

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS

TESINA PARA ASPIRAR AL TÍTULO DE
ESPECIALISTA EN MEDICINA DEPORTIVA DEL
EQUINO

“UTILIDAD CLÍNICA DE LA OZONIZACIÓN DE LA
SANGRE Y SUS COMPONENTES EN EQUINOS”

AUTOR

Médico Veterinario Andrés Felipe Rubiano Leyva

2015

ÍNDICE

1. AGRADECIMIENTOS	5
2. RESUMEN	6
3. INTRODUCCIÓN	7
3.1 Método de Obtención del Ozono	9
3.1.1 Ozono Médico	9
3.1.2 Manufactura y Control de Calidad	10
3.1.3 Mecanismo de Generación del Ozono	12
3.1.4 Ozonización de la Sangre	15
3.1.5 Ozonización del Plasma	16
3.1.5.1 Procedimiento de Ozonización del Plasma	17
3.1.5.2 Propiedades y Mecanismo de Acción del PRP	19
3.1.5.2.1 Factores de Crecimiento	21
3.2 Mecanismo de Acción del Ozono	23
3.3 Usos Clínicos del Ozono	27
3.4 Vías de Administración del Ozono	30
3.4.1 Autohemoterapia Mayor y Menor	30
3.4.2 Administración Endovenosa de NaCl Ozonizada	31

3.4.3	Exposición de la zona afectada al Ozono	31
3.4.4	Administración Subcutánea de Ozono	32
3.4.5	Administración Intramuscular de Ozono	32
3.4.6	Administración Intraperitoneal de Ozono	33
3.4.7	Administración Intrarrectal de Ozono	34
3.4.8	Administración Intravaginal de Ozono	34
3.4.9	Administración Intramamaria de Ozono	34
3.4.10	Administración Intraarticular de Ozono	35
4.	AUTOHEMOTERAPIA MAYOR CON OZONO	35
4.1	Asepsia e Higiene	35
4.1.1	Materiales Requeridos	36
4.1.2	Preparación del Procedimiento	36
4.1.3	Trabajando con el Paciente	37
5.	REACCIONES INDUCIDAS POR LA AUTOHEMOTERAPIA OZONIZADA.	40
5.1	Reacciones Iónicas y Radicales	40
5.2	Mecanismo de Reacción en toda la sangre bajo condiciones fisiológicas	42
5.3	Peróxidos	43
5.4	Antioxidantes	44
5.5	Protección contra el daño isquemia – reperfusión	46
5.6	Metabolismo de los Eritrocitos	47

5.6.1	Sistema de oxidación protectora y patrón fosfato pentosa	47
5.6.2	2,3 Difosfoglicerato	48
5.6.3	Concentración de Eritrocitos	51
5.6.4	Cambios Morfológicos de los Eritrocitos	53
5.7	ATP	54
5.8	Células Inmuno competentes	55
5.9	Flexibilización de las células de la piel	61
5.10	Parámetros Hematológicos y Constantes Fisiológicas	61
5.10.1	Parámetros Hematológicos	61
5.10.2	Frecuencia Cardíaca	65
5.10.3	Frecuencia Respiratoria	66
5.10.4	Concentración de Lactato plasmático	66
5.10.5	Proteínas Totales	67
5.10.6	Glucemia	67
6.	GENOTOXICIDAD DEL OZONO	68
7.	CONCLUSIONES	70
8.	BIBLIOGRAFÍA	72

1. AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios y a la Virgen por haberme brindado la oportunidad de cursar la carrera y obtener otro triunfo personal en mi vida, por haberme brindado salud, sabiduría y entendimiento para alcanzar esta meta.

Agradezco a mis padres, mi hermano, mis papas – abuelos, y a toda mi familia, por el apoyo incondicional en todo momento, que me permitió culminar mi carrera de posgrado y fue un incentivo para la realización de este trabajo.

Agradezco al doctor Jose Alberto García Liñeiro por haberme brindado la oportunidad de recurrir y aprovechar sus conocimientos, así como también por haberme tenido toda la paciencia del mundo para guiarme durante el curso de mi carrera.

Agradezco a la Universidad de la UBA por haberme aceptado a ser parte de ella y haberme abierto las puertas para poder estudiar esta carrera, así como también a los diferentes docentes que brindaron sus conocimientos y su apoyo para mi crecimiento profesional.

2. RESUMEN

El rendimiento de los caballos sometidos a un ejercicio intenso de manera regular, se ve afectado negativamente por el estrés oxidativo, por lo tanto, es importante aumentar y mejorar la capacidad antioxidante en el equino con el fin de reducir dicho estrés oxidativo.

La autohemoterapia ozonizada, permite la adaptación del organismo al estrés oxidativo favoreciendo una respuesta antioxidante más potente, produciendo una sensación de bienestar, por medio de la mejora en la capacidad y propiedades del eritrocito y su mayor disposición para ceder O₂ a los tejidos.

La Ozonoterapia es el conjunto de técnicas que utilizan el ozono como agente terapéutico en un gran número de patologías. Es una terapia netamente natural, con pocas contraindicaciones y efectos secundarios mínimos, siempre que se realice correctamente.

Esta terapia con fines lucrativos de animales deportivos se considera Doping a pesar de que no es detectable. ⁽¹⁾

3. INTRODUCCIÓN

El ozono es una forma alotrópica (O₃) del oxígeno molecular (O₂) que está presente, como un constituyente gaseoso natural, en las capas altas de la atmósfera, representando el 0,0001 % de su composición total. El ozono fue descubierto por el físico holandés Van Marum en 1783, investigando con máquinas electrostáticas las cuales desprendían un olor característico; al igual que le sucedió años más tarde, en 1801, a Ciusank al efectuar la hidrólisis del agua, después en 1840, Christia F. Shonbein descubrió una variedad alotrópica y más activa del oxígeno: el ozono, que posee una serie de propiedades, entre ellas la de ser antiséptico y desinfectante, que resultan de gran utilidad en medicina. ^(2, 5, 9)

El origen etimológico del ozono, bautizado así por Scobein en 1840, deriva del griego OZEIN verbo que significa "oler", ya que este gas presenta un olor muy característico, único y punzante. No puede ser olido cuando su concentración supera las 0,1 ppm pues empieza a ser un gas irritante. ⁽³⁾

El descubrimiento de las propiedades bactericidas y cicatrizantes del ozono permitió a los investigadores profundizar en el conocimiento de los efectos beneficiosos del mismo, hasta entonces desconocidos, y en el uso del ozono como terapia curativa en los distintos campos de la Medicina. ⁽³⁾

En 1950, Haüsler inventó un generador de ozono para uso médico que permitiría la dosificación exacta de las mezclas de ozono - oxígeno. Este hallazgo fue decisivo en la Terapéutica, pues es necesario aplicar una dosis adecuada de ozono para evitar la peroxidación excesiva que pudiese ocasionar daño en las membranas de las células. Esta dosificación varía entre 1 y 100 mg de ozono / litro de oxígeno de acuerdo a la vía de administración y la patología en cuestión, pero el Ozono médico, es en realidad una mezcla de un 5% de Ozono como máximo y un 95% de Oxígeno. ^(3, 9, 11)

El ozono que se utiliza en forma terapéutica es producido por un equipo de electromedicina, que somete al O₂ a una descarga eléctrica de alto voltaje y alta frecuencia, lo que produce una solución de peróxido de oxígeno (ozono) en oxígeno, el cual al ser

aplicado por distintas vías, mejora el metabolismo en forma integral y favorece la circulación sanguínea en los tejidos inflamados, aportándoles mayor cantidad de oxígeno y energía. ⁽⁴⁾

El ozono es un gas que se encuentra de manera natural en la naturaleza, es el resultado de la reacción del oxígeno con la energía producida en las tormentas eléctricas. Actúa como filtro para las radiaciones ultravioletas. El ozono es una modificación alotrópica del oxígeno cuya molécula está compuesta por tres átomos de oxígeno y puede existir en los tres estados de agregación. ^(3, 6)

El ozono actúa como un excelente agente antimicrobiano debido a su elevado poder oxidante, especialmente al nivel sistémico, pues es capaz de inhibir y destruir microorganismos patógenos como bacterias anaerobias, virus, algas, hongos y protozoos. ^(3, 4, 6, 7, 11)

Estudios recientes demuestran que el ozono es un poderoso oxidante y que su acción biológica se manifiesta en la destrucción de biomoléculas, siendo capaz de posibilitar mayor disponibilidad de oxígeno. Se plantea además, que el ozono tiene cierto efecto estimulante sobre los procesos de metabolismo del oxígeno y sobre la circulación sanguínea, así como acción germicida. ^(3, 4, 6, 7)

La medicina veterinaria está creciendo y especializándose rápidamente, ya que fue la búsqueda de alternativa más económica para proporcionar una mejor calidad de vida a nuestros pacientes con una técnica menos invasiva y menos costosa para el cliente. ⁽³⁾

Durante la última década, han sido objeto de publicación diversos efectos beneficiosos Ozono, el cual aplicado juiciosamente se define como una adaptación ante un estrés oxidativo agudo o acondicionamiento oxidativo. También se ha demostrado que la ozonoterapia restablece el balance redox intracelular, incrementando la actividad de las enzimas antioxidantes endógenas, y de esta forma disminuye el estrés oxidativo generado en cualquier patología. En la medicina humana se ha demostrado el efecto beneficioso de la

ozonoterapia en enfermedades de diferente etiología tales como, neurológicas, oftalmológicas, endocrino-metabólica, ortopédicas e inmunológicas. ^(3, 11)

Las enfermedades que padecen los animales son muy semejantes a las encontradas en humanos, por lo que se decide tomar como antecedentes estudios recientes realizados tanto en modelos experimentales como en humanos para fundamentar el uso de esta alternativa terapéutica (Ozonoterapia) en diferentes enfermedades que se presentan en los animales. ^(3, 6, 7, 8)

3.1 Métodos de obtención del ozono

El O₃ utilizado en medicina, se produce a partir de oxígeno médico puro a través de una descarga eléctrica silenciosa, de alta frecuencia y voltaje, mediante unos equipos que son los ozonizadores (generadores de ozono medicinal). El principio de acción de los ozonizadores con fines médicos es el siguiente: el oxígeno pasa por dos tubos de bajo voltaje y de distintas potencias, que están unidos en serie formando un campo eléctrico y el oxígeno se descompone en átomos los cuales reaccionan con otras moléculas de oxígeno formando ozono. A mayor voltaje y menor velocidad de la corriente de oxígeno, mayor será la concentración de ozono. ^(3, 4, 8)

3.1.1 Ozono Médico

El ozono con una sustancia farmacéutica que posee una molécula exactamente definida y un rango de indicaciones claramente definido. Cuando se habla del ozono médico en un rango de concentración entre 1 y 100 µg/ml son necesarios pre-requisitos especiales para tenerlo disponible como tal. ^(3, 4, 8)

A diferencia de otros fármacos, se tiene que preparar en el sitio a utilizarlo, y como se requiera, esto se debe al hecho de que la molécula de Ozono tiene una estabilidad y periodo

de vida limitado, por esto la disociación relevante y los valores de vida media deben tomarse en cuenta. ^(3,4,8)

3.1.2 Manufactura y Control de Calidad

Prerrequisitos Técnicos para los Generadores De Ozono Médico

~ Rango de concentración de ozono entre 1 y 100 $\mu\text{g/ml}$ (mg/l)

Con el fin de cumplir con los requerimientos de un rango de concentración entre 1 y 100 $\mu\text{g/ml}$ (mg/l), la única técnica que entra en consideración para su uso aquí es la de descarga eléctrica silente y no, por ejemplo, la de someter el oxígeno a irradiación en el rango ultravioleta (UV), ya que al usar ésta como fuente de energía, no se obtendrían las altas concentraciones de ozono necesarias, ni una dosificación exacta. ^(3,4,8)

~ Oxígeno médico como sustancia de ozono

Una altísima calidad (es decir lo más puro) en la mezcla de oxígeno/ozono, libre de óxidos nítricos, es una garantía para que el oxígeno absolutamente estéril sea usado como el gas inicial (sustancia de comienzo), al mismo tiempo, actúa como un solvente para la mezcla de ozono/oxígeno, de hecho las concentraciones de oxígeno no deben usarse tampoco, ya que siempre involucran un cierto residuo de nitrógeno. ^(3,4,8)

~ Aire libre de ozono en el lugar

Para evitar el riesgo de contactos tóxicos con el epitelio pulmonar, no debe escapar ningún rastro de ozono en el aire circundante en el sitio de uso (se cuenta con la percepción humana odorífera como un instrumento de detección), cualquier exceso de ozono generado debe ser totalmente convertido de nuevo en oxígeno. ^(3,4,8)

~ Materiales de trabajo fisiológicamente seguros

Dentro del generador, y esto concierne a todas las formas de aplicación, sólo pueden usarse materiales de trabajo que sean inertes y seguros fisiológicamente, lo que es logrado con cubiertas especiales de aluminio, vidrios y plásticos tales como el polietileno, polipropileno o PTFE (teflón) que han demostrado ser especialmente adaptables. ^(3, 4, 8)

~ Accesorios para medición constante de ozono

Como la concentración de ozono y la tasa de disociación dependen en forma considerable de diferentes parámetros tales como temperatura, presión, volumen de flujo, entre otros, los generadores de ozono médico deben por propósitos de calidad en seguridad estar equipados con un instrumento para medir la concentración, con el fin de determinarla y monitorearla continuamente. ^(3, 4, 8)

~ Unidad de ozono (generador) independiente del paciente

Para evitar cualquier tipo de riesgo desde el inicio, sólo se deben usar generadores de ozono que sean independientes e inaccesibles para el paciente.

La figura 1, ilustra esquemáticamente la función de un generador de ozono médico.

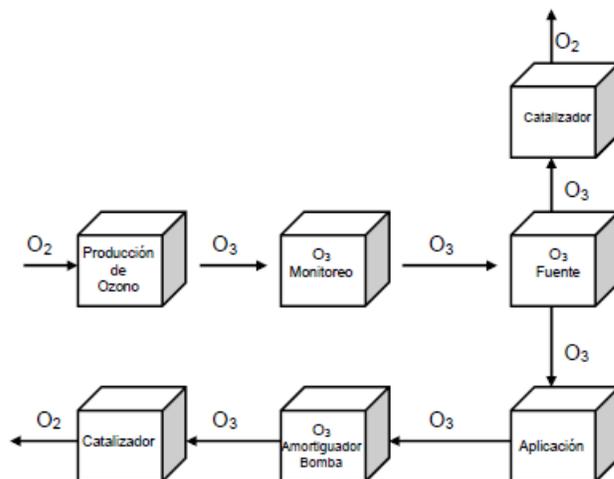


Figura 1. Secuencia funcional de una unidad de ozono médico. Tomado de Coumbe. K. 2012

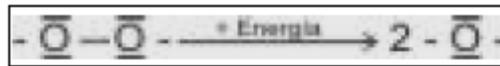
3.1.3 Mecanismo de generación del Ozono

Existen comercialmente disponibles generadores de ozono que tienen diferente construcción técnica; por ejemplo aquellos que se basan en corrientes alternas de alta y baja frecuencia, además de generadores con descarga de superficie o descarga plasmática. ^(3, 4, 8)

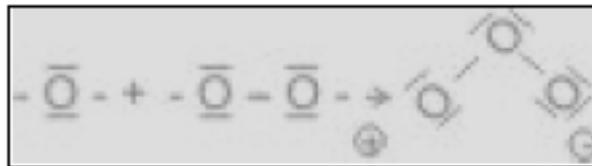
La energía proporcionada asegura un rompimiento en las moléculas de O₂ individuales en átomos de oxígeno (O) quienes entonces se combinan con una molécula de O₂ existente para formar una molécula de O₃. El ozono extra o no utilizado se convierte de nuevo en oxígeno catalíticamente. Figura 2. ^(3, 4, 8)

En este proceso tiene lugar lo siguiente:

Una parte de la molécula de Oxígeno (O₂) se rompe en átomos separados de oxígeno (O) cuando se aplica energía eléctrica:



Energía Individual – Carga de átomos de oxígeno reacciona con oxígeno molecular (O₂), perdiendo energía al mismo tiempo, para formar ozono (O₃):



El usuario puede variar la concentración de Ozono vía dos parámetros: el voltaje y volumen de flujo (flujo de gas). ^(3, 4, 8)

- ~ El Voltaje: Mientras más alto el voltaje aplicado, más grande el suministro de concentración de ozono.

~ El Flujo de gas: Mientras más grande sea el flujo de gas, es decir, mientras más rápido el oxígeno fluye a través de la zona de descarga, más bajo el número de moléculas desintegradas de O_2 , es decir que es menor la concentración de ozono suministrado. (3, 4, 8)

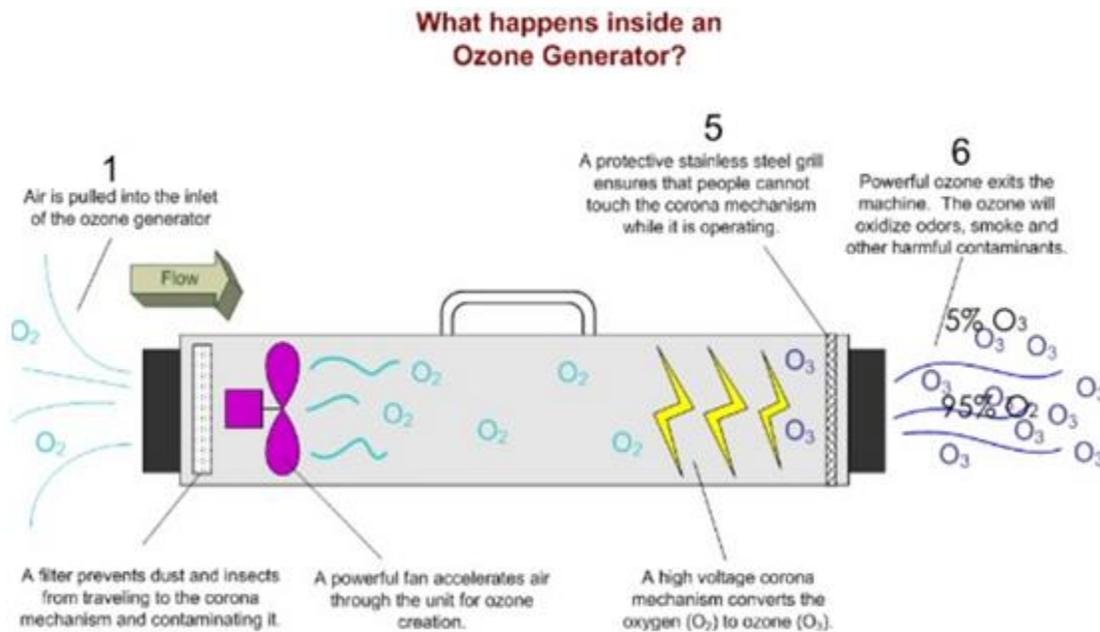


Figura 2. Mecanismo de obtención del ozono en el generador. Tomado de Delgado. M. 2013

En la ozonoterapia, se debe utilizar una mezcla homogénea de ozono y oxígeno, de lo cual se encarga el generador, así como de la regulación y medición de la concentración.

Para calcular la dosis de ozono, se debe tomar en cuenta:

- El volumen global de la mezcla de gas compuesta por oxígeno / ozono.
- La concentración de ozono indicada en microgramos por mililitro ($\mu g / ml$).
- La presión barométrica (mmHg).

La concentración de ozono / oxígeno no es suficiente para determinar la dosis total de ozono, la dosis se calcula según: ^(3, 4, 8)

$$D = V \times (O_3)$$

Donde D = dosis total de ozono

V = volumen de gas O₃/O₂

(O₃) = concentración del gas en µg/ml

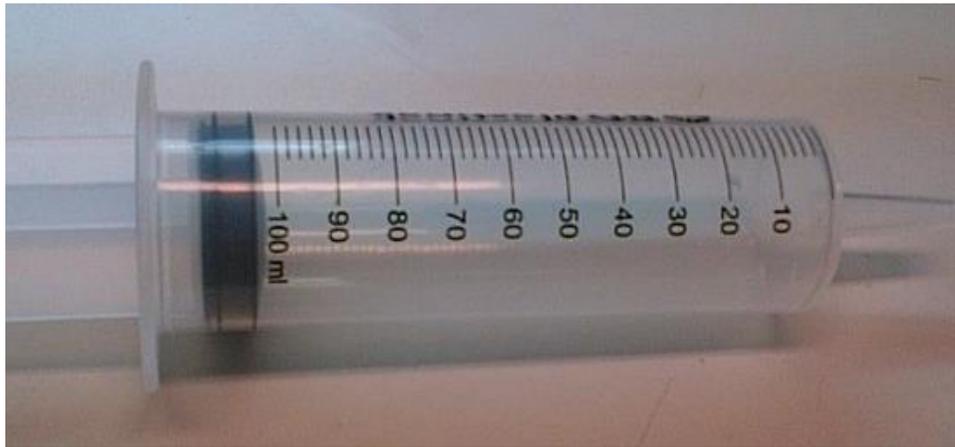


Figura 3. Jeringa desechable resistente al ozono con una concentración del mismo. Tomado de Delgado. M. 2013

Una jeringa de 100 ml llena con O₃/O₂ a concentración de 40 µg/ml contendrá una dosis total de ozono de: $D = 100 \times 40 = 4000\mu\text{g}$ totales de ozono.

Una concentración de 80 µg/ml puede parecer muy alta pero si está en un volumen de 10ml entonces habrá una dosis de solo 800µg de ozono

Una concentración de 10 µg/ml puede parecer baja pero si el volumen es de 100ml entonces la dosis será de 1000 µg.

3.1.4 Ozonización de la Sangre

En un estudio realizado por Travagli. V. et al., se utilizó un total de sangre de 50 ml en humanos, (equinos hasta 200 ml de sangre), utilizando anticoagulantes como heparina (20 UI / ml sangre) o citrato de sodio (1ml / 9ml sangre) y una mezcla de gases O₂ (95 % - 99 %) y O₃ (1% - 5%), con concentraciones de O₃ 20, 40, 80, 160 µg / ml sangre. ⁽³²⁾

Se determinó que el mantenimiento de las jeringuillas en un oscilador monodireccional (60 ciclos / min) durante 10 min permite un mezclado completo de las fases líquido-gas con mínima formación de espuma y que, dentro de este período de tiempo, el ozono reacciona completamente con los sustratos de la sangre, lo que implica que todas las muestras reaccionan con la dosis de ozono en su totalidad. ⁽³²⁾

En un estudio realizado por Boczkowska. B. et al., el proceso de ozonización de la sangre, se realiza inmediatamente obtenida la misma, para lo cual se utilizó una dosis de 10 – 20 ml de mezcla de O₂ / O₃, en donde la concentración final total de ozono en sangre fue de 15 – 30 µg / ml respectivamente. ⁽³³⁾

La mezcla de gas fue transferida en la sangre, utilizando jeringas de material resistente al ozono, intentando mantener un flujo constante de 1 ml / min. Inmediatamente las bolsas con sangre fueron puestas en un agitador de laboratorio durante 10 min para lograr una mezcla correcta de la sangre con el ozono. ⁽³³⁾

En un estudio realizado por Bocci. V., el ozono fue generada a partir de oxígeno de grado médico (O₂) utilizando descarga eléctrica de arco de corona, por el generador de O₃ (Modelo Ozonosan PMIOOK, Hansler. GmbH, Iffezheim, Alemania), que permite que el caudal de gas y la concentración de O₃ sean controlados en tiempo real por determinación fotométrica, como se recomienda por el Comité de Normalización de la Internacional. ⁽³⁴⁾

Asociación O₃. La velocidad de flujo de ozono se mantuvo constante a 3 l / min en todos los experimentos. ⁽³⁴⁾

Como anticoagulante se utilizó calciparina (Heparina cálcica 20 UI / ml de sangre), cada muestra de sangre fue tratada con una mezcla de O₂ / O₃ (96 % y 4 % respectivamente) en un volumen de 20 ml. ⁽³⁴⁾

El ozono fue introducido a las bolsas con sangre por medio de un sistema de llaves de paso multidireccional y posteriormente fue puesta en un oscilador monodireccional a 80 ciclos / min durante 1 min para lograr la correcta mezcla de la sangre con el ozono. ⁽³⁴⁾

3.1.5 Ozonización del Plasma

Estudios realizados por el Dr. Bocci (1999) y Re (2010), han demostrado que la ozonización del plasma heparinizado promueve la agregación plaquetaria acentuando así la liberación de sus factores de crecimiento. Se observó una gran diferencia entre la sangre anticoagulada con citrato o con heparina. El estudio del Dr. Bocci se realizó a diferentes concentraciones: 20 µg/ml, 40 µg/ml y 80 µg/ml de ozono, con mediciones tras 2 h, 4 h y 8h de incubación. Constató que cuando se utiliza heparina, aumenta la agregación plaquetaria en un 20 % con una concentración de ozono de 40 µg/ml y en un 68% cuando la concentración es de 80 µg/ml. ⁽³⁵⁾

Los factores de crecimiento derivados de las plaquetas que se estudiaron fueron: PDGF AB, el cual se libera especialmente cuando la sangre está heparinizada, a partir de 40 µg/ml de ozono, superando en más del doble a lo que se libera si la sangre se trata con citrato, las concentraciones más elevadas se alcanzaron a partir de las 2 h de incubación. TGF beta1, que se libera de manera creciente desde la primera hora hasta la cuarta, con una mayor expresión a las 4 h en el grupo donde se heparinizó la sangre y se trató con 80 µg de O₃. IL-8, la cual se libera a las 4 h, se supone que es el tiempo que necesita su síntesis. TBX2, que se libera desde la primera hora de incubación, los valores a las 2 y 4 h son similares y las diferencias en cuanto a su liberación dependiente del anticoagulante se registraron solo para 2 h de incubación a las concentraciones de 20 µg de O₃ y 80 µg de O₃ a favor del citrato. Por otra parte, la presencia de FGF es independiente del anticoagulante y se activa de igual modo con cloruro de calcio que con el ozono. ⁽³⁵⁾

El efecto anticoagulante de la heparina se ejerce a través de la activación de la antitrombina III. La heparina se une al inhibidor de la coagulación antitrombina III, produce un cambio conformacional de la molécula que acelera más de 1000 veces la unión de la antitrombina III a los factores activados, principalmente la trombina y el factor Xa, con menor intensidad

al XIa y XIIa (complejo heparina-antitrombina se une finalmente a la trombina). Esta unión inactiva las proteasas de la coagulación de suero. La inhibición de la activación mediada por trombina de los factores V y VII es de importancia fundamental para el efecto anticoagulante. ⁽³⁵⁾

El citrato sódico (10 ml 3,3% puede anticoagular 100 ml de sangre) es sólo anticoagulante in vitro por ser un secuestrador de los iones de calcio, y no tiene efecto sistémico. ⁽³⁵⁾

Los métodos convencionales de activación de las plaquetas usan citrato debido a que el cloruro de calcio que se añade para la activación, satura la capacidad quelante del citrato y activa el proceso de formación del coágulo, por tanto, cuando se trata de activar el PRP con O₃ y se necesite del coágulo deberá usarse como anticoagulante citrato, mientras que cuando la mayor importancia la tiene lograr un plasma más rico en factores deberá usarse heparina. ⁽³⁵⁾

La combinación de ambas técnicas, activación con calcio y ozono, acelera la activación de las plaquetas. Al ozonizar el PRP se forman ozónidos y otros derivados, que difunden en el interior de la plaqueta, se activan la fosfolipasa C y la A2 dependiente de calcio, facilitando la formación de sustancias pro-agregantes (PGE₂, Tromboxano, entre otras). Con ello se consigue no solo liberar los factores de crecimiento más rápidamente, sino que la formación de peróxidos despliega muchas rutas metabólicas curativas que estaban silentes. ⁽³⁵⁾

3.1.5.1 Procedimiento de ozonización del plasma

De manera general se carga en una jeringa un volumen de ozono similar al volumen de PRP obtenido, las concentraciones de O₃ van de 40 µg/ml a 80 µg/ml se procede a mezclar con el PPR por un minuto y a continuación se añade cloruro de calcio. Será la combinación de ambos la que dará una mejor y óptima liberación de los factores de crecimiento. ⁽³⁵⁾

Formación del coágulo: si el propósito es la formación del coágulo, es de vital importancia respetar las proporciones y nunca poner más cloruro cálcico del indicado, además de obtener el plasma con citrato de sodio como anticoagulante. Para acelerar la coagulación y la formación de fibrina se utiliza una incubadora que eleva la temperatura a 37° C y se

incuba durante unos 30 a 40 min. El coágulo obtenido se comportará como una esponja empapada en factores de crecimiento. ⁽³⁵⁾

En el caso de usar la técnica para la curación de heridas, estas se tratan con ozono (con agua ozonizada o bolsas de ozono), se debridan y se procede a irrigar la úlcera con el PRP no coagulado, se cubre la úlcera con la membrana biológica (fibrina), plasma coagulado y se sella con un apósito hidrocólicoide durante 3 días. Este procedimiento se repite cada 15 días. ⁽³⁵⁾

El sobrenadante del PRP es también ideal para su uso como colirio. La aplicación del PRP tanto de forma tópica como en colirio ha demostrado ser un procedimiento fiable, seguro y eficaz para restaurar la superficie epitelial de la cornea. El coágulo de PRP es ideal para estimular la regeneración ósea en alvéolos pos extracción, tratamiento de úlceras, ingeniería de tejidos, entre otros. ⁽³⁵⁾

Para la artrosis la combinación de la ozonoterapia tradicional con la de PRP potencia el efecto regenerativo del PRP, garantizando su esterilidad y añade los efectos conocidos del ozono como antiinflamatorio y en el control del dolor. ⁽³⁵⁾

Otra aplicación del plasma es el llamado plasmagel. Este se obtiene del plasma pobre en plaquetas y se utiliza para rellenos. Para su preparación se carga previamente la jeringa con ácido ascórbico 100 mg/ml, a razón de 1 ml por cada 5 ml de sangre que se va a extraer, mezclándose en la jeringa. Después la sangre sin anticoagulante se centrifuga (1800 r/min-1, 8 min). El PRP se carga en jeringuillas de 1 ml y se introduce en agua a 95 °C -98°C durante 3 min, con lo cual el plasma se gelifica por desnaturalización de las proteínas y ese es el material que se utiliza para los rellenos faciales. Se debe prestar especial atención a la desnaturalización de las proteínas, para lograr la formación de un gel con una viscosidad tal que facilite su inyección. Las infiltraciones se hacen por lo general con una jeringuilla de 1 ml y aguja de 27 G. Este procedimiento mantiene su efecto relleno de 3 a 4 meses. ⁽³⁵⁾

En un estudio realizado por Valacchi. G y Bocci. V., se utilizaron dos anticoagulantes como heparina (30 UI / ml de sangre) normalmente utilizados para propósitos terapéuticos (calciparina) y ACD (ácido cítrico, citrato de Na, glucosa). ⁽³⁶⁾

La sangre fue centrifugada a 200 g durante 20 minutos y las plaquetas fueron medidas por medio de un contador Coulter y se utilizó un rango de 3×10^8 / ml plasma. Se utilizaron 3 concentraciones de O₃ (20, 40 y 80 µg / ml de PRP) e inmediatamente se introdujo en la jeringa que contenía en PRP por medio de un conector en γ. La presión del gas final se mantuvo en la presión atmosférica normal. ⁽³⁶⁾

El PRP se mezcló con el ozono por medio de una agitación leve durante 30 segundos.

3.1.5.2 Propiedades y Mecanismo de Acción del PRP ⁽³⁷⁾

Los concentrados de PRP han sido ampliamente utilizados en la última década como complemento en las técnicas de regeneración de los tejidos, los autores que han empleado clínicamente el PRP aseguran que no hay riesgo de infección o transmisión de enfermedades y niegan la existencia de algún tipo de efecto indeseable. El plasma rico en plaquetas (PRP) es una preparación de sangre total que contiene varios factores de crecimiento importantes en la proliferación y diferenciación celular, la angiogénesis, y en la síntesis y deposición de matriz extracelular.

Las plaquetas son pequeños fragmentos citoplásmicos anucleadas, discoides derivadas de megacariocitos de la médula ósea. Tienen 5-7 µm de diámetro y 3 µm ancho, los cuales contienen varias proteínas citoplásmicas, las citocinas y factores bioactivos que están implicadas en la regulación de los aspectos básicos de la reparación de tejidos y la coagulación de la sangre.

El PRP es un concentrado de plaquetas y factores de crecimiento que incluye: el factor transformante beta (TGF-β), factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) y el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) entre otros. El Plasma Rico en Plaquetas (PRP) se define como la porción de la fracción de plasma de sangre autóloga que tiene una concentración de plaquetas superior al valor basal. El PRP no solo contiene plaquetas, sino que además está formado por: plasma, eritrocitos, leucocitos, células mesenquimales circulantes, factores de crecimiento, proteínas séricas como el fibrinógeno, fibrina, vitronectina y trombospondina, que intervienen en el proceso de curación y todos los componentes de la cascada de coagulación.

Sin embargo, el componente que motiva más el interés son los factores de crecimiento plaquetarios contenidos en los gránulos α y que se liberan durante el proceso de activación plaquetaria. Se ha constatado que posee efectos antiinflamatorios y que tiene efectos beneficiosos en la aceleración de los procesos de cicatrización cutánea y de tejidos blandos.

Las características fundamentales del PRP como vehículo terapéutico son:

- ~ Es rico en factores de crecimiento y contiene proteínas biológicamente activas.
- ~ Posibilita la acción conjunta de varios factores de crecimiento al mismo tiempo.
- ~ Incrementa la vascularización de los tejidos a través de la estimulación de la angiogénesis.
- ~ Proporciona un inmediato agente hemostático biocompatible, efectivo y seguro, que es absorbido por el cuerpo iniciando una regeneración local.
- ~ Estimula la quimiotaxis, diferenciación y multiplicación de múltiples linajes celulares, la síntesis de la matriz extra celular y ácido hialurónico.
- ~ Acelera la regeneración de tejidos blandos, e inicia la cascada de osteogénesis y la reparación de tejidos estimulando la epitelización.
- ~ Es atóxico e inmunorreactivo.

El PRP se obtiene de sangre no coagulada, debido a que las plaquetas son parte del coágulo y no han sido activadas y degranuladas, se puede obtener básicamente por tres técnicas: *Tubo (manual)*, *Centrifugado (semiautomático)* y *Aféresis (automático)*, en estos procedimientos varían el costo, la facilidad de preparación, el volumen de sangre requerido y la concentración de plaquetas obtenidas.

En el primer método, los costos son mínimos, la cantidad utilizada es pequeña y el PRP se obtiene fácilmente, pero con baja concentración de plaquetas. Los costos de centrifugación son bajos, pero es necesario adquirir una centrífuga, el volumen requerido es pequeño y también es fácil de obtener y se obtiene una mayor concentración de plaquetas. El último método es costoso, porque se requiere un equipo y diferentes "kits", el volumen específico de sangre requerido es grande, pero de igual forma se obtiene altas concentraciones de plaquetas y obtiene un mayor volumen de PRP.

El PRP está indicado en aquellas situaciones en que se precise estimular la regeneración celular, sobre todo cuando existe degeneración de partes blandas: tendinitis degenerativas, degeneración discal, fascitis, degeneración del cartílago, condropatías, osteocondritis y artrosis, lesiones de ligamentos de la rodilla u otras articulaciones, lesiones musculares y tendinosas, consolidación ósea, implantación de prótesis articulares, cicatrización de úlceras y heridas, regeneración cutánea, úlceras de decúbito, retardos de cicatrización, medicina estética entre otros.

3.1.5.2.1 Factores de Crecimiento

Los factores de crecimiento son polipéptidos contenidos en diferentes tipos celulares y en la matriz extracelular, que juegan un papel fundamental en la estimulación y la regularización de la curación de heridas en diferentes tejidos del organismo. Estos factores de crecimiento estimularán receptores de la membrana celular de las células de los tejidos dañados sin entrar en ellas, provocando reacciones químicas en los neurotransmisores encargados de regular los procesos de reproducción y crecimiento celular favoreciendo la proliferación, migración y diferenciación celular y de esta manera quedará reproducido el proceso fisiológico de reparación tisular.

De todos los factores de crecimiento liberados por las plaquetas, los que se encuentran en mayor concentración y cuya estructura y función ha sido ampliamente estudiada son el factor transformante beta (TGF- β), factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) y el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), los cuales son directamente responsables de la regulación de procesos celulares tales como la diferenciación, mitogénesis y la quimiotaxis, funciones biológicas claves en los mecanismos de la reparación de tejidos.

PDGF: promueve indirectamente la angiogénesis a través de los macrófagos, por un mecanismo de quimiotaxis. Es activador de macrófagos, mitógeno de las células endoteliales y facilita la formación de colágeno tipo I. El 50% del efecto mitogénico proviene de las plaquetas. Es producido por las plaquetas principalmente, macrófagos, osteoblastos en su isoforma BB, condrocitos, fibroblastos y células endoteliales.

TGF-beta: se encuentra involucrado en la quimiotaxis, en la proliferación y diferenciación de las células mesenquimales, ayuda en la síntesis del colágeno por los osteoblastos, es proangiogénesis, inhibe la formación de osteoclastos y la proliferación de las células epiteliales en presencia de otros factores. Tiene efecto mitogénico en las células mesenquimales e inhibe la proliferación en las células epiteliales dependiendo de la presencia de otros factores de crecimiento. Entre las células que lo producen están las plaquetas, macrófagos, linfocitos, neutrófilos, células mesenquimales, osteoblastos y matriz ósea.

FGF: coopera en la proliferación y diferenciación de los osteoblastos, también en la proliferación de fibroblastos e inducción de la secreción de fibronectina por estos, proangiogénesis por acción quimiotáctica sobre células endoteliales e inhiben los osteoclastos. Producido principalmente por los fibroblastos, macrófagos, osteoblastos, plaquetas y células endoteliales.

IGF: ayuda en la síntesis de osteocalcina, fosfatasa alcalina y colágeno I por los osteoblastos, igualmente en la proliferación y diferenciación de células mesenquimales y de revestimiento. Proviene de las plaquetas, macrófagos, osteoblastos, células mesenquimales y la matriz ósea.

VEGF: involucrado en la quimiotaxis y proliferación de células endoteliales y la hiperpermeabilidad de los vasos sanguíneos. Entre las células que lo producen están las plaquetas, los macrófagos, los osteoblastos y las células musculares lisas, sobre todo en caso de hipoxia.

EGF: es mitógeno, proapoptótico, favorece la quimiotaxis y diferenciación de células epiteliales, renales, gliales y fibroblastos a partir de las células mesenquimales. Es producido por las plaquetas en su mayoría, los fibroblastos y las células endoteliales.

El mecanismo fundamental de liberación de factores de crecimiento por los concentrados plaquetarios es de difusión, y se basa en los gradientes de concentración de los distintos factores en un momento específico de la cicatrización.

3.2 MECANISMO DE ACCIÓN DEL OZONO

El principio básico de la ozonoterapia es elevar el potencial oxidativo de la sangre y aumentar la capacidad de la hemoglobina para transportar oxígeno, debido a que el ozono es un potente oxidante, es decir, cede electrones en forma de oxígeno a otras moléculas más reducidas, al mismo tiempo, incrementa la concentración de oxígeno en el plasma, lo que permite que la sangre esté más oxigenada, produciendo una superoxia, y cediendo más oxígeno a los tejidos. ^(4, 11, 12)

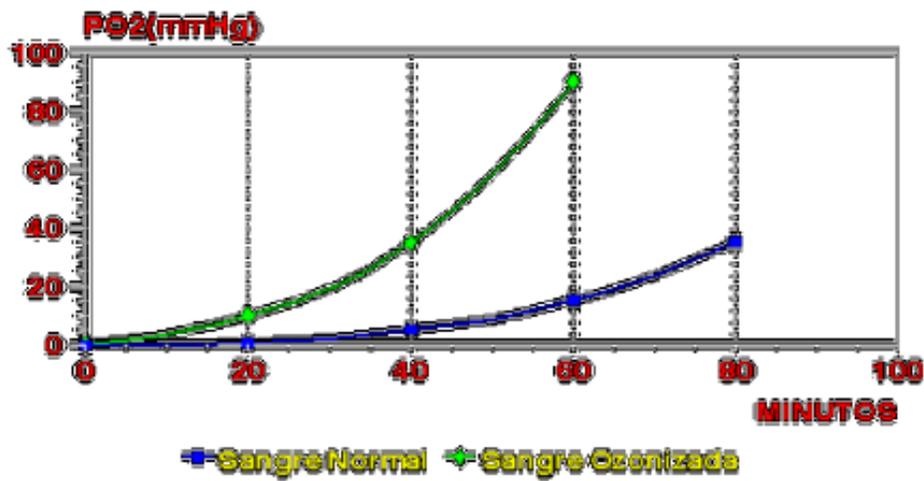
El ozono es uno de los oxidantes más potentes, por esta razón, es necesario conocer cuál es el coeficiente terapéutico, distinguiendo y/o diferenciando la dosis terapéutica de la tóxica.

El ozono, como cualquier otro gas, se disuelve en el agua, ya sea del plasma, o en los fluidos extracelulares, o en la capa de agua que cubre la piel y particularmente las mucosas de las vías respiratorias, intestino, vagina, entre otras, pero a diferencia del oxígeno, no se equilibra con el ozono restante que está en la fase de gas, esto sucede porque el ozono, es un potente oxidante que reacciona inmediatamente con moléculas presentes en los fluidos biológicos; antioxidantes, proteínas, carbohidratos y ácidos grasos poliinsaturados. ^(3, 10)

Los metabolitos del ozono producidos por la interacción con las membranas celulares son capaces de penetrarlas y allí estimular varios procesos bioquímicos básicos, uno de sus efectos es incrementar la producción de 2,3 DPG (ácido 2,3 bisfosfoglicérico), el cual se sabe que facilita la liberación de oxígeno en los tejidos a partir de la oxihemoglobina, de esta manera los glóbulos rojos cuando pasan a través de los micro capilares de los tejidos de la sección arterial a la venosa, tienen una capacidad superior para transferir más oxígeno al tejido circundante, facilitando el aporte en los momentos de máximo esfuerzo deportivo. ^{(4,}

¹²⁾

ABSORCION DE OXIGENO AUMENTO EN GLOB. ROJOS



PARAMETROS	ANTES	CON O ₂	CON O ₃ / O ₂
PO ₂ (mm Hg)	41 ± 1	73 ± 2	100 ± 2
(% AUMENTO)	-	78	143
SATURACION DE HB	60 ± 1	86 ± 2	93 ± 3
No. DE MUESTRAS	5	5	5

Figura 4. Obsérvese el incremento de la oxigenación de la sangre, valores de la presión parcial de oxígeno (PO₂) y saturación de la hemoglobina antes y después de la administración de la ozonoterapia. Tomado de Liñeiro. J. 2014

Este efecto en la activación de la microcirculación por parte del 2,3 DPG, es de gran beneficio en una enfermedad circulatoria, en donde la aglutinación de células rojas obstaculiza el flujo sanguíneo a través de los capilares pequeños y disminuye la captación de oxígeno a través de las células rojas, por la reducción de su superficie de área, aquí, el ozono reduce y elimina la aglutinación y recupera la flexibilidad del eritrocito, mejorando la viscosidad de la sangre, incrementando la capacidad de conducción del oxígeno y su disponibilidad a los diferentes tejidos. ^(7, 12)

La prostaciclina, uno de los miembros de la familia de moléculas lipídicas conocidas como eicosanoides, también es producida por el ozono, actuando principalmente como

vasodilatador arterial y en la prevención de la agregación plaquetaria, en relación con la coagulación de la sangre. ^(11, 12)

Algunos estudios realizados en caballos de deporte han demostrado que también disminuye la producción de ácido láctico incrementando así el rendimiento de estos animales. ⁽⁴⁾

La reacción del ozono con tantas moléculas implica dos procesos fundamentales:

- ~ En la reacción inicial del ozono se genera oxígeno reactivo que desencadena varias reacciones bioquímicas y los ROS (especies reactivas de oxígeno) se neutralizan de 0,5 – 1 minuto por el sistema antioxidante. Es una reacción a corto plazo.
- ~ La segunda reacción, es conocida como la peroxidación de lípidos en el entorno de plasma hidrófilo, un mol de una olefina y un mol de ozono dan lugar a dos moles de aldehídos (LOPS) y un mol de peróxido de hidrógeno (ROS), esta reacción es completada en cuestión de segundos.

Es una reacción a largo plazo ya que a partir de ahora los ROS y LOPS son los causantes de las diferentes reacciones bioquímicas por todo el cuerpo, y por tanto los responsables de los efectos biológicos y terapéuticos, por lo que esto aclara que mínimas dosis de ozono pueden ser inefectivas o equivalentes a placebo. ⁽¹⁰⁾

Los ROS se producen a corto plazo cuando el ozono está presente provocando efectos rápidos en la sangre, por el contrario, los LOPS que se producen al mismo tiempo pero con una vida media más larga permite que la reinfusión de sangre ozonizada llegue a todos los órganos del paciente y se desencadenen los efectos deseados. ^(3, 12)

La acción del ozono se explica en el hecho de que, tras ser liberado por la hemoglobina en los tejidos, provoca la aparición de metabolitos procedentes de la ruptura de cadenas de los ácidos grasos insaturados que son capaces de penetrar las membranas celulares. La llegada de tales moléculas en esta fase produce la activación de la glutatión peroxidasa, que las

reduce a alcoholes, a expensas del glutatión reducido (GSH), el cual es, a su vez, es oxidado a glutatión disulfuro (GSSG).^(3, 4)

Para neutralizar el estrés oxidativo, la relación GSH/GSSG en el citoplasma se mantiene por la glutatión reductasa activada, acoplada con el sistema NADPH/NADP, así, ocurre proporcionalmente un aumento correspondiente de la producción de NADPH, acelerándose de este modo la producción de ATP, causando un incremento de la disponibilidad de energía para las células.^(4, 12)

El ozono afecta también diferentes metabolismos, en especial al metabolismo glucídico, donde mediado por coenzimas, acelera la glucólisis anaeróbica resultando en aumento del ATP.^(11, 12)

Cuando el ozono es introducido en el cuerpo, este se destruye en radicales libres llamados peróxidos, lo cual tiene efectos beneficiosos, porque ellos son atraídos hacia las células débiles o enfermas y reaccionan con los lípidos dentro de la membrana celular.

En las células con pared celular intacta las enzimas previenen la penetración de estos peróxidos, por lo que se unen selectivamente solo a aquellas células que contienen parásitos, virus, o que están enfermas de cáncer o con toxinas.^(6, 7)

El ozono inhibe el metabolismo celular cancerígeno, oxidando la capa lipídica externa en las células cancerígenas, destruyéndolas.⁽⁷⁾

La administración adecuada de ozono medico causa un incremento en la producción de interferón e interleuquinas, lo cual desencadena la cascada de las reacciones inmunológicas.⁽⁷⁾

3.3 USOS CLÍNICOS DEL OZONO

El ozono se utiliza en alteraciones de origen inflamatorio, compromisos circulatorios, infecciones, dolores musculoesqueléticos, trastornos circulatorios y alteraciones inmunológicas. ⁽¹⁶⁾

Como se menciona con anterioridad, sus mecanismos de acción, están relacionados a una modificación de las propiedades reológicas de la sangre y un mejoramiento del transporte del oxígeno, activación del ciclo respiratorio y la vía de la glicólisis, activando o estimulando los sistemas enzimáticos anti radicales libres como son el sistema glutatión catalasa y superóxido dismutasa, aumentando la producción de citoquinas anti inflamatorias como la interleuquina, el factor de necrosis tumoral, interferón gamma y linfocitos CD4. ^(4, 11, 12, 16)

La alta capacidad energética del ozono, lo hace muy inestable, lo cual le permite reaccionar con todos los compuestos que tengan en su estructura dobles ácidos de carbono (estructura que forma parte de todas las membranas celulares), por lo tanto su acción directa es letal para cualquier célula que esté desprovista de mecanismos antioxidantes como los gérmenes y también aquellas que tengan los sistemas antioxidantes deprimidos, como le sucede a las células neoplásicas. ^(13, 14, 16)

El ozono actúa como un excelente agente antimicrobiano debido a su elevado poder oxidante, especialmente a nivel sistémico, pues es capaz de inhibir y destruir microorganismos patógenos como bacterias anaerobias, virus, algas, hongos y protozoos.

El ozono ha mostrado destruir la capa externa de la mayoría de los microorganismos, a través de la penetración de la membrana celular y la alteración del DNA.

Las células de los organismos más sofisticados como las células humanas tienen enzimas que pueden reestabilizar la disrupción del DNA, pero los organismos primitivos no tienen esta capacidad protectora, siendo este, otro mecanismo por el cual el ozono actúa selectivamente sobre los microorganismos causantes de enfermedad y no sobre las células sanas. ⁽¹⁶⁾

Algunos microorganismos son mucho más resistentes que otros y requerirán mayor tratamiento. Los virus como herpes e influenza, contienen lípidos en su membrana, lo cual los hace más sensibles a la desactivación por el ozono.

La aniquilación de la población viral, tal como sucede en la desinfección de una herida, no se desprende del mismo principio. Se presume que la destrucción viral puede deberse a dos procesos sincrónicos, a saber: ⁽¹⁵⁾

- ~ A una inactivación del virus por medio del ozono, o mejor, por medio de los peróxidos del ozono.
- ~ A una intolerancia a los peróxidos por parte de las células viralmente infectadas.

Por otra parte, ambos factores se deben a la capacidad de reacción del ozono y por consiguiente a la estructura de la molécula misma. La reacción más importante en la sangre, reacción que se lleva a cabo a una velocidad inconmensurable, sucede con los ácidos grasos no saturados.

Si se observa el ciclo de reproducción de un virus, se ve que la intervención del ozono o mejor dicho de sus peróxidos se lleva a cabo en los llamados “spikes” del virión libre, con lo cual se interrumpe y se detiene el contacto virus – célula. Estos últimos, en forma de ácido N-acetilglucosaminico, reaccionan químicamente bajo condensación con las respectivas sustancias receptoras, a través de esta reacción química hacen posible la penetración del virus a la célula anfitriona.

El par de electrones libres en el nitrógeno de la acetilglucosamina representan presumiblemente el punto de ataque para la molécula electrofílica del ozono, o en otras palabras, para sus peróxidos. Es así como el virus queda bloqueado para realizar reacciones posteriores y se lleva a su inactivación.

Adicionalmente, la reacción electrófila del ozono también puede llevarse a cabo con los ácidos grasos no saturados de los componentes de la célula corporal infectada y así represar peróxidos en la célula misma.

Esta célula infectada, como reacción de defensa, produce peróxido de hidrógeno (H_2O_2) llevando a una situación en la que ya no se toleran más peróxidos por peligro de que la célula llegue a reventarse antes de que se cierre el ciclo de reproducción de los virus. Por otra parte, los peróxidos expresados actúan en forma sinérgica con aquellos formados a nivel intercelular y destruyen conjuntamente los microorganismos que lograron penetrar en la célula. ^(3, 6, 8, 13, 14)

La ozonoterapia ha sido el tratamiento de elección para revertir los síntomas clínicos de la AIE, así como también revertir los resultados del Test de Coggins. También la ozonoterapia es usada para tratar la Fiebre Equina de Potomac. ⁽⁷⁾

Gracias al efecto del ozono que permite el incremento en el metabolismo de las células rojas (2,3 DPG), resultando en una mayor oxigenación tisular, cualquier enfermedad con compromiso circulatorio se encuentra indicada para el tratamiento con ozono, ya que éste, reduce y elimina la aglutinación celular y recupera la flexibilidad del eritrocito, por consiguiente disminuye la viscosidad de la sangre e incrementa la capacidad de conducción y distribución del oxígeno a los tejidos afectados. ^(11, 13, 14, 16)

Como ya se sabe las láminas del casco tienen bajo nivel antioxidante por lo que éste, es un órgano diana para la endotoxemia en equinos. En laminitis aguda la autohemoterapia está contraindicada, ya que lo que se busca es generar una vasoconstricción antes de la instauración de los síntomas.

Por el contrario, una vez instaurado los síntomas, en laminitis crónicas, la autohemoterapia con ozono, fomenta la liberación de citoquinas antiinflamatorias y mejora la perfusión y regeneración tisular con la liberación de NO, logrando un efecto vasodilatador inmediato, mejorando la capacidad del eritrocito y liberación de factores del crecimiento por activación de las plaquetas. ^(3, 4)

En la siguiente tabla, se muestran algunas de las patologías en donde se recomienda el uso de la ozonoterapia.

PATOLOGÍAS	
Compromisos Vasculares	

Gastrointestinales	Colon espasmódico, Síndrome de isquemia – reperusión, gastritis, colitis
Oftalmológicas	Neuritis óptica
Dermatológicas	Dermatitis
Músculo Esqueléticas	Enfermedades degenerativas articulares, tendinosas y ligamentosas, fracturas, traumas,
Metabólicas	Rabdomiolisis, azoturia
Oncológicas	Sarcoides
Respiratorias	Bronquitis, EIPH, influenza, arteritis viral equina, rinoneumonitis

Tabla 1. Diferentes patologías en las que se indica el uso de la terapia con ozono. Tomado de Liñeiro. J. 2014

La actuación sobre el proceso metabólico del ozono en el caballo da lugar a una mayor disponibilidad de energía para las células en forma de ATP y, por lo tanto, una mayor disponibilidad energética de los tejidos musculares del caballo.

3.4 VÍAS DE ADMINISTRACIÓN DEL OZONO

3.4.1 Autohemoterapia Mayor y Menor

La autohemoterapia representa la técnica clásica en los métodos de ozonización de la sangre. La autohemoterapia mayor y menor, hace referencia únicamente a la cantidad de sangre utilizada, ya sea en mayor o en menor volumen respectivamente, sin embargo, la vía de administración es diferente en ambas técnicas, endovenosa en la autohemoterapia mayor e intra muscular en la autohemoterapia menor. ^(10, 19, 20, 21, 22)

El ozono se disuelve muy rápido en el plasma e inmediatamente reacciona con anti oxidantes hidrosolubles como el ácido ascórbico, ácido úrico, glutatión reductasa, y con los ácidos grasos poliinsaturados, principalmente el omega 6 unido a la albúmina. ⁽¹⁰⁾

La autohemoterapia mayor ha probado ser de gran utilidad en afecciones vasculares complicadas con procesos isquémicos, debido al mejoramiento en la vasodilatación de las zonas isquémicas y a un mayor suministro de sangre oxigenada. ⁽¹⁰⁾

3.4.2 *Administración endovenosa de Solución Salina Fisiológica Ozonizada*

En 1994, se demostró que la ozonización de solución salina fisiológica (NaCl 0,9%) con diferentes concentraciones de ozono, inducen la formación de peróxido de hidrógeno y otros radicales libres. ⁽¹⁰⁾

En un estudio realizado en humanos, se comprobó que la infusión de solución salina ozonizada, genera un dolor considerable en la vía venosa de infusión, posterior a las 24 horas de realizada, lo cual indica que la solución genera irritación en el endotelio vascular con el riesgo subsecuente de flebitis y la formación transitoria de HOCL (ácido hipocloroso), el cual es un agente nocivo, ya que genera inflamación del endotelio y activación plaquetaria, lo cual induce a la micro coagulación. ⁽¹⁰⁾

3.4.3 *Exposición de la zona afectada al ozono* ⁽¹⁰⁾

Se han realizado diferentes estudios en tratamientos de infecciones localizadas y úlceras crónicas en la piel, exponiéndolas a oxígeno / ozono en un área húmeda, totalmente encerrada y /o hermética, utilizando bolsas de polietileno.

Generalmente las concentraciones de ozono utilizadas en estos procedimientos, son elevadas (70 ug / ml), debido a que son necesarias, para la resolución de infecciones de curso crónico y debido a que a una temperatura de 30 °C, el ozono se descompone rápidamente. ^(10, 19, 20, 21, 22)

A medida que se observa un grado de mejoría en las lesiones y la infección se logra controlar y atenuar, se utilizan concentraciones menores de ozono, para favorecer la proliferación celular y resolución de la herida.

No se ha observado ningún daño en el tejido adyacente, por lo que se recomienda el uso del ozono en patologías que afecten la piel.

3.4.4 *Administración Subcutánea de Ozono* ⁽¹⁰⁾

La mezcla de oxígeno / ozono colectado en una jeringa de material ozono resistente, puede ser inyectada en varios compartimientos del organismo, un ejemplo de esto es la vía subcutánea, en donde se pueden administrar volúmenes de 1 – 2 ml, con una concentración de ozono de 2 – 3 ug / ml. Es una vía segura, efectiva y atóxica.

3.4.5 *Administración Intramuscular de Ozono*

La vía intramuscular no se usa como sustituto de la autohemoterapia debido a la alta cantidad de ozono que es requerida, lo cual se torna peligrosa por su toxicidad y por otra parte, genera gran dolor en su administración. ⁽¹⁰⁾

Sin embargo, estudios realizados en humanos, demuestran la efectividad de la aplicación intramuscular en el músculo paravertebral para el tratamiento de hernias discales, con 10 – 20 ml de ozono, siendo definida como una “acupuntura química”, la cual aumenta el umbral del dolor con la secuencia de varias aplicaciones. ^(10, 19, 20, 21, 22)

Se cree que la efectividad de esta vía se basa en la teoría de que el ozono infiltrado en el músculo genera burbujas de gas posterior a 24 horas (oxígeno residual), el cual se moviliza al canal vertebral, pudiéndose visualizar y confirmar radiológicamente. Se ha postulado que el ozono actúa directamente en el sitio de la hernia, generando una lisis de la misma. ⁽¹⁹⁾

Otra teoría, se basa en la idea en que el ozono al ser soluble en agua, se disuelve rápidamente en el líquido intersticial del músculo aproximadamente en 20 – 40 segundos, lo cual genera la formación de ROS y LOPS capaces de inhibir la función de las fibras amielínicas, permitiendo un aumento en el umbral del dolor y mejorando la respuesta antiálgica. Este es el motivo por el cual, tanto la introducción de la aguja como del gas, es considerado como una acupuntura química. ^(10, 19)

En conclusión, los mecanismos que juegan un papel importante son: ^(10, 19, 20, 21, 22)

- Liberación de endorfinas y endocannabinoides que bloquean la transmisión de la señal nociva al tálamo y la corteza.
- Hipo estimulación vinculada a la oxidación degenerativa de los nociceptores por medio de los ROS y LOPS, los cuales actúan como la capsaicina.
- La analgesia y la oxigenación localizada son los mecanismos de mayor importancia, gracias a que permiten la relajación muscular y la vasodilatación, llevando a la reactivación del metabolismo muscular, favoreciendo la oxidación del lactato, la neutralización de la acidosis, el incremento en la síntesis del ATP, la recaptación de Ca y la absorción de edemas.

3.4.6 *Administración Intraperitoneal de Ozono* ^(7, 10)

En un estudio realizado en ratas y carneros para tratar los reservorios del virus de la hepatitis B (HVB) se utilizó el ozono vía intraperitoneal. Se realizó la evaluación clínica de ambos animales, así como también el estudio por microscopio óptico del hígado y pulmones. Ningún efecto indeseable fue encontrado en estos animales. La morfología microscópica estudiada no evidencia ninguna alteración. Los efectos tóxicos del ozono clínicos y microscópicos fueron corroborados cuando se aplicaron pequeñas dosis a través del tracto respiratorio. Se concluye que el ozono aplicado por vía intraperitoneal es inocuo para dichas especies. ^(7, 10, 19, 20, 21, 22)

Los diferentes órganos estudiados: corazón, hígado, Pulmón, riñones y bazo no presentaron lesiones obvias en su estructura y ultra estructura después de la aplicación de ozono intraperitoneal.

3.4.7 *Administración Transrectal de Ozono* ⁽⁷⁾

Ejerce un efecto protector sobre el endotelio vascular, el efecto de la mezcla de ozono y oxígeno a dosis 0.25 y 1 mg a través del recto fue estudiado en dos modelos de inducción de daño vascular por citrato trisódico e hipertensión arterial en ratas. Los resultados obtenidos muestran que el ozono ejerce un efecto protector sobre el endotelio vascular en ratas en las dosis y la vía de administración aplicada.

La insuflación rectal de ozono es potente frente al tratamiento de enfermedades infecciosas o no infecciosas del tracto digestivo. El ozono es efectivo reduciendo parásitos gastrointestinales, virus, y ritckettsias, bacterias, protozoos y hongos. También es efectivo en diarrea y en enfermedad inflamatoria intestinal de los caballos.

3.4.8 *Administración Intravaginal de Ozono*

Las insuflaciones intravaginales de ozono son efectivas para Candidiasis y para metritis contagiosa equina.

3.4.9 *Administración Intramamario de Ozono*

La aplicación de ozono en lugar de antibióticos es efectiva para mastitis en animales grandes, por ejemplo en mastitis en hembras causada por *Streptococcus zooepidemicus*, *S. equi*, *S. equisimilis*, *S. agalactiae* y *S. viridans*.

3.4.10 *Administración Intra-articular de Ozono*

Es efectivo para la Artritis séptica, el efecto terapéutico positivo del ozono médico intraarticular es a largo plazo, la mayoría de estudios al respecto recomiendan repetir el ciclo 6 meses después, ya que aproximadamente un 6 % pueden recidivar después de este tiempo, su efecto terapéutico prolongado se debe a que este gas actúa en forma fisiológica regulando entre otras acciones, el metabolismo celular y la oxigenación tisular y evita los cambios degenerativos del cartílago articular, también ha sido demostrado que el ozono

intraarticular disminuye la síntesis de IL – 8, reduce la cantidad de granulocitos y de otras células inflamatorias. ^(23, 24)

4. AUTOHEMOTERAPIA MAYOR OZONIZADA

Durante los últimos 10 años, la Autohemoterapia mayor (MAH) se ha convertido en la forma más importante de aplicación sistémica de ozono de bajo riesgo. La reacción de ozono / sangre tiene lugar fuera del cuerpo del paciente, después de lo cual su propia sangre es re aplicada con las células rojas de la sangre activadas y sus células inmuno competentes activadas de igual manera. ^(17, 25, 26, 28)

Por principio, sólo material estéril y desechable puede utilizarse en esta forma de tratamiento, el cual debe realizarse en un sistema cerrado, libre de presión: son extraídos de 50 a 100 ml de sangre en humanos y de 100 a 400 ml en equinos, la cual es enriquecida con una dosificación exacta de ozono fuera del organismo. ^(17, 25, 26, 28)

4.1 Asepsia e higiene ^(25, 26,)

La Autohemoterapia mayor con ozono se lleva a cabo en un sistema cerrado y libre de presión de acuerdo a los lineamientos de higiene (Instituto para la Higiene de la Universidad de Giessen, Alemania)

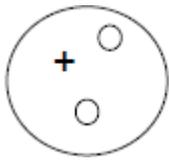
4.1.1 Material Requerido

- Botella de vacío Ozonosan de 250 ml. Con sistema de micro burbujas.
- Equipo de transfusión.

- Set de perfusión de 1.1 para extraer la sangre.

- Un tubo de perfusión de ozono “Anti gérmenes” con filtro bacterial y abrazadera de rodillo.
- Jeringa desechable “OZ55 “de 50 ml. (resistente al ozono, siliconizada).
- Parches adheribles para fijar (empaquetados individualmente).
- Almohadillas de algodón (estériles y en plásticos sellados), agentes de desinfección manuales más algodón absorbente estéril o gasas.
- Ampolleta de 10 ml. De citrato de sodio estéril, libre de pirógenos, sin agentes conservadores. Todos los artículos son desechables, estériles y libres de pirógenos.

4.1.2 Preparación de la botella de vacío Ozonosan.



Vista superior de la tapa de la botella al vacío.

- Remueva el tapón protector de la parte superior de la botella al vacío; el mejor método es empujar el tapón con ambos dedos pulgares, desinfecte la tapa de la botella de vacío usando desinfectantes para la piel enjuagando y frotando o rociándola (deje durante +1 minuto para lograr un mejor efecto) y permita que seque.
- Cierre el sistema anti gérmenes con la abrazadera y perfore la tapa en el punto marcado con un cruz (+).
- Cierre la abrazadera en el equipo de transfusión y perfore el tapón en el punto marcado con un círculo grande (o).

- Atraiga el citrato de sodio de la ampolleta de 10 ml. Con el equipo de transfusión y cierre la abrazadera.

- De acuerdo a las especificaciones, extraiga 50 ml de ozono del generador usando una jeringa desechable y conéctela al sistema “anti-gérmenes” en la parte superior de la botella.

Ahora diríjase al paciente con la botella de transfusión preparada en esta forma.

4.1.3 *Trabajando con el Paciente* ^(25, 26)

- Conecte el equipo de perfusión con el equipo de transfusión.

- Acceda a la vena del paciente, abra suavemente la abrazadera movible en la línea de transfusión y retire de 100 a 400 ml de sangre, con la previa desinfección de la zona.

- Poco antes de que se alcance la cantidad requerida de sangre, abra la abrazadera en el lado del Sistema “anti-gérmenes” que conduce a la jeringa llena con ozono. Entonces el vacío en la botella de infusión provoca que la mezcla gaseosa de oxígeno/ozono sea succionada de la jeringa. Cierre la abrazadera en la posición “anti-gérmenes” (la abrazadera en la línea de transfusión permanece abierta durante este período).

- Mueva suavemente la botella con un movimiento circular, provocando que el líquido se revuelva -¡NO LO AGITE!- Suspenda la botella en el gancho del tripié de transfusión, se debe abrir la abrazadera en la posición “anti gérmenes” (para permitir que entre el aire).

- Fije el goteo y reinyecte la sangre en el paciente.

La mezcla de ozono/oxígeno debe pasarse a través de la sangre homogéneamente en forma de burbujas extremadamente finas, ya que el ozono reacciona con ésta casi inmediatamente, el oxígeno de ésta se pierde y se vuelve a reunir sobre el líquido sin haber tenido influencia sobre la reacción o sobre sus productos.



Figuras 5 y 6. Materiales requeridos en la autohemoterapia mayor con ozono. Tomado de Delgado. M. 2013)

Entonces la sangre se administra de nuevo al paciente por medio de una infusión normal, es decir de 60 a 90 gotas por minuto aproximadamente, en un estudio realizado en equinos, se administro 3.2 ml / Kg / hr.

Al trabajar con ozono, además de ser un método higiénico y sin error, siempre se debe utilizar material especial resistente al ozono.

Las indicaciones más importantes para la Autohemoterapia mayor son: trastornos circulatorios arteriales, infecciones y enfermedades que se presenten en el contexto de inmuno-deficiencias, se ha utilizado en el mejoramiento del performance del equino, aunque es considerado como doping.

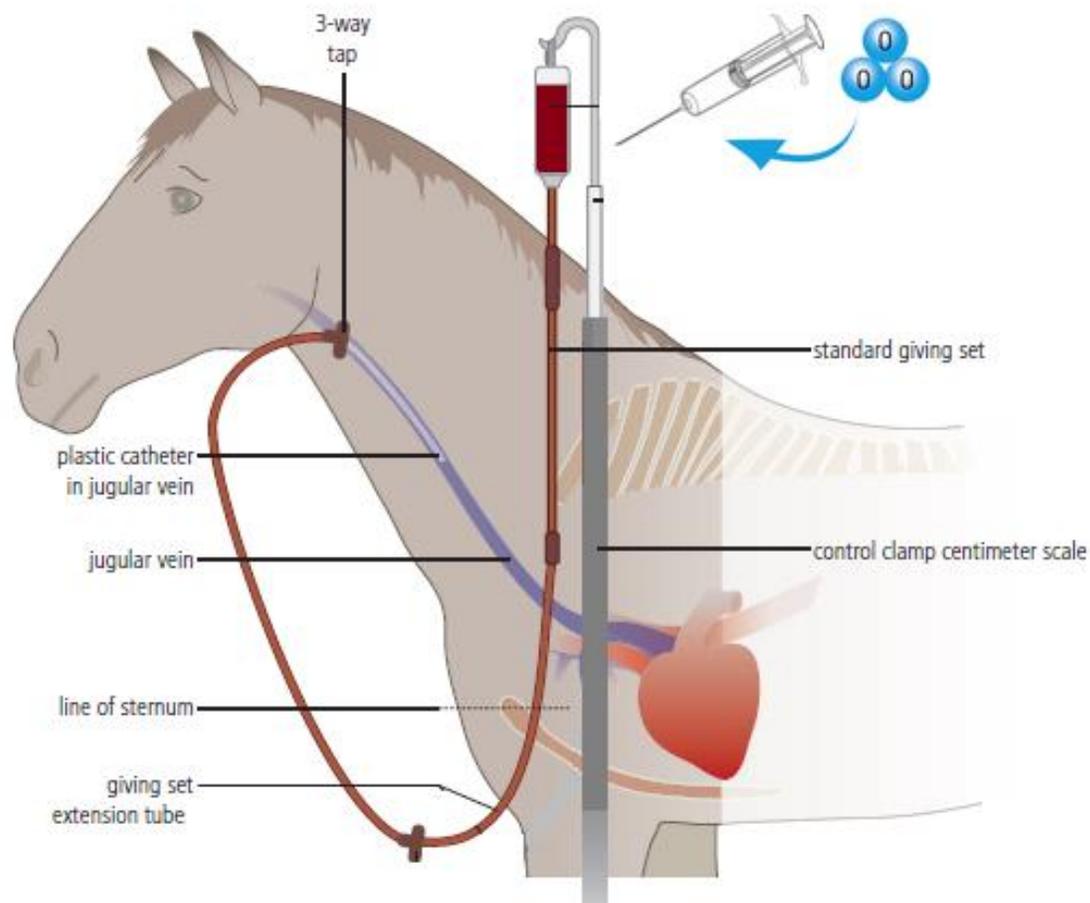


Figura 7. Autohemoterapia mayor con ozono en el equino. Tomado de Coumbe. K. 2012

El oxígeno ayuda a aumentar el área superficial de la sangre durante la reacción momentánea del ozono, acumulándose en la fase gaseosa de nuevo en el extremo superior de la botella sobre el líquido.

Se realiza entonces la reinfusión en el paciente.

El ozono se disuelve muy rápido en el plasma e inmediatamente reacciona con antioxidantes hidrosolubles como el ácido ascórbico, ácido úrico, glutatión reductasa, y con los ácidos grasos poliinsaturados, principalmente el omega 6 unido a la albúmina.⁽¹⁰⁾

Una vez el ozono entra en contacto con la sangre, se producen reacciones como:

5. REACCIONES INDUCIDAS POR LA AUTOHEMOTERAPIA MAYOR CON OZONO

5.1 Reacciones Iónicas y Radicales

De acuerdo a sus patrones de reacción el O_3 sufre cambios de acuerdo a mecanismos diferentes; en la presencia de los participantes de reacción orgánicos el ozono tiene un juego de reacciones marcadamente selectivas. En principio son posibles los mecanismos de reacción iónicos y radicales. Figura 8. (17, 25, 26, 28, 29)

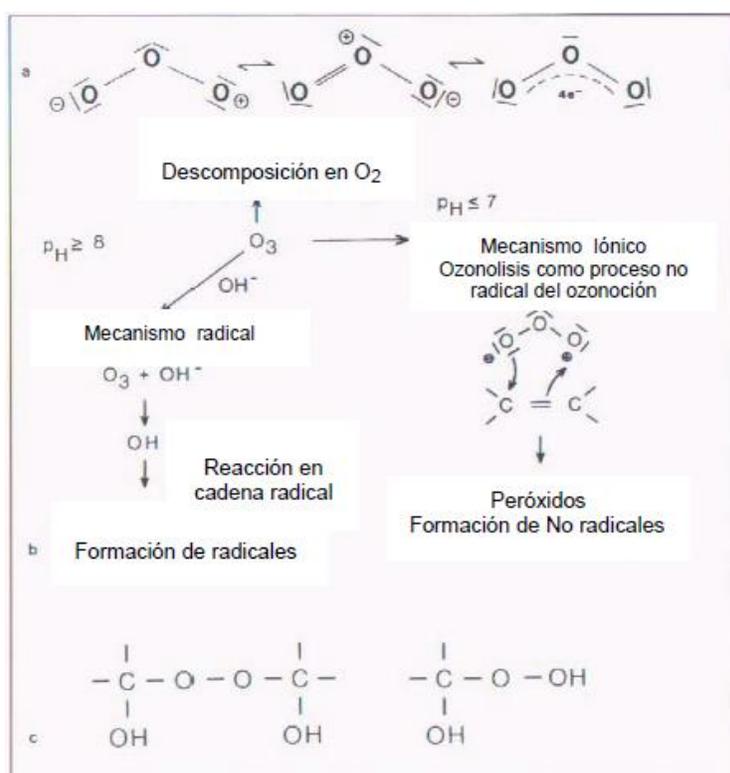


Figura 8. Estructura molecular y (a) mecanismos de reacción del ozono (b) característico del peróxido de ozono y productos resultantes de la ozonólisis (c). Tomado de Hansler. R. 2007

Los mecanismos de reacción iónicos y radicales generados son:

- ~ Descomposición del ozono en oxígeno molecular con valores de vida media dependientes del sistema ($2 O_3 \rightarrow 3 O_2$) en el estado gaseoso ($t_{1/2} = 55$ minutos en una jeringa desechable de 50 ml) o incluso en un medio acuoso, aunque con tiempos

de vida media considerablemente retrasados ($t_{1/2} = 10$ horas en agua bidestilada a $20^{\circ}\text{C}/69^{\circ}\text{F}$). ^(17, 25, 26, 28, 29)

- ~ En valores del $\text{pH} \leq 7.4$ es decir bajo condiciones fisiológicas, en la presencia de ácidos grasos no saturados (UFA) el inicio de la primera reacción se va a encontrar en una adición dipolar, resultante de los productos de secuela de peróxidos después del rompimiento del doble enlace de UFA (particularmente con un doble enlace aislado) por ejemplo los fosfolípidos de la membrana celular. ^(17, 25, 26, 28, 29)

- ~ En la presencia de los iones OH^- es decir preferiblemente en un medio alcalino con unos valores de $\text{pH} \geq 8$, se genera un número creciente de reacciones radicales, formando radicales OH y como consecuencia, reacciones en cadena de radicales.

De acuerdo a esto, en el caso de los valores del pH fisiológico, el mecanismo de reacción iónico es predominante, contribuyendo a no añadir radicales a los que ya están formados.

En forma correspondiente por ejemplo la Vitamina E no actúa como un antioxidante contra el ozono aunque este es exactamente el caso que ocurre con la vitamina C y con los antioxidantes enzimáticos que reaccionan tanto iónica como radicalmente. ^(28, 29)

En esta forma los hidroperóxidos como productos de reacción de ozonólisis en fosfolípidos de la membrana celular, son capaces de entrar al espacio intracelular al menos en parte para influenciar el metabolismo celular, lo cual puede seguirse, utilizando métodos de medición por ejemplo en el caso de las células rojas de la sangre en la forma de goteo en el GSH y en un incremento en el ATP y en 2,3 DPG, así como en las células inmuno competentes a través de la activación del factor nuclear NFkB, resultando en la inducción, y la liberación de citocinas. ^(26, 27, 28, 29)

5.2 Mecanismos de reacción en toda la sangre bajo condiciones fisiológicas

Como resultado de su conducta de reacción selectiva, la molécula de ozono tiene una reacción dominante bajo las condiciones fisiológicas en valores $\text{pH} \leq 7.4$ de acuerdo a la ozonólisis clásica. (17, 25, 26, 27, 28, 29)

Este proceso ozonolítico ocurre en fracciones de segundo; la cadena corta de hidroxihidroperóxido como se muestra en la figura 7, es típica y los productos reaccionan de preferencia en un medio acuoso.

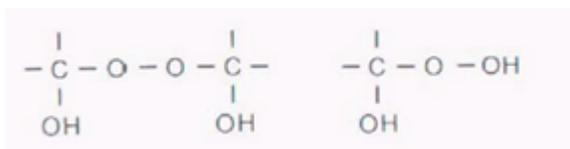


Figura 9. Cadena corta de hidroxihidroperóxido.

Tomado de Hansler. R. 2007

La figura 10, muestra el patrón de reacción para esos peróxidos hidrofílicos que se forman como productos de rompimiento de los ácidos grasos no saturados por vía de diferentes etapas intermedias.

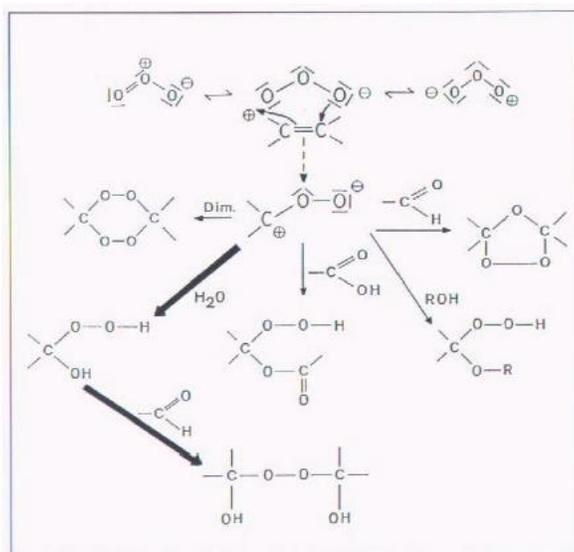


Figura 10.- Ozonólisis con resultado y productos intermedios. Tomado de Hansler. R. 2007

Entre los componentes celulares de la sangre, descubrimos que las células rojas de la sangre que forman su mayor parte y los ácidos grasos no saturados como constituyentes de la doble capa de fosfolípidos de la membrana celular, son los compañeros de reacción del ozono preferidos. Acompañados por una división de cadena, la ozonólisis entonces produce cadenas cortas de hidroxihidroperóxidos, influenciando así a la glicólisis de la RBC (células rojas de la sangre). (25, 26, 28,)

5.3 Peróxidos de ozono

En la aplicación sistémica del ozono, los peróxidos forman bajo la influencia del ozono médico lo que es llamado el “efecto del ozono en las células”. En las células rojas de la sangre, el sistema de protección oxidativa responde inmediatamente, lo cual puede verse como el primer factor limitante de dosis, de esta manera con el fin de activar las enzimas anti oxidativas, una concentración de ozono baja es necesaria. El rango de estimulación efectivo, se encuentra bajo los 80µg de ozono por mililitro de toda la sangre, aunque el que parece ser el nivel óptimo se alcanza entre los 20 y 60 ug por ml. (25, 26, 27, 28, 29)

Los peróxidos de algunos otros tipos se producen por ejemplo en lo que se conoce como auto oxidación de ácidos grasos en la forma de reacción en cadena radical. Figura 11.

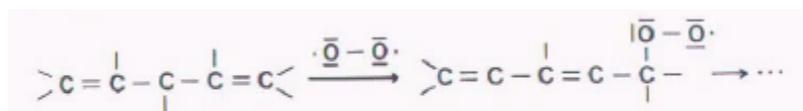


Figura 11. Auto oxidación de los ácidos grasos. Tomado de Hansler. R. 2007

El efecto y toxicidad de los peróxidos orgánicos dependen en gran medida de su propia estructura química.

En un estudio realizado por *Weitzel y otros*, los hidroxihidroperóxidos mostraron un efecto inhibitorio usando una investigación sistemática en el efecto de peróxidos orgánicos ascíticos en carcinoma de ratones. Se encontró que entre otros 50 peróxidos, el hidroxidimetilperóxido, posee un efecto de inhibición de crecimiento de 90% y por lo tanto era el peróxido más efectivo descubierto que tenga un efecto anti tumoral. ^(25, 26, 27, 28)

Como un ejemplo de un peróxido con un efecto carcinogénico posible podemos mencionar el benzoilperóxido (BPO), como una sustancia que es, dermatológicamente sin ningún interés. El BPO se desintegra fácilmente en dos radicales idénticos de benzoil y por esta razón se emplea en la química orgánica preparatoria como un iniciador radical. Los electrones libres que en esta forma de compuesto se estabilizan con el sistema aromático tienen una vida específica y establecen un gran número de procesos radicales. ^(25, 26, 27, 28)

Además de la estructura, la concentración tiene un papel decisivo: mientras que 20 mg (disueltos en acetona) administrados dos veces por semana en los ratones aceleran el crecimiento de los tumores de la piel inducidos químicamente, existe un 5% de atenuación en la forma de un ungüento que parecía no tener efecto exhibiendo en vez de esto una habilidad para proteger contra el cáncer de la piel inducido fotogénicamente. ^(25, 26, 27, 28)

5.4 Antioxidantes

Antioxidantes Enzimáticos

En las dosificaciones terapéuticas nosotros podemos contar con una activación de aquellas enzimas que están involucradas en las reacciones peroxídicas en el organismo, y que simultáneamente asumen una función protectora contra la secuela degenerativa sobre una sobreproducción de peróxidos y de radicales de oxígeno, como es el caso de las condiciones degenerativas y artríticas. ^(25, 26, 27, 28)

La superóxido dismutasa, es responsable del rompimiento de un exceso de radicales superóxidos, la catalasa para el peróxido de hidrógeno H_2O_2 formada como una secuela, y la glutatión peroxidasa para el rompimiento de los peróxidos orgánicos tales como por ejemplo los “peróxidos de ozono” así como el H_2O_2 . Figura 12

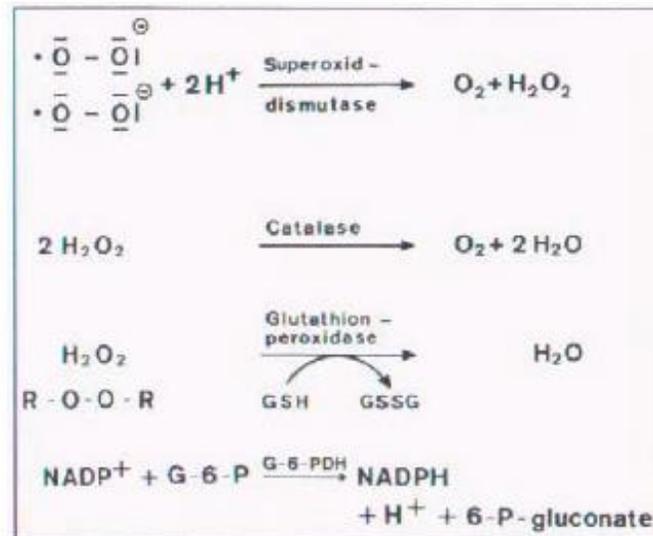


Figura 12. Antioxidantes enzimáticos del sistema biológico y sus funciones. Tomado de Hansler. R. 2007

No todos los antioxidantes son eliminadores de radicales libres al mismo tiempo, el sistema de glutatión por ejemplo es capaz de reaccionar tanto como un eliminador radical libre como un mecanismo de ión. (25, 26, 27, 28)

Además de las enzimas anti oxidativas, una enzima en las células rojas de la sangre es también activada, la cual pone en marcha su sistema de protección oxidativa, es decir, el patrón fosfato pentosa: *glucosa-6-fosfato deshidrogenasa*.

La activación de los antioxidantes enzimáticos a través de la Autohemoterapia mayor, permite obtener resultados interesantes: (25, 26, 27, 28, 29)

- ~ En los procesos inflamatorios crónicos, los radicales que se forman en exceso pueden ser rescatados.
- ~ En condiciones vasculares inflamatorias, cuya causa también puede atribuirse a un exceso de radicales libres, quizás se puedan ver favorablemente influenciados, además de procesos degenerativos, en los que el superóxido o los radicales OH obviamente tienen una parte causal.

Esto significa que existe una función decisiva en el mecanismo activo del ozono médico que se presenta además con el mejoramiento de la capacidad anti oxidativa de organismo.

5.5 Efectos protectores contra el daño por reperfusión

En estudios realizados por Bocci, Peralta y colaboradores, se ha demostrado una activación de antioxidantes inherentes y eliminación de radicales libres en el organismo. En estudios con animales, fueron capaces de demostrar que el ozono tiene un efecto protector contra el daño por reperfusión. Después de la diaria aplicación rectal del gas de ozono (insuflación) durante 10 días previos a la intervención el daño producido a través a través del síndrome de isquemia reperfusión, pudo ser prevenido en la mayor parte de las ratas. ^(25, 26, 27, 28)

En los animales pre-tratados con O₃, el incremento inducido en SOD provoca una protección contra los radicales libres, en particular con los radicales OH y superóxidos; en comparación con los animales no tratados la producción de H₂O₂ permanece dentro de los rangos normales. ^(25, 26, 27, 28, 29)

En los animales pre-tratados la glutatión reductasa permanece prácticamente sin cambios en comparación con el grupo central, mientras que el daño por reperfusión en los animales no tratados involucra un decremento de GHS de aproximadamente un 50% de forma que esa protección contra la oxidación a ese nivel celular resulta prácticamente ineficaz. ^(25, 26, 27, 28)

En concordancia con esto, la administración preventiva sistémica del ozono, por autohemoterapia o por insuflación rectal, incrementa la capacidad auto-oxidativa y reduce el daño subsecuente provocado por los radicales libres.

5.6 Metabolismo de las células rojas de la sangre

La autohemoterapia mayor con ozono se ha convertido en la forma de aplicación sistémica fundamental, en lo que es todo el concepto de terapia de O₃, se utiliza en todas las indicaciones importantes en dosificaciones bajas que van de un rango de 500 µg hasta 4,000 µg de ozono por sesión de tratamiento. ^(17, 25, 26, 27, 28)

Gracias a su función como un transportador de oxígeno, la célula roja de la sangre está particularmente enlazada con los eventos de un trastorno circulatorio, por esto, los efectos del ozono en el metabolismo de las células rojas de la sangre y en su función así como un medio de transporte de oxígeno son de un interés extraordinario. ^(25, 26, 27, 28)

5.6.1 Sistema de oxidación protectora y el patrón de fosfato pentosa

A partir de investigaciones realizadas in vitro e in vivo, se sabe que el ozono interviene directamente en el metabolismo de los eritrocitos, los fosfolípidos en la membrana del glóbulo rojo son divididos y dan paso a hidroperóxidos en la célula a través de la reacción específica del ozono con los enlaces dobles de ácidos grasos no saturados.

Las células rojas de la sangre inmediatamente responden al iniciar su mecanismo detoxificante de peróxido el cual como un sistema protector de oxidación finalmente protege al hierro (Fe) en la hemoglobina de la oxidación y es por esto responsable de mantener el balance de oxígeno / hemoglobina. ^(25, 26, 27, 28)

Como es de esperarse, la cantidad de CGH glutatión reductasa disminuye inmediatamente después de la administración del ozono extracorpóreo, alcanzando su nivel anterior de concentración después de aproximadamente 15 minutos, como pudo ser demostrado por Bocci y otros autores. ^(25, 26, 27, 28)

El mantenimiento y regeneración del sistema glutatión está relacionado con un aumento en la glucosa 6 fosfato deshidrogenasa (G-6-PDH), resultando en una activación de la desviación del pentosa fosfato y por esto en una estimulación del metabolismo completo de las células rojas de la sangre. Figura 13. (25, 26, 27, 28)

El aumento en el ATP es característico de una activación metabólica general, y del contenido de 2,3 DPG (2,3 difosfoglicerato) para la funcionalidad de las células sanguíneas rojas.

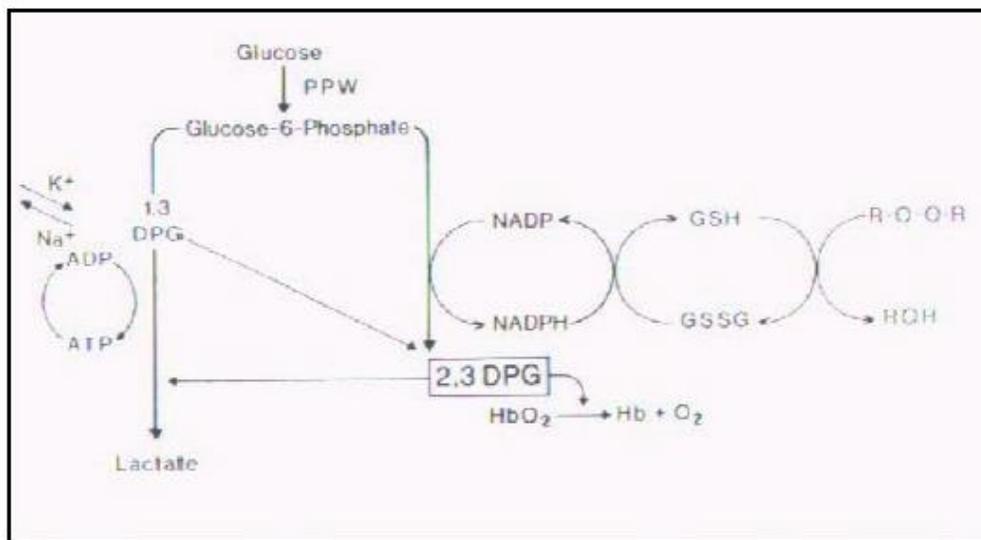
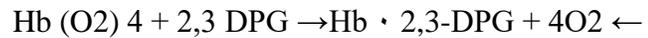


Figura 13. Metabolismo de las células rojas de la sangre y la influencia de los peróxidos. Tomado de Hansler. R. 2007

5.6.2 2,3 Difosfoglicerato

La sustancia desoxigenante 2,3 DPG tiene una parte especial en la funcionalidad de las células rojas de la sangre como un transporte de oxígeno, transportándolo al lugar donde es necesitado para su posterior uso, la afinidad de la hemoglobina con el oxígeno depende sin embargo en gran medida del 2,3 DPG, en un sistema sano este 2,3 DPG se presenta en las mismas cantidades molares como la misma hemoglobina, es de hecho, que puede deslizarse

en el centro de la estructura cuartaria de la hemoglobina y al mismo tiempo liberar cuatro moléculas de oxígeno. ^(25, 26, 27, 28, 29)



El efecto de liberación de oxígeno del ozono, significa que las células rojas de la sangre pueden liberar su oxígeno más fácilmente, lo que da como resultado una mejor provisión de oxígeno a las periferias. Si esta liberación de oxígeno se reduce debido al contenido de 2,3 DPG ya porque sea muy bajo o porque fluctúe demasiado, la aplicación de O₃ en este momento, implica una re funcionalización del eritrocito y por lo mismo una mejor liberación de oxígeno. ^(25, 26, 27, 28, 29)

En estudios realizados in vitro en sangre con todos sus elementos, tras la administración de ozono por autohemoterapia mayor, se encuentran resultados como: ^(25, 26, 27, 28, 29)

- ~ En el almacenamiento y transfusión de sangre con todos sus elementos, el 2,3 difosfoglicerato juega una parte muy especial y puede tomarse como una medida de la funcionalidad de las células rojas de la sangre, es decir, de la función de transferencia de oxígeno.
- ~ Las células rojas de la sangre que no contienen más 2,3 DPG ya sea que se deba a los procesos de envejecimiento o a través de la adición de inhibidores de coagulación, no son capaces de volver a obtener la mitad del nivel normal de 2,3 DPG hasta después de 24 horas, es decir, les toma aproximadamente 24 horas en reasumir su función principal como transportadores de oxígeno.
- ~ Gracias a la intervención específica del ozono en el metabolismo del eritrocito, la glicólisis así como la derivación de pentosa fosfato puede ser reactivadas a tal nivel que se produzca nuevo 2,3 DPG, y que la afinidad con el oxígeno de la

hemoglobina comience a caer, por lo tanto se genera una re funcionalización y rejuvenecimiento de las células rojas de la sangre.

Los resultados de esta re funcionalización, de este agotamiento de todas las reservas de la sangre después de la aplicación de ozono se muestran en la Figura 14.

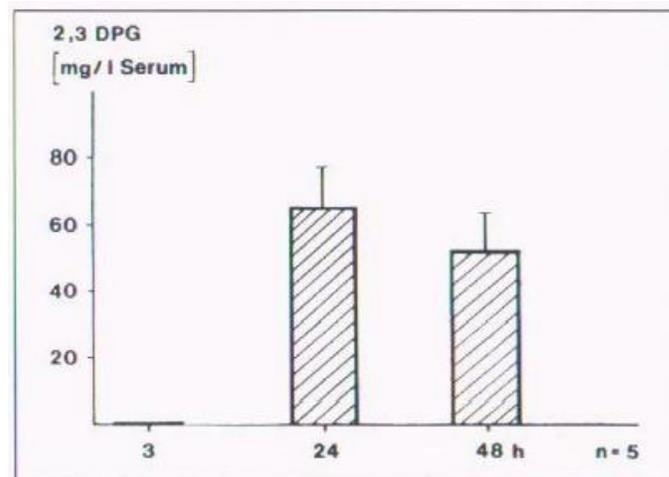


Figura 14. Contenido de 2,3 DPG en reservas sanguíneas, pos aplicación de ozono. Tomado de Hansler. R. 2007

Fue posible demostrar la presencia de 2,3 DPG en todas las conservas de sangre cuyo límite final de cuatro semanas se había pasado en forma deliberada, después de poner el ozono en la forma de finas burbujas y después de un período de incubación de tres horas, el contenido de 2,3 DPG no manifestó ningún cambio en ninguna de las cinco muestras, mientras que hubo un incremento considerable en la medición después de 24 horas; cayendo nuevamente sólo en un 20% durante un período posterior de 24 horas. ^(25, 26, 27, 28, 29)

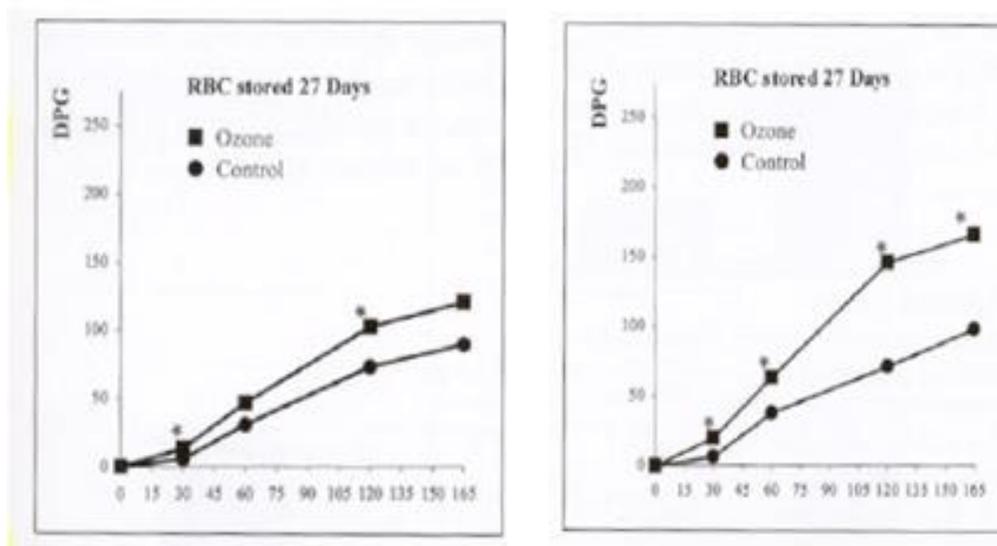
Este proceso de reactivación en la sangre preservada debe ser de un interés particular en el tratamiento de conserva de sangre para su reutilización, ya que la función de transferencia de oxígeno de las células rojas de la sangre por este medio, puede ser garantizada inmediatamente después de una transfusión de sangre. ^(25, 26, 27, 28, 29)

5.6.3 Concentración de glóbulos Rojos

Por lo general, los glóbulos rojos se administran en forma de concentrados, siendo en nuestros días el método más práctico con el fin de estudiar los efectos del ozono en parámetros metabólicos, Hoffman realizó extensas investigaciones en concentrados de glóbulos rojos (RBC) después de diferentes tiempos de almacenamiento y diferentes dosis de ozono. Después de la transfusión mientras el metabolismo de los glóbulos rojos gradualmente se “normaliza”, los parámetros sanguíneos relevantes también cambian y el contenido de 2,3 DPG aumenta. ^(17, 25, 26, 27, 28, 29)

Para obtener una comparación eficiente entre las concentraciones de glóbulos rojos tratados y los que no se sometieron a tratamiento con un factor de referencia válido, se ha desarrollado especialmente un método que simula la transfusión.

Bajo el efecto del ozono, la síntesis de DPG se acelera en los concentrados de glóbulos rojos correspondientemente preparados hasta en un 30% como se muestra en las Figuras. 15 y 16.



Figuras 15 y 16. Influencia del ozono sobre el incremento de DPG en glóbulos rojos inducidos por una simulación de transfusión inmediatamente después de la aplicación del ozono (Figura 15) y 5 hr después de la aplicación del ozono (Figura 16). Tomado de Hansler. R. 2007

Es interesante notar que esta propiedad del ozono permite un mejor almacenamiento de la sangre, de forma que la misma aún tiene efecto incluso cuando las conservas de glóbulos rojos tratados con ozono se hayan mantenido a 4C° durante otras 5 horas. La tabla 2 da un resumen que muestra la aceleración de la síntesis de DPG en ambos modelos de pruebas. ^{(25,}

26, 27, 28, 29)

Inicio de transfusión después de la aplicación de ozono	% de incremento del nivel de DPG en glóbulos rojos después del almacenamiento para preservación a 4°C durante			
	13 días	20 días	27 días	34 días
Inmediatamente	77.6	115.3	131.2	120.0
Después de 5 horas	93.3	131.0	247.7	114.7

Tabla 2. % de incremento del nivel de DPG. Tomado de Hansler. R. 2007

En un estudio realizado en humanos, en un grupo de 11 pacientes con trastornos circulatorios arteriales periféricos en su mayoría diabéticos, la influencia de unos tratamientos de ozono en serie en el contenido de 2,3 DPG fue determinada, solo en un paciente los autores encontraron un decremento en su 2,3 DPG los otros 10 pacientes mostraron un considerable incremento. ^(25, 26, 27, 28, 29)

El incremento significativo en 2,3 DPG y con éste la reducción en la afinidad de O₂ de la hemoglobina y la desviación simultánea del balance de oxígeno / hemoglobina hacia la hemoglobina desoxigenada, constituye sin duda una de las razones fundamentales para el mejoramiento en el suministro de oxígeno periférico a través de la terapia de ozono. ^(25, 26, 27, 28, 29)

En los deportistas profesionales sanos hay como regla un incremento de DPG en aproximadamente 10% después de una serie de aplicaciones de ozono sistémicas, un incremento similar también puede ser registrado en los profesionales después de un ejercicio de alto impacto. ^(25, 26, 27, 28, 29)

De hecho los pacientes mayores responden al tratamiento de ozono sistémico en una forma similar ya sea en la forma de Autohemoterapia mayor o en la de insuflación rectal de gas O₃. (25, 26, 27, 28, 29)

5.6.4 Cambios morfológicos en los eritrocitos

El mejoramiento en las propiedades reológicas de la sangre acompañado por un incremento en la flexibilidad de los eritrocitos, ha sido logrado bajo la aplicación de ozono por medio de la autohemoterapia. (25, 26, 27, 28, 29)

Estudios realizados por Bayer y colaboradores en células rojas de la sangre que fueron sometidas a estrés mecánico en un viscosímetro y cuyos cambios en su flexibilidad fueron determinados utilizando un difractómetro de láser especial, arrojaron los siguientes resultados: Mientras que las sustancias fotosensitivas redujeron considerablemente la flexibilidad de las células rojas de la sangre, su flexibilidad permaneció sin influencia cuando se administró el ozono de 2 a 77 µg/ml; no obstante, la hemólisis se incrementó sobre un nivel de 7 µg/ml en toda la sangre. (17, 25, 26, 27, 28, 29)

Fue posible demostrar que la resistencia mecánica de las células se incrementa bajo la aplicación de ozono. Comparado con un grupo control que utilizaba oxígeno puro, existió un efecto significativo estadísticamente hablando en concentraciones mayores a 7 µg por ml de toda la sangre. (25, 26, 27, 28, 29)

Conforme la concentración de ozono por ml en sangre total se incrementa, la hemólisis cae a una concentración de 37 µg/ml, es decir la tolerancia a la tensión mecánica de las células rojas de la sangre es mejorada bajo el ozono, aunque en concentraciones más altas, tales como de 77 µg/ml, este efecto se reduce. Figura 17 (25, 26, 27, 28, 29)

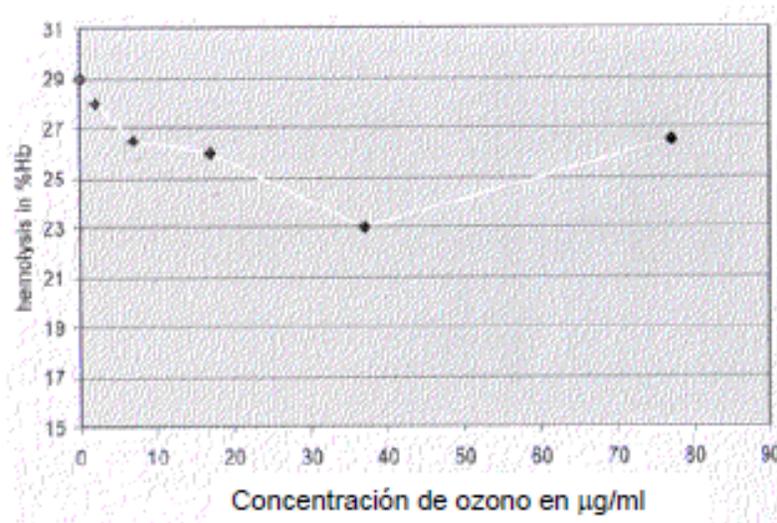


Figura 17. Influencia del ozono en la resistencia mecánica de los eritrocitos. Tomado de Hansler. R. 2007

5.7 Adenosintrifosfato ATP

Durante el incremento en los porcentajes de glicólisis en las células rojas de la sangre, después de la aplicación de ozono, el contenido de adenosin trifosfato también se eleva, siendo interpretado como una activación general del metabolismo celular. Es posible que un aumento inducido por ozono en las células rojas de la sangre, el ATP es el responsable en estabilizar el potencial de membrana y mejorar la resistencia mecánica. (25, 26, 27, 28, 29)

Las cantidades generadas de ATP extracelular, gracias a la reacción con el ozono, ocurren rápidamente, y son las responsables de mecanismos tales como la vasodilatación y la disponibilidad de reservas energéticas. (17, 25, 26)

Se han realizado diferentes estudios en humanos del efecto del ozono en el rendimiento deportivo, encontrando resultados como que aparte de los valores 2,3 DPG que reciben atención muy especial en el deporte profesional, el contenido de ATP también se ha medido

en los profesionales en reposo y durante el ejercicio después de la aplicación sistema de O₃ por autohemoterapia, los resultados se muestran en la Figura 18. (25, 26, 27, 28, 29)

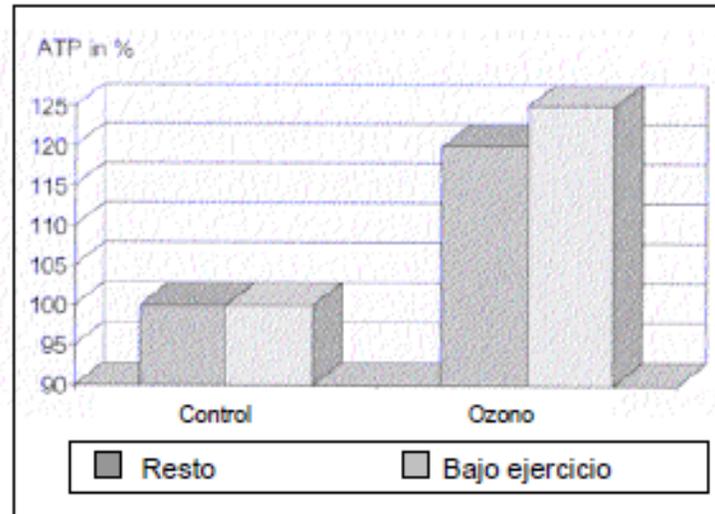


Figura 18. Contenido in vivo de ATP en deportistas profesionales sanos. Autohemoterapia mayor con 950 ug de ozono por aplicación. a) valores en reposo. b) valores bajo ejercicio. Tomado de Hansler. R. 2007

5.8 Células inmunocompetentes

Inducción citocínica.

Entre las células inmuno competentes, los linfocitos T4 (TH) ocupan una posición clave, activados por los macrófagos producen citocinas que inician la comunicación intercelular en su función de mensajeros, por ejemplo encontramos interleucina 2, la cual es responsable de un gran número de funciones, tales como la activación de más linfocitos T4 o de linfocitos B para producir anticuerpos específicos. De esta forma las células que ayudan, son activadas desatando una cascada completa de reacciones inmunes. (25, 26, 27, 28, 29)

En toda la sangre tratada, el ozono está en posición de asumir la activación de la célula inmuno competente directamente, es decir puede producir inmuno activación específica.

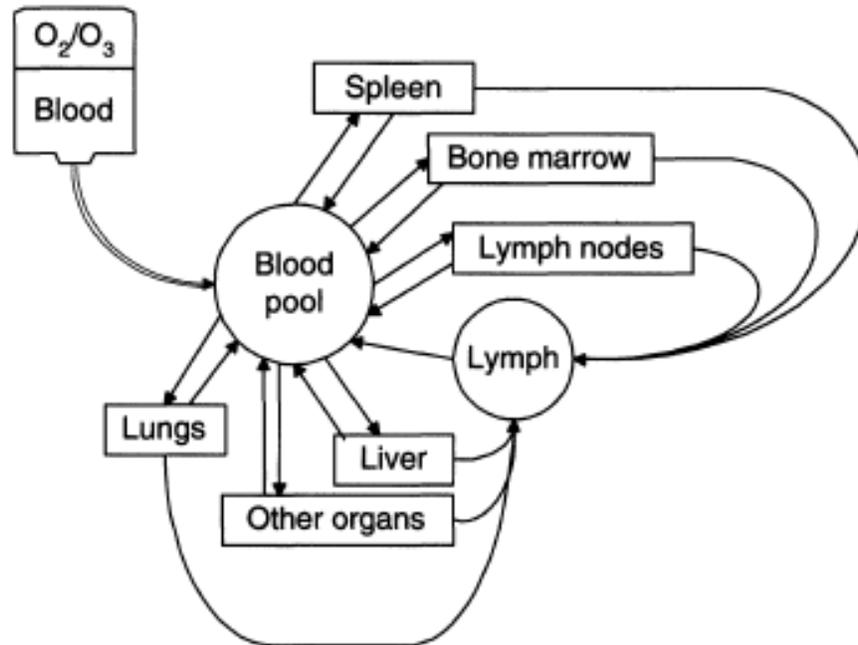


Figura 19. El esquema sugiere que las células mononucleares de la sangre, después de la reinfusión, dejan el compartimento sanguíneo y se dirigen a los órganos linfoides y no linfoides, para activar la producción de citocinas responsables de la activación del sistema inmune. Los eritrocitos activados por el ozono favorecen la oxigenación y el metabolismo celular. Tomado de Bocci. V. 2008

Autores como Bocci han mostrado en sus resultados que después de períodos de incubación correspondientes, la sangre ozonizada libera interferones (IFN- α , IFN- β y IFN- γ), interleucinas (interleucinas de los tipos IL-1b, 2, 4, 6, 8 y 10), factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), factor estimulante de colonias de macrófagos granulocíticos (GM-CSF), y el factor de crecimiento TGF- β 1. (25, 26, 27, 28, 29)

La inducción de interleucina-2, IFN- γ , TNF- α y GM-CSF ha sido registrada en la figura 20. (25, 26, 27, 28, 29)

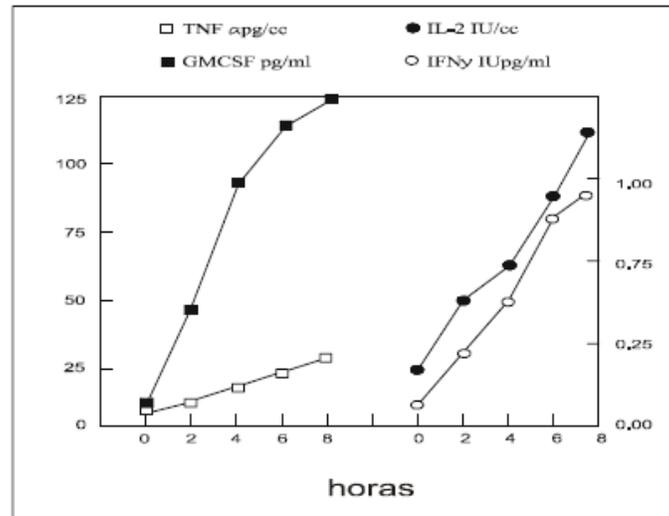


Figura 20. Liberación fisiológica de citocinas en sangre total producida por el ozono. Tomado de Hansler. R. 2007

La liberación de citocinas es aparentemente una expresión de funciones biológicas fundamentales, la interleucina-6 por ejemplo acelera la síntesis de anti-cuerpos y las proteínas en fase aguda, los interferones con su actividad antiviral previenen la replicación viral y adicionalmente activan las funciones inmuno moduladoras básicas junto con la interleucina-2 y el TNF- α . (25, 26, 27, 28, 29)

Se produce una activación de las células T-Citotóxicos (CD8), macrófagos, neutrófilos, eosinófilos, células Natural killer y una activación de la citotoxicidad celular dependiendo de los anti cuerpos, finalmente responsables de matar las células infectadas por virus o las células neoplásicas, o responsable de eliminar bacterias y parásitos. (25, 26, 27, 28, 29)

Inversamente la liberación de interleucina-10 y de TGF- β 1 es capaz de suprimir el exceso de inmuno estimulación resultando así en una programación ordenada de la respuesta inmune. Esta es posiblemente una de las razones por lo que la Autohemoterapia mayor también se aplica basándonos empíricamente, en el tratamiento de condiciones autoinmunes patológicas. (25, 26, 27, 28, 29)

Aquí es interesante hacer notar que la oleada principal de inmuno activación se presenta hasta una concentración de 42 μg de ozono por ml de sangre, por el contrario, un incremento posterior en la concentración de ozono produce una elevación posterior menor en las citocinas correspondientes. (25, 26, 27, 28, 29)

El primer máximo de interferón $-\gamma$ se presenta en una concentración de ozono de 11 μg O_3 por ml de la sangre. Figura 21

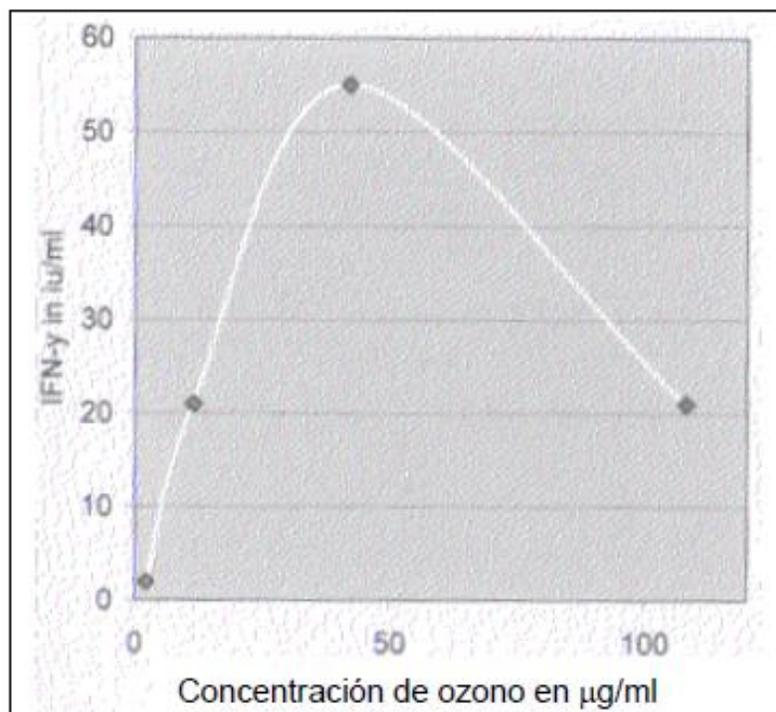


Figura 21. Inducción de interferón $-\gamma$ en la sangre dependiendo de la concentración de ozono utilizada. Tomado de Hansler. R. 2007

Mientras el TNF- α y las interleucinas muestran una moderada elevación a los 25 μg de ozono por ml de sangre, no existe ninguna elevación posterior después de que se alcanzan los 75 $\mu\text{g/ml}$, ver tabla 2

Ozonoconcentración ($\mu\text{g/ml}$ de sangre)	IL-1 (pg/ml)	IL-2 (iU/ml)	GM-CSF (pg/ml)	IFN- β (iU/ml)	IFN- γ (iU/ml)	IL-6 (pg/ml)	TNF- α (pg/ml)
Control Aire estéril	80 (100%)	0.9	122	0	0.5	8	18
11					1.5	20	22
25					1.0	28	30
42	145(182%)	1.7	247	22	1.2	23	32
78	160 (200%)	1.8	283	30	2.1	35	52
* Sin medida							

Tabla 3. Inducción de citocinas a través del ozono en la sangre como dependientes de la concentración de ozono. Tomado de Hansler. R. 2007

Las concentraciones de entre 20 y 40 $\mu\text{g/ml}$ de ozono en sangre, son capaces de hacer una contribución positiva a la inmuno activación.

Así, a menudo que se incrementa la concentración inicial, la liberación del IFN- γ también se incrementa alcanzando su punto óptimo de 40 a 60 μg de ozono por ml de la sangre, siendo el efecto inversamente proporcional, aproximadamente a 80 $\mu\text{g/ml}$ en adelante y esto se debe presumiblemente a la elevación del nivel de daño en la membrana. (25, 26, 27, 28, 29)

Correspondientemente también se produce un incremento en el porcentaje de hemólisis, de forma que las concentraciones de ozono superiores a 80 $\mu\text{g/ml}$ de la sangre no se utilizan en la terapia. Estas concentraciones están reservadas para la aplicación tópica, es decir la desinfección, limpieza y cicatrización. (25, 26, 27, 28, 29)

El primer paso en la activación de ozono de las células inmuno competentes, muy probablemente tiene lugar en una forma similar a la de la activación de las células rojas de la sangre a través de la ozonólisis de los ácidos grasos no saturados como componentes de la membrana celular. (25, 26, 27, 28, 29)

Gracias a la activación del mRNA en el núcleo celular, la traslación, y la síntesis proteica correspondiente, las citocinas específicas celulares también son liberadas en las células mono nucleares, eventos que tienen lugar extra corpóreamente (Autohemoterapia).

La reinfusión de la propia sangre del paciente con las células rojas de la sangre activadas y con las células inmuno competentes activadas es seguida por un proceso en donde las células mono nucleares migran hacia las diversas linfas (vaso, nódulos linfáticos, y a órganos no linfáticos (pulmón, y hígado), activando a otras células inmuno competentes. (25, 26, 27, 28, 29)

Generalmente de 100 ml a 400ml de sangre son re administrados a través de la infusión en el equino, por esta razón, una serie de tratamientos de varias infusiones autohemoterapéuticas son necesarios para lograr los efectos a largo plazo. (25, 26, 27, 28, 29)

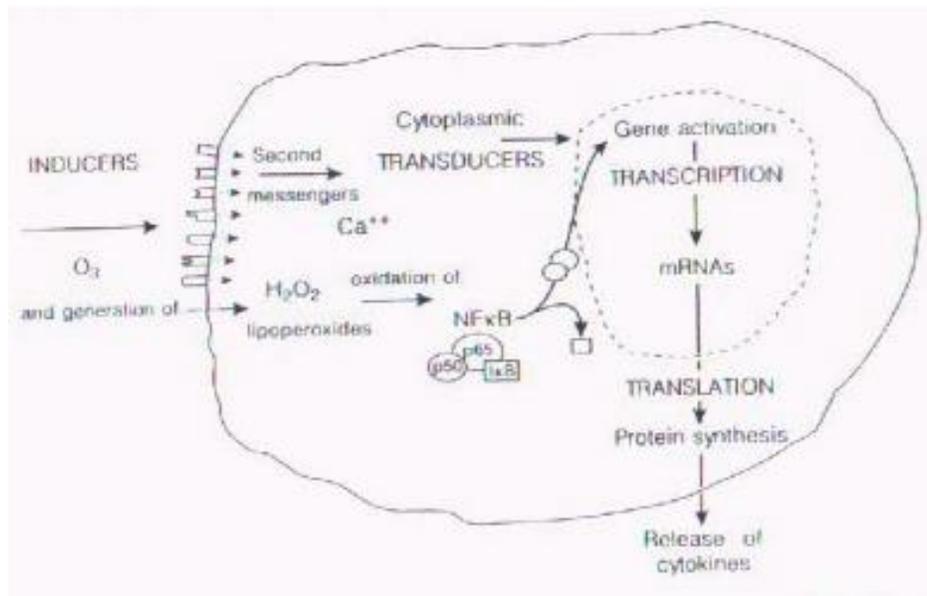


Figura 22. Inducción de citocinas a través del ozono en las células mono nucleares. Tomado de Hansler. R. 2007

5.9 Flexibilización de las células de la piel

Específicamente, en las células de la piel la ozonoterapia aumenta su capacidad para absorber nutrientes, micro elementos y oxígeno, así como para expulsar el material de desecho y los productos finales del metabolismo. Esto mejora la vitalidad de la piel, así como también su aspecto y grado de hidratación. ^(5, 10, 11, 12)

5.10 Parámetros Hematológicos y Constantes Fisiológicas

5.10.1 Parámetros Hematológicos

En un estudio realizado en mayo de 2006 a junio de 2007, en las instalaciones del Club Hípico de la Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano a 32 km de Tegucigalpa, Honduras, se utilizaron 12 equinos de los encastes Cuarto de Milla × Pura Sangre Andaluz y Cuarto de Milla × Paso Fino Peruano, distribuidos en seis machos y seis hembras, con edades entre los 4 y 12 años, con el fin de medir el comportamiento de los diferentes parámetros hematológicos y constantes fisiológicas, generados tras la administración de ozono por medio de autohemoterapia sistémica o mayor. ^(5, 11)

Se hicieron cuatro tratamientos: ^(5, 11)

- ~ Ozono con 1000 ml (T01000): tres hembras fueron tratadas con una dosis de 0.06 mg/kg de peso vivo equivalente a 1000 ml de ozono (O_3) vía intravenosa mezclados con Solución Salina Fisiológica 0.9% cada 3 días hasta completar ocho aplicaciones. (Tabla 3).
- ~ Ozono con 1000 ml (T01000): tres machos fueron tratados con una dosis de 0.06 mg/kg de peso vivo equivalente a 1000 ml de ozono (O_3) vía intravenosa mezclados con Solución Salina Fisiológica 0.9% cada 3 días hasta completar ocho aplicaciones. (Tabla 3).

~ Ozono con 500 ml (T0500): tres hembras fueron tratadas con una dosis de 0.04 mg/kg de peso vivo equivalente a 500 ml de ozono (O_3) vía intravenosa mezclados con Solución Salina Fisiológica 0.9% cada 3 días hasta completar ocho aplicaciones. (Tabla 3).

~ Ozono con 500 ml (T0500): tres machos fueron tratados con una dosis promedio de 0.04 mg/kg de peso vivo equivalente a 500 ml de ozono (O_3) vía intravenosa mezclados con Solución Salina Fisiológica 0.9% cada 3 días hasta completar ocho aplicaciones. (Tabla 4).

Sensibilización (AHT)		Tratamiento Ozono con 1000 mL (TO1000)								
Tiempo (días)	0	3	6	9	12	15	18	21	24	27
Ozono (mL)	250	500	750	1000	1000	1000	1000	1000	1000	0
Sensibilización (AHT)		Tratamiento con Ozono con 500 mL (T0500)								
Tiempo (días)	0	3	6	9	12	15	18	21	24	27
Ozono (mL)	250	500	500	500	500	500	500	500	500	0

AHT: Autohemotransfusión

Tabla 4. Tratamientos establecidos para el estudio realizado. Tomado de Haddad, M. et al. 2009 y López, L. 2007

Se tomaron muestras de sangre de la siguiente manera:

- Primera muestra: 5 minutos antes de la aplicación del Ozono
- Segunda muestra: 1 hora pos-aplicación
- Tercera muestra: 6 horas pos-aplicación.
- Cuarta muestra: 24 horas pos-aplicación

Para la medición de los parámetros fisiológicos se utilizó el siguiente esquema: Con un fonendoscopio se tomaron Frecuencia Cardíaca (FC) y Respiratoria (FR) 10 minutos antes de la aplicación (FC_1 y FR_1), durante la aplicación (FC_2 y FR_2), y 20 minutos después de la aplicación (FC_3 y FR_3).^(5, 11)

Se midieron las siguientes variables: Hematocrito (%), Hemoglobina (g/dl), Eritrocitos ($\times 10^6 \mu\text{l}$), Plaquetas ($\times 10^3 \mu\text{l}$), Leucocitos ($\times 10^3 \mu\text{l}$), Linfocitos ($\times 10^3 \mu\text{l}$), Neutrófilos ($\times 10^3 \mu\text{l}$), Basófilos ($\times 10^3 \mu\text{l}$), Eosinófilos ($\times 10^3 \mu\text{l}$), Monocitos ($\times 10^3 \mu\text{l}$), Frecuencia cardíaca (lpm), Frecuencia respiratoria (rpm).^(5, 11)

Se obtuvieron los siguientes resultados:

Dosis	Hematocrito (%)	Hemoglobina (g/dL)	Eritrocitos ^{ns} ($\times 10^6 \mu\text{L}$)	Plaquetas ^{ns} ($\times 10^3 \mu\text{L}$)
500 mL	39.3	9.9	8.5	9.9
1000 mL	41.1	10.3	8.4	9.6
CV	14.1	11.0	14.4	26.7

CV: Coeficiente de variación.

Valores en la misma columna con diferentes letras difieren entre sí ($P < 0.05$).

^{ns} no significativo

Total de 432 muestras

Tabla 5. Valores medios de línea roja en equinos tratados con ozono clínico según dosis. Tomado de Haddad. M. et al. 2009 y López. L. 2007

Las diferencias por los valores de hematocrito por dosis y sexo fueron significativas ($P < 0.05$) para los valores de hematocrito de acuerdo a la dosis y sexo. Las hembras con 1000 ml de ozono tienen los porcentajes más altos de hematocrito, iniciando el incremento a partir de la primera aplicación.^(5, 11)

El aumento en los eritrocitos se da a partir de la primera aplicación en con 1000 ml de ozono. La concentración de plaquetas está en el rango normal (5-17.5 plaquetas/campo), hubo un aumento en esta variable después de la primera aplicación comprobando la

disminución de la agregación plaquetaria que tiene el ozono, ya que al haber una reducción plaquetaria el organismo da una respuesta fisiológica aumentando la concentración de plaquetas para que no ocurra una hemorragia, estabilizándose los equinos después de la quinta aplicación debido al proceso de adaptación. Es importante mencionar que tanto las hembras como los machos aumentaron la concentración de plaquetas a lo largo del experimento siendo las hembras las que obtuvieron mayores valores sobre este parámetro que los machos. ^(5, 11)

Resultados del efecto del ozono sobre la línea blanca.

Dosis	Leucocitos (x10 ³ µL)	Linfocitos (x10 ³ µL)	Segmentados (x10 ³ µL)	Bandas ^{ns} (x10 ³ µL)	Basófilos (x10 ³ µL)	Eosinófilos (x10 ³ µL)	Monocitos (x10 ³ µL) ^{ns}
500 mL	8.3	41.7	51.6	0.5	0.9	2.9	2.1
1000 mL	8.3	33.6	58.7	0.7	1.2	3.5	2.1
CV	21.8	19.8	22.0	11.4	10.1	15.2	12.7

Valores en la misma columna con diferentes letras, difieren entre sí (P<0.05).

CV: Coeficiente de variación.

ns: no significativo.

Total de 432 muestras.

Tabla 6. Valores medios de la línea blanca en equinos tratados con ozono clínico según dosis. Tomado de Haddad. M. et al. 2009 y López. L. 2007

Este estudio plantea que el ozono fortalece el sistema inmunológico, principalmente a dosis 1000 ml, estimulando los glóbulos blancos y aumentando la actividad de los leucocitos para detectar células patógenas que producen cáncer y enfermedades, lo que sugiere que una dosis más elevada de ozono podría inducir a una respuesta más activa de la médula ósea en la liberación de estas células en la circulación sanguínea. ^(5, 11)

De igual manera se concluye que bajo los efectos de los metabolitos del ozono se evidencia un incremento en la proliferación y actividad de linfocitos, permitiendo que se incrementen las defensas del organismo. ^(5, 11)

5.10.2 Frecuencia Cardiaca

En la tabla 7 se presentan los valores medios obtenidos a lo largo del experimento sobre frecuencia cardiaca, de los equinos evaluados por dosis de ozono (500 ml y 1000 ml). Se encontraron diferencias ($P < 0.05$) en la FR según la dosis aplicada, con los valores más altos durante la aplicación y dentro de éstas, las de 1000 ml de ozono clínico, presentando mayor incremento en la FC2 y FC3 de un 11% y 5% respectivamente en comparación con la FC1 o inicial, mientras que con la dosis de 500ml no se encontraron diferencias. ^(5, 11)

Dosis	FC1	FC2	FC3	CV
500 mL ozono	30.12	33.62	31.62	14.82
1000 mL ozono	33.50	37.62	35.45	14.28
C.V.	17.46	19.54	18.11	

FC1: frecuencia cardiaca 10min antes de la aplicación de ozono clínico. FC2: frecuencia cardiaca durante la aplicación de ozono clínico. FC3: frecuencia cardiaca 20min después de la aplicación de ozono clínico. lpm: latidos por minuto

CV: coeficiente de variación

Valores en la misma fila con diferentes números, difieren entre sí ($P < 0.05$); valores en la misma columna con diferentes letras difieren entre sí ($P < 0.05$).

Total de 288 muestras.

Tabla 7. Valores medios (latidos por minuto lpm) de frecuencia cardiaca en equinos tratados con ozono clínico de acuerdo a la dosis. Tomado de Haddad. M. et al. 2009 y López. L. 2007

La frecuencia cardiaca tras realizar un ejercicio intenso de salto durante 30 minutos, en animales con ozonoterapia, se encuentra disminuida, según las experiencias obtenidas, de un 5% respecto a los ritmos basales de cada caballo. En general, la ozonización hace disminuir la frecuencia cardiaca post ejercicio. ^(5, 10, 11, 12)

5.10.3 Frecuencia respiratoria (FR)

Dosis	FR1	FR2	FR3	C.V.
500 mL ozono	13.25	24.41	25.25	32.67
1000 mL ozono	14.12	28.00	32.00	31.17
C.V.	25.80	27.07	26.23	

FR1: frecuencia respiratoria 10min antes de la aplicación de ozono clínico. FR2: frecuencia respiratoria durante la aplicación de ozono clínico. FR3: frecuencia respiratoria 20min después de la aplicación de ozono clínico.

CV: coeficiente de variación

rpm: respiraciones por minuto.

Valores en la misma fila con diferentes números, difieren entre sí ($P < 0.05$); valores en la misma columna con diferentes letras difieren entre sí ($P < 0.05$).

Total de 288 muestras.

Tabla 8. Valores medios (respiraciones por minuto rpm) de frecuencia respiratoria en equinos tratados con ozono clínico de acuerdo a la dosis. Tomado de Haddad. M. et al. 2009 y López. L. 2007

La FR disminuyó inmediatamente al cesar el ejercicio, pero permaneció elevada sobre los valores de reposo debido a la hiperventilación que se produce para cubrir el déficit de oxígeno post ejercicio y cumplir con su función termorreguladora, por lo que no es un buen indicador de la recuperación en forma aislada. ^(5, 10, 11, 12)

5.10.4 Concentración de lactato plasmático (LP)

La lactacidemia se utiliza para evaluar el estado físico del equino y su modificación por el entrenamiento, y permite determinar el tipo de ejercicio que realiza, aeróbico o anaeróbico, y entrenarlo en consecuencia. En estas disciplinas deportivas, coexisten componentes aeróbicos y anaeróbicos para obtener energía. Tanto en uno como en otro tipo, el lactato se encuentra disminuido tras la ozonización. ^(5, 10, 11, 12)

5.10.5 Proteínas totales (PT)

Los cambios en la concentración de las PT plasmáticas reflejan variaciones del equilibrio hídrico, tanto en ejercicios intensos de corta duración, como en aquellos de resistencia. En salto, la elevación de este parámetro a los cinco minutos sugiere un trasvase de fluidos al espacio intracelular. En paso, la elevación bifásica marca una pérdida de fluidos a los 30 minutos. En trote, la elevación ligera, junto con valores elevados de FC, FR, temperatura rectal y albúminas, también indica una pérdida por sudor. (5, 10, 11, 12)

5.10.6 Glucemia

En el estudio realizado se encontraron los siguientes valores respecto al comportamiento de la glucosa, tras la administración de ozono clínico por autohemoterapia.

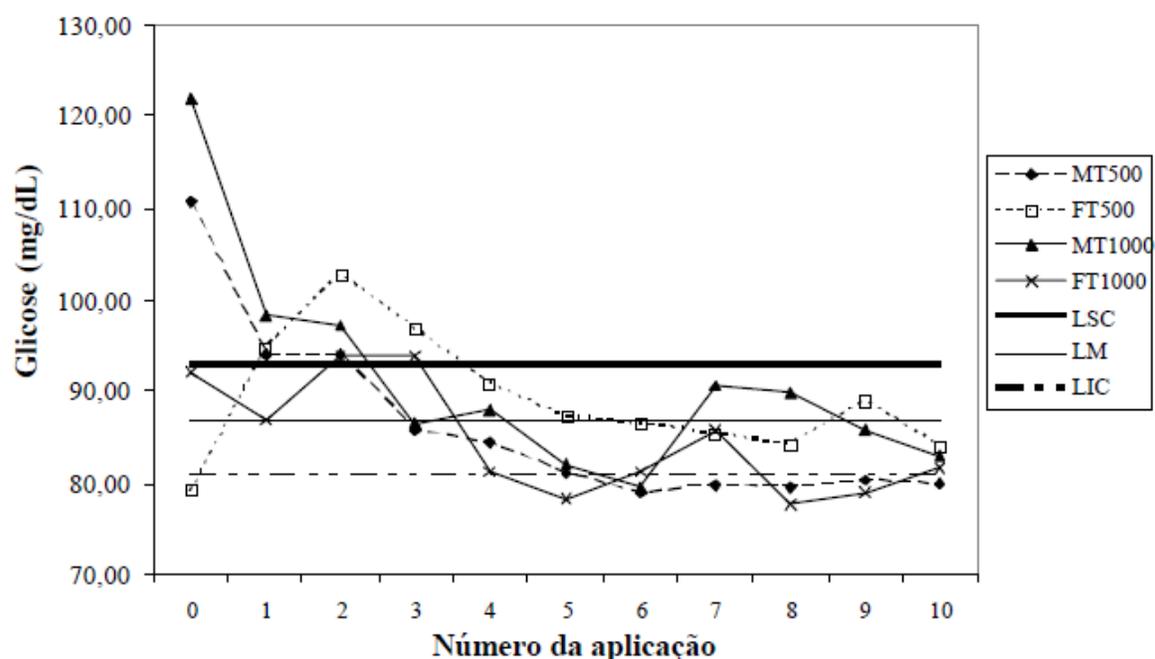


Gráfico 1. Medias de las concentraciones de glucosa (mg/dl) (a) en MT500 (machos tratados con 500mL), FT500 (hembras tratadas con 500mL), MT1000 (machos tratados con 1000mL) y FT1000 (hembras tratadas con 1000mL), a lo largo de las aplicaciones de ozono. LSC: límite superior de control, LM: limite medio, LIC: límite inferior de control (Aplicaciones 1-9). Periodo cero: corresponde al inicio del experimento, en que los animales aún no estaban expuestos al ozono.

Período 1: sensibilización de los animales. Período 10: refleja los valores medios de los resultados de las muestras obtenidas tres días después de la última aplicación de ozono. Tomado de Haddad. M. et al. 2009.

La glucemia post ejercicio se elevó en todos estos deportes, los valores de glucemia por debajo de lo normal en reposo y post ejercicio, se deben, probablemente a la práctica de los entrenadores de privar de alimentos 24 horas antes de la carrera. El ozono puede generar una hipoglucemia debido a una transformación metabólica de la glucosa por vía del ciclo de las pentosas. ^(5, 10, 11, 12)

6. GENOTOXICIDAD DEL OZONO ⁽⁷⁾

La exposición aguda al gas por inhalación se ha reportado que produce inflamación pulmonar y daño celular al epitelio de la cavidad nasal, a los bronquios y bronquiolos, así como a los macrófagos alveolares, todo lo cual provoca la hiperreactividad bronquial y la inducción y el agravamiento de las crisis de asma.

Estudios citogenéticos realizados in vivo en animales de laboratorio a los que se les administró el O₃ por las vías inhalatoria, intramuscular, intraperitoneal, intratesticular e intrarrectal, en su mayoría han mostrado resultados negativos. Se han detectado en los hamsters chinos Aberraciones cromosómicas y en las cromátidas de los linfocitos de sangre periférica expuestos al O₃. No se han reportado efectos citogenéticos del O₃ en las células de la médula ósea ni en espermatozoides de los animales tratados.

En bacterias ocurren mutaciones y rotura en la cadena del ADN, principalmente en experimentos en los cuales el O₃ fue burbujado a través de suspensiones de microorganismos en cultivo, en cuyo caso también se forman radicales OH⁻ y H₂O₂. En los cultivos de células animales y humanas tratadas con O₃ se han detectado aberraciones en las cromátidas, e intercambio de cromátidas hermanas.

También han sido documentados casos de embolismo en humanos, un caso de psicosis alucinatoria tras hemotransfusión y complicaciones de inyecciones: enfisema orbitario, o subcutáneo o hemorragias vítreo-retinales.

Es importante reseñar, además que el ozono se utiliza como mutagénico en modelos animales y que se han comunicado casos de aumento del DNA linfocitario, secundario a la desregulación del ciclo celular por radicales superóxido mutagénidos.

7. CONCLUSIONES

En la célula normal existe un delicado equilibrio entre los oxidantes y los antioxidantes, de manera que el resultado de un desequilibrio entre la formación de sustancias oxigenadas reactivas o pro-oxidantes y su eliminación por parte de los mecanismos celulares antioxidantes (enzimáticos y no enzimáticos), en favor de los primeros, es lo que dará lugar al concepto de "estrés oxidativo".

Un gran número de enfermedades están asociadas con el concepto de "estrés oxidativo", incluyendo numerosos procesos fisiológicos y fisiopatológicos tan diversos como son: la inflamación, el envejecimiento, las infecciones microbianas (bacterias y virus), la carcinogénesis, la acción de drogas, la toxicidad de los medicamentos y los mecanismos de defensa contra los protozoos.

La versatilidad de las vías de administración del ozono, permiten tener un manejo más adecuado a la hora de instaurar un correcto tratamiento frente a las diversas patologías que se puedan presentar.

El uso de la autohemoterapia con ozono, mejora la capacidad antioxidante del organismo, efecto que puede durar aproximadamente 7 – 14 días según estudios realizados en equinos, por lo que es posible que autohemoterapia con ozono mejore la condición y / o performance del caballo. Sin embargo el acuerdo de Paris, prohíbe la reinfusión de sangre en equinos de carreras por ser considerado doping, limitando el uso de esta técnica.

La terapia de ozono en dosificación baja en la forma de autohemoterapia, produce una activación en el metabolismo de las células rojas de la sangre en que entre otros fenómenos se manifiesta en la forma de una elevación en el ATP.

También en un incremento en el 2,3 difosfoglicerato es la causa de la liberación de oxígeno como efecto del ozono, la cual puede atribuirse a una intervención de los peróxidos formados a partir del ozono en el patrón de glicólisis de pentosa fosfato.

En el contexto inmunológico la Autohemoterapia mayor con ozono debe tomarse como una terapia de inducción de citocinas endógena, con una liberación fisiológica concomitante de las citocinas inherentes al cuerpo.

Por todo y por los pocos efectos adversos que tiene es una herramienta médica a la cual debemos estar abiertos y usar como complemento de tratamientos convencionales.

8. BIBLIOGRAFÍA

1. Alonso, M. Usos clínico de la autohemoterapia. En: Curso teórico práctico de ozonoterapia en équidos. Facultad de veterinaria de la universidad complutense de Madrid; 2013.
2. Rilling S.: Hystorical view of the developements of medical ozone therapy. Kongresbericht I.O.A. 7 Ozon-weltkongres 9-12 September 1985, Tokyo.
3. López, M., Goyoaga, A. Autohemoterapia con ozono y su uso en la clínica equina. 2013. En: <http://www.equisan.com/images/pdf/ozonoterapia2.pdf>, consultado 11 de Octubre de 2015
4. García Liñeiro, J.A. Evaluación del efecto de la terapia por peróxido de oxígeno (ozonoterapia) en la circulación de la cuartilla y casco del equino. Universidad de Buenos Aires, Facultad de Medicina Veterinaria, 12 de Noviembre de 2010
5. López. L. Efecto de la ozonoterapia sobre los parámetros hematológicos y constantes fisiológicas en equinos. Universidad Zamorano, 2007
6. Hänsler. R., Fernández. O., Fahmy. Z., Ozone in Medicine: The low – dose ozone concept – guidelines and treatment strategies. Ozone: Science & Engineering; 34: 408 – 424. 2012. International Ozone Association
7. Leonardi. M. Possibilities of Medical Ozone. Bologna University. International Journal of Ozone Therapy. 2013
8. Bocci. V., Zanardi. I., Michaeli. D., Travagli. V. Mechanisms of Action and Chemical-Biological Interactions between Ozzone and Body Compartments: A

- Critical appraisal of the different administration routes. *Current Drug Therapy*, 4:159-73, 2009 y *Int. J. Ozone Therapy* 9:63-77, 2010
9. Haddad. M. et al. Comportamento de componentes bioquímicos do sangue em equinos submetidos à ozonioterapia. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.61, n.3, p.539-546, 2009
 10. Gjonovich. A., Sallusti. G., Brusomini. A. Effect of Major Autohaemotherapy with oxygen – ozone on the anaerobic threshold in athletes. *Rivista Italiana di Ossigeno – Ozonoterapia* 5 : 12 – 16, 2006
 11. Viglino. G. Ozonoterapia en el paciente Equino. Instituto de Ciências Aplicadas do Vale do Paraíba. Associação Brasileira de Ozonioterapia. 2010
 12. Bocci. V. Biological and clinical effects of ozone. Has ozone therapy a future in medicine?. *British Journal of Biomedical Science*. 56 : 270 – 279. 1990. Biomedical Essay
 13. Yu. B., et al. Bacterial Culture Experiments of Medical Ozone. *International Journal of Ozone Therapy* 9 : 59 – 62. 2010
 14. Garcia Liñeiro. J. A. Efectividad de la inyección ecoguiada de peróxido de oxígeno (ozono) en artropatías intervertebrales del equino. Universidad de Buenos Aires, Facultad de Medicina Veterinaria, 2014
 15. Tsuzuki. N. et al. Effects of ozonated autohemotherapy on the antioxidant capacity of Thoroughbred horses. *The Journal of Veterinary Medical Science*. 10 Jul 2015

16. Cataldo. F., Gentilini. L. On the action of ozone on whole bovine blood. Societa` Lupi Chemical Research, Via Casilina 1626/A, 00133 Rome, Italy. *Polymer Degradation and Stability* 89 (2005) 527 e 533
17. Bocci. V., Aldinucci. C. Biochemical modifications induced in human blood by oxygenation – ozonation. *J Biochem Mol Toxicol.* 2006; 20 : 133 – 138
18. Bocci. V. Scientific and medical aspects of ozone therapy. State of the art. *Arch Med Res.* 2006; 37 : 425 – 435
19. Bocci. V. The case for oxygen – ozonotherapy. *Br J Biomed Sci.* 2007 ; 64 : 44 – 49
20. Bocci. V., et al. The ozone paradox: Ozone is a strong oxidant as well as a medical drug. *Med Res Rev.* 2009; 29 : 646 – 682
21. Huanqui. C. et al., Eficacia y Seguridad del ozono intraarticular en artrosis de rodilla refractaria al tratamiento. *Rev. Perú Reum.* Vol 12, N° 1, 2006
22. Iliakis. E. et al., Is Medical ozone safe when injected intra – articular? A comparative histological study in rat. *International Journal of Ozone Therapy.* 7 : 7 – 15. 2008
23. Coumbe. K. *Equine Veterinary Nursing.* Second Edition. 2012
24. Hansler. R. *The Use of Ozone in Medicine.* Germany. 2007
25. Delgado. M. *Generadores de Ozono Médico.* SEOT. Valencia 09 de Marzo de 2013
26. Menéndez. S. et al. *El Ozono: Aspectos básicos y sus aplicaciones clínicas.* Centro de Investigaciones del Ozono, Habana, Cuba. 2008

27. Bocci. V. A reasonable approach for the treatment of HIV infection in the early phase with ozonotherapy (autohemotherapy), How inflammatory cytokines may have a therapeutic role. Institute of General Physiology and Nutritional Sciences. University of Siena. Italy. 2008.
28. Gerard. V. Sunnen. M. A virology primer: with special reference to ozone. September 22, 2001.
29. Borges. F. Autohemoterapia como terapia auxiliar no tumor venéreo transmissível. UCB. 2009.
30. Travagli. V. et al. A physicochemical investigation on the effects of ozone on blood. International Journal of Biological Macromolecules 41 (2007) 504–511
31. Boczkowska. B. et al. Ozonation of human blood increases sphingosine-1-phosphate in plasma. Journal of physiology and pharmacology. 2015.
www.jpp.krakow.p
32. Bocci. V. et al. Ozonation of Human Blood Induces a Remarkable Upregulation of Heme Oxygenase-1 and Heat Stress Protein-70. Hindawi Publishing Corporation Mediators of Inflammation Volume. 2007.
33. Schwartz, A. Martínez- Sánchez, G. Re, L. Factores de crecimiento derivados de plaquetas y sus aplicaciones en medicina regenerativa. Potencialidades del uso del ozono como activador. Revista Española de Ozonoterapia. Vol.1, nº 1, pp. 54-73. 2011

34. Valacchi. G y Bocci. V. Studies on the biological effects of ozone: 10. Release of factors from ozonated human platelets. Institute of General Physiology, University of Siena, 53100 Siena Italy. 2000

35. Roberto. A. Liñeiro. A. Plasma rico en plaquetas ozonizado en lesiones de los ligamentos colaterales de la articulación interfalángiana distal. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad de Buenos Aires. 2013