

PAPEL NEFROPROTECTOR DEL OZONO EN EL DAÑO RENAL CRÓNICO EXPERIMENTAL

NEPHROPROTECTIVE OZONE ROLE ON EXPERIMENTAL CHRONIC RENAL DAMAGE

José Luis Calunga Fernández^a (0000-0002-8388-4571)
Zullyt Zamora Rodríguez^{b*} (0000-0002-9387-3761)
Silvia Menéndez Cepero^c (0000-0003-2786-3239)
Carlos Rafael Núñez Cairo^d (0000-0003-4079-4688)
Alberto Goberna Hernández^e (0000-0002-5903-2096)

^a Centro Médico De La Salud Integral México-Cuba.

^b Centro Nacional de Investigaciones Científicas. Biocubafarma.

^c Jubilada del Centro Nacional de Investigaciones Científicas.

^d Instituto de Ciencias Básicas y Preclínicas Victoria de Girón.

^e Hospital Docente Pediátrico: Eliseo Noel Camaño, Matanzas, Cuba.

*zullyt.zamora@cnic.cu

Recibido: 21 de septiembre de 2022;

Aceptado: 8 de diciembre de 2022;

RESUMEN

Los productos avanzados de la glicosilación de proteínas (PAGP) constituyen mediadores importantes que ocasionan daño al tejido renal en diferentes situaciones clínicas. Conociendo los efectos nefroprotectores de la ozonoterapia rectal (OTR), el objetivo del estudio fue demostrar la influencia de esta terapia en los niveles de fructosamina como PAGP y la actividad de la fosfolipasa A2 en tejido renal con insuficiencia renal crónica por ablación de la masa renal (AMR) en ratas. Se seleccionaron ratas Wistar hembra con peso corporal entre 200 y 220 g, se dividieron en cuatro grupos experimentales: un grupo control sin daño renal, otro grupo control con daño renal por AMR y otros dos grupos también con daño renal y tratados con ozonoterapia y oxígeno también por vía rectal, respectivamente. Los resultados evidenciaron la reducción significativa $p < 0,05$ de los niveles de fructosamina y la actividad de la fosfolipasa A2 en el tejido renal de ratas tratadas con OTR. Por lo que se concluye que la OTR demostró acción antiinflamatoria, como mecanismo contribuyente a la preservación de la estructura y función del riñón sometido a daño renal experimental crónico, por ablación de la masa renal.

Palabras clave: Fructosamina, ozonoterapia, fosfolipasa A2, productos avanzados de glicosilación de proteínas, daño renal.

ABSTRACT

Advanced protein glycosylation products (APGP) represent an important mediators of renal tissue damage in different clinical situations. Knowing, the nephroprotective effects of rectal ozonotherapy (ROT), the objective of the study was to demonstrate its influence on fructosemine levels and activity of phospholipase A2 in kidney tissue with chronic renal failure by renal mass ablation (RMA) in rats. Female Wistar rats with body weight between 200 and 220 g divided into four experimental groups were selected: a control group without renal damage, another control group with renal damage by RMA and two other groups also with renal damage and ozone therapy and oxygen also via the rectal route, respectively. The results evidenced the significant reduction $p < 0.05$ of fructosamine levels and phospholipase A2 activity in the renal tissue of rats treated with OTR. Therefore, it is concluded that OTR demonstrated anti-inflammatory action, as a contributing mechanism to the preservation of structure and function kidney subjected to chronic experimental renal damage, by ablation of the renal mass.

Keywords: Fructosamine, ozonotherapy, phospholipase A2, Advanced protein glycosylation products, Kidney damage.

INTRODUCCION

Los productos avanzados de la glicosilación de proteínas constituyen mediadores importantes que ocasionan daño al tejido renal en diferentes situaciones clínicas como: La Insuficiencia Renal Aguda y crónica, la Nefropatía Diabética, la Glomerulonefritis, entre otras (Arsov et al., 2014). Estos productos avanzados de la glicosilación de proteínas (PAGP) aparecen en condiciones fisiopatológicas (Diabetes Mellitus e Insuficiencia Renal), donde la interacción química de la glucosa con la proteína es excesiva sin intervención enzimática (Ansari & Dash, 2013; Ott et al., 2014), produciendo la glicosilación de las proteínas (albumina). El producto inicial de la glicosilación de las proteínas es la base de Schiff, que se caracteriza por un reordenamiento intramolecular lento transformándose en fructosamina, tal como se le dominó a los PAGP. Este compuesto juega un papel crucial en el deterioro de la estructura y función renal en pacientes portadores de Nefropatía Diabética (Cruz & Licea, 2010; Fotheringham et al., 2022).

Se han encontrado receptores de PAGP en numerosas células, como macrófagos, monocitos, células endoteliales, linfocitos, células mesangiales, podocitos, capaces de unirse a estos (Egaña et al., 2020). La unión de los PAGP a los receptores en el macrófago, causa la activación de estos y se comienza a liberar citocinas proinflamatorias como la interleucina 1 (IL-1), el factor de necrosis tumoral alfa (TNF α), interleucina 8 (IL-8), interleucina 6 (IL-6) y el factor estimulador de colonia de granulocitos y monocitos (FSC-GM), capaces de dañar diferentes órganos como los riñones (Cruz & Licea, 2010; Egaña et al., 2020). En particular, se reporta que cuando se unen los PAGP a los receptores de las células mesangiales del glomérulo, estas producen cantidades crecientes de factor de crecimiento plaquetario (FCP) el cual promueve la producción de colágeno tipo IV, laminina y proteoglicano, causando expansión mesangial, glomérulo esclerosis focal y proteinuria (Cruz & Licea, 2010; Egaña et al., 2020). A nivel renal, tanto en el daño agudo (isquemia-reperusión renal y necrosis tubular aguda) como en el daño crónico (glomérulonefritis crónica e insuficiencia renal crónica), los PAGP causan el incremento de los niveles de Endotelina-1, potente vasoconstrictor, que disminuye el coeficiente de filtración glomerular (kf), reduciendo la intensidad de filtración glomerular y empeorándose de esta manera la función renal (Cruz & Licea, 2010; Fotheringham et al., 2022). Adicionalmente, se demostró que los PAGP son capaces de reaccionar con el óxido nítrico (ON), inactivarlo y disminuir así, la respuesta vasodilatadora en arterias renales de pacientes portadores de nefropatía diabética (Cruz & Licea, 2010; Fotheringham et al., 2022). Otro mediador del daño renal es la enzima fosfolipasa A2 (FLA2), esta enzima es una ATPasa, que hidroliza los enlaces éster presentes en los fosfolípidos (Ratee et al., 2009; van Hensbergen et al., 2020), que interviene en el metabolismo del ácido araquidónico. En el tejido renal inflamado por proceso de isquemia-reperusión renal, glomerulonefritis e insuficiencia renal, se estimula la reacción catalizada por FLA2 donde es liberado el ácido araquidónico de los fosfolípidos de las membranas celulares. Esto provoca alteración en la composición y propiedades funcionales de la bicapa lipídica de las membranas plasmáticas y a nivel de los organelos membranosos intracelulares (mitocondrias, etc) (Ratee et al., 2009; van Hensbergen et al., 2020). A consecuencia del incremento de la actividad de la FLA2 en el tejido renal lesionado, se liberan cantidades crecientes de ácidos grasos tóxicos capaces de desacoplar la fosforilación oxidativa provocando un daño en la síntesis de ATP a nivel de células renales (Hu et al., 2019; Portilla et al., 1994; Ozaki et al., 1999).

La ozonoterapia posee acciones biológicas generales, que incluyen: la estimulación del metabolismo del oxígeno, el mejoramiento de las propiedades reológicas de la sangre, la liberación de prostaciclina, la estimulación de los sistemas antioxidantes endógenos y el efecto inmunomodulador (Menéndez et al., 2008), que particularmente en modelos de daño renal agudo y crónico (Hui et al., 2008; Borrego et al., 2004) mejoraron la función y estructura del riñón. Por lo que el objetivo del estudio es evaluar la influencia de la OTR sobre niveles tisulares de fructosamina como PAGP y actividad de la fosfolipasa A2 como mediadores en el daño renal crónico, inducido por ablación de la masa renal.

MATERIALES Y MÉTODOS.

Animales:

Se utilizaron en el estudio, 40 ratas Wistar hembras de 200-220 gramos de peso corporal, procedentes del Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB). Todos los procedimientos fueron realizados según lo aprobado por los Comités Éticos Internacionales para el Cuidado de los Animales, de acuerdo con las regulaciones ya establecidas para la experimentación animal (ICILAS 2000).

Diseño experimental

Se crearon 4 grupos de 10 animales cada uno, distribuidos de la siguiente manera.

Grupo 1. Grupo control sin daño renal.

Grupo 2. Grupo con daño renal por ablación de la masa renal (AMR) sin tratamiento

Grupo 3. Grupo con daño renal por AMR, tratado con oxígeno por vía rectal

Grupo 4. Grupo con daño renal por AMR, tratado con ozonoterapia rectal (OTR)

Insuficiencia Renal Crónica (IRC) por ablación de la masa renal (AMR)

Los animales anestesiados con pentobarbital sódico (30 mg/kg, vía ip), se les realizó la laparotomía ventral, el riñón derecho fue removido (nefrectomía derecha), previa ligadura del paquete vascular renal, mientras que dos tercios del riñón izquierdo sufrió infarto agudo, inducido por ligadura de dos ramas principales de la arteria renal izquierda. De esta forma se obtuvo una IRC por ablación de 5/6 de la masa renal (Calunga et al., 2005). Culminado el procedimiento quirúrgico, se suturó la incisión abdominal. Transcurridas 10 semanas, se comenzaron a aplicar los tratamientos de ozonoterapia y oxígeno por vía rectal.

Tratamiento con ozono

La ozonoterapia se aplicó, utilizando un generador de ozono (Ozomed ® plus) fabricado en el Centro Nacional de Investigaciones Científicas (CNIC), La Habana, Cuba. La mezcla ozono/oxígeno (MOO), generada por el equipo, se administró por vía rectal utilizando una jeringa conectada a una sonda de polietileno. Se aplicó un volumen de 2.5-2.6 mL, con una concentración de la MOO de 50 µg/ml, cada 24 h, durante 10 días, para una dosis de 0.5 mg/kg de peso. El grupo de animales que recibió oxígeno por vía rectal, se le aplicó igual volumen, equivalente a 26 mg/kg, durante 10 días consecutivos, con igual frecuencia.

Obtención de las muestras de riñón

La eutanasia de los animales, se practicó, culminados los 10 días de tratamiento, mediante sobredosis de anestesia, con Tiopental sódico (50 mg/kg). Se extrajeron los riñones y se conservaron a -20 ° C.

Preparación de homogenado de tejido renal

El tejido renal, se homogenizó en un destructor de tejido Edmond Bohler HO₄ (Alemania). Se Homogenizó una porción de tejido previamente pesado, se le adicionaron 5 mL de solución amortiguadora KCI-histidina, y posteriormente, se centrifugó a 5 000 rpm/min, durante 15 min a 4 ° C para la obtención del sobrenadante, el cual se conservó a -20 °C hasta el momento de realizar las determinaciones de la actividad de la fosfolipasa A2 (FLA2) y la fructosamina como indicador de los productos avanzados de la glicosilación de las proteínas (PAGP).

Variables

La actividad total renal de FLA2 se determinó por el procedimiento descrito por Hotter *et al.*, 1991. Los niveles renales de fructosamina, como indicador de PAGP, se determinó por método fotolorimétrico, expresándose en unidades de densidad óptica por gramo de tejido renal, método descrito por Thome *et al.*, 1996.

Análisis Estadístico.

Primeramente, se realizó el análisis descriptivo en el cual se calcularon la media y desviación estándar para cada grupo y variables. Se realizaron comparaciones simples entre grupos, para las variables actividad de enzimas FLA₂ y los niveles de fructosamina, utilizando el ensayo no paramétrico de U de Mann-Whitney. El nivel de significación estadística empleado en todos los casos fue p<0.05

RESULTADOS y DISCUSION.

La insuficiencia renal crónica inducida por AMR, produjo un incremento significativo de la actividad de la FLA2 y los niveles de fructosamina con respecto al grupo control sano (Tabla 1). El grupo de animales tratados con ozonoterapia rectal, experimentó una reducción de los niveles de fructosamina y actividad de la FLA2, con respecto al control dañado, sin que este última alcanzara niveles similares a los del control sano. Las aplicaciones de oxígeno, no mostraron diferencias significativas (p<0,05) con respecto al grupo control dañado.

Tabla 1. Influencia de la ozonoterapia rectal sobre la actividad de la FLA2 y los niveles de Fructosamina en tejido renal de ratas con IRC por AMR.

Variables	Control sano	Control (AMR)	AMR + MOO	AMR + Oxígeno
FLA2 (U/g prot)	25,5 ± 5,9 ^a	278,8 ± 97,8 ^b	114,5 ± 37,4 ^c	285,7 ± 99,6 ^b
Fructosamina (ΔD. O)	0,01 ± 0,00 ^a	0,07 ± 0,00 ^b	0,03 ± 0,00 ^c	0,07 ± 0,00 ^b

FLA2: fosfolipasa A 2, U/g prot: unidades por gramo de proteínas, UI/g prot: unidades internacionales por gramos de proteínas, μmol/g prot: micromoles por gramos de proteínas, ΔD. O: variación de densidad óptica. AMR: Ablación de la masa renal, IRC: Insuficiencia renal crónica. MOO: Mezcla Ozono-Oxígeno Letras diferentes significan diferencias significativas $p < 0,05$. Se aplicó el ensayo no paramétrico U de Mann Whitney.

La insuficiencia renal crónica inducida por ablación de la masa renal (IRC-AMR), incrementó significativamente la actividad de la FLA₂ y los niveles de fructosamina en el tejido renal, como productos avanzados de la glicosilación de proteínas (PAGP), con respecto al grupo control aparentemente sano. La ozonoterapia rectal (10 aplicaciones), revirtió la disfunción renal, mediante la reducción de la actividad de las FLA₂ y los niveles de fructosamina en el tejido renal de ratas con IRC-AMR.

Por primera vez, se demostró que el efecto protector renal de la ozonoterapia, en parte, es mediada por la reducción de la formación de PAGP y la actividad de la FLA₂, en el modelo de IRC –AMR. Resultados, similares se alcanzaron en modelos de daño renal agudo, (Calunga *et al.*, 2009; Calunga *et al.*, 2019) confirmando así, que la ozonoterapia rectal es capaz de reducir el daño renal y preservar la función de este, tanto en procesos agudos como crónicos. Dicho mecanismo, se encuentra, adicionalmente, favorecido por la acción estimuladora de enzimas antioxidantes endógenas, tal como se ha evidenciado en estos y otros modelos experimentales en los que se evaluó la ozonoterapia (Barber *et al.*, 1999; Hotter *et al.*, 1991; Calunga *et al.*, 2009. La actividad de la catalasa (CAT) y la superóxido dismutasa (SOD), acompañado por la reducción de los niveles de las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (SRATB), fue el mecanismo responsable de la disminución del daño crónico renal, definido por el restablecimiento del flujo plasmático renal, la intensidad del filtrado glomerular, los niveles de creatinina y las proteínas excretadas (Barber *et al.*, 1999; Hotter *et al.*, 1991; Calunga *et al.*, 2009; Calunga *et al.*, 2019)

Los PAGP tienen un importante papel dentro del proceso fisiopatológico del daño renal crónico. Cuando los PAGP, se unen a sus receptores, ocurre una rápida disminución de la trombomodulina, impidiendo la activación de la proteína C (agente anticoagulante capital). Este hecho, durante un proceso de isquemia-reperusión, promueve la formación de trombos en arterias renales disminuyendo la I.F.G. (Stirban, Gawlowski, Roden. 2014; Cohen, 2011).

Anteriormente, se reportó la vinculación del efecto protector de la ozonoterapia mediado por la reducción de los niveles de la fructosamina y PAGP, así como la actividad de la FLA₂, en modelo crónico experimental de GTEA, (Calunga *et al.*, 2010) resultados que se corresponden con los reportados en el modelo de IRC-AMR de este estudio (Tablas 1). Adicionalmente, la modulación del estado Redox intracelular, que conduce al mejoramiento de la función renal y reversión del daño histomorfológico del tejido, tanto en el modelo de GTEA (Calunga *et al.*, 2010) y IRC-AMR (Calunga *et al.*, 2019), son aspectos bioquímicos-estructurales favorecidos por la ozonoterapia rectal.

En el modelo de I/R renal, se evidencia histomorfológicamente que la ozonoterapia revierte del daño provocado, que en primer lugar puede estar sustentado por la disminución en los niveles de fructosamina a nivel renal, (Thome *et al.*, 1996) lo que impediría la formación de trombos, mejorando así, la función del riñón (niveles del flujo plasmático renal (FPR) e Índice de filtrado glomerular (IFG)). Además, los PAGP tras unirse a sus receptores activan al factor transcripcional NF-KB este promueve la expresión de interleucinas proinflamatorias, creándose un estado pro-inflamatorio el cual daña severamente la función y estructura de la nefrona (Cohen, 2011; Radcliffe *et al.*, 2017). Por otra parte, los PAGP producen reducción del ON e incrementan los niveles renales de endotelina-1, provocando así, la disminución del coeficiente de filtración glomerular (kf) y el IFG (Cohen, 2011; Radcliffe *et al.*, 2017). Adicionalmente, los PAGP al unirse a sus receptores en las células mesangiales y podocitos producen proteinuria (Fotheringham *et al.*, 2022; Cohen, 2011; Radcliffe *et al.*, 2017). Por lo que la reducción de los PAGP, por parte de la ozonoterapia rectal, conduce a la disminución de la activación de los receptores, por tanto, se espera un menor daño inflamatorio renal, poco deterioro de la función del riñón, disminución de niveles plasmáticos patológicos de creatinina, reducción del grado de proteinuria y preservación en gran medida de la arquitectura renal, tanto en biomodelos agudos como crónicos.

Por otra parte, también los PAGP son capaces de inducir mecanismos productores de especies reactivas del oxígeno (ERO), fundamentalmente, peróxido de hidrógeno y el anión superóxido, provocando un estrés oxidativo a nivel renal, el que contribuye al deterioro de la función de la nefrona ((Hotter *et al.*, 1991; Diaz & Luna, 2016; Calunga *et al.*, 2019; Radcliffe *et al.*, 2017; Delgado *et al.*, 2017). La ozonoterapia, por la vía de la activación del factor transcripcional nuclear eritroide 2 (Nrf2), estimula endógenamente la síntesis de enzimas

antioxidantes como la SOD y la CAT, controlando el estrés oxidativo (Delgado *et al.*, 2017; Galie *et al.*, 2019; Martínez *et al.*, 2012). Por tanto, se sugiere, que la ozonoterapia no solo tiene acción nefroprotectora, sino citoprotectora, justificada por el poder de estimular la síntesis endógena de enzimas antioxidantes (CAT y la SOD), la reducción en los niveles de peroxidación lipídica y por ende el daño oxidativo desarrollado en diferentes condiciones fisiopatológicas (Hui *et al.*, 2008; Al-Dalain *et al.*, 2001; Bocci, 2006; Borrego *et al.*, 2004; Calunga *et al.*, 2004; Calunga *et al.*, 2019).

El proceso inflamatorio renal tanto agudo como crónico, se ha vinculado al incremento de la expresión de citocinas proinflamatorias, a través de la estimulación del factor de transcripción nuclear NF- κ B (Xing *et al.*, 2015). Dichos autores, demostraron que la ozonoterapia redujo el daño renal, mediante la disminución de la expresión tisular de este factor y consecuentemente redujo la expresión de citocinas proinflamatorias (FNT, la IL1 y la IL-6) y estos resultados, se corresponden con los demostrados por Calunga *et al.*, 2019, quienes confirman que la OTR redujo la expresión de la IL-6, acompañada por el incremento de la actividad de los sistemas antioxidantes endógenos en el modelo de IRC por AMR.

Otro de los mecanismos moleculares que revelan y sustentan el indiscutible efecto nefroprotector de la ozonoterapia, es su influencia sobre la disminución de la expresión del NLRP3 (inflamósoma), la caspasa 1-p10, conjuntamente con la IL-1 β en ratas con 5/6 nefrectomizadas (Yu *et al.*, 2017).

La actividad de FLA2 fue menor significativamente por la ozonoterapia rectal en el modelo de daño renal crónico (IRC-AMR), reflejando así el efecto antiinflamatorio. Esto ha sido demostrado, en otros modelos experimentales, como el de alcoholismo (Adali *et al.*, 2019), de displasia en ratones transgénicos ((Peirone *et al.*, 2018) y daño pulmonar por I/R (Wang *et al.*, 2018), preservando así la integridad de las estructuras tisulares. Estos resultados, sustentan que el uso de inhibidores de FLA₂, tiene efecto protector en el daño isquémico cardiaco, en cultivos de células renales y del túbulo proximal (Hotter *et al.*, 1991).

Estos resultados, sustentan los efectos beneficiosos de la ozonoterapia rectal por AMR, compartiendo mecanismos de acción en común, como es, la estimulación del sistema antioxidante endógeno, modular la respuesta inflamatoria, mediante la reducción de los PAGP y la actividad de la FLA2, acciones fundamentales que aseguran la preservación de la función renal y la reversión del daño estructural histopatológico evidenciado en los modelos de daño renal estudiados hasta el momento.

CONCLUSIONES

La Ozonoterapia rectal demostró acción antiinflamatoria, mediante la reducción de los niveles de fructosamina y la actividad de FLA2 a nivel renal, como mecanismo contribuyente a la preservación de la estructura y función del riñón sometido a daño renal experimental crónico, por ablación de la masa renal

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adali, Y., Eroglu, H.A., Makav, M., Guvendi, G.F. (2019). Efficacy of Ozone and Selenium Therapy for Alcoholic Liver Injury: An Experimental Model. *In Vivo*, 33, 763–769.
- Ansari, N. A., & Dash, D. (2013). Amadori glycated proteins: Role in production of autoantibodies in diabetes mellitus and effect of inhibitors on non-enzymatic glycation. *Aging and Disease*, 4, 50–56
- Arsov, S., Graaff, R., van Oeveren, W., Stegmayr, B., Sikole, A., Rakhorst, G., et al. (2014). Advanced glycation end-products and skin autofluorescence in end-stage renal disease: A review. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 52, 11–20
- Barber, E., Menéndez, S., León, O.S., Barber, M.O., Merino, N., Calunga, J.L., Cruz, E., Bocci, V. (1999). Prevention of renal injury after induction of ozone tolerance in rats submitted to warm ischaemia. *Mediat Inflamm*, 8, 37-41.
- Borrego, A., Zamora, Z.B., González, R., Romay Ch., Menéndez, S., Hernández, F., Montero, T., Rojas, E. (2004). Protection by ozone preconditioning is mediated by the antioxidant system in cisplatin-induced nephrotoxicity in rats. *Mediat Inflamm*, 13(1), 13-1914
- Calunga, J. L., Zamora, Z., Borrego, A., del Rio, S. (2005). Ozone Therapy on Rats Submitted to Subtotal Nephrectomy: Role of Antioxidant System, 4, 221–227.
- Calunga, J.L., Bello, M., Menéndez, S., Merino, N., Zamora, Z., Ramos, T. (2010). Efecto de la Ozonoterapia sobre marcadores de la inflamación en un modelo de Glomerulonefritis Tóxica Experimental. *Revista CENIC. Ciencias Biológicas*, vol. 41.
- Calunga, J.L., Menéndez, S., & Zamora, Z. (2019). Ozone Therapy On Rats Submitted To Subtotal Nephrectomy: Role Of Interleukin 6 And Antioxidant System. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas*, 38(1), 1-10.
- Calunga, J.L., Trujillo, Y., Menéndez, S., Zamora, Z. (2009). Ozone oxidative post-conditioning in acute renal failure. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 2009, 61, 1–7.

- Cohen, E.N.S. (2011). La glicosilación no enzimática: una vía común en la diabetes y el envejecimiento. *Med Cutan Iber Lat Am*, 39(6),243-246.
- Cruz, J.H., Licea, P.M.E. (2010). Glucosilación no enzimática y complicaciones crónicas de la diabetes mellitus. *Revista Cubana de Endocrinología*, 21(2), 223-255.
- Delgado, L.R., Riera, R.M., Mesta, F., Hernandez. M.Y., Barrios, J.M., Martinez SG., & Aldalaien, S.M. (2017). Medical Ozone promotes Nrf2 phosphorylation reducing oxidative stress and proinflammatory cytokines in multiple sclerosis patients. *European Journal of Pharmacology*, 811,148-154.
- Díaz, C.L., Luna P.D. (2016). Productos finales de glicación avanzada en la enfermedad cardiovascular como complicación de la diabetes Advanced glycation end products in cardiovascular disease as a complication of diabetes. *Medicina e Investigación*, 4, 52-57
- Egaña, G.L., López, D.R., Yepuri, G., Ramirez, L.S., Reverdatto, S., Gugger, P.F., Shekhtman, A., Ramasamy, R. and Schmidt, A.M. (2020). Receptor for Advanced Glycation End Products (RAGE) and Mechanisms and Therapeutic Opportunities in Diabetes and Cardiovascular Disease: Insights From Human Subjects and Animal Models. *Front. Cardiovasc. Med*, 7,37
- Fotheringham, A.K., Gallo, L.A., Borg, D.J., Forbes, J.M. (2022). Advanced Glycation End Products (AGEs) and Chronic Kidney Disease:Does the Modern Diet AGE theKidney? *Nutrients*, 14, 2675
- Galie, M., Covi, V., Tabaracci, G., Malatesta, M. (2019). The Role of Nrf2 in the Antioxidant Cellular Response to Medical Ozone Exposure. *Int. J. Mol. Sci*, 17,20(16), 4009.
- Hotter, G., Leon, O.S., Roselló-Catafau, J., López-Boado, M.A., Parellada, P.P., Henriques, R.D., et al., (1991). Tissue prostanoid release, phospholipase A2 activity and lipid peroxidation in pancreas transplantation. *Transplantation*, 51, 987–990.
- Hu, Y., Li, T.T., Zhou, W., Lu, T.T., Li, F.F., Liu, B.L., Xie, X.J., et al. (2019). Lipoprotein-associated phospholipase A2 is a risk factor for diabetic kidney disease. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 150,194-201
- Hui, C., Bianzhi, X., Xiuheng, L. (2008). Ozone oxidative preconditioning inhibits inflammation and apoptosis in a rat model of renal ischemia/reperfusion injury. *Eur J Pharmacol*, 581, 306-314.
- Marengo, D. A., Duran, M.L. (2016). Más allá de la Diabetes Mellitus: Glicación de proteínas. *Biociencias*, 11 (1), 105-111.
- Martinez, G.S., Schwartz, A. & Di Donna, V. (2020). Potential Cytoprotective Activity of Ozone Therapy in SARS-CoV-2/COVID-19. *Antioxidants*, 9 (389), 2-12.
- Menéndez, S., Hernández, R., González, R. et al. (2008). *Ozono Aspectos Básicos y aplicaciones Clínicas*. 1era Ed. CNIC.
- Ott, C., Jacobs, K., Haucke, E., Navarrete Santos, A., Grune, T., & Simm, A. (2014). Role of advanced glycation end products in cellular signaling. *Redox Biology*, 2, 411–429
- Ozaki, M., Yamada, Y., Matoba, K., Otani, H., Mune, M., Yukawa, S., Sakamoto, W. (1999). Phospholipase A₂ activity in ox-LDL-stimulated mesangial cells and modulation by alpha- tocopherol. *Kidney Int*, 56 (Suppl 71), S171-S173.
- Peirone, C., Mestre, V.F., Fonseca, M.B., Colaco, B., Pires, M.J., Martins, T., et al. (2018). Ozone therapy prevents the onset of dysplasia in HPV16-transgenic mice-A pre-clinical efficacy and safety analysis. *Biomed. Pharmacother*, 104, 275–279.
- Portilla, D., Shah, S.V., Lehman, P.A., Creer, M.H. (1994). Role of cytosolic calcium-independent plasmalogen-selective phospholipase A₂ in hypoxic injury to rabbit proximal tubules. *J Clin Invest*, 93, 1609-1618.
- Radcliffe, N.J., Seah, J.M., Clarke, M., MacIsaac, R.J., Jerums, G., Ekin, E.I. (2017). Clinical predictive factors in diabetic kidney disease progression. *J Diabetes Investig*, 8(1), 6-18.
- Rathee, P., Peluso, L., Raguzzini, A. (2009). Mechanism of action of flavonoids as anti-inflammatory agents: A review. *Inflamm. Allergy Drug Targets*, 8, 229–235.
- Stirban, A., Gawlowski, T., Roden, M. (2014). Vascular effects of advanced glycation end products: Clinical effects and molecular mechanisms. *Molecular metabolism*, 3, 94–108
- Thome, J., Munch, G., Miller, R. (1996). Advanced glycation end products-associated parameters in the peripheral TAU blood of patients with Alzheimer's disease. *LJ/t Sd*, 59, 679-685.
- van Hensbergen, V. P., Wu, Y., van Sorge, N. M. & Touqui, L. (2020). Type IIA secreted phospholipase A₂ in host defense against bacterial infections. *Trends Immunol*, 41, 313–326.
- Wang, Z., Zhang, A., Meng, W., Wang, T., Li, D., Liu, Z., et al. (2018). Ozone protects the rat lung from ischemia-reperfusion injury by attenuating NLRP3-mediated inflammation, enhancing Nrf2 antioxidant activity and inhibiting apoptosis. *European Journal of Pharmacology*, 835, 82-93.

Xing, B., Chen, H., Wang, L., Weng, X., Chen, Z., Li, X. (2015). Ozone oxidative preconditioning protects the rat kidney from reperfusion injury via modulation of the TLR4-NF- κ B pathway. *Acta Cir. Bras*, 30 (1), 60-66.

Yu, G., Bai, Z.H., Chen, Z., Chen, H., Wang, G., Wang, G. et al. (2017). The NLRP3 inflammasome is a potential target of ozone therapy aiming to ease chronic renal inflammation in chronic kidney disease. *International Immunopharmacology*, 43, 203–209.

Este artículo no presenta conflicto de intereses

CONTRIBUCION AUTORAL:

José Luis Calunga Fernández: Autor principal. Conceptualización, investigación, metodología, análisis formal e interpretación de los resultados, redacción del borrador original, redacción (revisión y edición).

Zullyt Bárbara Zamora Rodríguez: Conceptualización, investigación, metodología, análisis formal e interpretación de los resultados, revisión crítica de la versión final y su aprobación, redacción del borrador original, redacción (revisión y edición).

Silvia Menéndez Cepero: Conceptualización, investigación, metodología.

Carlos Rafael Núñez: Investigación, metodología.

Alberto Valentín Goberna Hernández: Investigación, metodología, validación.