



Los documentos del ISCO3 son recomendaciones que sirven de guía y referencia a todos aquellos que practican la terapia con ozono. Sin embargo, corresponde a cada ozono terapeuta seguir o no las recomendaciones emitidas por el ISCO3.

Vías de aplicación no recomendadas en ozono terapia

Índice

1. Antecedentes	2
1.1 Alcance	2
1.2. Acrónimos, abreviaturas y definiciones	3
1.3 ¿Por qué es necesaria una evaluación crítica de los procedimientos inapropiados de la ozono terapia?	3
1.4 Requisitos científicos de una práctica segura de ozonoterapia	3
2. Bases fármaco-toxicológicas del mecanismo de acción del ozono	5
2.1. Relación dosis - efecto	5
2.2. Vías de administración	5
3. Vías de administración no soportadas por estudios clínicos o pre-clínicos	6
3.1. Terapias emergentes	6
3.1.1 Administración Intravenosa Directa (DIV)	7
3.1.2 Administración hiperbárica (HBO3) multi pases	7
3.1.3 Ozono Intraperitoneal (IPO3)	8
3.2 Análisis comparativo de varios métodos	8
4. Conclusiones	10
6. Historial de modificaciones	11
7. Registros del documento	11
Bibliografía.....	12



1. Antecedentes

1.1 Alcance

El alcance del presente documento está en consonancia con dos de los principales objetivos del ISCO3:

- 1) AUTORIDAD CIENTÍFICA INTERNACIONAL: El ISCO3 fue creado con la clara intención de convertirse en una autoridad científica internacional debido a la composición de sus miembros; y que sus recomendaciones puedan convertirse en fuente de referencia para todos aquellos que practican esta terapia médica.
- 2) DOCUMENTO INTERNACIONAL GUÍA Y REFERENCIA: Determinar los méritos científicos y médicos de cada uso particular del ozono, así como un código de buenas prácticas, para evitar una posible negligencia.

Los objetivos del ISCO3 se ajustan a dos requisitos importantes de la ozonoterapia moderna:

"Es absolutamente necesario trabajar con objetivos específicos y de manera unificada para asegurar una práctica de mayor precisión y seguridad".¹

"Hay una variación en los procedimientos que se aplican que la comunidad médica de ozono terapeutas está en la necesidad de estandarizar. Ya se han hecho progresos, pero es necesario continuar con el desarrollo de procedimientos médicos definidos y con protocolos que determinen las mejores vías de aplicación, así como un código de buenas prácticas, con el fin de evitar una posible negligencia".¹

Además, este documento, está en sintonía con dos principios generales de la medicina:

- 1) *Primum non nocere*: lo primero es no hacer daño.²
- 2) **Los principios éticos de la medicina**.³ Estos principios generales se deben tener en cuenta en la práctica clínica de la ozonoterapia. Como consecuencia, cualquier aplicación recomendada de ozono debe documentarse mediante ensayos clínicos y preclínicos.

La Declaración de Madrid sobre la terapia con ozono y este documento no son instrumentos jurídicamente vinculantes. La autoridad de la Declaración se basa en que ha influido en la legislación y los reglamentos nacionales o regionales. Su función puede resumirse en estas palabras: "Aunque la Declaración de Madrid sobre la terapia con ozono es responsabilidad del ISCO3, el documento debe ser considerado propiedad de todos los pacientes"



1.2. Acrónimos, abreviaturas y definiciones

AGPI	Ácidos grasos poli insaturados
CAT	Catalasa
DIV	Aplicación intra venosa directa (<i>Direct Intravenous</i>)
HBO3	Aplicación de ozono hiperbárica (<i>Hyperbaric Ozone</i>)
HDO	Altas dosis de ozono (<i>High Doses of Ozone</i>)
HNE	4-hidroxinonenal
HO1	Hemo oxigenasa 1
IPO3	Ozono Intraperitoneal (<i>Intraperitoneal Ozone</i>)
MAHT	Autohemoterapia Mayor (<i>Major autohemotherapy</i>)
O3SS	Solución Salina Ozonizada (<i>Ozonized Saline Solution</i>)
RIO3	Insuflación rectal (<i>Rectal insufflation</i>)
RMDIV SM	Método de Robins para la aplicación intravenosa directa SM
SOD	Superóxido dismutasa

1.3 ¿Por qué es necesaria una evaluación crítica de los procedimientos inapropiados de la ozono terapia?

El ozono utilizado dentro de las ventanas terapéuticas determinadas es absolutamente seguro y más eficaz que los medicamentos estándar de uso regular en numerosas patologías. Sin embargo, existen profesionales que, con ánimo de lucro y aplicando procedimientos sin bases científicas, pretenden curar enfermedades crónicas aplicando formas alternativas de administración o utilizando altas dosis de ozono, que no están estandarizadas ni respaldadas por datos preclínicos / clínicos, ni evaluados toxicológicamente.⁴

Por lo tanto, el objetivo de este documento es enfatizar en las reglas para una práctica segura de la terapia de ozono con la esperanza de que se utilice basada en pruebas científicas para evitar daños irreversibles en los pacientes.

1.4 Requisitos científicos de una práctica segura de ozono terapia

1.4.1 Facultativo

Tal como se define en la Declaración de Madrid sobre la terapia con ozono,¹ para llevar a cabo cualquier procedimiento se requiere personal técnico calificado. Los profesionales deben asistir a



cursos de formación de posgrado que incluyan al menos los contenidos básicos definidos por el ISCO3,⁵ o contenidos similares bajo la supervisión de una universidad local o una asociación científica de ozono terapia.

Los profesionales deben limitar su práctica al campo de su formación profesional básica. Esto significa: los médicos estarán a cargo del tratamiento médico humano o ensayos clínicos; los veterinarios deben tratar enfermedades, trastornos y lesiones en animales no humanos; los dentistas deben tratar enfermedades y condiciones de la cavidad oral. Bioquímicos, farmacéuticos, biólogos, participarán en la investigación molecular, preclínica y clínica (en caso de investigación clínica, la interacción directa con los pacientes será responsabilidad de un médico). Las enfermeras y los técnicos actuarán siguiendo las instrucciones del médico correspondiente.

1.4.2 Generadores y material mono uso

Los generadores utilizados deben estar en línea con las recomendaciones del ISCO3⁶ y la mezcla de oxígeno y gas ozono debe pasar un filtro estéril antimicrobiano (<20 µm) antes de ser inyectado.

Todos los materiales utilizados deben ser mono uso y resistentes al ozono: vidrio, sondas de silicona, catéteres y tubos de silicona, conexiones de Kynar o acero inoxidable 316 y jeringas siliconadas.

1.4.3 Protocolos

Los protocolos clínicos deben basarse en evidencias (preclínicas / clínicas) que deben ajustarse a los principios científicos / éticos generalmente aceptados. Deben justificarse sobre la base de un conocimiento profundo de la literatura científica y de otras fuentes de información pertinentes, estudios de laboratorios adecuados y, cuando proceda, experimentación con animales.

Las nuevas vías de aplicación de la ozono terapia, implican una investigación clínica. El diseño y el desempeño de cada estudio de investigación con seres humanos debe estar claramente descrito y justificado en un protocolo de investigación. Cualquier investigación clínica en el área de la ozono terapia debe ajustarse al mismo criterio establecido para un medicamento regular. Las nuevas vías de aplicación propuestas deben demostrar cierta ventaja sobre el tratamiento disponible, tales como:

- Mostrar eficacia superior al tratamiento ya establecido
- Evitar los efectos secundarios graves de un tratamiento disponible
- Mejorar el diagnóstico de una enfermedad grave
- Disminuir de manera significativa la toxicidad de un tratamiento disponible
- Cubrir un problema concreto de salud pública



2. Bases fármaco-toxicológicas del mecanismo de acción del ozono

2.1. Relación dosis - efecto

Mayores concentraciones de ozono no son necesariamente más efectivas, de la misma manera que ocurre con todos los medicamentos, el ozono tiene dos mecanismos generales: 1) *La oxidación directa*, donde el efecto del O₃ es inmediato (por ejemplo, inactivación de un microorganismo o mediador del dolor) 2) *Efectos retardados*, que implican la activación de efectores nucleares (Nrf2 o NFκB) para inducir la respuesta farmacológica. En ambos, hay una ventana terapéutica. El conocimiento de las ventanas terapéuticas para cada vía de aplicación se describe en la Declaración de Madrid¹ y representa un resumen extraído de la experiencia clínica de las principales escuelas de ozono terapia, derivadas de la práctica clínica o de la investigación experimental.

La respuesta hormética del ozono no es una hipótesis, es un hecho demostrado clínica y experimentalmente.^{7,8} La interacción de los mediadores del ozono [principalmente H₂O₂ y 4-hidroxi-2,3-trans nonenal (HNE)] con los factores nucleares, induce una respuesta terapéutica, lo que ha quedado demostrado desde el punto de vista científico.⁹⁻¹¹ Las bajas dosis de ozono son capaces de utilizar conmutadores moleculares claves como Nrf2 / Keap1 o NF-κB / IκB para inducir resistencia adaptativa. De este modo, dosis bajas estimulan rutas de sobrevida sin alterar la viabilidad celular;¹² por el contrario, dosis altas pueden ser genotóxicas.¹³⁻¹⁶

El uso de dosis no apropiadas de ozono en la clínica puede originar efectos secundarios graves, desde la necrosis tisular^{17,18} hasta un posible cáncer que puede desarrollarse durante la exposición crónica o durante la exposición a dosis elevadas.¹⁹

2.2. Vías de Aplicación

El ozono puede administrarse con gran flexibilidad por diferentes vías (por ejemplo, ozonización extravascular de la sangre, subcutánea, intramuscular, intradiscal, intravaginal, intrauretral, vesical, entre otras; pero nunca debe utilizarse:

- 1) **Mediante inhalación.** El ozono oxida los antioxidantes disponibles y reacciona instantáneamente con los ácidos grasos poliinsaturados (AGPI) del surfactante pulmonar presentes en la interfase aire – epitelio, para formar especies reactivas del oxígeno que dañan el sistema respiratorio.²⁰ Inmediatamente después de la exposición aparecen los primeros síntomas (cefalea, pecho pesado, dificultad para respirar), y se deben tomar medidas de ayuda urgentes.²¹

Hay dos excepciones en la administración de ozono o derivados por inhalación.

- a) Administración de pequeños volúmenes de ozono gaseoso (O₂/O₃) a baja concentración (6 µg/mL), en apnea y realizado por un médico bien entrenado, para el tratamiento de enfermedades de los senos paranasales.^{22,23}



b) Compuestos orgánicos volátiles generados por ozono. Existen diferentes métodos, como el burbujeo de aceites esenciales (por ejemplo, aceite esencial de pino, timo, eucalipto, árbol de té) o aceites fijos (aceite de girasol o aceite de oliva), que generan derivados que pueden ser potencialmente utilizados desde el punto terapéutico.^{24,25} En este caso, el vapor inhalado no es O₂/O₃, sino terpenos u otros compuestos orgánicos.

2) **Inyección directa** (inyección intra-arterial o intravenosa directa). La inyección de una mezcla de gases en los vasos circulatorios tiene riesgo de generar embolia gaseosa, dado que la mezcla de gases nunca contiene menos del 95% de oxígeno.²⁰ Su aplicación es fuertemente desaconsejada debido al riesgo de embolismo gaseoso que puede ocurrir incluso en el caso de usar una bomba de infusión lenta y volúmenes de 20 mL. Las complicaciones son variadas y van desde una simple sensación de burbujeo axilar, tos, sensación de peso retroesternal, mareos, cambios en la visión (ambliopía), crisis hipotensiva, signos de isquemia cerebral (paresia de los miembros) y muerte. Es importante señalar que al menos cinco pacientes murieron como resultado de un embolismo gaseoso después de la administración de ozono por inyección intravenosa directa.²⁶⁻²⁹ Debe tenerse en cuenta que la solubilidad del oxígeno a 37 ° C es sólo de alrededor de 0,23 mL por 100 mL en el agua plasmática y, por lo tanto, el plasma venoso no puede disolver el oxígeno lo suficientemente rápido, lo que conduce a la formación de una embolia gaseosa.¹

Además, el ozono es un gas muy inestable, a medida que pasa el tiempo (min), la concentración se pierde. Si se comienza con 20 µg/mL, tras 5 min, la concentración alcanza (10-14) µg / mL o incluso menos. Teniendo en cuenta los conocimientos científicos actuales, el uso de DIV (aplicación intravenosa directa) implica un riesgo innecesario, que no debe realizarse fuera de un ensayo clínico controlado, ni en un centro sin capacidad para resolver posibles complicaciones. Por otra parte, las sociedades científicas deberían dejar clara su postura contraria a este proceder (fuera de estudios clínicos oficiales), para salvaguardar la imagen de la ozono terapia en caso de accidente.

Sería suficiente un sólo caso de iatrogenia producido por usar DIV para originar un caos en la comunidad profesional de ozonoterapia. Por lo tanto, es de suma importancia evitar en la práctica médica, intervenciones que pongan en riesgo la vida del paciente, especialmente si el procedimiento no ha sido científicamente probado. Cualquier mal resultado sería perjudicial para la ozono terapia a nivel global.

3. Vías de administración no soportadas por estudios clínicos o preclínicos

3.1. Terapias emergentes

Con el término "terapias emergentes" en la ozono terapia, se pueden resumir una serie de métodos no apoyados por evidencias científicas que no toman en cuenta ninguna de las cuestiones descritas en el punto 1.3 o 2 de este documento. Tampoco se puede encontrar un "reporte de caso" ni datos preclínicos que respalden esas variantes aberrantes. Los únicos canales para la difusión del "éxito" de las "terapias emergentes" son: Facebook, YouTube, sitios web personales, testimonios de pacientes, etc.



Por lo tanto, en la mayoría de los casos, constituyen casos serios de experimentación humana que evaden los estándares éticos médicos elementales.² En la mayoría de los casos, los métodos se anuncian como curativos o "resolutivos" de enfermedades (por ejemplo, cáncer o VIH). Además, la lista de enfermedades que "curan" estos métodos es interminable.

En lugar de ser métodos más eficaces que los tradicionales, hay informes de muertes y de acontecimientos adversos severos entre los pacientes que han sido tratados con estas "terapias emergentes".

Las terapias emergentes más representativas son: la aplicación directa intravenosa (DIV), el método Robins de tratamiento directo con ozono intravenosoSM (RMDIVSM), el método hiperbárico (HBO3) de múltiples pasos, (3 -10 o más pasos) con 200 mL sangre + 200 mL de O₃ a 70 µg / mL a 1 bar de presión, y (2000 - 25000) IU de heparina por paso, dosis alta de ozono terapia (HDO), y Ozono Intraperitoneal (IPO3).

3.1.1 Administración Intravenosa Directa (DIV)

La DIV no tiene ninguna evidencia científica. Una simulación del efecto de DIV en un estudio preclínico utilizando modelos de ratón y conejo, llegan a esta conclusión: "Los resultados preclínicos obtenidos proporcionan evidencia de que la aplicación de ozono intravenoso directo es altamente arriesgada, debido a los graves efectos adversos y la mortalidad que origina, por lo que su uso no está justificado en los seres humanos.³⁰ En la clínica, ni siquiera un informe de caso apoya el beneficio de estos métodos. Debido a la falta de homogeneidad en la terminología utilizada en la terapia con ozono, una búsqueda bibliográfica con la palabra clave "ozono intravenoso" puede dar lugar a la aparición de 15 artículos.³¹⁻⁴⁵ Sin embargo, en la lectura de la sección "materiales y métodos" puede constatar que los autores han llamado "ozono intravenoso" a la auto hemoterapia mayor clásica (MAHT) o a la administración de solución salina ozonizada (O3SS). En cualquier caso, no utilizan el gas ozono directamente en la vena.

Los síntomas de embolia gaseosa son evidentes en pacientes sometidos a DIV. A pesar de la discusión teórica sobre si el oxígeno (el componente principal de O₂/O₃) puede ser gas embólico o no, el hecho es que hay informes de muertes por la aplicación de este método.²⁶⁻²⁸

3.1.2 Administración hiperbárica (HBO3) multi pases

El método hiperbárico de múltiples pases utiliza dosis extra de ozono y extra dosis de heparina. Como la DIV, HBO3 no tiene ninguna evidencia clínica preclínica o científica, de acuerdo con evidencias anecdóticas de pacientes o profesionales, los principales efectos secundarios son: pérdida de visión, alteraciones pulmonares, orina coloreada (rojo, marrón). Es bien sabido, que la asociación de la heparina con el ozono aumenta la activación de las plaquetas,^{46,47} esta es la razón por la cual en la MAHT se usa un anticoagulante basado en citrato. En una típica sesión de 10 pasos (200 mL de sangre + 200 mL de O₃ a 70 µg / mL + 2000 U de heparina), el paciente recibe una dosis total de 140 mg de ozono (en MAHT 100 mL de O₃ a 40 µg / mL y 4 mg de ozono) y 20 000 U de heparina. La dosis de heparina es demasiado alta para un paciente sin trastorno de la



coagulación y puede exacerbar el principal efecto secundario de la heparina: trombocitopenia, dolor leve, hematoma, hemorragia, irritación local, eritema, aumento de la aminotransferasa hepática, anafilaxia o reacción de hipersensibilidad inmune.⁴⁸ Los efectos secundarios observados durante el paso múltiple de HBO3 son indicativos de la toxicidad de dosis altas de ozono.

3.1.3 Ozono Intraperitoneal (IPO3)

Se ha planteado que, en caso de mesotelioma, carcinomatosis peritoneal o peritonitis, se puede realizar una inyección endoperitoneal o endopleural de hasta 2 500 mL de mezcla gaseosa con una concentración de ozono de 10-20 µg / mL.⁴ Esta modalidad se usa con poca frecuencia y debe ser realizada por un especialista.⁴ No hay ningún ensayo clínico documentando sus beneficios. Sin embargo, el uso de esta terapia en el cáncer está respaldado por un estudio preclínico.⁴⁹⁻⁵¹ La administración de un fármaco en un estudio preclínico por vía intraperitoneal (i.p.) es habitual, debido al difícil abordaje de las venas del animal. La vía i.p. se considera una vía esencialmente experimental. Uno de los modelos experimentales de cáncer en conejos se realiza mediante la implantación del tumor en la oreja del conejo. Como consecuencia la vena marginal de la oreja no puede usarse para la administración de fármacos. Es probable que el resultado observado en el ensayo preclínico que estudia el efecto del ozono en tumores implantados en la oreja del conejo no dependa de la forma de administración del ozono (i.p.).

El uso de IPO3 en humanos no es frecuente, e implica un método muy invasivo, por eso necesita condiciones de quirófano. Por lo tanto, los beneficios del ozono como adyuvante en el cáncer deben alcanzarse de otra manera como con el empleo de la MAHT,⁵² con bajos efectos secundarios, bajo costo y baja invasividad en comparación con la i.p. (efectos secundarios: hemorragia intraperitoneal, dolor, etc.). Cualquier intervención sobre el cáncer debe ser aprobada por el paciente y consultada con un oncólogo. El único hecho disponible hoy sobre el papel del ozono en el cáncer es su acción como adyuvante,⁵³ no como una cura. Prometer o crear expectativas de curación de un paciente con cáncer es una falta grave de ética médica.

3.2 Análisis comparativo de varios métodos

Una tabla comparativa muestra las diferencias entre los métodos de aplicación de ozono bien establecidos y "los métodos emergentes" (Tabla 1).



Tabla 1. Comparación de la base de evidencias científicas de algunos métodos de aplicación de la ozonoterapia, habituales y "emergentes".

Método	Respaldo preclínico	Respaldo clínico	Efectos colaterales
MAHT	Bioquímico, molecular y pre-clínico. ⁵⁴	>11 000 tratamientos. ⁵⁵ > 577 pacientes ⁵⁵	* Infección por el virus de la Hepatitis C. ⁵⁶ Liberación de plastificantes cuando se usaron bolsas de PVC. ⁵⁷ Muerte. ⁵⁸
RIO3	Bioquímico, molecular y pre-clínico. ⁵⁹	>47 000 tratamientos. ⁵⁵ > 716 pacientes. ⁵⁵	** Efectos secundarios menores. ⁵⁹
O3SS	Bioquímico, molecular y pre-clínico. ⁶⁰⁻⁶²	>500 Tesis de doctorado en Rusia. ⁶³	
DIV	1 reporte toxicológico que reporta muerte fatal. ³⁰	0 estudios clínicos. >140 000 tratamientos. ^{***} > 2000 pacientes ^{***}	5 muertes fatales documentadas. ^{26,27,64} Síntomas de embolia gaseosa: sensación de burbujeo axilar, tos, sensación de peso retroesternal, mareos, cambios en la visión (ambliopía), crisis hipotensiva, signos de isquemia cerebral (parálisis de los miembros) y muerte.
HBO3	-	0 estudios clínicos. Número de pacientes y tratamientos aplicados desconocidos.	Pérdida de visión, alteraciones pulmonares, orina coloreada (rojo, marrón).
IPO3	3 estudios farmacológicos en Cáncer. ⁴⁹⁻⁵¹	0 estudios clínicos. Número de pacientes y tratamientos aplicados desconocidos.	Hemorragia intra-peritoneal, dolor.

Leyenda: MAHT, autohemoterapia mayor; RIO3, Insuflación rectal; O3SS, solución salina ozonizada; DIV, aplicación intravenosa directa; HBO3, múltiples pases hiperbáricos; IPO3, ozono intraperitoneal. * Los efectos secundarios descritos de MAHT son: un sabor metálico muy discreto en la boca al comienzo de la reinfusión, el cansancio al día siguiente, la necesidad de ajustar la medicación antidiabética a dosis más bajas, la necesidad de ajustar la medicación anti-hipertiroidismo a dosis más bajas, la necesidad de ajustar la medicación digitalica cardiaca (disminuir las dosis), es necesario ajustar la medicación antihipertensiva.⁵⁴ Los efectos secundarios descritos en la Tabla 1 para MAHT fueron consecuencia de la *mala praxis*.

** Cuando se administró ozono mediante insuflación rectal, se notificaron casos de hinchazón y estreñimiento.^{65,66} También se reportó ligera irritación y flatulencia transitoria⁶⁷ e irritación leve a corto plazo.⁶⁸ En dos casos se describió ligera flatulencia transitoria inmediatamente después de la aplicación del ozono rectal.⁵⁵

*** La información sobre el número de tratamientos y pacientes fue remitido por Howard F. Robins, D.P.M. en una carta a ISCO3 en 2014, titulada: La seguridad y los beneficios de la terapia de ozono intravenoso directo (DIV). Pero no se refiere a ninguna bibliografía o estudio publicado.



4. Conclusiones

Los nuevos métodos (emergentes) en ozono terapia deben ser validados de acuerdo con los métodos científicos y siguiendo los principios éticos promovidos por la *World Medical Association*.² Cualquier estudio clínico debe seguir un protocolo clínico racional que se ajuste a las buenas prácticas clínicas, con la aprobación de un comité de ética y revisión. Los actuales métodos emergentes en la terapia de ozono se caracterizan por la falta de soporte científico y representan un grave riesgo para la salud humana. El ISCO3 no recomienda la aplicación clínica de ninguno de los métodos emergentes (excepto los pacientes incluidos en un ensayo clínico) hasta que se proporcionen nuevas pruebas científicas sobre la relación beneficio / riesgo.



6. Historial de modificaciones

SOP no.	Fecha efectiva	Cambios significativos	SOP previo
ISCO3/LEG/00/10	13/07/2017	Borrador	Primera versión
	5/09/2017	Versión 1. Cambios menores de ortografía y redacción. El argumento sobre SSO3 se separó para incluirse en un documento dedicado a ese tema. En "conclusión" se especificó que se aceptará un nuevo método si los pacientes se inscriben en un ensayo clínico.	Primera versión
	21/09/2017	Versión 2. Cambios menores de ortografía y redacción.	Primera versión

7. Registros del documento

	Nombre	Título	Firma	Fecha
Autores	Gregorio Martínez-Sánchez	PhD.; Pharm. D.		17/07/2017
Revisores	Roberto Quintero Mariño	Lawyer. Legal advisor ISCO3		18/07/2017
	Adriana Schwartz	M.D. Secretary ISCO3		18/07/2017
	Fadi Sabbah	D.D., vice-president ISCO3		18/07/2017
Aprobación	ISCO3 Miembros 2015-2020			5/09/2017
Traducción y revisión al español	Gregorio Martínez-Sánchez Carlos Alberto Matiz Pedraza	PhD.; Pharm. D. M.D. Miembro Experto Externo de ISCO3 2015 -2020.		18/10/2017



Bibliografía

1. Schwartz-Tapia A, Martínez-Sánchez G, Sabah F, et al. Madrid Declaration on Ozone Therapy. *ISCO3*, 2ª edición. 2015:50.
2. World Medical A. World Medical Association Declaration of Helsinki: ethical principles for medical research involving human subjects. *JAMA*. Nov 27, 2013;310(20):2191-2194.
3. Bocci V, Borrelli E, Zanardi I, Travagli V. Oxygen-ozone therapy is at a cross-road. *Revista Española de Ozonoterapia*. 2011;1(1):74-86.
4. Bocci V, Zanardi I, Travagli V. Oxygen/ozone as a medical gas mixture. A critical evaluation of the various methods clarifies positive and negative aspects. *Med Gas Res*. Apr 28, 2011;1(1):6.
5. ISCO3. Learning Methodology Instructions and Perfection in Ozone Therapy for Medical Doctors. www.isco3.org. 2015.
6. ISCO3. Guidelines and Recommendations for Medical Professionals Planning to Acquire a Medical Ozone Generator. <http://www.isco3.org/offdocs.html>. 2014. <http://www.isco3.org/offdocs.html>.
7. Bocci VA, Zanardi I, Travagli V. Ozone acting on human blood yields a hormetic dose-response relationship. *J Transl Med*. May 17, 2011;9(1):66.
8. Re L. Therapy with Oxygen-Ozone or Ozohormesis: Recent Clinical Advances. *Medici & Medici*. 2008; 16:19-21.
9. Pecorelli A, Bocci V, Acquaviva A, et al. NRF2 activation is involved in ozonated human serum upregulation of HO-1 in endothelial cells. *Toxicol Appl Pharmacol*. Feb 15, 2013;267(1):30-40.
10. Re L, Martinez-Sanchez G, Bordicchia M, et al. Is ozone pre-conditioning effect linked to Nrf2/EpRE activation pathway in vivo? A preliminary result. *Eur J Pharmacol*. Nov 5, 2014; 742:158-162.
11. Delgado-Roche L, Riera-Romo M, Mesta F, et al. Medical ozone promotes Nrf2 phosphorylation reducing oxidative stress and pro-inflammatory cytokines in multiple sclerosis patients. *Eur J Pharmacol*. 2017; in press.
12. Delgado-Roche L, Riera-Romo M, Mesta F, et al. Medical ozone promotes Nrf2 phosphorylation reducing oxidative stress and pro-inflammatory cytokines in multiple sclerosis patients. *Eur J Pharmacol*. Sep 15, 2017; 811:148-154.
13. Diaz-Llera S, González-Hernández Y, Mesa JEG, Martínez-Sánchez G, Re L. Induction of DNA primary damage in peripheral blood leukocytes and exfoliated colorectal epithelial cells in rats treated with O3/O2 mix. *International Journal of Ozone Therapy*. 2009; 8:217-221.
14. Diaz-Llera S, Gonzalez-Hernandez Y, Prieto-Gonzalez EA, Azoy A. Genotoxic effect of ozone in human peripheral blood leukocytes. *Mutat Res*. May 27, 2002;517(1-2):13-20.
15. Díaz-Llera S, González-Mesa JE, González-Hernández Y, Wong R. Study of O3-O2 therapy in patients by single cell gel electrophoresis assay. *On submission*. 2011.
16. Diaz-Llera S, Podlutzky A, Osterholm AM, Hou SM, Lambert B. Hydrogen peroxide induced mutations at the HPRT locus in primary human T-lymphocytes. *Mutat Res*. Aug 21, 2000;469(1):5161.
17. Vanni D, Galzio R, Kazakova A, et al. Intraforaminal ozone therapy and particular side effects: preliminary results and early warning. *Acta Neurochir (Wien)*. Mar 2016;158(3):491-496.
18. Di Paolo N, Bocci V, Cappelletti F, Petrini G, Gaggiotti E. Necrotizing fasciitis successfully treated with extracorporeal blood oxygenation and ozonization (EBOO). *Int J Artif Organs*. Dec 2002;25(12):1194-1198.
19. Foksinski M, Bialkowski K, Skiba M, Ponikowska I, Szmurlo W, Olinski R. Evaluation of 8-oxodeoxyguanosine, typical oxidative DNA damage, in lymphocytes of ozone-treated arteriosclerotic patients. *Mutat Res*. Jan 2, 1999;438(1):23-27.
20. Bocci V. Is it true that ozone is always toxic? The end of a dogma. *Toxicol Appl Pharmacol*. Nov 1, 2006;216(3):493-504.
21. ISCO3. FIRST AIDS IN OZONE THERAPY. (Inhalatory exposition and accidental over dose). 2015:16.
22. Petrov GM, Kudriavtsev BP, Akulich, II. [The efficacy of using ozone preparations in the combined treatment of paranasal sinusitis]. *Voen Med Zh*. Dec 1996;317(12):26-28, 80.
23. Muminov AI, Khushvakova N. [Ozone therapy in patients with chronic purulent rhinosinusitis]. *Vest Otorhinolaryngology*. 2001(6):48-49.
24. Bocci V, ed *Ozone: A new medical drug*. ISBN-10: 9048168058. ISBN-13: 978-9048168057. Netherlands: Springer; 2010.
25. Gao M, Singh A, Macri K, et al. Antioxidant components of naturally-occurring oils exhibit marked anti-inflammatory activity in epithelial cells of the human upper respiratory system. *Respir Res*. Jul 13, 2011; 12:92.
26. Zambello A, Bianchi M, Bruno F. Sicurezza in ozonoterapia. *Rev. Ital. Ossigeno Ozono Ter*. 2004; 1:25-30.
27. Bocci V. Biological and clinical effects of ozone. Has ozone therapy a future in medicine? *Br J Biomed Sci*. 1999;56(4):270-279.
28. Di Paolo N, Bocci V, Gaggiotti E. Ozone therapy. *Int J Artif Organs*. Mar 2004 ;27(3) :168-175.
29. 5 FT. 2 accused of death during alternative medicine procedure.



31. <http://www.fox5vegas.com/story/28995673/2-accused-of-death-during-alternative-med-procedure>. Posted: May 06, 2015 9:58 PM 2015. Accessed 4/9, 2017.
32. Janet CC, Colom Loo Y, Cruz Piñón M, et al. Preclinical Toxicity Study of Direct Intravenous Ozone Therapy. *Rev Esp. Ozonoterapia*. 2015;5(2 Supplement 1):47-48.
33. Takatori T, Shimasaki H. Metabolism of labeled fatty ozonides administered intravenously in rats. *Hokkaido Igaku Zasshi*. May 1977;52(3):261-264.
34. Belianin, II, Nikolaeva GM, Martynova LP. [Action of dissolved ozone on mycobacterium tuberculosis and alveolar macrophages in experimental tuberculosis]. *Problem Tuberk*. 1997(1):56-59.
35. Belianin, II, Shmelev EI. [Blood ozonation in the treatment of patients with progressive pulmonary tuberculosis concurrent with diabetes mellitus]. *Problem Tuberk*. 1998(1):30-33.
36. Belianin, II, Abdullaev R. [Use of soluble ozone in combined treatment of pulmonary tuberculosis: lipid peroxidation and blood antioxidative defense systems]. *Problem Tuberk*. 2000(3):41-44.
37. Belianin, II, Titiukhina MV. [Enhancing the impact of chemotherapy of tuberculosis with parenteral administration of dissolved ozone]. *Problem Tuberk*. 2000(6):57-61.
38. Belianin, II, Martynova LP, Shmelev EI. [Dissolved ozone treatment-induced change in the resistance of multi-resistant mycobacterial strain to isoniazid and rifampicin]. *Problem Tuberk*. 2002(1):46-49.
39. Tafil-Klawe M, Wozniak A, Drewa T, et al. Ozone therapy and the activity of selected lysosomal enzymes in blood serum of patients with lower limb ischaemia associated with obliterative atheromatosis. *Med Sci Monit*. Jul 2002;8(7):CR520-525.
40. Belianin, II, Shmelev EI. [Changes in drug resistance of Mycobacteria in the simultaneous use of chemotherapy and intravenous infusions of dissolved ozone]. *Problem Tuberk Bolezn Legk*. 2004(7):3235.
41. Mandzhgaladze NR, Kharebava ER, Didia Ts G, Ardzhevanishvili MD, Gudzhabidze MV, Chigiashvili Ts N. [Influence of intravenous ozone treatment on the level of different specificity antibodies]. *Georgian Med News*. Sep 2006(138):93-95.
42. Artiukhin AA. [Conservative methods in the therapy of male sterility. Critical analysis]. *Vestn Ross Akad Med Nauk*. 2008(4):27-34.
43. Struchkov PV, Selitskii GV, Korobeinikova MV, Zubkova AV. [Use of ozonotherapy (OT) in combined treatment of patients with discirculatory encephalopathy (DEP)]. *Vopr Kurortol Fizioter Lech Fiz Kult*. Mar-Apr 2008(2):10-13.
44. Gimaev R, Drapova DP, Skvortsov D, Olezov NV. [The influence of intravenous ozone therapy on the electrophysiological properties of myocardium during combined treatment of the patients presenting with arterial hypertension]. *Vopr Kurortol Fizioter Lech Fiz Kult*. Nov-Dec 2013(6):48-51.
45. Zhakiev BS, Zhumabaeva AN, Kaliev AA, Kazbekova GA. [Application of direct electric current and intravenous ozone therapy in the complex treatment of destructive forms of acute pancreatitis in experiment]. *Eksp Klin Gastroenterol*. 2013(7):32-37.
46. Kaliev AA, Zhakiev BS, Eleulov GA, Konakbaeva NK. [Concomitant use of intravenous ozone therapy and small doses of direct current in the integrated treatment of patient with sterile pancreatonecrosis]. *Vestn Ross Akad Med Nauk*. 2014(1-2):16-18.
47. Hernandez F, Menendez S, Wong R. Decrease of blood cholesterol and stimulation of antioxidative response in cardiopathy patients treated with endovenous ozone therapy. *Free Radic Biol Med*. Jul 1995;19(1):115-119.
48. Bocci V, Valacchi G, Rossi R, et al. Studies on the biological effects of ozone: 9. Effects of ozone on human platelets. *Platelets*. 1999;10(2-3):110-116.
49. Valacchi G, Bocci V. Studies on the biological effects of ozone: 10. Release of factors from ozonated human platelets. *Mediators Inflamm*. 1999;8(4-5):205-209.
50. Bick RL, Frenkel EP. Clinical aspects of heparin-induced thrombocytopenia and thrombosis and other side effects of heparin therapy. *Clin Appl Thromb Hemost*. Oct 1999;5 Suppl 1:S7-15.
51. Schulz S, Haussler U, Mandic R, et al. Treatment with ozone/oxygen-pneumoperitoneum results in complete remission of rabbit squamous cell carcinomas. *Int J Cancer*. May 15, 2008;122(10):2360-2367.
52. Häußler U. *Effect of Ozone/Oxygen-Pneumoperitoneum on Tumour Growth and Metastatic Spread of the Rabbit VX2 Head and Neck Cancer Model*. Marburg, Germany, Philipps Univ; 2009.
53. Rossmann A, Mandic R, Heinis J, et al. Intraperitoneal oxidative stress in rabbits with papillomavirus-associated head and neck cancer induces tumoricidal immune response that is adoptively transferable. *Clin Cancer Res*. Aug 15 2014;20(16):4289-4301.
54. Velez A M. Terapia adyuvante con ozono en paciente con cáncer de páncreas metastásico. *Revista Española de Ozonoterapia*. 2015 2015;5(1):21 - 31.
55. Clavo B, Santana-Rodríguez N, Llontop P, et al. Ozone Therapy in the Management of Persistent Radiation-Induced Rectal Bleeding in Prostate Cancer Patients. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2015;2015:480369.
56. ISCO3. Major Autohemotherapy. www.isco3.org2016:13.
57. Renate VH, Sonia LFO, Fahmy Z. Ozone in Medicine: Clinical Evaluation and Evidence
58. Classification of the Systemic Ozone Applications, Major Autohemotherapy and Rectal Insufflation, According to the Requirements for Evidence-Based Medicine. *Ozone: Science & Engineering*. 2016:25.



International Scientific Committee of
Ozone Therapy

SOP: ISCO3/LEG/00/10
Version: 2
Date: 5/09/2017
Page 14 of 14

Tel/Fax (+34) 913515175. Cell Phone (+34) 669685429
Avenida Juan Andrés 60. Local 1 – Bajo Izquierdo
28035, Madrid (Spain) info@isco3.org www.isco3.org

59. Faustini A, Capobianchi MR, Martinelli M, Abbate I, Cappiello G, Perucci CA. A cluster of hepatitis C virus infections associated with ozone-enriched transfusion of autologous blood in Rome, Italy. *Infect Control Hosp Epidemiol.* Sep 2005;26(9):762-767.
60. Ciborowski M, Lipska A, Godzien J, et al. Combination of LC-MS- and GC-MS-based metabolomics to study the effect of ozonated autohemotherapy on human blood. *J Proteome Res.* Dec 07 2012;11(12):6231-6241.
61. Marchetti D, La Monaca G. An unexpected death during oxygen-ozone therapy. *Am J Forensic Med Pathol.* Jun 2000;21(2):144-147.
62. ISCO3. Rectal Insufflation www.isco3.org. Vol ISCO3 MET 00 232017:9.
63. Kontorshchikova KN, Solopaeva IM, Peretiagin SP. [Effect of ozone on the liver state in experimental chronic hepatitis]. *Biull Eksp Biol Med.* Aug 1996;122(8):238-240.
64. Korolev BA, Boiarinov GA, Monakhov AN, Shvets NA, Peretiagin SP. [Metabolism and ultrastructure of the myocardium in protection of the heart against ischemia using an ozonized cardioplegic solution]. *Grudn Khir.* Nov-Dec 1983(6):27-31.
65. Qu DD, Peng FJ, Liu L, Yang SL, Guo YB. [Effect of ozonized saline on signaling passway of Keap1-Nrf2-ARE in rat hepatocytes]. *Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi.* May 2011;19(5):367-371.
66. Schwartz A. Solución Salina Ozonizada (SSO3): Fundamentos Científicos. *Revista Española de Ozonoterapia.* 2016;6(1):121-129.
67. Di Paolo N, Bocci V, Salvo DP, et al. Extracorporeal blood oxygenation and ozonation (EBOO): a controlled trial in patients with peripheral artery disease. *Int J Artif Organs.* Oct 2005;28(10):1039-1050.
68. Clavo B, Ceballos D, Gutierrez D, et al. Long-term control of refractory hemorrhagic radiation proctitis with ozone therapy. *J Pain Symptom Manage.* 2013;46(1):106-112.
69. Clavo B, Santana-Rodríguez N, Llontop P, et al. Ozone Therapy in the Management of Persistent Radiation-Induced Rectal Bleeding in Prostate Cancer Patients. Evid Based. *Complement Alternat Med.* 2015;2015(480369).
70. Hidalgo-Tallon J, Menendez-Cepero S, Vilchez JS, Rodríguez-Lopez CM, Calandre EP. Ozone therapy as add-on treatment in fibromyalgia management by rectal insufflation: an open-label pilot study. *J Altern Complement Med.* Mar 2013;19(3):238-242.
71. Carpendale MT, Freeberg J, Griffiss JM. Does ozone alleviate AIDS diarrhea? *J Clin Gastroenterol.* Sep 1993;17(2):142-145.