

artículo original

Ozonoterapia en el tratamiento de la vulvo-vaginitis recurrente por *Candida albicans*

Ozone therapy in the treatment of recurrent vulvo-vaginitis by *Candida albicans*

Dra. Adriana Schwartz

MD Ginecóloga-Obstetra. Directora científica Clínica Fiorela. Presidenta de la Asociación Española de Profesionales Médicos en Ozonoterapia (AEPROMO) www.aepromo.org Presidenta de la Federación Internacional de Ozonoterapia (IMEOF), www.imeof.org Secretaria científica del Comité Científico Internacional de Ozonoterapia (ISCO3), www.isco3.org

Palabras clave

vulvo-vaginitis,
ozonoterapia,
aceite
ozonizado,
Candidiasis,
insuflación
vaginal, *Candida
albicans*,
Oleosar^R.

Resumen

La vaginitis causada por *Candida albicans* es la enfermedad ginecológica más común encontrada en la atención médica primaria. La vulvo-vaginitis por candida la hace un problema sanitario de indudable importancia por su alta frecuencia, y su diagnóstico en ocasiones resulta difícil, porque puede tener manifestaciones simples o combinaciones de síntomas de diferentes etiologías. El objetivo del estudio fue valorar la eficacia de la ozonoterapia y la dieta en el tratamiento de la vulvovaginitis de repetición refractaria al tratamiento farmacológico habitual. Se seleccionaron 150 pacientes de edades que fluctuaban entre 30 a 50 años, que presentaban vulvovaginitis de repetición de cómo mínimo 6 meses de evolución, refractarias al tratamiento farmacológico habitual y con cultivos positivos a candidiasis. A todas las pacientes se les realizó una hidrocolonoterapia con agua ozonizada, se les instauró una dieta baja en carbohidratos de alto índice glucémico, se les administró duchas intravaginales diarias con agua ozonizada (10 sesiones), insuflaciones de ozono intravaginales diarias a una concentración de 20 µg/mL a una velocidad de 0,1 L/min durante 10 min (10 sesiones), seguidas de la aplicación de 1 mL de Fluvix (Gel con Factor de Crecimiento Epidérmico) aceite ozonizado (*Oleosar*^R, Lacoser, Italia) con índice de peróxido de 600 y 400 IP durante 10 días, 4 autohemoterapia mayor a 2.,0 µg una vez a la semana. Al final del tratamiento fue repoblada la flora vaginal con tabletas vaginales de *Lactobacillus* durante 7 días y repoblada la flora intestinal con *Lactobacillus* usando la vía oral, durante 1 mes. El 85% de las pacientes respondieron favorablemente al tratamiento, el 10% permanecieron asintomáticas durante un período de menos de un año y un 5% de las pacientes no respondieron al tratamiento. La terapia de ozono intravaginal, ofrece una alternativa eficaz al tratamiento convencional con fungicidas habituales. Se logró una remisión de los síntomas y cultivos negativos de exudados vaginales..

Keywords

vulvo-vaginitis,
ozone-therapy,
ozonized oil,
Candidiasis,
insufflation,
Candida albicans,
Oleosan^R

Abstract

Vaginitis caused by *Candida albicans* is the most common gynaecological disease found in the primary health care and makes a health issue of great importance because of its high frequency. The objective of the study was to assess the effectiveness of the ozone and diet therapy treatment of recurrent vulvo vaginal by *Candida albicans* infections. Patients (150) were selected with ages ranging from 30 to 50 years, with vulvo-vaginitis for at least 6 months of evolution, refractory to usual drug treatment and positive cultures for candidiasis.

It was performed one hydrocolonotherapy with ozonized water. It was given: diet low in carbohydrates of high glucemic index, daily intravaginal instillations with ozonized water (10 sessions), daily intravaginal ozone insufflations at concentration of 20 µg/mL at speed of 0.2 L/min during 10 min (10 sessions), application of ozonized oil (*Oleosan*^R, Lacoser, Italy) with peroxide number of 600 and 400, during 10 days, 4 major autohemotherapy at 2.0 µg once a week. At the end of treatment were repopulated the vaginal flora with *Lactobacillus* vaginal tablets for 7 days and repopulated the intestinal flora with lactobacillus using oral route, during 1 month. Results: 85% of patients favourably responded to treatment, 10% remained asymptomatic for a period of less than one year and 5% of patients did not respond to treatment. Intravaginal ozone therapy, offers an effective alternative to conventional treatment with usual fungicides, not only achieved a remission of symptoms and negative cultures of vaginal exudates in patients with vulvo-vaginitis, but also increased Ig A and *lactobacillus* in the vaginal epithelium. Also serves to restore the body's own defence abilities by stimulating the normalization of vaginal mucosa local immunity. Without producing a disturbing effect on the saprophytes.

Sugerencia sobre cómo citar este artículo:

Schwartz, Adriana. (2015). Ozonoterapia en el tratamiento de la vulvo-vaginitis recurrente por *Candida albicans*. *Revista Española de Ozonoterapia*. Vol. 5, nº 1, pp. 89-97.

Introducción

La consulta por vulvovaginitis es la enfermedad más común encontrada en la atención médica primaria¹ y que generalmente no se resuelve con facilidad. Su diagnóstico en ocasiones resulta difícil, porque puede tener manifestaciones simples o combinación de síntomas de diferentes etiologías², y a que la propia paciente, en la mayoría de las veces, se auto medica sin realizar una consulta médica^{2,3} creando una resistencia a los fármacos habituales. El uso y abuso extensivo de fungicidas, antibióticos y antisépticos vaginales, muy lejos de resolver el cuadro, más bien lo complica, esto lleva a explorar métodos alternativos o complementarios para resolver el problema⁴. Se establece que una vulvovaginitis de repetición es cuando el cuadro se reitera cuatro o más veces por año.

Para poder entonces realizar un buen diagnóstico y terapéutica es necesario individualizar perfectamente cada caso, ya que las candidiasis no complicadas responden perfectamente a los tratamientos comunes, incluyendo los que utilizan monodosis, mientras que las complicadas no responden en general a los mismos y requieren terapias prolongadas o profilácticas (profilaxis de la infección recurrente).

La vulvovaginitis cursa con secreciones con flujo espeso, blanquecino, abundante tipo quesillo con un olor característico, eritema, dolor, ardor, escozor e irritación. La vulvovaginitis infecciosa es la responsable del 90% de los restantes tipos de vaginitis, siendo las principales causas la Vaginosis Bacteriana, la Candidiasis y la Trichomoniasis⁵.

Se estima que el 75% de las mujeres han tenido candidiasis una vez en su vida y el 40% han presentado episodios recurrentes. La *Candida albicans* resulta ser el agente etiológico en el 85% de los casos, seguida de *Candida glabrata* con un 10% y *Candida tropicalis* con un 5%⁶. Bajo la influencia de los estrógenos, el epitelio produce glucógeno que se degrada por la acción de *Lactobacillus spp* a glucosa y finalmente a ácido láctico, este último mantiene un pH vaginal menor de 4,5, que excesivo de bacterias patógenas^{7,9}.

Objetivo

Teniendo en cuenta que una de las acciones biológicas del ozono es la activación del sistema Nrf2 a través de un estímulo moderado y controlado de estrés oxidativo, provocando una inhibición de la inflamación mediada por citoquinas a través de la inducción de la reductasa de leucotrieno B4. Por lo tanto, el sistema Nrf2 contribuye a la protección contra diversas patologías, incluyendo carcinogénesis, toxicidad hepática, respiratorio y enfermedades inflamatorias crónicas, la isquemia neuronal y problemas renales^{10,12}. Conociendo además que el ozono tiene efectos:

1) desinfectantes y tróficos directos, cuando es aplicado localmente. 2) Efecto antibacteriano y antiviral sistémico debido a una discreta formación de peróxidos. 3) Incrementa la deformidad de los glóbulos rojos con un relativo mejoramiento de la circulación sanguínea. 4) Mejora la entrega de oxígeno a los tejidos. 5) Mejora el metabolismo eritrocitario haciéndose más eficiente el metabolismo de la glucosa y que 6) Mejora el metabolismo de los ácidos grasos por la activación de enzimas antioxidantes encargadas de eliminar peróxidos y radicales libres. Se ha considerado como objetivo del presente trabajo demostrar la efectividad de la aplicación de la ozonoterapia en sus formas de aplicación tópica y sistémica en la vulvo-vaginitis recurrente por *Candida albicans spp*.

Materiales y Métodos

La investigación se llevó a cabo en Clínica Fiorela Madrid, durante dos años y medio (2010-2013), bajo la dirección de la Dra. Adriana Schwartz. Estudio monocéntrico observacional retrospectivo. Las pacientes seleccionadas que accedieron al programa firmaron un consentimiento informado detallado previo al inicio del estudio.

El protocolo de investigación fue sometido a discusión por los investigadores participantes, a su revisión y aprobación por el comité de ética y revisión institucional (Clínica Fiorela, Madrid). El protocolo se ejecutó solo después de su aprobación y cumplía y los procedimientos éticos para las investigaciones médicas en seres humanos establecidos en la Declaración de Helsinki emanada por la Asamblea Médica Mundial¹³.

Fueron incluidos 150 sujetos con diagnóstico de vulvo-vaginitis de repetición de cómo mínimo 6 meses de evolución refractarias al tratamiento farmacológico habitual y con cultivos positivos a candidiasis, de edades comprendidas entre 30 y 50 años y que mostraban su voluntad a través de su consentimiento informado de forma oral y escrita para participar en el estudio. Fueron excluidos sujetos con: 1) Embarazo y lactación, 2) Presencia de otras infecciones vaginales tales como: gonorrea, ureplasmosis, clamidiosis, papilloma virus, 3) Uso de fungicidas u otros medicamentos de aplicación local, durante el mes previo al tratamiento, 4) Participación en otro estudio clínico o utilización de algún fármaco en fase de experimentación, 5) La no voluntad del sujeto para participar en el estudio. Los criterios de salida fueron: Negativa del sujeto a continuar en el estudio, fallecimiento o aparición de enfermedad psiquiátrica.

Los criterios clínicos y microbiológicos de efectividad fueron 1) Curación clínica y microbiológica completa, 2) Ausencia de síntomas clínicos subjetivos, 3) Ausencia de alteraciones inflamatorias de la membrana de la mucosa vaginal, y Cultivos vaginales negativos tomados después de finalizado el tratamiento.

Se consideró el paciente mejorado cuando tenía lugar una reducción considerable de los síntomas objetivos y subjetivos. Se consideró la infección recurrente cuando se detectó la presencia recurrente de los síntomas subjetivos y/u objetivos de la candidiasis con un cultivo o exudado vaginal positivo después de 2-4 semanas de haber terminado el tratamiento.

Protocolo clínico general: Se tomaron exudados vaginales y cultivos antes y al final del tratamiento, que fueron enviados al laboratorio clínico para su análisis por métodos convencionales (cultivo en caldo de dextrosa Sabouraud, SDB y observación directa o en medio de solución de hidróxido de potasio (KOH) al 10%). Se prescribió una dieta baja en carbohidratos de bajo índice glucémico. Se les realizó el test de sensibilidad alimentaria (por medición de anticuerpos IgG, test de intolerancia a la Lactosa por déficit de lactasa y test de intolerancia al Gluten por anticuerpos en sangre de antiendomiso, antigliadina y antitransglutaminasa), para determinar los alimentos a los cuales eran intolerante o sensibles, los cuales fueron retirados de la dieta. Al inicio del tratamiento se les realizó una hidroterapia de colon (HC-1 Classic, Transcom S.L., Gipuzkoa-España) con agua ozonizada para detener la migración intestinal de microorganismos.

Tratamiento con ozono: Durante 10 días se realizaron instilaciones vaginales con agua ozonizada. Se ozonizaron 1,2L de agua bidestilada esterilizada 5 mg/L durante 20 min a flujo de 1 L/h. Con esa agua ozonizada se realizaron 10 lavados intravaginales (400 mL) con ayuda de una jeringa de 100mL. seguidas de insuflación de la mezcla gas oxígeno-ozono a concentración de 20 µg/mL durante 10 min, a 0,2 L/min a flujo continuo (2 L volumen total). Se utilizó un dispositivo intravaginal especialmente diseñado para estos propósitos (Figura 1) VIN-100 (Econika SPE, Odessa-Ucraina), que permitió conseguir una óptima ozonización

intravaginal, garantizando una mayor e igualitaria superficie de contacto del ozono con el epitelio vaginal, permitiendo al médico trabajar de forma segura, ya que no hay escape de ozono a la atmósfera.

Se aplicaron 4 autohemoterapia mayor (AHTMayor) a dosis de 2,0 mg O₂-O₃ al ritmo de una por semana.

Frecuentemente la uretra y vejiga se vio involucrada en este proceso inflamatorio, por lo tanto, ambas también fueron instiladas con agua ozonizada en tres sesiones con 150 mL de volumen.

El generador de ozono utilizado fue Bozon-N (Econika SPE, Odessa-Ucraina).

En los casos de escoriaciones y úlceras vulvares, se aplicaron compresas ozonizadas enriquecidas con Factor de Crecimiento Epidérmico Senitul[®] y Oxiderm[®] (Lab. Heberfarma, España).

Dado el efecto fungicida y bactericida del aceite ozonizado^{14,19} diariamente se aplicó (intravaginal) 1 mL de aceite ozonizado a 600IP Oleosan[®] (Lacoser, Italia) durante la infección aguda, en cuanto se controlaron los síntomas, la concentración del aceite se bajó a 400IP Oleosan[®] (Lacoser, Italia), aplicaciones (intravaginal) de 1 mL Fluvix[®], gel que contiene factor de Crecimiento recombinante (Lab. Heberfarma, España), para proteger la mucosa vaginal de la sequedad que el ozono en gas directo provoca en las mucosas.

Al final del tratamiento, la flora vaginal fue repoblada con *lactobacillus* (Isadin-a-barcilus-lactobacillus-plantarum-p-17630-isdin) durante 10 días por vía vaginal y durante 1 mes por vía oral (Lactibiane Tolerance. Lab. Pileje).

Medidas profilácticas: Se le dejó aplicación de aceite O₃ 400IP (Lacoser, Italia), durante 5 días post menstruación, durante 3 meses a modo de prevención. La pareja también fue tratada con aplicaciones en el glande de aceite Oleosan[®] de 600IP (Lacoser, Italia) durante 10 días. Calendario profiláctico de Isadin-a-barcilus por vía vaginal: al finalizar el periodo menstrual, 1 cápsula vaginal, durante 6 días por la noche, durante tres meses. Fig. 2

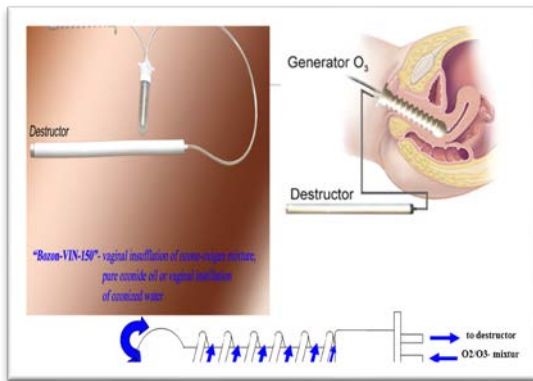


Figura 1. Dispositivo utilizado para la administración de ozono por vía vaginal.



Figura 2 Calendario profiláctico de Isadin-a-barcilus por vía vaginal.

Además de considerar la información de la historia clínica a las pacientes se les realizó una entrevista estructurada, que permitió obtener datos generales para el formulario de recogida de datos. Las variables que se recogieron en el formulario fueron las siguientes: número de inclusión, número de historia clínica, nombres y apellidos, género, etnia, edad, peso, talla, presión arterial, grado de escolaridad, hábitos tóxicos, actividad física, antecedentes patológicos, consumo de fármacos o suplementos y hábitos alimentarios y datos para medir índice de calidad de vida según un cuestionario de la Asociación Española de Candidiasis (www.candidiasischronica.info) Tabla 1

Tabla 1. Indicadores de la calidad de vida antes y después del tratamiento.

Índices de calidad de vida	Antes del tratamiento	Datos al cabo de 3 meses post-tratamiento
		Grupo tratado
Alteraciones del sueño	3,4 = 0,2	1,8 = 0,2*
Limitaciones en la dieta	2,9 = 0,4	2,1 = 0,3
Ansiedad	4,2 = 0,3	1,4 = 0,3*
Depresión	2,3 = 0,3	0,7 = 0,3
Inseguridad	3,1 = 0,4	1,2 = 0,4*
Déficit atencional y de memoria	3,7 = 0,3	1,8 = 0,4*
Irritabilidad	4,1 = 0,3	1,8 = 0,4*
Miedo a que la enfermedad empeore	3,4 = 0,4	1,5 = 0,3*
Disfunción sexual	3,9 = 0,3	1,2 = 0,3*
Falta de interés por la vida	1,1 = 0,1	0,9 = 0,3
Conflicto familiar	4,0 = 0,5	1,1 = 0,3*

Leyenda: * diferencias significativas ($p < 0,05$).

Procesamiento estadístico

El análisis exploratorio de los datos se realizó mediante un análisis para detectar puntos aberrantes (outliers). Posteriormente los datos experimentales fueron sometidos a un análisis descriptivo. Para determinar diferencias estadísticas entre las proporciones de pacientes antes y después del tratamiento se utilizó la prueba de McNemar.

Resultados

El estudio microbiológico inicial evidenció que los cultivos vaginales presentaban los siguientes microorganismos no específicos:

- En 150 pacientes con vulvo-vaginitis la *Candida albicans* estaba presente en un 100 %;
- *Streptococci* group B, estaba presente en 12 pacientes (8 %) con $10^3 - 10^8$ cel./mL;
- *Streptococci* D en 9 pacientes (6 %) en cantidad de 10^5 cel./mL; *Epidermal staphylococcus* en 3 pacientes (2 %) en cantidad de $10^5 - 10^3$ cel./mL;
- *Bacteroides* en 10 (6,6 %) en cantidad de $10^3 - 10^4$ cel./mL;
- *Proteus spp* en 5 pacientes (3,3 %) en cantidad de 10^4 cel./mL;
- *Escherichia coli* en 30 pacientes (20 %) en cantidad de 10^5 cel./mL.

Adicionalmente en el grupo estudiado se determinó que:

- En el 90 % (135) de las pacientes con vulvo-vaginitis el índice de la microflora vaginal era muy bajo, el número de *Lactobacillus* no llegaba a 10^2 cel./mL.
- 30 % (45) de las pacientes sufrían de dermatitis atópica.
- 100 % (150) de las pacientes sistemáticamente se auto administraban antisépticos, antibióticos orales y tópicos.

El 85 % de las pacientes respondió favorablemente al tratamiento. El 10% tuvo una recaída antes de un año y un 5 % de las pacientes no respondió al tratamiento.

Discusión

Una vez finalizado el tratamiento (aplicación del protocolo clínico y tratamiento con ozono), se pudo determinar que:

- o 100 pacientes (66,7 %) notaron la desaparición o una notable reducción de los síntomas al tercer día de tratamiento.
- o 50 pacientes (33,3%) hacia el 7º día de tratamiento registraban un ligero picor con un moderado flujo vaginal.
- o En 10 días, solo 15 pacientes (10%) se quejaban de prurito vaginal moderado, a las cuales se aplicaron 5 insuflaciones adicionales para la resolución completa de los síntomas
- o En 8 pacientes (5,3 %) y por abandono o por no seguir las pautas de forma correcta, no fue posible establecer obtener mejorías.

La acción germicida del ozono, se basa: En el transitorio estrés oxidativo, que es mortal para el microorganismo debido a lo débil que es su sistema de defensa antioxidante^{20, 24} Ellos carecen de enzimas tales como la superóxido dismutasa, la catalasa y la glutación peroxidasa que conforman el sistema defensivo celular capaz de enfrentar y neutralizar la acción oxidante del ozono. El ozono es capaz de estimular cierto número de células del sistema inmune^{25,27}. Como consecuencia, estas células pueden liberar pequeñas cantidades de citocinas inmunoestimuladoras e inmunosupresoras^{28,29}

El Ozono en sus formas de aceite ozonizado, agua ozonizada y gas actúa como: Un excelente agente fungicida y germicida debido a su elevado poder oxidante^{30,33} El ozono es capaz de colocar al sistema inmune en estado de alerta, usualmente, sin ocasionar un desbalance entre la activación y la supresión del sistema inmune, actuando como un inmunomodulador.

Durante la realización de este estudio se pudo verificar: 1) Acción sinérgica al tratamiento de ozono en sus diferentes formas de aplicación: agua ozonizada, gas y aceite ozonizado y de las medidas alimentarias tomadas. 2) Remisión de los síntomas y negativización de los cultivos y exudados vaginales.

Agradecimientos

Agradezco profundamente al Dr. Gregorio Martínez por su constante asesoramiento y amistad, a las auxiliares Olga Moreno y Clara Barrachina, excelentes profesionales. Por último, a mi esposo y mis hijos, por su enorme paciencia de soportar mis largas ausencias de casa. Sin todos ellos este trabajo no hubiese sido posible.

REFERENCIAS

1. Azam W, Cermeno V, Juman R, García Y. Vulvovaginitis por *Candida* spp y *Trichomonas vaginalis* en mujeres sexualmente activas. *Invest. Clin.* 43 (1): 3 –13, 2002
2. Egan M, and Lipsky M.: *Diagnosis of Vaginitis.* *Am.Fam.Physician*, 62:1095-104, 2000
3. Plourd D. *Practical Guide to diagnosing and treating vaginitis.* *Mescape General Medicine* , 1 (2), 1999.
4. Anderson M, Karasz A and Friedland: *Are vaginal symptoms ever normal? A Review of the literature.* *Mescape General Medicine*, 6 (4), 2004.
5. Gennady O. Grechkanev, Rajani Chandra-D’Mello, Adriana Schwartz Tapia (2011). *Ozonotherapy for inflammatory diseases in female genital organs.* *Revista Española de Ozonoterapia.* Vol.1, nº 1, pp. 3-xx. www.aepromo.org
6. Owen M and Clenney T: *Management of vaginitis.* *Am.Fam.Physician*, 70:2125-2132, 2139-40, 2004 *American Academy of Family Physicians.*
7. Mendosa M, Gonzalez F, Bellovin E Salazar W, Mendosa L, Zambrano E. *Insolation, identification and serotyping of yeast obtained from vaginal fluid in patient investigated.* *Invest Clin*, 40 (1): 25-26, 1999.
8. Barrenetxea, G. *Vulvovaginitis candidiásica.* *Rev. Iberoam. Micol.*, 19: 22 –24, 2002.
9. Brzychczy S, Wloch M, Kochan P and Heczko P: *Hydrogen peroxide produced by lactobacillus species as regulatory molecule for vaginal microflora.* *Med.Dosw.Mikrobiol.*, 56(1): 67-77, 2004.
10. *NRF2 activation is involved in ozonated human serum upregulation of OH-1 endothelial cells.* 2013 Elsevier. *Toxicology and Applied Pharmacology* 267 (20B 30-40) Alessandr Pecorelli, Velio Bocci, Alessandra Acquaviva, Giuseppe Belmonte, Concetta Gardi, Fabio Virgili, Lucia Ciccoli, Giuseppe Valcchi.
11. Lamberto Re, Gregorio Martínez-Sánchez, Marica Bordicchia, Giuseppe Malcangi, Antonella Pocognoli, Miguel Angel Morales-Segura, John Rothchild and Armando Rojas. *Is ozone pre-conditioning effect linked to Nrf2/EpRE activation pathway in vivo?*
12. Bocci, V., Valacchi, G., Corradeschi, F. and Fanetti, G., *Studies on the biological effects of ozone: 8. Effects on the total antioxidant status and on interleukin-8 production,* *Mediators Inflamm*, 1998, 7: 313-317.
13. WMA. *World Medical Association Declaration of Helsinki. Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects.* Adopted by the 18th WMA General Assembly, Helsinki, Finland, June 1964: *J Int Bioethique*; 2004. p. 124-129.
14. Lezcano I, García G, Martínez G, Moleiro J. *Efectividad del aceite de teobroma, OZONOL, ozonizada para el tratamiento de la candidiasis vaginal.* *Revista CENIC Ciencias Biológicas* 1998;29:211.
15. Fernández, I., Curtiellas, P., Sánchez, E., Gómez, M. *In vitro antimicrobial activity of ozonized teobroma oil against *Candida albicans*.* *Ozone Sci. Eng.* 2006, vol. 28 nº3, p. 187-190.
16. De las Cagigas T, Bastard V, Menéndez S, Gómez M, Eng L. *“Empleo del aceite ozonizado en pacientes con vulvo-vaginitis”.* *Primer Congreso Iberoamericano de Aplicaciones del Ozono, 1990, Ciudad de La Habana, Cuba.*
17. Rozada D, Menéndez S, Sariol MT, Moleiro J. *“Aplicación de óvulos, OZONOL, en el tratamiento de la cervicovaginitis”.* *XII Seminario Científico Nacional de Investigaciones Científicas, junio de 1995, Ciudad de La Habana, Cuba.*
18. Morris G, Menéndez S. *“Oleozon in Gynecology”.* *2º Simposio Internacional de Aplicaciones del Ozono, 1997, Ciudad de La Habana, Cuba.*
19. Nuñez N, Lezcano I, Fernández C. *“Actividad fungicida del Oleozon frente a especies del género *Candida*”.* *3er Simposio Internacional de Aplicaciones del Ozono, 2000, Ciudad de La Habana, Cuba.*
20. Bocci, Velio. *Ozone: A new medical drug.* Springer, Netherlands 2010. 295 pages. Publisher: Springer; 1st Edition. (December 1, 2010). ISBN-10: 9048168058. ISBN-13:978-9048168057.
21. Adriana Schwartz et al. *Guía para el uso médico del ozono: fundamentos terapéuticos e indicaciones.* Asociación Española de Profesionales Médicos en Ozonoterapia, AEPRIMO. Madrid, 2011. 315 p.+ XVIII + 11 p. láminas de color. ISBN: 978-84-615-2244-6.
22. Bocci, Velio. *Ozone: A new medical drug.* Springer, Netherlands 2005.
23. Sharma M, Hudson JB. *Ozone gas is an effective and practical antibacterial agent.* *Am J Infect Control.* 2008 Oct;36(8):559-63.

24. Schwartz, A.; Martínez-Sánchez, G. (2012). Ozone therapy and its Scientific Foundations. *Revista Española de Ozonoterapia*. Vol. 2, nº 1, pp. 121-139.
25. Babor BM, Takeuchi C, Ruedi J, Gutierrez A, Wentworth P, Jr. Investigating Antibody-catalyzed ozone generation by human neutrophils. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 2003 Mar 18;100(6):3031-4
26. Pecorelli, A., Bocci, V., Acquaviva, A., Belmonte, G., Gardi, C., Virgili, F., Ciccoli, L., and Valacchi, G. (2013). NRF2 activation is involved in ozonated human serum upregulation of HO-1 in endothelial cells. *Toxicol Appl Pharmacol* 267, 30-40.
27. Nogales, CG.; Ferreira, MB.; Lage-Marques, JL.; Antoniazzi, JH. (2014). Comparison of the antimicrobial activity of three different concentrations of aqueous ozone on *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, and *Enterococcus faecalis* – in vitro study. *Revista Española de Ozonoterapia*. Vol. 4, nº 1, pp. 9-15.
28. G. Martínez-Sánchez, L. Re, Gema Perez-Davison, Rosemeres Howat Delaporte (2012). Las aplicaciones médicas de los aceites ozonizados, actualización. *Revista Española de Ozonoterapia*. Vol. 2, nº1, pp. 121-139
29. Antonio Dorigo, Monica Cricca, Luigi Checchi. Comparison of the antibacterial activity of an ozonated oil with chlorhexidine digluconate and povidone-iodine. A disk diffusion test. Marco Montevicchi, , Department of Periodontology and Implantology, School of Dentistry, Alma Mater Studiorum, University of Bologna, Bologna, Italy; Department of Experimental, Diagnostic and Specialty Medicine-DIMES, Alma Mater Studiorum, University of Bologna, Bologna, Italy *NEW MICROBIOLOGICA* , 36 , 289-302, 2013
30. Siqueira JF Jr, Roças IN, Cardoso CC, Macedo SB, Lopes HP. Antibacterial effects of a new medicament – the ozonized oil- compared to calcium hydroxide pastes (original article in Portuguese) *Rev Bras Odont* 2000;57:252-256.
31. Seidler V, Linetskiy I, Hubalkova H, Stankova H, Smucler R, Mazanet J. Ozone and Its Usage in General Medicine and Dentistry. A review Article. *Prague Medical Report*. 2008; 109(1): 5-3.
32. Hee et al. Therapeutic Effects of Topical Application of Ozone on Acute Cutaneous Wound Healing. *J Korean Med Sci* 2009; 24: 368-7
33. Cardoso MG, Oliveira LD, Koga-Ito CY, Jorge AOC. Effectiveness of ozonated water on *Candida albicans*, *Enterococcus faecalis*, and endotoxins in root canals *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2008;105:e 85-e91