TOS) and paraoxonase activity (PON1) with smoking. *Clin. Biochem* [Internet] 2014 [consultado 2021 Mar 10]; 47(6):393-397. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0009912013004530?via%3Dihub> DOI <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2013.10.002>

30. León O, Menéndez S, Merino N, Castillo R, Sam S, Pérez L, et al. zone oxidative preconditioning: a protection against cellular damage by free radicals. *Mediators Inflamm* [Internet] 1998 [consultado 2020 Jul 2]; 7(4):289-294.

Disponibile en: <https://www.hindawi.com/journals/mi/1998/793438/> DOI <https://doi.org/10.1080/09629359890983>

31. Mashhoudi M, Tajziehchi M, Heidari M, Bushehri A, Moayer F, Mansouri N, et al. Stimulation Effect of Low Level Laser Therapy on Sciatic Nerve Regeneration in Rat. *J Lasers Med Sci* [Internet] 2017 [consultado 2021 Mar 10]; 8(1):32-37. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5642176/> DOI 10.15171/jlms.2017.s7

32. Jessen K, Brennan A, Morgan L, Mirsky R, Kent A, Hashimoto Y, et al. The schwann cell precursor and its fate: A study of cell death and differentiation during gliogenesis in rat embryonic nerves. *Neuron* [Internet] 1994 [consultado 2021 Mar 10]; 12(3):509-527. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/0896627394902097> DOI [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(94\)90209-7](https://doi.org/10.1016/0896-6273(94)90209-7)

33. Yuca Y, Yucesoy T, Tok O, Alkan A. The efficiency of ozone therapy and low-level laser therapy in rat facial nerve injury. *J Craniomaxillofac Surg* [Internet] 2020 [consultado 2020 Jun 16]; 48(3):308-314. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1010518220300251> DOI <https://doi.org/10.1016/j.jcms.2020.01.017>

34. Sene G, Sousa F, Fazan V, Barbieri C. Effects of laser therapy in peripheral nerve regeneration. *Acta Ortop Bras* [Internet] 2013 [consultado 2021 Mar 10]; 21(5):266-270. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3874995/> DOI 10.1590/S1413-78522013000500005

35. Schwartz-Tapia A, Martínez-Sánchez G, Sabah F. Madrid Declaration on Ozone Therapy; ISCO3 (International Scientific Committee of Ozone Therapy) 2nd ed.[Internet] 2015 [consultado 2020 Ago 16]. Disponible en: [http://scholar.google.cl/scholar\\_url?url=https://www.doktermulder.nl/wp-content/uploads/2020/02/Madrid-Declaration.pdf&hl=es&sa=X&ei=YAAbY](http://scholar.google.cl/scholar_url?url=https://www.doktermulder.nl/wp-content/uploads/2020/02/Madrid-Declaration.pdf&hl=es&sa=X&ei=YAAbY)

[lqjJ40By9YP0reL0AU&scisig=AAGBfm3Q\\_d55j2aYDbNxScKTuvq7FyLGgg&nossl=1&oi=scholar](https://doi.org/10.1016/j.jmb.2015.04.001)

36. Hassen, E., mahmod, A., Ibrahem, N., El-Shal, A. The Effect of Long Term Administration of Aspartame on the Sciatic nerve of adult male albino rats and the Possible Therapeutic Role of Ozone (Histological and Biochemical Study). *EJH* [Internet] 2019 [consultado 2020 Jun 20]; 42(1):191-201. Disponible en: [https://ejh.journals.ekb.eg/article\\_36758.html](https://ejh.journals.ekb.eg/article_36758.html) DOI 10.21608/ejh.2018.6082.1035

37. Soffritti M, Padovani M, Tibaldi E, Falcioni L, Manservigi F, Belpoggi F. The carcinogenic effects of aspartame: The urgent need for regulatory re-evaluation. *Am J Ind Med* [Internet] 2014 [consultado 2020 Ago 16]; 57(4):383-397. Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/ajim.22296> DOI 10.1002/ajim.22296

38. Liu B, Xin W, Tan J, Zhu R, Li T, Wang D, et al. Myelin sheath structure and regeneration in peripheral nerve injury repair. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet] 2019 [consultado 2021 Mar 11]; 116(44):22347-22352. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6825268/> DOI 10.1073/pnas.1910292116

39. Liu Z, Jin Y, Chen L, Wang Y, Yang X, Cheng J, et al. Specific marker expression and cell state of Schwann cells during culture in vitro. *PloS one* [Internet] 2015 [consultado 2021 Mar 11]; 10(4):e0123278. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4393255/> DOI 10.1371/journal.pone.0123278

40. Fang Z, Ge X, Chen X, Xu Y, Yuan W, Ouyang Y. Enhancement of sciatic nerve regeneration with dual delivery of vascular endothelial growth factor and nerve growth factor genes. *J Nanobiotechnol* [Internet] 2020 [consultado 2021 Mar 11]; 18:46. Disponible en: <https://jnanobiotechnology.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12951-020-00606-5#citeas> DOI <https://doi.org/10.1186/s12951-020-00606-5>

41. Nishida Y, Yamada Y, Kanemaru H, Ohazama A, Maeda T, Seo K. Vascularization via activation of VEGF-VEGFR signaling is essential for peripheral nerve regeneration. *Biomed Res* [Internet] 2018 [consultado 2021 Mar 11]; 39(6):287-294. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30531158/> DOI 10.2220/biomedres.39.287
42. Dun XP, Parkinson DB. Role of Netrin-1 Signaling in Nerve Regeneration. *Int J Mol Sci* [Internet] 2017 [consultado 2021 Mar 11]; 18(3):491. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5372507/> DOI 10.3390/ijms18030491
43. Tomita Y, Horiuchi K, Kano K, Tatsukawa T, Matsuo R, Hayasaka T, et al. Ninjurin 1 mediates peripheral nerve regeneration through Schwann cell maturation of NG2-positive cells. *Biochem Biophys Res Commun* [Internet] 2019 [consultado 2021 Mar 11]; 519(3):462-468. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31526566/> DOI 10.1016/j.bbrc.2019.09.007
44. McGregor CE, English AW. The Role of BDNF in Peripheral Nerve Regeneration: Activity-Dependent Treatments and Val66Met. *Front Cell Neurosci* [Internet] 2019 [consultado 2021 Mar 11]; 12:522. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/pmid/30687012/> DOI 10.3389/fncel.2018.00522
45. Boyd JG, Gordon T. Glial cell line-derived neurotrophic factor and brain-derived neurotrophic factor sustain the axonal regeneration of chronically axotomized motoneurons in vivo. *Exp Neurol* [Internet] 2003 [consultado 2021 Mar 11]; 183(2):610-9. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14552902/> DOI: 10.1016/s0014-4886(03)00183-3
46. Feng X, Yuan W. Dexamethasone enhanced functional recovery after sciatic nerve crush injury in rats. *Biomed Res Int* [Internet] 2015 [consultado 2021 Mar 11]; 2015: 627923. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4369935/> DOI 10.1155/2015/627923