



Revista CENIC. Ciencias Biológicas
ISSN: 0253-5688
ISSN: 2221-2450
editorial.cenic@cnic.edu.cu
Centro Nacional de Investigaciones Científicas
Cuba

Evaluación de la irritabilidad dérmica y oftálmica de la formulación de aceite de girasol ozonizado en conejos

Zamora Rodríguez, Zullyt; Gutierrez Martínez, Ariadne; Ocaña Napoles, Leyanis; Urquiaga Riso, Daniela; Ledea Iozano, Oscar; Fernández García, Lidia Asela; Gil Ibarra, Dayana

Evaluación de la irritabilidad dérmica y oftálmica de la formulación de aceite de girasol ozonizado en conejos

Revista CENIC. Ciencias Biológicas, vol. 50, núm. 3, 2019

Centro Nacional de Investigaciones Científicas, Cuba

Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=181263502003>

Evaluación de la irritabilidad dérmica y oftálmica de la formulación de aceite de girasol ozonizado en conejos

Evaluation of the dermal and ophthalmic irritability of the ozonized sunflower oil formulation in rabbits

Zullyt Zamora Rodríguez zullyt.zamora@cnic.edu.cu

Unidad de Productos Naturales, CNIC, Cuba

Ariadne Gutierrez Martínez

Unidad de Productos Naturales, CNIC, Cuba

Leyanis Ocaña Napoles

Unidad de Productos Naturales, CNIC, Cuba

Daniela Urquiaga Riso

Unidad de Productos Naturales, CNIC, Cuba

Oscar Ledea Iozano

Unidad de Productos Ozonizados, CNIC, Cuba

Lidia Asela Fernández García

Unidad de Productos Ozonizados, CNIC, Cuba

Dayana Gil Ibarra

Unidad de Productos Ozonizados, CNIC, Cuba

Revista CENIC. Ciencias Biológicas, vol. 50, núm. 3, 2019

Centro Nacional de Investigaciones Científicas, Cuba

Recepción: 30 Octubre 2019
Aprobación: 16 Diciembre 2019

Redalyc: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=181263502003>

Resumen: Ozonized vegetable oils and their formulations are used, for their beneficial effects, however, it is important to demonstrate their safety. For this reason, the evaluation of its possible dermal and ophthalmic irritant effect in rabbits of the formulation based on ozonized sunflower oil (AGO) at 30% was performed. For this purpose, New Zealand male young adult rabbits of 1.8 to 2.2 kg of body weight were used, obtained from the National Center for Laboratory Animals (CENPALAB). A group of three animals was used for dermal irritability and another group of equal number for ophthalmic irritability. For dermal irritability, 0.5 g of the AGO cream was applied to an area of previously shaved skin, and covered with a patch. The patch was removed after the first hour to observe the evolution of the degree of edema and erythema according to the Draize scale at 1, 24, 48 and 72 h. For ophthalmic irritability, 0.1 g of the 30% AGO cream was applied in the right conjunctival sac of each animal. The evaluation of the degree of affection for each of the ocular structures, were performed at 1, 24, 48 and 72 h after application. Slight irritation was observed in the first 24 h, therefore, it was classified as mildly irritating. Regarding ophthalmic irritability, there was a slight presence of edema and injection of the conjunctival blood vessels grade 1 and 2 that reverts between 48 and 72 h later, being classified as non-irritating. The 30% AGO cream was classified as mild dermal irritant and non-ophthalmic irritant

Palabras clave: AGO, conejos, irritación dérmica, irritación, oftálmica, edema, eritema.

Abstract: Ozonized vegetable oils and their formulations are used, for their beneficial effects, however, it is important to demonstrate their safety. For this reason, the evaluation of its possible dermal and ophthalmic irritant effect in rabbits of the formulation based on ozonized sunflower oil (AGO) at 30% was performed. For this purpose, New Zealand male young adult rabbits of 1.8 to 2.2 kg of body weight were used, obtained from the National Center for Laboratory Animals (CENPALAB). A group of three animals was used for dermal irritability and another group of equal number for ophthalmic irritability. For dermal irritability, 0.5 g of the AGO cream was applied to an area of previously shaved skin, and covered with a patch. The patch

was removed after the first hour to observe the evolution of the degree of edema and erythema according to the Draize scale at 1, 24, 48 and 72 h. For ophthalmic irritability, 0.1g of the 30% AGO cream was applied in the right conjunctival sac of each animal. The evaluation of the degree of affectation for each of the ocular structures, were performed at 1, 24, 48 and 72 h after application. Slight irritation was observed in the first 24 h, therefore, it was classified as mildly irritating. Regarding ophthalmic irritability, there was a slight presence of edema and injection of the conjunctival blood vessels grade 1 and 2 that reverts between 48 and 72 h later, being classified as non-irritating. The 30% AGO cream was classified as mild dermal irritant and non-ophthalmic irritant.

Keywords: OSO, rabbits, dermal irritation, ophthalmic irritation, edema, erythema.

INTRODUCCIÓN

Es importante conocer que un producto químico puede provocar irritación no solo mediante la destrucción directa del tejido, sino que puede alterar distintas funciones celulares provocando la formación, liberación y activación de autacoides. Los autacoides en la piel, como la histamina, los metabolitos del ácido araquidónico, las cininas, el sistema del complemento, algunas especies reactivas del oxígeno y las citocinas son los encargados de iniciar una cascada de reacciones que conducen inevitablemente a la reacción inflamatoria. (Berrardesca & Distante, 1994).

El mecanismo principal que utilizan las células epidérmicas, para participar en las reacciones inflamatorias es la producción y liberación de citocinas. Los queratinocitos, que constituyen aproximadamente un 90 o 95 % de las células de la epidermis, son una fuente muy importante de citocinas y, por tanto, desempeñan un papel decisivo en el inicio y el mantenimiento de las reacciones inflamatorias (Mckenzie & Sauer, 1990). Los queratinocitos en condiciones normales, producen algunas citocinas constitutivamente, como las interleucinas 1- α (IL-1 α) (Dinarelo, 1998), pero también son capaces de producir otras citocinas (TNF- α , IL-8 e IL-6) en respuesta a estímulos externos (Sims *et al*, 1990). Sin embargo, entre todas las citocinas que son capaces de producir y liberar, únicamente la IL1- α , la IL1- β y el TNF- α activan un número suficiente de efectores para desencadenar por sí misma un proceso inflamatorio (Kupper, 1990).

La cornea, en las reacciones de irritación ocular, constituye un importante tejido del globo ocular, cuya estructura proteica, muy organizada, permite el paso libre de la luz a través de ella. Algunas sustancias químicas pueden alterar la estructura de la córnea hasta el punto de perder su transparencia, de modo que pueden provocar pérdida parcial de la visión o incluso ceguera. Alrededor del 80 % de la córnea está formada por estroma, una red organizada de macromoléculas, con un nivel de hidratación apropiado (Kupper, 1990).

La pérdida de la impermeabilidad transepitelial, debido a daños sobre las uniones estrechas y los desmosomas que unen las células del epitelio, es uno de los fenómenos iniciales en las lesiones inducidas por productos químicos (Bothan *et al*, 1998), de modo que si el epitelio se lesiona puede aparecer opacidad corneal. Sin embargo, niveles de opacidad menos

graves pueden revertirse dado que el epitelio tiene la capacidad de auto regenerarse a través del movimiento de las células de alrededor hasta cubrir la herida o mediante reemplazo de las células dañadas por división celular. En cambio, el endotelio no es capaz de repararse. Por ese motivo, las lesiones sobre esas células pueden tener consecuencias graves como la ceguera permanente (Curren & Harbell, 1998). La conjuntiva, como estructura que queda expuesta al ambiente, está formada por epitelio escamoso no queratinizado y es muy sensible a las sustancias extrañas. Por tanto, cuando una sustancia irritante entra en contacto con la conjuntiva se inicia un proceso inflamatorio que provoca dilatación de la red vascular, confiriendo un aspecto enrojecido a la membrana. Asimismo, se pueden producir cambios en la permeabilidad de los capilares, provocando edema. Algunos productos pueden provocar conjuntivitis sin afectar la córnea. Los efectos de los productos químicos sobre la conjuntiva suelen ser reversibles (Curren & Harbell, 1998).

El iris se sitúa por detrás de la córnea y se encuentra rodeada por el humor acuoso. Es una estructura vascular formada por el tejido conjuntivo laxo, fibras musculares y células pigmentadas. La irritación también puede provocar sobre esta estructura la dilatación de los vasos sanguíneos y la liberación de líquidos vasculares que provocan edema. Además, al producirse daños sobre el iris, la liberación de proteínas procedentes de la sangre acuosa puede cambiar su índice de refracción provocando alteraciones de la visión. Los daños más graves pueden provocar la destrucción del tejido del iris que tiene como consecuencia la pérdida de su reactividad a la luz (Curren & Harbell, 1998).

El 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 (Diaz *et al*, 2001; Diaz *et al*, 2005; Diaz *et al*, 2008; Ledea, 2004; Ledea *et al*, 2005). Ha sido demostrado que el AGO presenta efectos anti-inflamatorios (AI) en diferentes modelos experimentales. En tal sentido, se demostró su eficacia en el modelo de inflamación aguda (edema en la oreja de ratón), donde redujo significativamente el edema y el infiltrado inflamatorio (Zamora *et al*, 2006). Recientemente, se ha evidenciado la eficacia antiinflamatoria de una nueva formulación de crema de AGO en un modelo de inflamación crónica (granuloma por algodón) (Zamora *et al*, 2018). Además, el tratamiento tópico con AGO en la cola de la rata como modelo experimental de ortoqueratosis, redujo la liberación del calcio, lo cual estuvo asociado al incremento de la actividad de la enzima antioxidante superóxido dismutasa (SOD) (Martínez *et al*, 1997).

Estudios con el aceite de oliva ozonizado (AOO) y el oleato de metilo ozonizado (OMO) han reportado evidencias sobre los mecanismos moleculares implicados en sus propiedades anti-inflamatorias. Así, los ozónidos contenidos en el AOO y el OMO inhibieron la expresión de prostaglandina E2 (PGE2) y la ciclooxigenasa 2 (COX-2) en el cultivo de macrófagos ThP1 estimulados por lipopolisacárido (LPS) (Tamoto *et al*, 2005). La reducción de la expresión de COX-2 y como consecuencia los niveles de PGE-2, se encontraron asociados a la disminución de la

fosforilación de la subunidad inhibitoria I κ B del factor de transcripción nuclear NF κ B (Nakamuro *et al*, 2005).

Por otra parte, ha sido demostrado que el AOO inhibió el proceso de mitogénesis inducido por Concanavalina A (Con A) en linfocitos esplénicos de ratones, sugiriendo que suprime la reacción inmune de los linfocitos. La actividad anti-inflamatoria del AOO también fue demostrada mediante la inhibición de la enzima óxido nítrico sintasa inducible (ONSi) en macrófagos de la línea celular J447.1 de ratones estimulada por LPS (Nakamuro *et al*, 2005).

Otra de las acciones farmacológicas importantes que sustentan el uso de los aceites ozonizados en diferentes procesos dermatológicos es que estimula la cicatrización, siendo demostrado en diferentes modelos experimentales. Este efecto se basa fundamentalmente en la activación local de la expresión de factores de crecimiento, la reducción de la infiltración de neutrófilos en el tejido y la estimulación consecuente de la formación del tejido de granulación (Sánchez *et al*, 1998; Barroetabeña *et al*, 2002; Sakazaki *et al*, 2007; Kim *et al*, 2009; Valachi *et al*, 2011). Adicionalmente, el poder germicida de amplio espectro

(Lezcano *et al*, 2000; Sechi *et al*, 2001) es otra de las acciones farmacológicas descrita para el AGO, que favorece el proceso de cicatrización, conjuntamente con la respuesta anti-inflamatoria local. La evaluación toxicológica aguda del OLEOZON $\hat{a}$ tópico (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*, 2000). Los estudios de mutagenicidad, teratogenicidad y genotoxicidad, de forma similar mostraron la seguridad del OLEOZON $\hat{a}$ 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 anti-inflamatorio en el modelo del edema en la oreja del ratón inducido por aceite de crotón (Díaz *et al*, 2008). Un estudio previo demostró que la aplicación en piel de la crema a base de ATO protegió de las lesiones inducidas por radiaciones (UV) en ratas y estimuló la actividad de las enzimas del sistema antioxidante endógeno como la SOD y la glutatión peroxidasa (GPx), sugiriendo que este mecanismo antioxidante contribuye, al menos en parte, a reducir el proceso inflamatorio en la piel con lesiones inducidas por radiaciones (Sánchez *et al*, 2011).

Por otra parte, 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).

Sin embargo, ante el desarrollo de una nueva formulación de forma farmacéutica a base de OLEOZON $\hat{a}$, para uso dermatológico, por lo que,

el objetivo de este estudio es evaluar el efecto irritante dérmico y oftálmico de la nueva formulación en conejos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Sustancia objeto de estudio

Formulación de AGO al 30 % lote: 260517003. Procedente de laboratorio de Química de la Unidad de productos Ozonizados-Centro Nacional de Investigaciones Científicas (CNIC). La sustancia es una crema semisólida de color beige, almacenada en frascos plásticos de alta densidad y mantenidos en refrigeración de 2 a 8 ° C.

Animales

Se emplearon conejos Nueva Zelandia machos, suministrados por el CENPALAB (La Habana, Cuba), adultos jóvenes de 1,8 a 2,2 kg de peso corporal.

Se utilizó esta especie lagomorfa por ser la especie destinada a este fin según establece la Organización de Cooperación Económica para el Desarrollo (OCDE 404 del 2015 y 405 del 2012).

Los animales tuvieron un periodo de cuarentena de 14 días en condiciones convencionales de temperatura y humedad ambientales. El manejo de los animales se realizó bajo el cumplimiento de las normas éticas para el manejo de animales de laboratorio, establecidas en el Centro de Producto Naturales. Todo el estudio se realizó bajo las mismas condiciones de temperatura y humedad ambiental. El alimento que se les administró durante todo el estudio fue pienso estándar para esta especie preparado y suministrado por el CENPALAB. Los animales tuvieron durante todo el estudio acceso *ad libitum* del alimento y el agua.

Se seleccionaron seis animales y se dividieron en dos grupos de tres animales cada uno, un grupo para irritabilidad dérmica y el otro para irritabilidad oftálmica.

Los animales se colocaron en jaulas individuales, la identificación de cada animal se colocó en la chapilla de cada jaula.

Administración y dosificación

La crema de AGO (30%) se aplicó tópicamente para los ensayos de irritabilidad dérmica y oftálmica. En el caso de la dérmica, se aplicó en la piel directamente, previo rasurado de la zona de aplicación, y en el caso de la oftálmica se aplicó en el saco conjuntival. Ambas sustancias se aplicaron en forma de dosis única, entre los horarios de 8:30 am y 9:00 am ya que es la frecuencia comúnmente aceptada para estos estudios.

Procedimiento Irritabilidad dérmica

Para este ensayo se procedió 24 h antes con el rasurado de los animales. El rasurado se realizó con una máquina eléctrica (Oster turbo A5, USA), se rasuró un área mayor de 6 cm. a ambos lados dorsales (derecho e izquierdo), el lado derecho se seleccionó como tratado y el izquierdo como control. La sustancia a evaluar (crema de AGO) se aplicó un volumen de 0,5 g según directriz para sustancias sólidas (OCDE 2015). Luego se cubrieron con un parche de gasa y se aseguró con una cinta adhesiva hipoalérgica. Los animales permanecieron en el cepo durante las primeras 4 h.

Mediciones a realizar

Transcurrida la primera hora después de retirado el parche se realizó la primera observación. La zona de aplicación se lavó con solución salina fisiológica, sin provocar alteraciones en la superficie de la piel. En el examen se evaluó por separado el grado de eritema y edema según se describe en la escala de Draize et al. (1944) y que aparece recogida en la norma de la OCDE (2015) (Tabla 1). Se registraron las lecturas de las variables (eritema y edema) a los tiempos de 1, 24, 48 y 72 horas. El Índice de Irritación Primario (IIP) se calculó teniendo en cuenta los resultados obtenidos a partir de las 24 h tal como se plantea en la norma cubana (UNE EN ISO 10993-10:2015) y dividiendo la suma de estos (resultados de 24 h + 48 h + 72 h), para eritema y edema entre 9, o sea tres conejos y tres días en que se realizaron las evaluaciones, siguiendo el criterio de clasificación descrito en la Norma Cubana CN UNE EN ISO 10993-10: 2015 (Tabla 2).

Procedimiento Irritabilidad oftálmica

Previo selección de los animales para el ensayo, se les aplicó en cada saco conjuntival del ojo derecho, la cantidad de 0,1 g de cada sustancia en ensayo, según la norma descrita por la OCDE, 2012. Posteriormente, los párpados permanecieron cerrados durante 15 s, con el fin de garantizar la distribución uniforme de la sustancia. Transcurrida una hora de aplicada la sustancia, se procedió al lavado con solución salina, de la zona de aplicación con el objetivo de eliminar los restos de residuos de la crema. El otro ojo no tratado (izquierdo) fue tomado como control.

La lectura se realizó a las 1, 24, 48 y 72 h después de la aplicación y la valoración del daño del ojo se efectuó por una escala de puntos. (Tabla 3)

Mediciones realizadas

Se valoraron los cambios en tres estructuras del ojo: la conjuntiva, el iris y la córnea, a los tiempos de 1, 24, 48 y 72 h, según la clasificación descrita en la Tabla 3. Para el cálculo del Índice de Irritación Ocular (IIO) se

determinó la suma de todas las observaciones que se encontraron en las tres estructuras analizadas y este valor fue dividido entre 12 (3 estructuras, 4 tiempos de evaluación) (García *et al*, 1988). Para el análisis del valor final del IIO, se considera como no irritante un valor hasta 10, según describe García *et al*, 1988.

RESULTADOS Y DISCUSION

En la tabla 4 se describen los resultados del índice de irritación dérmica primaria en la piel de conejos para la formulación de crema de AGO al 30 %, también se muestran los datos de las observaciones registradas para cada uno de los tiempos tomados en cuenta, según lo descrito por la norma ISO (ECS, 1996) (Draize *et al*, 1944). Después de retirado el parche de la zona de aplicación de las sustancias, se observó que las 24 h la crema de AGO provocó en el primer animal un eritema grado 1, el cual se mantuvo hasta las 48 horas y este fue revertido a grado 0 a las 72 h posteriores. En el animal dos, el eritema provocado por la crema de AGO alcanzó un grado 1 a las 24 h, sin embargo, este fue revertido en los restantes tiempos de observación (48 y 72 h). El animal número tres mostró un comportamiento similar al dos. Dichos resultados permitieron realizar el cálculo de índice de irritación dérmico primario (IIP) para la crema de AGO que fue de 0,5, por tanto, se clasificó la sustancia que provoca una irritación Leve. Es importante destacar que, para la sustancia ensayada, en ninguno de los animales seleccionados para el estudio se observó edema en la zona de aplicación, ni ningún otro tipo de reacción toxica significativa. Tal como se puede observar los tres animales seleccionados para la evolución de dicha formulación, desarrollaron reacciones muy similares sin que dejaran de existir su respuesta individual. Tal como fue demostrado anteriormente el AGO resultó no irritante en la piel de los conejos (Díaz *et al*, 2006), resultado que se encuentra en correspondencia con el alcanzado en este estudio.

Debemos señalar que, a pesar de existir una reacción eritematosa inicial en cada uno de los animales seleccionados para el ensayo, lo que nos define entonces que es capaz de producir un ligero enrojecimiento en la piel de los conejos, no se produjo una reacción inflamatoria con formación edematosa intersticial. Por otra parte, debemos considerar según nos plantean los órganos regulatorios, que este tipo de ensayo realizado en animales (conejos) con pieles altamente sensibles a cualquier sustancia, aunque no nos permite extrapolar fielmente este resultado a la piel de los humanos, si nos brinda la información necesaria para que pueda ser utilizado en estos con una alta seguridad.

Los ensayos culminaron a las 72 h, pues tal como se describe en la regulatoria OCDE (2015), no se observaron lesiones que no fueran identificadas como irritación o corrosión e incluso las lesiones observadas que solo eritema grado 1, este comenzó a revertirse a partir de las 24 h posteriores a la aplicación de las sustancias. Tampoco fue necesario realizar exámenes histológicos ni sacrificios intermedios, ya que no se

presentaron ni resultados dudosos ni manifestaciones de signos de dolor severo ni angustia en los animales.

En la Tabla 5 se muestran los resultados del ensayo de irritación oftálmica para la crema de AGO 30 %. Se muestra que una hora después de la aplicación de la sustancia en los tres animales, se produjo una ligera presencia de edema e inyección de los vasos sanguíneos conjuntivales que alcanzaron grado 1 y 2 entre la una, 24 y 48 h de observación, revirtiéndose a las 72 h en los tres animales estudiados. En el iris al igual que en la córnea no se observaron cambios. Debemos destacar que también se observó una ligera inflamación en los párpados en todos los animales. La sumatoria de los grados de cambios ocurridos en cada una de las estructuras oculares en los tres animales analizados alcanzaron un valor de 13, por tanto, el cálculo del Índice de irritación oftálmico fue de 1,08 clasificándose la sustancia como No irritante, ya que el índice calculado fue menor que 10 (OECD, 2012; Draize *et al*, 1944; Norma Cubana; 2015; García, 1988).

Tal como se describe en la regulatoria OCDE (2015), para la ejecución de este tipo de ensayo, donde se plantea que las observaciones se extenderán hasta los 21 d, para observar la reversibilidad de estas, pero si la reversibilidad se presenta antes de este tiempo no es necesario extender el estudio hasta los 21 d y este se detiene en el tiempo se evidencie la reversibilidad de las lesiones descritas. Por tal razón el estudio culminó a las 72 h y no fue necesario extender las observaciones durante 21 d, pues las lesiones que se presentaron, aunque no fueron graves, estas desaparecieron antes de las 72 h de ser aplicadas sustancias.

Considerando el objetivo de ambos ensayos (irritabilidad dérmica y oftálmica), se evidenció la seguridad de la crema de AGO (30%). Por tanto, se sugiere que esta puede ser aplicada con seguridad en la piel tanto de los humanos como de los animales, sin que ocurran cambios tóxicos evidentes. Adicionalmente, tal como se reportó en nuestro estudio, en caso de ocurrir la aplicación accidental de dichas cremas en la zona oftálmica de igual forma no será objeto de irritación alguna. Por tanto, se demostró la seguridad tanto dérmica como oftálmica de la formulación de crema de AGO.

Tabla 1.

Clasificación de eritema y edema dérmico según escala de Draize para piel de conejos.

Reacción cutánea	Clasificación	Valor
Eritema	No eritema	0
	Eritema muy ligero (apenas perceptible)	1
	Eritema bien definido	2
	Eritema de moderado a severo	3
	Eritema severo, a formación de escara (heridas de profundidad)	4
Edema	No edema	0
	Edema muy ligero (apenas perceptible)	1
	Edema ligero	2
	Edema moderado (elevación de aproximadamente 1 mm)	3
	Edema severo (elevación mayor de 1 mm y entendiéndose más allá del área de exposición)	4

Tabla 2

Categorías del índice de irritación primaria o acumulativa en un conejo

Puntuación media	Categoría de la respuesta
0 a 0,4	Insignificante
0,5 a 1,9	Leve
2 a 4,9	Moderada
5 a 8	Grave

Tabla 3.
Valoración cuantitativa de las lesiones oculares (Guía 405, OCDE)

Estructura	Descripción	Clasificación
Cornea	Opacidad: grado de densidad (las lecturas deben tomarse de la zona más densa) La opacidad corneal debe ser notada *	
	Sin ulceración ni opacidad	0
	Zonas de opacidad dispersas o difusas (con excepción del ligero mate del brillo normal); detalles del iris claramente visible	1
	Zona traslúcida fácilmente perceptible; Detalles del iris ligeramente oscurecidos	2
	Zona nacarada; no se ven los detalles del iris; Tamaño de la pupila apenas perceptible	3
	Córnea opaca; no se distingue el iris por la opacidad	4
Iris	Normal.	0
	Pliegues marcadamente hundidos, congestión, hinchazón, hiperemia moderada o inyección alrededor de la córnea; Iris reactivo a la luz (si la reacción es defectuosa, se considera como efecto)	1
	Hemorragia, destrucción visible o ausencia de reacción a la luz	2
Conjuntiva	Enrojecimiento (se refiere a la conjuntiva palpebral y bulbar, excluyendo la córnea y el iris)	
	Normal	0
	Algunos vasos sanguíneos con hiperemia	1
	Color carmesí difuso, los vasos individuales no fácilmente discernibles	2
	Rojo carne difusa	3
Párpados	Hinchazón (se refiere a los párpados y/o membranas nictitantes)	
	Normal	0
	Alguna hinchazón por encima de lo normal	1
	Obvia hinchazón, con parcial eversión del párpado	2
	Hinchazón, con párpados medianamente cerrados	3
	Hinchazón con párpados más de la mitad cerrados	4

CONCLUSIONES

La crema de AGO al 30 %, se clasificó como que produce una irritación dérmica Leve y como No irritante oftálmica.

REFERENCIAS

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).
- Berardesca, E., & Distant, F. (1994). The modulation of skin irritation, *Contact Dermatitis*, 31, 281-287.
- Bothan, P.A., Earl, L.K., Fentem, J.H., Roguet, R., & Van de sandt, J.J.M. (1998). Alternative methods for skin irritation testing: the status. *ATLA*, 26, 195-211.
- Curren, R.D., & Harbell, J.W. (1998). In vitro alternatives for ocular irritation. *Environ Health*, 106, Suppl 2, 485-492.
- Díaz, M., García, G., García, K., Sánchez, Y., & Tillan, J. Evolución de la irritabilidad dérmica, oftálmica y el efecto sensibilizante del OLEOZON® tópico. REDVET. 2006; VII (11) <http://www.veterinaria/revistas/redvet/0111106.html>.
- 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. Revista Electronica de Clínica Veterinaria*, 3(9).
- 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*, 11(4), 1695-7504.
- 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.
- Dinarello, C.A. (1998). Interleukin 1, interleukin 1 receptor and interleukin 1 receptor antagonist. *Intern Rev Immunol*, 16, 457-499.
- Draize, J.H., Woodard G., & Calvery, H.O. (1944). Methods to the study of the irritation and toxicity of substances applied topically to the skin and mucous membranes. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 82 (3), 377-390.
- García, S.G., Palacios, Á.M., Pérez, P.L., García, A.R., Díaz, M.G., & Gazapo, P.R. (1988). Elaboración de una metodología para evaluar la irritabilidad oftálmica. Validación con distintos métodos. *Rev Cub Farm*, 22(2), 5-24.
- ISO 10993-10:2015: Norma Cubana, Biological evaluation of medical devices. Part 10: Test for irritation and delayed -type hypersensitivity. UNE EN ISO 10993-10:2015.
- Kim, H., Noh, S., Sun, U., Han, Y.W., Kim, K.M., Kang, H., Kim, H.O., & Park Young, M. (2009). Therapeutic Effects of Topical Application of Ozone on Acute Cutaneous Wound Healing. *J Korean Med Sci*, 24, 368-74.
- Kupper, T.S. (1990). Immune and inflammatory process in cutaneous tissues. Mechanism and Speculations. *J Clin Invest*, 86, 1783-1789.

- 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., 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.
- 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.
- Mckenzie, R.C., & Sauer, D.N. (1990). The role of keratinocytes cytokines in inflammation and immunity. *J of Investigative Dermatology*, 95, 1055-1075.
- Nakamuro, K., Sakasaki, H., Okuno, T., & Ueno, H. (2005). Suppressive effects on immune cells and oxidative cytotoxicity of ozonized olive oil. IOA. 17 Wold Ozone Congress Stranburg 2005.
- OECD, 2012. Acute eye irritation /corrosion. Methods 405. OECD Guidelines for testing of chemicals.
- OECD, 2015. Acute dermal irritation /corrosion. Methods 404. OECD Guidelines for testing of chemicals.
- 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 medula ósea y sangre periférica de ratón. *Revista CNIC Ciencias Biológicas*, 29 (3), 200-203.
- Rodríguez, M.D., Menéndez, S., Gómez, M., et al. (1990). Estudio teratogénico del aceite ozonizado. Primer Congreso Iberolatinoamericano de Aplicaciones del Ozono. CNIC- CIMEQ. 1990.
- Sakazaki, F., Kataoka, H., Okuno, T., Ueno, H., Semma, M., Ichikawa, A., & Nakamuro, K. (2007). Ozonated Olive Oil Enhances the Growth of Granulation Tissue in a Mouse Model of Pressure Ulcer. *Ozone Science and Engineering*, 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*. 1998; 29 (3):181-183.
- Sánchez, Y., Díaz, 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.

- Sims, J.E., Gayle, M.A., Slack, J.L., Alderson, M.R., Bird, T.A., Giri, J.G., *et al.* (1990). Interleukin 1 signaling occurs exclusively via the type I receptor. *Proc Nat Acad Sci USA*, 6155-6159.
- Tamoto, K., Yamazaki, A., Noche, H., & Miura, T. (2005). Ozonides of olive oil and methyl oleate inhibit the expresión of cyclooxygenase-2 through the supresión of I κ B/ NF κ B- dependent pathway in lipopolisaccharide-stimulated macrophage-like THP-1 cells. IOA 17th World Ozone Congreso- Stranburg 2005.
- Valacchi, G., Lim, Y., Belmonte, G., Miracco, C., Zanardi, I., Bocci, V., & Travagli, V. (2011). Ozonated sesame oil enhances cutaneous wound healing in SKH1 mice. *Wound Repair Regen*, 19(1),107-115.
- 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).
- Zamora, Z.R., Molina, V., Mena, L., & Ledea, O. (2018). Efectos del aceite de girasol ozonizado en el modelo de granuloma por algodón en ratas (modelo de inflamación crónica). *Rev. CENIC Cienc. Biol*,49(3), 1-12.