

Efecto del aceite de girasol ozonizado y su formulación en crema sobre la formación del granuloma

Ozonized sunflower oil effect and its cream formulation on granuloma formation

Zamora Zullyt R^{a,*}, Molina Vivian^a, Mena Licet^a, Ledea Oscar L^b

^a Departamento de Farmacología Experimental. Unidad de Productos Naturales, CNIC, La Habana, Cuba.

^b Departamento de Química Analítica, Unidad de Sustancias Ozonizadas. CNIC, La Habana, Cuba.

* zullyt.zamora@cnic.edu.cu

Recibido: 22-03-2018; Aceptado: 22-08-2018

RESUMEN

La inflamación aguda persistente conduce a la cronicidad del proceso inflamatorio. Estudios anteriores demostraron el efecto anti-inflamatorio del aceite de girasol ozonizado. Se evaluó el efecto anti-inflamatorio del aceite de girasol ozonizado (AGO) y formulaciones en crema, en el modelo de inflamación crónica inducido en ratas. Los animales (Ratas Sprague Dawley macho), se dividieron en ocho grupos experimentales de diez animales cada uno, se les indujo la inflamación crónica (granuloma por algodón): control positivo, dos controles vehículos (aceite de girasol y placebo de formulación), grupo tratado con AGO y tres grupos con formulaciones semisólidas (FSS) (10, 30 y 50 % de AGO) y otro con crema de indometacina al 4%. Todos los tratamientos se administraron por vía tópica durante los seis días consecutivos, posteriores a la inducción del granuloma. Se determinó como variable de eficacia, el peso húmedo (PH) y el peso seco (PS) de los granulomas. El AGO redujo de forma significativa y moderada tanto el PH (35,63 %) como el PS (38,48 %) del granuloma, comparado con el grupo control. De manera similar, las FSS de AGO (10, 30 y 50 %) inhibieron de forma significativa y moderada, el PH (37,02; 35,83 y 40,80 %, respectivamente) y el PS (42,9; 43,9 y 45, 5%, respectivamente), del granuloma en comparación con el grupo control. Los resultados de este estudio demuestran el efecto anti-inflamatorio del AGO y de las FSS a base de AGO, aplicados tópicamente, durante seis días consecutivos, en la zona del granuloma inducido experimentalmente por la mota de algodón en ratas.

Palabras clave: inflamación; granuloma; ratas; aceite de girasol ozonizado; formulación semisólida

ABSTRACT

Persistent acute inflammation leads to the chronicity of the inflammatory process. Previous studies have demonstrated the anti-inflammatory effect of ozonized sunflower oil. The anti-inflammatory effect of ozonized sunflower oil (OSO) and cream formulations were evaluated in the chronic inflammation model induced in rats.

The animals (male, Sprague Dawley rats) were divided into eight experimental groups and chronic inflammation (cotton granuloma) was induced: positive control, two control vehicles (sunflower oil and placebo formulation), OSO treated group and three groups with semisolid formulations (10, 30 and 50% of OSO) and another one with 4% indomethacin cream. All treatments were administered topically during six consecutive days after granuloma induced. The wet weight (WW) and the dry weight (DW) of the granulomas were determined as an efficacy variable. The OSO significantly and moderately reduced both WW (35.63%) and DW (38.48%) of the granuloma compared to the control group. Similarly, OSO formulation (10, 30 and 50%) significantly and moderately inhibited the WW (37.02, 35.83 and 40.80%, respectively) and the DW (42.9, 43.9 and 45.5%, respectively) of the granuloma compared to the control group. As conclusion, in this study was demonstrate anti-inflammatory effect of OSO and OSO formulations, applied topically, during six consecutive days, in the experimental granuloma area induced by cotton swabs.

Keywords: Inflammation; granuloma; rats; Ozonized sunflower oil; semisolid formulations

INTRODUCCIÓN

La inflamación es una respuesta biológica transitoria del tejido frente a un estímulo nocivo, tal como una lesión, antígenos exógena o endógena, en el intento de eliminar el estímulo y reparar el tejido dañado para lograr la reparación de este y retornar a la homeostasis (Egger, 2012). Aunque la inflamación es un mecanismo de defensa positivo del organismo, se considera como la llamada “espada de doble filo”, ya que esta reacción de forma prolongada y descontrolada puede ser (Mizuno *et al*, 2011), reconocida como causa de diferentes desórdenes crónicos, como la diabetes, alergias, aterosclerosis, obesidad, cáncer y el dolor. Por otra parte, la disfunción inflamatoria que da paso a las enfermedades crónicas, incrementa el costo de la atención médica por parte de la sociedad (Mizuno *et al*, 2011; CIHR, 2012). La inflamación aguda persistente conduce a la cronicidad del proceso inflamatorio, el cual se caracteriza por el crecimiento del tejido proliferativo, la formación del granuloma y la reparación del mismo (Eddouks *et al*, 2012). Dentro del proceso inflamatorio se involucran sustancias que actúan mediadores, que incluyen las especies reactivas del oxígeno (EROs) derivados de los neutrófilos, el óxido nítrico (Saha *et al*, 2004), las prostaglandinas y las citocinas (Valko *et al*, 2006; Nair *et al*, 2013). La inflamación crónica se caracteriza por la infiltración de monocitos-macrófagos y la proliferación de fibroblastos (Hosseinzadeh *et al*, 2000) que conjuntamente con la acumulación de líquido, apoptosis y el daño a los tejidos adyacentes, se origina el llamado granuloma. La inflamación crónica se encuentra vinculada con enfermedades como la dermatitis atópica entre otras como las dermatitis causadas por dermatofitos (Galli y Tsai, 2012; De Sousa *et al*, 2015).

Hasta el presente, los procesos inflamatorios son tratados con fármacos antiinflamatorios convencionales, clasificados en: esteroideos (prednisona, betametasona, triamcinolona, etc.) y no esteroideos, como la aspirina, indometacina, naproxeno, ibuprofeno, entre otros, cuya acción anti-inflamatoria se sustenta

principalmente por la inhibición de la enzima ciclooxigenasa tipo 2 (COX-2) (Su *et al*, 2011). Sin embargo, el uso prolongado de estos fármacos se encuentra asociado a diversas reacciones adversas, como ulceraciones, perforación, irritación gástrica, hematoquecia (hemorragia digestiva baja) (Chan *et al*, 2010; Roth, 2012), complicaciones renales, hepáticas e incluso cardiovasculares (Harirforoosh *et al*, 2013).

Por tal motivo, la búsqueda de sustancias de origen natural o sintético para el tratamiento de los procesos inflamatorios que sean seguras y bien toleradas constituye una problemática actual a pesar del desarrollo vertiginoso de la industria farmacéutica. El aceite de girasol ozonizado (AGO) llamado comercialmente OLEOZON® tópico, contiene una mezcla de principios activos (Hidroperóxidos, peróxidos, aldehídos, ozónidos) obtenidos a partir de la ozonización parcial del aceite de girasol (Díaz *et al*, 2001; Díaz *et al*, 2005; Díaz *et al*, 2008; Ledea, 2004; Ledea *et al*, 2005).

El efecto anti-inflamatorio de los aceites ozonizados ha sido demostrado tanto *in vitro* (Tamoto *et al*, 2005; Nakamuro *et al*, 2005) como *in vivo* (Zamora *et al*, 2006). En un modelo experimental de orto queratosis, la aplicación de AGO demostró reducir la liberación de calcio, lo cual se acompañó de la estimulación de la actividad de la superóxido dismutasa (SOD), como enzima antioxidante (Martínez *et al*, 1997). Tal como se ha demostrado en diferentes modelos experimentales (Sánchez *et al*, 1998; Barroetabeña *et al*, 2002), la acción cicatrizante de los aceites ozonizados (AOs) es un hecho. Dicha acción farmacológica, se fundamentó mediante la modulación del infiltrado inflamatorio, el incremento de la expresión de factores de crecimiento, que garanticen la formación del tejido de granulación y la formación de colágeno (Sakazaki *et al*, 2007; Kim *et al*, 2009; Valachi *et al*, 2011; Pai *et al*, 2014). Adicionalmente, el poder germicida de amplio espectro (Lezcano *et al*, 2000; Sechi *et al*, 2001) es otra de las acciones farmacológicas descrita para los AOs, que favorece entonces, el proceso de cicatrización conjuntamente con la respuesta antiinflamatoria local.

La evaluación toxicológica del AGO (irritabilidad dérmica y oftálmica en conejos), conjuntamente con la evaluación del posible efecto fototóxico en curieles avala su seguridad para ser aplicado tópicamente (Díaz *et al*, 2006). Los ensayos de teratogenicidad y genotoxicidad, de forma similar evidencian la seguridad del AGO, administrado por vía oral (Rodríguez *et al*, 1990; Remigio *et al*, 1998).

Debido a la composición oleosa del AGO se requiere en oportunidades emplear otra forma farmacéutica que permita incrementar su biodisponibilidad o dirigirlo íntegramente al sitio donde se requiere la acción. La utilización de cremas (semisólidas) que contengan al medicamento es una línea de mucho interés. Dichas formulaciones semisólidas, como la crema a base de aceite de teobroma ozonizado (ATO), mostró moderado efecto antiinflamatorio en el modelo del edema en la oreja del ratón inducido por aceite de crotón (Díaz *et al*, 2008). En un estudio, realizado en ratas con lesiones dérmicas inducida por radiaciones (UV), se demostró que la crema a base de ATO aplicado sobre las lesiones, incrementó de forma significativa la actividad de las enzimas antioxidantes superóxido dismutasa (SOD) y glutatión peroxidasa (GPx). El incremento de la actividad enzimática antioxidante (SOD y GPx), se sugiere como uno de los mecanismos mediante el cual la crema de ATO ozonizado redujo el

proceso inflamatorio en la piel inducido por las radiaciones en las ratas (Sánchez *et al*, 2011). El ensayo toxicológico de irritabilidad dérmica y oftálmica en conejos, demostró la seguridad de los productos crema cosmética a base de ATO al 40 % y al 100 % (Díaz *et al*, 2010).

Por tanto, el objetivo de este estudio es evaluar los efectos de la aplicación de una formulación semisólida de AGO y el AGO tópico en el modelo de inflamación crónica (granuloma por algodón) en ratas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Las sustancias de estudio son el aceite de girasol ozonizado (AGO) nombrado comercialmente (OLEOZON[®] tópico) (DALMER, Cuba), aceite de girasol virgen y lanolina (vehículos), formulaciones semisólidas (FSS) de AGO e Indometacina 4 % (crema) (LABIOFAM, Cuba) como fármaco de referencia.

Animales

Se utilizaron ratas Sprague Dawley machos (250-300 g de peso corporal) provenientes del CENPALAB (Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio, La Habana), las cuales se adaptaron durante siete días a las condiciones de laboratorio (temperatura de 20 a 25 °C, humedad relativa de 60 ± 10 %, ciclos de luz/oscuridad de 12 horas) con libre acceso al agua y la comida. Toda la ejecución del estudio, se realizó mediante el estricto cumplimiento de las normas éticas establecidas para los ensayos en animales de laboratorio,

Descripción de los grupos experimentales y niveles de dosis

Una vez culminada la cuarentena, las ratas se distribuyeron en ocho grupos de diez animales cada uno a los que se les indujo el granuloma por algodón: un grupo control sin tratamiento, otro control con aceite de girasol virgen, un grupo con AGO tópico, el placebo de la FSS, tres grupos tratados con FSS de AGO (10, 30 y 50 %) y otro con crema de indometacina 4%. Los tratamientos (vehículos y aceite de girasol ozonizado (AGO) (OLEOZON[®] tópico) y la FSS de AGO) se aplicaron por vía tópica (200 µl/área del granuloma), la crema de indometacina (0,1 g/área del granuloma). Las cantidades de cada sustancia fueron las suficientes como para cubrir la zona del granuloma, se utilizó la vía tópica, las aplicaciones comenzaron una hora después de implantada la mota de algodón, durante seis días consecutivos.

Inducción del granuloma por algodón

Las ratas fueron anestesiadas ligeramente bajo atmosfera de halotano utilizando una campana de cristal. Previo rasurado de la zona en la mitad dorso-lateral izquierda, se les realizó una incisión creando un túnel subcutáneo mediante pinzas romas donde se colocó una mota de algodón estéril de 50 mg de peso (Carbajal *et al*, 1998). Posteriormente la herida se suturó.

Peso del granuloma

Una vez extraídos los granulomas de cada animal, se determinó el peso húmedo de estos. Se colocaron de forma individual en pesafiltros (previamente pesados), se

pesaron en una balanza analítica y se calculó en peso húmedo. El peso del pellet de algodón (50 mg) se le sustrajo al peso húmedo del granuloma.

El peso seco (PS) del granuloma se calculó de forma similar, previo secado de este en una estufa a 60 °C durante 24 h hasta alcanzar un peso constante. El peso del pellet de algodón (50 mg) se le sustrae al peso del granuloma y el peso seco se utilizó como expresión de la formación del granuloma. El porcentaje de inhibición se expresó tomando como referencia el peso del granuloma del grupo control.

Análisis estadístico

Los datos se expresaron como la media \pm el error estándar de la media. La comparación entre los grupos se realizó mediante el ensayo no paramétrico de la U de *Mann-Whitney*. El nivel de significación estadística fue seleccionado con anterioridad $\alpha=0.05$. El análisis se realizó mediante el programa estadístico *Statistic* para Windows (Release 4.2, Stat Soft, Inc USA). Para evaluar la relación dosis dependiente, se usó el análisis de regresión lineal usando el programa *Bioestadística Primer* (Stanton A, Glantz; copyright (c) 1992, McGraw-Hill, Inc versión 3.01).

RESULTADOS

Los resultados del efecto de las aplicaciones tópicas de los tratamientos de las sustancias en ensayo (AGO y FSS (10, 30 y 50 % de AGO) sobre los parámetros de peso húmedo (PH) y PS en el modelo del granuloma inducido por algodón en ratas. El grupo control mostró una marcada respuesta inflamatoria determinada por el incremento tanto del PH como del PS del pellet de algodón, partiendo de un peso inicial de 50 mg. (tabla 1).

Tabla 1: Efectos del AGO y la formulación semisólida a base de AGO sobre los parámetros de peso húmedo y seco del granuloma inducido por algodón en ratas.

Grupos	PH (mg)	I (%)	PS (mg)	I (%)
Control (+)	1 834,62 \pm 109,30		279,40 \pm 92,44	
AG (virgen)	1 213,47 \pm 102,38** a	33,85	174,33 \pm 18,25** a	37,6
AGO	1 180,85 \pm 65,93***a	35,63	164,94 \pm 8,34*** a	38,48
Placebo (FSS)	1 301,06 \pm 104,77 ** b	29,08	191 \pm 19,26 ** b	17,17
FSS (10 %)	1 155,42 \pm 31,78*** b	37,02	159,34 \pm 4,61*** bc	42,9
FSS (30 %)	1 177,17 \pm 54,42***b	35,83	156,55 \pm 5,60*** c	43,9
FSS (50 %)	1 086,02 \pm 64,99***b	40,80	152,88 \pm 8,18*** c	45,5
Indometacina 4%	655,34 \pm 43,80*** #	64,27	79,81 \pm 6,52*** #	71,3

FSS: Formulación semisólida, AGO: Aceite de girasol ozonizado, AG: Aceite de girasol, I: inhibición, PH: Peso húmedo, PS: Peso seco, *p < 0,05; ** p < 0,01; ***p < 0,001 Comparación vs Control (Test de la U de Mann Whitney). letras: Comparación vs Placebo o AG. #: Comparación vs indometacina.

La aplicación tópica durante seis días del AGO redujo de forma significativa y moderada tanto el PH (35,63 %) como el PS (38,48 %) del granuloma, comparado con el grupo control. De manera similar, las FSS de AGO (10, 30 y 50 %) inhibieron de forma significativa y moderada, el PH (37,02; 35,83 y 40,80 %, respectivamente) y el PS (42,9; 43,9 y 45,5 %, respectivamente), del granuloma en comparación con el grupo control, siguiendo este último parámetro de PS, una respuesta dependiente de la dosis

para $p < 0,05$. El grupo de animales que recibió tratamiento con la crema de indometacina 4 %, experimentó una reducción significativa y marcada tanto del PH como del PS (64, 27 y 71,3 %, respectivamente) del granuloma inducido por algodón, en comparación con el grupo de animales control y al resto de los grupos estudiados (tabla 1).

Las sustancias vehículo (AG y placebo de la FSS) también inhibieron de forma significativa y moderada tanto el PH (29,08 y 17,17 %, respectivamente) como el PS (37,6 y 38,48 %, respectivamente), en comparación con el grupo control. El análisis estadístico entre los grupos AG y AGO no mostraron diferencias significativas para ambos parámetros analizados (PH y PS), por lo que ambas sustancias inhibieron de forma similar la formación del granuloma. Si bien, la comparación entre el vehículo de las FSS de AGO no alcanzó significación estadística con respecto a los grupos de FSS (10, 30 y 50 %) para el PH, el porcentaje de inhibición del PS de las FSS de 30 y 50 % sí difieren significativamente con respecto al grupo tratado con el vehículo de la FSS. El comportamiento del PS de los granulomas, de cada uno de los grupos estudiados, se representa en la figura 1 para mejor visibilidad de los resultados.

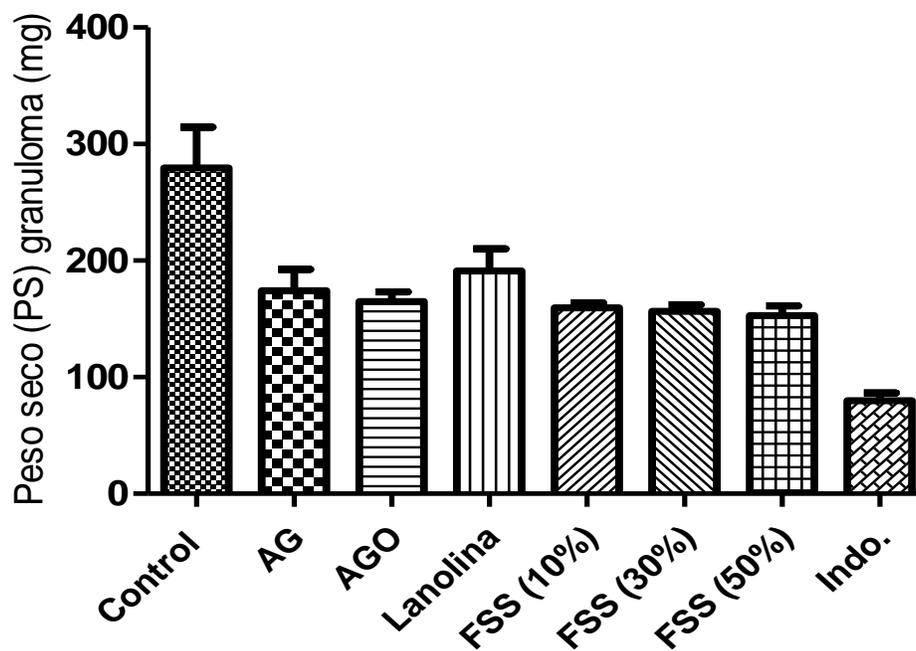


Figura 1. Representación gráfica del comportamiento del peso seco de los granulomas para cada uno de los grupos experimentales.

DISCUSIÓN

En este estudio se demostró que las aplicaciones tópicas de ambas sustancias en ensayo, el AGO y las FSS de AGO (10; 30 y 50 %), inhibieron de forma significativa y moderada el peso del granuloma, inducido a partir de la implantación de una mota de algodón en las ratas, en comparación con el grupo control sin tratamiento. Tal como se esperaba, la implantación subcutánea de una mota de algodón (50 mg) en el dorso

lateral de las ratas produjo la formación de un granuloma, corroborando así, la validez del modelo experimental empleado bajo nuestras condiciones de trabajo; resultado que estuvo en correspondencia con estudios anteriores (Carbajal *et al*, 1998).

La formación del granuloma consta de tres fases fundamentales, la transudativa, exudativa y la proliferativa de la inflamación crónica (Cuman *et al*, 2001; Kumar *et al*, 2005). La fase transudativa se expresa por el aumento del peso húmedo del pellet durante las primeras tres horas tras implantar la mota de algodón, la exudativa ocurre entre las 3 y 72 h y en ella ocurre un incremento severo de la permeabilidad vascular. Mientras que la fase proliferativa se caracteriza por el incremento del peso seco del granuloma la cual ocurre entre los 3 y 6 días posteriores a la implantación de la mota de algodón. Así, el fluido absorbido por el pellet influye considerablemente en el peso húmedo del granuloma, mientras que el peso seco se correlaciona con la cantidad de tejido granulomatoso formado (Kumar *et al*, 2005). Basándonos en lo anterior, nuestros resultados evidencian que tanto el AGO como las FSS a base de AGO (10, 30 y 50 %) aplicadas de forma tópica, influyeron de forma significativa en ambos procesos de la formación del granuloma, en la fase transudativa, mediante la disminución del PH y en la fase proliferativa, por la reducción del PS del granuloma.

Este resultado constituye la primera evidencia experimental sobre el efecto antiinflamatorio tanto del AGO como de las FSS a base de AGO, en la formación del granuloma inducido por algodón en ratas (modelo clásico de inflamación crónica). La acción antiinflamatoria de ambas sustancias (AGO y FSS a base de AGO) se encuentra en correspondencia con resultados anteriores (Zamora *et al*, 2006), donde el AGO inhibió el edema y la infiltración de células inflamatorias en el tejido, inducido por aceite de crotón en ratones. Así, también la formulación de aceite de teobroma ozonizado (ATO), redujo la inflamación aguda inducida por el aceite de crotón en ratones (Díaz *et al*, 2010).

Estudios *in vitro* demostraron que los ozónidos formados a partir de la ozonización de los aceites inhibieron la síntesis de prostaglandina E₂ (PgE₂). Como resultado de la reducción de la actividad de la enzima ciclooxigenasa 2 (COX-2), siendo esta la vía principal de la producción de dicha prostaglandina, en macrófagos activados con lipopolisacárido; (Tamoto *et al*, 2005) proponiéndose este, como mecanismo antiinflamatorio principal fundamental para los AOs. Aunque se carece de evidencias *in vivo* que fundamente dicho mecanismo, consideramos apropiado sugerir que el efecto antiinflamatorio de ambas sustancias (AGO y las FSS de AGO) mostrados en nuestro estudio pudieran estar asociados a la inhibición de la transcripción nuclear del factor NF-κB y así reducir entonces la expresión nuclear de COX-2 y disminuir los niveles de PgE₂ (Tamoto *et al*, 2005).

La infiltración de células inflamatorias en la zona de implantación del granuloma constituye la base fundamental del mecanismo fisiopatológico de respuesta para la formación del mismo (Hosseinzadeh *et al*, 2000). El proceso inflamatorio se encuentra asociado a la generación de EROs y especies reactivas del nitrógeno (Jung *et al*, 2005). Recientemente fue demostrado que el tejido granulomatoso inducido por la mota de algodón se asoció a la presencia de altos niveles de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico, como indicador de peroxidación lipídica y de la mieloperoxidasa,

acompañado por la reducción del contenido de glutatión reducido (Muthuraman *et al*, 2011). Considerando que el AGO aplicado de forma tópica en ratas indujo la activación de la enzima antioxidante SOD (Martínez *et al*, 1997) y que la formulación de ATO revirtió el daño inducido por UV en la piel de las ratas mediante el incremento de la actividad de la enzimas antioxidantes SOD y GPx (Sánchez *et al*, 1998), se sugiere entonces que el efecto estimulador de la actividad de las enzimas antioxidantes endógenas sea unos de las acciones pleiotrópicas del AGO, que como parte indisoluble del resto de las otras acciones farmacológicas ya demostradas, favorecen la prevención de la formación del tejido granulomatoso demostrado en este estudio.

La acción antiinflamatoria evidenciada por el AG aplicado tópicamente, como resultado de este estudio, corresponde con los alcanzados en otros estudios que demuestran la acción antiedematosa del AG, tanto en el modelo del edema inducido por aceite de crotón (Zamora *et al*, 2006), como en el de inflamación por carragenina en ratas (Odabasoglu *et al*, 2008). De forma similar, el vehículo (lanolina) de la FSS utilizada en este ensayo redujo la formación del granuloma siendo esto de esperar ya que, la lanolina está compuesta por ácidos grasos obtenidos a partir de las glándulas sebáceas de las ovejas y se ha demostrado que posee actividad antiinflamatoria y cicatrizante (Abou-Dakn *et al*, 2010).

Realizando un análisis crítico de los resultados alcanzados en nuestro estudio podemos plantear que, si bien la inhibición del proceso inflamatorio de origen granulomatoso logrado tanto por el AGO como por las formulaciones de AGO fueron similares a los de los grupos tratados con sus respectivos vehículos (AG y lanolina), no descartamos las grandes posibilidades que poseen estas formulaciones a base de sustancias ozonizadas para revertir la respuesta inflamatorio de causa variada (infecciosa, parasitaria e incluso alérgica). Hecho que se fundamenta sobre la base de la actividad farmacológica principal (germicida) del AGO (Ledea *et al*, 2010). Por tanto, el efecto antiinflamatorio ya sea proporcionado por los ozónidos, hidroperóxidos y/o aldehídos e incluso por los propios ácidos grasos (mayoritario ácido linoléico) presentes aún en la porción de AG que no fue transformada durante el proceso de ozonización (Ledea *et al*, 2005), se considera una acción farmacológica secundaria que favorece positivamente la reversión del daño inducido inicialmente.

Aunque el mecanismo anti-inflamatorio específico del AGO y de la FSS a base de AGO sobre la fase proliferativa en este modelo no es aún conocido, se puede hipotetizar de forma general que ambas propiedades (estimulador de enzimas antioxidantes y antiedematosa), según describen resultados anteriores, son los responsables de dicha acción farmacológica. Considerando que este estudio constituye la primera evidencia del efecto anti-inflamatorio del AGO y las FSS de AGO (10, 30 y 50 %) en la formación del granuloma, se sientan las bases fundamentales para la realización de estudios posteriores, para los cuales se sugiere entonces, la evolución de los efectos de estas sustancias y sus principios activos sobre los parámetros de estrés oxidativo en el modelo del granuloma inducido por algodón en ratas.

CONCLUSIONES

Los resultados de este estudio demuestran el efecto anti-inflamatorio del AGO y de las

FSS a base de AGO, aplicados tópicamente durante seis días en la zona del granuloma inducido experimentalmente por la mota de algodón en ratas.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abou-Dakn, M., Fluhr, J.W., Gensch, M., & Wockel, A. (2010). Positive effect of HPA Lanolin versus expressed breastmilk on painful and damaged nipples during lactation. *Skin Pharmacol Physiol*, 24,27-35.

Barroetabeña, A.R., Sánchez, A.A., & Guerra, J.M. (2002). Acción del aceite ozonizado sobre el proceso inflamatorio en heridas de piel de animales de experimentación. *Correo Científico Médico de Holguín*, 6(2).

Carbajal, D., Molina, V., Valdés, S., Arruzazabala, M.L., Más, R., & Magraner, J. (1998). Anti-inflammatory activity of D-002: an active product isolated from beeswax. *Prostagl Leukotr Essent Fatty Acids*, 59 (4), 235-238.

Chan, F.K., Cryer, B., Goldstein, J.L., Lanus, A., Peura, D.A., Scheiman, J.M., *et al.* (2010). A novel composite endpoint to evaluate the gastrointestinal (GI) effects of nonsteroidal antiinflammatory drugs through the entire GI tract. *Journal of Rheumatology*, 37 (1), 167-174.

CIHR Canadian Institutes of Health Research. Inflammation in chronic disease initiative. 2012, <http://www.cihr-irsc.gc.ca/e/44070.html>

Cuman, R.K.N., Bersani-Amado, C.A., & Fortes, Z.B. (2001). Influence of type 2 diabetes on the inflammatory response in rats. *Inflammation Research*, 50 (9): 460-465.

De Sousa, M.G.T., Santana, G.B., Criado, P.R., & Benard, G. (2015). Chronic widespread dermatophytosis due to *Trichophyton rubrum*: a syndrome associated with a Trichophyt n-specific function a defect of phagocytes. *Front. Microbiol*, 6, 801.

Díaz, M., García, G., García, K., Sánchez, Y., & Tillan, J. (2006). Evolución de la irritabilidad dérmica, oftálmica y el efecto sensibilizante del OLEOZON® tópico. REDVET, VII (11). <http://www.veterinaria/revistas/redvet/01111106.html>.

Díaz, M., Gavín, J., Ledea, O., Hernández, F., Alaiz, M., & Garcés, R. (2005). Spectroscopic Characterization of Ozonated Sunflower Oil. *Ozone Science and Engineering*, 27 (3), 247-253.

Díaz, M., Gavín, J.A., & de Andrade, J.B. (2008). Structural characterization by Nuclear Magnetic Resonance of ozonized triolein. *Grasas y Aceites*, 59 (3), 274-281.

Díaz, M., Lezcano, I., Molerio, J., & Hernández, F. (2001). Spectroscopic characterization of ozonides with biological activity. *Ozone Sci Eng*, 23(1),35-40.

Díaz, M.F., Romay, Ch., Rojas, E., & González, R. (2008). Efecto del aceite de teobroma ozonizado sobre la respuesta inflamatoria inducida en el modelo de edema en la oreja del ratón. *RECVET*, 3(9). <http://www.veterinaria.org/revistas/recvet/n090908.html>

Díaz, M.F., Sánchez, Y., García, K., Meneau, R.I., & García, G. (2010). Evaluación

del poder irritante de la Crema Cosmética OZONOL®. REDVET. Revista electrónica de Veterinaria. 2010; 11(4). <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n040410.htm>.

Eddouks, M., Chattopadhyay, D., & Zeggwagh, N.A. (2012). Animal models as tools to investigate antidiabetic and anti-inflammatory plants. *Evid Based Complement Alternat Med*, 142087.

Egger, G. (2012). In search of a germ theory equivalent for chronic disease. *Preventing Chronic Disease*, 9, 1-7.

Galli, S.J., & Tsai, M. (2012). IgE and mast cells in allergic disease. *Nature Medicine*, 18 (5), 693-704.

Harirforoosh, S., Asghar, W., & Jamali, F. (2013). Adverse effects of nonsteroidal antiinflammatory drugs: an update of gastrointestinal, cardiovascular and renal complications. *J Pharm Pharm Sci*, 16, 821-847.

Hosseinzadeh, H., Ramezani, M., & Salmani, G. (2000). Antinociceptive, anti-inflammatory and acute toxicity effects of *Zataria multiflora* Boiss extracts in mice and rats. *Journal of Ethnopharmacology*, (3), 379-385.

Jung, H.J., Nam, J.H., & Choi, J. (2005). Anti-inflammatory effects of *chiisanoside* and *chiisanogenin* obtained from the leaves of *Acanthopanax chiisanensis* in the carrageenan and Freund's complete adjuvant-induced rats. *J Ethnopharmacol*, 97, 359-367.

Kim, H., Su, N., Sun, U., Han, Y.W., Kim, K.M., Kang, H., *et al.* (2009). Therapeutic Effects of Topical Application of Ozone on Acute Cutaneous Wound Healing. *J Korean Med Sci*, 24, 368-374.

Kumar, S.S., Sivakumar, T., Chandrasekar, M.J., & Suresh, B. (2005). Evaluation of anti-inflammatory activity of *Eclipta alba* in rats. *Ancient Science of Life*, 24 (3), 112-118.

Ledea, O.E. (2004). Estudio de la composición química del aceite de girasol ozonizado OLEOZON®. *Revista CENIC Ciencias Químicas*, 35 (1), 33-34.

Ledea, O.E., Curtiellas, V., Molerio, J., Garcés, R., Díaz, M., Martínez-Force, E., *et al.* (2010). Evidencias del mecanismo oxidante en la actividad antibacteriana del aceite de girasol ozonizado. *Revista CENIC, Ciencias Químicas*, 41(4), 1-13.

Ledea, O.E., González, M., Hernández, C., López, A., Moleiro, J. & Rosado, A. (2005). Validación de un método espectrofotométrico para la determinación del contenido de aldehídos en el aceite de girasol ozonizado (OLEOZON®). *Revista CENIC Ciencias Químicas*, 36 (3), 149-155.

Ledea, O.E., Martínez, E.F., Garcés, R.M., Alaiz, M., Díaz, M.G., Dobarganes, C., *et al.* (2005). Aplicación de Métodos Cromatográficos en el estudio de la Composición Química del Aceite de Girasol Ozonizado "OLEOZON®" *Revista CENIC Ciencias Químicas*, 36, No. Especial.

Lezcano, I., Nuñez, N., Espino, M., & Gómez, M. (2000). Antibacterial activity of ozonized sunflower oil, OLEOZON, against *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus*

epidermitis. Ozone Sci Eng, 22, 207-214.

Martínez, G., Merino, N., & Sam, S. (1997). Efecto histológico y bioquímica del OLEOZON® en el modelo de la cola del ratón. *Revista CENIC. Ciencias Biológicas*, 28 (1), 31-34.

Mizuno, Y., Jacob, R.F., & Preston, M.R. (2011). Inflammation and the development of atherosclerosis-effects of lipid-lowering therapy. *Journal of Atherosclerosis and Thrombosis*, 18 (5), 351-358.

Muthuraman, A., Sood, Sh., & Kumar, S.S. (2011). The antiinflammatory potential of phenolic compounds from *Emblica officinalis L.* in rat. *Inflammopharmacol*, 19, 327-334.

Nair, V., Singh, S., & Kumar, Y.G. (2013). Anti-granuloma activity of *Coriandrum sativum* in experimental models. *J Ayurveda Integr Med*, (1), 13-18.

Nakamuro, K., Sakasaki, H., Okuno, T., & Ueno, H. (2005). Suppressive effects on immune cells and oxidative cytotoxicity of ozonized olive oil. IOA. 17 Word Ozone Congress, Stranburg, France.

Odabasoglu, F., Halici, Z., Cakir, A., Halici, M., Aygun, H., Suleyman, H., *et al.* (2008). Beneficial effects of vegetable oils (corn, olive and sunflower oils) and alpha-tocopherol on anti-inflammatory and gastrointestinal profiles of indomethacin in rats. *Eur J Pharmacol*, 591(1-3), 300-306.

Pai, S.A., Gagangras, S.A., Kulkarni, S.S., & Majumdar, A.S. (2014). Potential of ozonated sesame oil to augment wound healing in rats. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 76(1), 87-92.

Remigio, A.C., González, Y., Zamora, Z., Fonseca, G., & Molerio, J. (1998). Evaluación genotóxica del OLEOZON® mediante los ensayos de micronúcleos en médula ósea y sangre periférica de ratón. *Revista CENIC, Ciencias biológicas*, 29 (3), 200-202.

Rodríguez, M.D., Menéndez, S., Gómez, M., *et al.* (1990). Estudio teratogénico del aceite ozonizado. Primer Congreso Iberoamericano de Aplicaciones del Ozono. CNIC-CIMEQ, 31 de octubre de 1990.

Roth, S.H. (2012). Coming to terms with nonsteroidal anti-inflammatory drug gastropathy. *Drugs*, 72, 873-879.

Saha, K., Lajis, N.H., Israif, D.A., Hamzah, A.S., Khozirah, S., Khamis, S., *et al.* (2004). Evaluation of antioxidant and nitric oxide inhibitory activities of selected Malaysian medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*, 92(2-3), 263-267.

Sakazaki, F., Kataoka, H., Okuno, T., Ueno, H., Semma, M., Ichikawa, A., *et al.* (2007). Ozonated Olive Oil Enhances the Growth of Granulation Tissue in a Mouse Model of Pressure Ulcer. *Ozone Sci Eng*, 29, 503-507.

Sánchez, A.A., Díaz, P.R., Rodríguez, G.G., Leyva, E.S., Díaz, E.S., & Borrego, L.P. (1998). Acción del aceite ozonizado sobre la cicatrización de heridas de piel en animales de experimentación. *Revista CENIC Ciencias Biológicas*, 29 (3), 181-183.

- Sánchez, Y., Diaz, M.F., Hernández, F., Gil, D., & Garcia, G. (2011). Antioxidant effects of an ozonized theobroma oil formulation on damaged-inflammatory rat skin. *Grasas y aceites*, 62(1), 105-110.
- Sechi, L.A., Lezcano, I., Nuñez, N., Espim, M., Dupre, I., & Pinna, A. (2001). Antibacterial Activity of Ozonized Sunflower Oil (OLEOZON). *J Appl Microbiol*, 90(2), 279-284.
- Su, S., Wang, T., Duan, J.A., Zhou, W., Hua, Y.Q., Tang, Y.P., *et al.* (2011). Anti-inflammatory and analgesic activity of different extracts of *Commiphora myrrha*. *Journal of Ethnopharmacology*, 134(2), 251-258.
- Tamoto, K., Yamazaki, A., Noche, H., & Miura, T. (2005). Ozonides of olive oil and methyl oleate inhibit the expression of cyclooxygenase-2 through the suppression of I κ B/ NF κ B- dependent pathway in lipopolisaccharide-stimulated macrophage-like THP-1 cells. IOA 17th World Ozone Congress- Stranburg, France.
- Valacchi, G., Lim, Y., Belmonte, G., Miracco, C., Zanardi, I., Bocci, V., *et al.* (2011). Ozonated sesame oil enhances cutaneous wound healing in SKH1 mice. *Wound Repair Regen*, 19(1):107-115.
- Valko, M., Rhodes, C.J., Moncol, J., Izakovic, M., & Mazur, M. (2006). Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions*, (1), 1-40.
- Zamora, Z., González, Y.C., & Ledón, N. (2006). Effect of Ozonized sunflower oil on Myeloperoxidase activity in the model of ear oedema in mouse. *Revista Electrónica de Veterinaria REDVET*, VII (12).