

REPUBLICA DE CUBA
CENTRO NACIONAL DE INVESTIGACIONES CIENTIFICAS (CNIC)
CENTRO DE INVESTIGACIONES DEL OZONO (CIO)



**Efecto del Precondicionamiento Oxidativo con Ozono
en la Prevención del Daño Orgánico y Muerte en
Modelos de Sepsis Peritoneal y Choque Endotóxico.**

**Tesis presentada en opción al grado
Científico de Doctor en Ciencias
Básicas Médicas.**

AUTOR: DMV. Zullyt Bárbara Zamora Rodríguez

TUTORES: Dr. C F. Ricardo González Álvarez

Dr. C Vet. Siegfried Schulz

Ciudad de La Habana

AGRADECIMIENTOS

A toda mi familia: A mi madre y mi padre por enseñarme el camino correcto y sembrar en mi los valores y principios mas justos del ser humano, a mi hermano por ser un ejemplo a seguir para mi, a mi esposo José Ángel por su amor, comprensión y dedicación a mi en todo momento, a mis dos pequeños hijos Maurin y Brian por ser la luz que me alumbran e impulsan día a día a ser mejor ser humano, madre, esposa, hija y trabajadora.

Instituciones:

- Centro de Investigaciones del Ozono.
- Universidad Phillipps- Marburg Alemania
- Centro de Química Farmacéutica.

A mis tutores:

PhD. Siegfried Schulz, Jefe del Departamento de servicios veterinarios de la Univesidad Marburg, Alemania. Por confiar en mí para desarrollar la temática del choque séptico, enseñarme el modelo experimental y confiarme todas sus experiencias. También por su apoyo material para el buen desarrollo de los experimentos, y por brindarme su amistad incondicional.

PhD. Ricardo González Álvarez, Investigador Titular del departamento de Biomedicina y jefe del Laboratorio de Ensayos biológicos del Centro de Investigaciones del Ozono, quien es mi guía científico y he tenido el honor de ser uno de sus últimos frutos en la formación científica de nuevos doctores en ciencias. También por tener confianza en mi y por su amistad.

Profesionales, Investigadores y técnicos.

- PhD. Frank Hernández. Gracias a su exigencia como jefe de departamento soy mejor trabajadora y científico.
- PhD. Silvia Menéndez. Centro de investigaciones del Ozono. Por ser durante todos estos años un ejemplo de mujer científica a seguir para mi
- Tec. Yaima Alonso (Centro de Investigaciones del Ozono) por ser un apoyo incondicional durante los extensos experimentos que realizamos juntas.
- Tec. Maritza González, por ser la madre del Departamento y por su apoyo también incondicional durante todos estos años.
- Dra. Ivonne Méndez, MsC. Ing. Eliet Veliz, PhD. José Luís Calunga por su apoyo en todo momento y su amistad incondicional.
- Ms.C. Aluet Borrego, por su amistad y por haber continuado mi trabajo durante mi primera licencia de maternidad.

- A todos los compañeros del departamento y del centro que de una forma u otra han colaborado también con el desarrollo de este trabajo.

COLABORADORES PRINCIPALES:

- PhD. Frank Hernández. Investigador Titular. Jefe del Departamento de Biomedicina. Centro de Investigaciones del Ozono.
- PhD. Michael Bette. Universidad – Marburg. Alemania.
- PhD. Siegfried Schulz. Universidad – Marburg. Alemania.
- PhD. Rene Delgado. Investigador Titular. Centro de Química Farmacéutica
- PhD. Nelson Merino. Investigador Titular. Centro de Química Farmacéutica.
- Lic Vet. Yilian Luque. Centro de Química Farmacéutica.
- Lic. Dailen Guanche. Aspirante a Investigador.

Muchas gracias.

SINTESIS

Una de las principales estrategias terapéuticas y preventivas que se están desarrollando hoy en día, con vistas a disminuir los efectos nocivos de la sepsis y el choque séptico, es el uso de sustancias antioxidantes y moduladoras de la respuesta inflamatoria sistémica.

En este trabajo de tesis se abordan los siguientes aspectos: i) El efecto del acondicionamiento oxidativo con ozono (POO) sobre la liberación de TNF- α , ON y parámetros indicadores de estrés oxidativo hepático en el modelo de endotoxemia en ratón inducido por LPS. ii) El efecto del POO sobre la disfunción orgánica, la liberación de citocinas pro-inflamatorias (TNF- α e IL-1 β) y la supervivencia de los animales en el modelo de sepsis peritoneal en ratas. iii) También se evaluó el efecto del POO en combinación con antibiótico y su influencia sobre la expresión de las citocinas proinflamatorias (TNF- α e IL-1 β) tanto en tejido esplénico como hepático, en el modelo de sepsis peritoneal en ratas. Como resultados se obtuvieron: i) El POO disminuyó significativamente la liberación de TNF- α y ON en el suero de ratones con endotoxemia y también incrementó las defensas antioxidantes endógenas en el tejido hepático. ii) Se observó un restablecimiento de las funciones orgánicas determinadas por parámetros indicadores de disfunción tanto hepática como renal, también se demostró una disminución en la liberación de las citocinas pro-inflamatorias en suero, lo cual se correspondió con una elevada supervivencia de los animales de hasta un 61,5 %. iii) También se demostró que la combinación del POO con el tratamiento con el antibiótico (Piperacilina/tazobactam), fue favorable incrementando significativamente la supervivencia de los animales entre el 78 y 93 %, esto se acompañó de una disminución en la expresión tisular de las citocinas pro-inflamatorias (TNF- α e IL-1 β). Se demostró que la protección conferida por el POO a

los animales con choque séptico, estuvo mediado por la activación de las enzimas antioxidantes tanto en el tejido hepático como en sangre, la reducción de los niveles de ON y citocinas proinflamatorias en suero y su expresión en tejido, así como la disminución de la infiltración de neutrófilos en el tejido pulmonar. De esta forma, también se evitó, la formación de zonas necróticas en el tejido hepático. Lo anteriormente expuesto demuestra el efecto beneficioso del POO en la disminución de la intensidad de la respuesta inflamatoria sistémica, con un menor daño tisular y la preservación de las funciones orgánicas. Por tanto se concluye en nuestro trabajo que el POO, a tres niveles de dosis, mostró un efecto beneficioso sobre el daño inducido tanto por choque endotóxico como por sepsis peritoneal.

Abreviaturas

1. 2.3 DPG- 2,3 difosfoglicerato.
2. ATP- Adenosil trifosfato.
3. CD-14- Receptor de membrana celular.
4. CID- Coagulación intravascular diseminada.
5. EROs- Especies reactivas del oxígeno.
6. FTC β - Factor transformador del crecimiento- β .
7. G6PDH- Glucosa 6 fosfato deshidrogenasa.
8. GCs - Guanilato ciclasa soluble.
9. GM-CSF -Factor estimulante de colonia granulocitos/macrófagos (del ingles, granulocyte/macrophage colony-stimulating factor).
10. GMPc- Glutamil monofosfato cíclico.
11. GPx- Glutation peroxidasa.
12. GST- Glutation S transferasa.
13. GTP -Glutamil trifosfato.
14. H₂O₂. Peróxido de hidrógeno.
15. HSPs- Proteínas de choque térmico (del ingles, *heat shock proteins*) .
16. I- κ B – Subunidad inhibitoria kappa B.
17. IgG -Inmunoglobulina-G.
18. IL-1- Interleucina -1.
19. IL-10-Interleucina -10.
20. IL-1RA - antagonistas de los receptores de IL-1.
21. IL-4-Interleucina-4.
22. INF γ - Interferón gamma.
23. LBP- Proteína de unión al LPS. (del ingles, *lipopolysacharide binding proteins*).
24. L-NAME- N-Nitro-L-arginina metylester .
25. LPC- Ligadura y punción cecal.
26. LPS- Lipopolisacárido.
27. LTB₄–leucotrieno B₄.
28. LTs- Leucotrienos.
29. MCP-1-Proteínas quimioatrayentes de monocitos-1.
30. MDA- Malondialdehido.
31. MPO- Mieloperoxidasa.

32. NF- κ B - Factor nuclear kappa B. (del ingles, *Nuclear factor – kappa B*).
33. NO- oxido nítrico. (del ingles, *nitric oxide*).
34. O₂HB- Oxígeno hiperbático.
35. O_{2s} - Oxígeno singlete.
36. O₂⁻ - Anión radical superóxido.
37. OH[·] - Radical hidroxilo.
38. ONOO⁻ - Peroxinitrito.
39. ONS- óxido nítrico sintetasa.
40. ONSe - óxido nítrico sintetasa endotelial.
41. ONSi- óxido nítrico sintetasa inducible.
42. ONSn - óxido nítrico sintetasa neuronal.
43. PAF- Factor activador de plaquetas (del ingles, *Platelet-activating factor*).
44. PCA- Proteína C activada.
45. PGI₂. Prostaciclina.
46. PGs- Prostaglandinas.
47. POO- Precondicionamiento oxidativo con ozono.
48. PTZ- Piperacilina/tazobactam.
49. SDMO- Síndrome de Disfunción Múltiple de Órganos.
50. SIRS- Síndrome de Respuesta Inflamatoria Sistémica.
51. SOD- Superóxido dismutasa.
52. SRASC- Síndrome Respuesta Anti-inflamatoria Sistémica Compensatoria.
53. SRATB- Sustancia reactiva del ácido tiobarbitúrico.
54. TNF- α - Factor de necrosis tumoral- alfa. (del Ingles, *tumor necrosis factor-alpha*).
55. TXA₂. Tromboxano A₂.
56. ICAM- Molécula de adhesión intercelular (del Ingles, *Intercellular adhesion molecule*).
57. VCAM- Molécula de adhesión vascular (del Ingles, *vascular cell adhesion molecule*).

INTRODUCCIÓN	1
1. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	9
1.1. Conceptos generales	9
1.2. Prevalencia del choque séptico.	10
1.3. Fisiopatología del Choque séptico.	11
1.4. Mediadores pro-inflamatorios.	13
1.4.1. Citocinas.	13
1.4.2. Mediadores derivados del ácido araquidónico.	16
1.4.3. Especies reactivas del Oxígeno (EROs) en el choque séptico.	17
1.4.4. Especies reactivas del Nitrógeno (ERN) en el choque séptico.	19
1.5. Mediadores antiinflamatorios.	23
1.5.1. Citocinas.	23
1.5.2. Mecanismo anti-inflamatorio molecular mediado por proteínas de choque térmico (HSPs).	25
1.6. Intervenciones terapéuticas en el choque séptico.	27
1.6.1. Antibióticos.	27
1.6.2. Inhibidores de la cascada de citocinas.	28
1.6.3. Sustancias antioxidantes.	29
1.6.4. Inhibidores de la ONS.	30
1.6.5. Oxígeno Hiperbárico (O ₂ HB).	30
1.6.6. Proteína C reactiva.	31
1.7. Ozonoterapia. Generalidades.	32
1.7.1. Propiedades físico-químicas del Ozono.	32
1.7.2. Mecanismos biológicos asociados a la eficacia de la Ozonoterapia.	35
2. MATERIALES Y MÉTODOS	40
2.1. Materiales.	40
2.1.1. Reactivos.	40
2.2. Métodos.	40
2.2.1. Obtención y administración de la Mezcla Ozono/Oxígeno (MOO)	40
2.2.2. Biomodelos.	41
2.2.3. Procedimientos para la instauración de una sepsis peritoneal en ratas.	42
2.2.3 a. Procedimiento quirúrgico.	42
2.2.3.b. Procedimiento no quirúrgico.	43
2.2.3 c. Inducción de la endotoxemia en ratones.	43
2.3. Diseños experimentales.	44
2.3.1. Diseño No 1. Efecto del POO en el modelo de choque endotóxico inducido por LPS en ratones.	44

2.3.2. Diseño No 2. Efecto del POO sobre la sobrevivencia en el modelo de sepsis peritoneal en ratas.	45
2.3.3. Diseño No 3. Efecto del POO sobre el estrés oxidativo y fallo múltiple de órganos inducido por sepsis peritoneal en ratas.	46
2.3.4. Diseño No 4. Efecto del POO combinado con antibiótico (Piperacilina/ Tazobac) en el modelo de sepsis peritoneal inducido por materia fecal Efecto del POO	47
2.4. Determinaciones bioquímicas de parámetros de estrés oxidativo en tejido hepático y la actividad de la mieloperoxidasa (MPO) en pulmón.	49
2.4.1. Homogenado de hígado.	49
2.4.2. Homogenado de pulmón.	49
2.4.3. Sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (SRATB).	50
2.4.4. Actividad enzimática de la GSH: H ₂ O ₂ oxidoreductasa (GSH-Px).	50
2.4.5. Determinación de la GST (Glutation S- transferasa).	51
2.4.6. Actividad enzimática de la SOD/Cu-Zn dependiente (superóxido oxidoreductasa).	51
2.4.7. Determinación de la Actividad de la enzima mieloperoxidasa (MPO).	52
2.5. Determinaciones de parámetros bioquímicos e inmunológicos en sangre.	53
2.5.1. Procedimiento para la obtención de muestras de sangre de rata.	53
2.5.2. Sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico en plasma	54
2.5.3. Actividad de la superóxido dismutasa en eritrocitos.	54
2.5.4. Actividad de la glutatión peroxidasa en eritrocitos.	55
2.5.5. Análisis hematológico.	55
2.5.6. Determinación de nitratos como método indirecto para evaluar la inducción de la óxido nítrico sintasa inducible (ONSi).	55
2.5.7. Ensayo inmunoenzimático para la cuantificación de IL-1 β y TNF- α).	56
2.5.8. Determinaciones de parámetros indicadores de daño orgánico.	57
2.6. Análisis inmunohistoquímico.	57
2.6.1. Hibridización <i>in situ</i>	57
2.7. Análisis histopatológico	58
2.8. Análisis estadístico.	59
3. RESULTADOS.	60
3.1. Efecto del POO sobre los niveles de TNF- α y ON en el suero, actividad de la MPO en pulmón y parámetros de estrés oxidativo en el tejido hepático de ratones con choque endotóxico.	60

3.2. Efecto del POO sobre la mortalidad en ratas inducida por sepsis peritoneal.-----	68
3.3. Efecto del POO sobre parámetros indicadores de estrés oxidativo y daño orgánico, la actividad de la MPO y la liberación de citocinas (IL-1 β y TNF- α) en un modelo de sepsis peritoneal en ratas.-----	71
3.4. Efecto del POO combinado con Piperacilina/Tazobactam en la supervivencia de las ratas con sepsis peritoneal y la expresión de IL-1 β y TNF- α en tejido. -----	75
4. DISCUSIÓN. -----	79
5. CONCLUSIONES. -----	100
5.1. Recomendaciones.-----	101
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.	
ANEXOS	

INTRODUCCIÓN.

Los mecanismos involucrados en el desarrollo del daño orgánico producido durante la sepsis, son multifactoriales y todavía no se encuentran identificados. En algunas circunstancias, la disfunción orgánica es atribuible a la hipoxia tisular como consecuencia del deterioro hemodinámico y disminución de la perfusión o isquemia tisular. Sin embargo, el papel de la hipoxia tisular ha sido cuestionado como mecanismo exclusivo del fallo orgánico en la sepsis (Hurtado y cols., **1992**). Así, en la ausencia de compromiso hemodinámico demostrable, como puede ocurrir en los estados hiperdinámicos del choque séptico, resulta cuestionable atribuir el fallo orgánico a la hipoxia tisular solamente (Vallet y cols., **2002**). Por otra parte, hay evidencia de otros posibles mecanismos patogénicos. Tal es el caso de la activación de los leucocitos polimorfonucleares. Esta activación que caracteriza el proceso inflamatorio que acompaña a la sepsis, se produce en conjunto con un marcado incremento del estrés oxidativo, entendiendo por tal el desbalance entre la formación de especies reactivas del oxígeno (EROs) y las defensas antioxidantes a favor de las primeras (Goode y cols., **1995**). De este modo, las ERO no totalmente neutralizadas por las defensas antioxidantes pueden reaccionar con proteínas, ADN, ARN y lípidos de membranas celulares, de manera tal que sus efectos deletéreos pueden interrumpir diversos pasos importantes del metabolismo celular, entre los que se encuentra el fallo energético de la célula producto de la disfunción mitocondrial (Fink., **2001**).

Simultáneamente con el proceso inflamatorio ocurre el aumento de la producción del óxido nítrico (ON) por inducción del óxido nítrico sintasa inducible (ONSi). El -ON formado puede a su vez, reaccionar con el anión superóxido (O_2^-) dando como resultado la producción de peroxinitrito ($ONOO^-$), especie altamente reactiva capaz de oxidar y nitrar componentes celulares y tisulares, tales como los residuos de

tirosina de las proteínas celulares y plasmáticas, el ADN y lípidos o enzimas críticas del metabolismo intermediario (Radi y cols., **2000**). Así, está bien documentado el daño estructural y funcional a nivel mitocondrial, que se torna irreversible debido a la oxidación y nitración de componentes mitocondriales. El ONOO^- también oxida y produce depleción de los antioxidantes endógenos tales como el ascorbato, glutatión (GSH) y superóxido dismutasa (SOD) (Radi y cols., **2000**).

De este modo, la presencia de ONOO^- y otras especies reactivas derivadas del nitrógeno (ERN) tales como el dióxido de nitrógeno (NO_2), nos lleva a ampliar el concepto clásico de estrés oxidativo al de estrés nitrosativo. En esta situación, predomina la formación de estas ERN sobre los mecanismos detoxificadores intracelulares y plasmáticos, llevando al consiguiente daño celular y tisular.

El estrés oxidativo y nitrosativo actúan conjuntamente perpetuando el proceso inflamatorio por diferentes mecanismos. Por una parte, las ERO y ERN tienen efectos quimiotácticos, favoreciendo el reclutamiento de neutrófilos y por otra, las moléculas mediadoras del estrés oxidativo se convierten también en mensajeros intracelulares para la transducción de señales del proceso inflamatorio. Así por ejemplo, el factor nuclear kappa B ($\text{NF-}\kappa\text{B}$) activado por estos mensajeros secundarios migra al núcleo donde selectivamente estimula la transcripción de proteínas específicas de la inflamación. Este induce la transcripción de genes que promueven la producción de citocinas como la interleucina -6 (IL-6), interleucina -8 (IL-8) y moléculas de adhesión (ICAM-1) que perpetuarán el proceso inflamatorio (Peterson y cols., **2001**).

En la búsqueda de nuevas alternativas terapéuticas para el manejo de la sepsis grave y el choque séptico se han producido algunos avances. Así, han desempeñado un papel importante y podrían ser beneficiosos para algunos grupos de pacientes la

administración oportuna de soporte nutricional, la prevención de las infecciones nosocomiales, la profilaxis de la trombosis venosa profunda, el uso adecuado de sedación-analgésia y el uso de patrones de ventilación mecánica protectora, (Wheeler y cols., **1999**). Sin embargo, los tratamientos farmacológicos más específicos, que intentaron modular o bloquear algunos componentes del proceso inflamatorio, no han alcanzado el éxito esperado o sencillamente, han fracasado.

No obstante, los conocimientos sobre los eventos moleculares que subyacen en la génesis de la sepsis han aumentado de manera sustancial en los últimos años, abriendo expectativas al ensayo de nuevas terapias alternativas. Si tenemos en cuenta que el estrés oxidativo y nitrosativo constituyen fenómenos fundamentales en la patogenia de la sepsis, la terapia moduladora de la síntesis de ON, el empleo de antioxidantes y/o atrapadores de ERO y ERN, han mostrado beneficios prometedores en modelos experimentales. Por tanto, no sería aventurado pensar que un enfoque de este tipo resulte finalmente una terapia exitosa para disminuir la mortalidad de pacientes con choque séptico.

El preconditionamiento oxidativo con ozono (POO) fue demostrado por León y col., **1998**. Este mecanismo de acción propuesto para el ozono con fines médicos plantea que la aplicación de este gas a concentraciones controladas (25-50 mg/L) produce un estrés oxidativo ligero, el cuál estimula los mecanismos antioxidantes endógenos, preparando al hospedero a enfrentar condiciones fisiopatológicas mediadas por especies reactivas del oxígeno (ERO). Otros autores han utilizado el POO en modelos experimentales de isquemia/reperfusión (I/R) tanto renal como hepática (Barber y cols., **1999**; Al-Dalain y cols., **2001**), donde se ha preservado tanto el funcionamiento, como la estructura de ambos órganos. Estos hechos se han encontrado íntimamente relacionados con el incremento en la actividad de los

sistemas antioxidantes endógenos, los cuales revierten el estrés oxidativo ocasionado por la I/R. También ha sido demostrado recientemente la eficacia del POO en un modelo de endotoxemia en ratas, donde los animales que recibieron este tratamiento, mostraron una disminución en la formación de radicales libres inducido por el lipopolisacárido y la normalización de la actividad de las enzimas antioxidantes (Madej y cols., 2007). Unido a ello, se demostró que el POO restableció la actividad de las enzimas indicadoras de daño mitocondrial, tales como la succinato deshidrogenasa y la ATPasa, preservando de esta forma la actividad mitocondrial (Madej y cols., 2007). Por otra parte, se demostró que el POO fue capaz de incrementar la expresión del 6-keto-prostaglandina F₂, metabolito de la Prostaciclina (PGI₂) en tejido vascular arterial (Schulz y col., 2005), lo cual corrobora que el POO, mediante la inducción de esta PG pudiera ejercer un efecto beneficioso dentro de la fisiopatología del choque séptico actuando como un agente vasodilatador, antiagregante plaquetario e inhibidor del factor de transcripción nuclear kappa B (NF-κB), disminuyendo de esta forma la respuesta inflamatoria sistémica.

Teniendo en cuenta las premisas expresadas en los párrafos anteriores, se concibió el siguiente problema e hipótesis de trabajo:

Problema.

El choque séptico es considerado una de las primeras causas de muerte en las Unidades de Cuidados Intensivos tanto en países del primer mundo como del tercero. El choque puede ser causado por traumatismos, hemorragias, factores cardiogénicos y/o por infecciones severas, que conllevan a complicaciones tales como la hipotensión y la disfunción vascular. Estos trastornos finalmente resultan en la disfunción de órganos vitales tales como el riñón, hígado, intestino, pulmón y cerebro que ponen, en riesgo la vida del paciente, así como su calidad de vida futura. El

choque séptico se presenta con más frecuencia en niños, ancianos y pacientes inmunocomprometidos. Actualmente, las terapias empleadas para el manejo del choque séptico poseen un alcance limitado y tienen un alto costo, por lo que resulta necesaria la búsqueda de nuevas alternativas terapéuticas. Por tanto teniendo en cuenta los efectos beneficiosos de la ozonoterapia, como inmunomodulador y regulador del estrés oxidativo inducido en modelos experimentales de Isquemia/reperfusión tanto hepática como renal entre otros, nos planteamos la siguiente hipótesis de trabajo:

Hipótesis.

El preconditionamiento oxidativo con ozono, puede proteger contra el daño que se produce en un modelo de sepsis peritoneal y en otro modelo de choque endotóxico, a través de la modulación y restablecimiento de las defensas antioxidantes y de la respuesta inflamatoria sistémica, mediada por la inhibición de la liberación de citocinas proinflamatorias.

Teniendo en cuenta esta Hipótesis se plantearon los siguientes:

OBJETIVOS.

OBJETIVO GENERAL:

Evaluar el efecto protector del preconditionamiento oxidativo con ozono a nivel experimental en la prevención del daño orgánico y la muerte por sepsis peritoneal y por endotoxemia.

OBJETIVOS ESPECIFICOS:

1. Evaluar el efecto del POO sobre la liberación de TNF- α y los niveles de óxido nítrico (ON) en suero y de la actividad de la Mieloperoxidasa (MPO) en tejido pulmonar, así como el comportamiento de parámetros indicadores de estrés oxidativo (SRATB, SOD, GPx y GST) en tejido hepático de ratones tratados con LPS.
2. Evaluar el efecto del preconditionamiento oxidativo con ozono (POO) sobre la sobrevivencia en un modelo de sepsis peritoneal letal en ratas.
3. Determinar la influencia del POO sobre parámetros indicadores de estrés oxidativo (SRATB, SOD y GPx) y de disfunción orgánica del tejido hepático (ASAT, ALAT) y del tejido renal (contenido de CRE), así como de los niveles de citocinas proinflamatorias (IL-1 β y TNF- α) en suero de ratas con sepsis peritoneal.
4. Determinar el efecto del POO combinado con Piperacilina/Tazobactam, y su influencia sobre la expresión de la IL-1 β y TNF- α en tejido (hepático y esplénico) en el modelo de sepsis peritoneal en ratas.

Resultado económico, social o científico que aportará el tema al sector o rama.

Sociales: La protección de pacientes identificados con riesgo a desarrollar choque séptico después de ingresar en las Unidades de cuidados intensivos es de vital importancia hoy en día, con vistas a prevenir el fallo orgánico y la muerte por la sepsis. Los presentes resultados, constituyen las investigaciones a nivel preclínico necesarias para sustentar una nueva indicación del POO en la prevención de los daños inducidos por choque séptico en pacientes con alto riesgo. De este modo, nuestros resultados nos permitirían proponer un esquema de tratamiento con el POO y su posible aplicación al paciente con riesgo de desarrollar choque séptico. Se conoce que el choque séptico es la causa del 50 y el 70 % de muerte en las unidades

de cuidados intensivos. El POO sería un proceder fácil de aceptar para el paciente con dosis ya estudiadas, sin ningún efecto adverso, que podría contribuir a reducir los riesgos y las complicaciones de la sepsis y con ello a lograr una mejor calidad de vida para éstos. Desde el punto de vista **económico** sería una variante terapéutica eficaz y poco costosa.

Científicos: El estudio del efecto del POO sobre parámetros funcionales, bioquímicos, inmunológicos e histológicos en dos modelos de choque séptico (sepsis peritoneal y endotóxico) es una investigación novedosa y de gran impacto en el campo de la medicina en general. Los resultados de esta investigación permitirán profundizar en el conocimiento sobre los efectos del POO sobre mediadores moleculares del daño inducido por sepsis, demostrando uno de sus posibles mecanismos de acción. Los resultados de nuestro trabajo muestran los efectos beneficiosos del POO tanto en un modelo de sepsis peritoneal como en el modelo de choque endotóxico, siendo estos los primeros resultados publicados sobre la eficacia a nivel preclínico de esta alternativa terapéutica y los mecanismos por los cuales ejerce su efecto protector en dichos modelos, lo cual avala la novedad científica del tema en estudio.

1. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.

1.1. Conceptos generales.

El término *choque séptico*, designa el estado de disfunción metabólico-circulatorio agudo que se desencadena tras la liberación de endotoxinas bacterianas en el organismo, secundaria a un proceso séptico principal que se caracteriza por una disminución del flujo sanguíneo acompañado de hipotensión arterial causado por un decremento del gasto cardíaco, una hipoxia tisular y alteraciones del metabolismo celular.

A principios de la década del 90, se reunió la Comisión de Consenso del Colegio Norteamericano de Patología del Tórax y la Sociedad de Medicina Crítica (ACCP/SACM) para definir las características del Síndrome de Respuesta Inflamatoria Sistémica (SRIS) (Muckart and Bhagwanjee, **1997**), entidad que engloba una respuesta inflamatoria sistémica relacionada con la infección por bacterias, Gram-negativas y positivas, hongos, parásitos, virus y otras condiciones como politraumatismos, quemaduras, pancreatitis y tratamientos anticancerosos, etc.

Las definiciones y características del Síndrome de Respuesta Inflamatoria Sistémica (SIRS), Sepsis, Sepsis severa, Choque séptico, Síndrome de Disfunción Múltiple de Órganos (SDMO) se describen en el **Anexo. 1** (Mackenzie., **2001**; Ma y col, **2002**). El concepto de Síndrome Respuesta Anti-inflamatoria Sistémica Compensatoria (SRASC) fue también introducido en la literatura después que se demostró que algunos mediadores anti-inflamatorios también se encontraban elevados durante la sepsis (Añel y col., **2001**). En esta respuesta los mediadores que participan, en su gran mayoría están constituidos por aquellas citocinas mayormente relacionadas con linfocitos T auxiliares de tipo II. (Carrillo y cols., **2001**).

1.2. Prevalencia del choque séptico.

La sepsis y el choque séptico además de ser causantes de una morbilidad elevada, constituyen también la causa más frecuente de muerte en las unidades de cuidados intensivos de los Estados Unidos (Martín y cols., **2003**) y muchos otros países (Alberti y cols., **2002**). Históricamente, la mortalidad asociada con la sepsis se mantuvo entre el 50 y el 75 % aproximadamente en los pacientes portadores de la misma, pero a partir del advenimiento de la terapia con antibióticos se redujo hasta un rango entre un 30 y un 50 % (Zanotti y cols., **2002**). A pesar de este avance, los estimados recientes señalan que la incidencia de choque séptico se está incrementando y alcanza un rango de mortalidad entre 30 y el 70 % y que la fuente de infección más común es el pulmón (25%), el abdomen (25%) entre otras fuentes (Russel, **2008**). En la actualidad más personas fallecen anualmente por choque séptico que por infarto del miocardio, cáncer de pulmón o de mama, accidentes vasculares encefálicos o por traumatismo (Cauwels, **2007**).

En Cuba, los reportes de mortalidad, refieren el 47,5 %, por lo que se considera un azote en los servicios de cirugía y cuidados intensivos (Morales y cols., **2000** y Lombardo y cols., **2001**).

Ha sido ampliamente estudiado que existen factores predisponentes como el incremento del uso de terapias con drogas citotóxicas e inmunosupresoras, dispositivos invasivos (catéteres intravasculares), la longevidad de los pacientes con riesgo a desarrollar sepsis y un incremento de las infecciones causadas por microorganismos resistentes a los antibióticos, el fallo orgánico crónico, factores iatrogénicos (Martín y cols., **2003**, Alberti y cols., **2002**), el sexo masculino (Hubacek y cols., **2001**) y el polimorfismo en genes que regulan la inmunidad (Lin y col., **2004**).

1.3. Fisiopatología del choque séptico.

La sepsis es un síndrome clínicamente muy complicado y dinámicamente regulado en el cual intervienen muchos procesos inmunológicos que están dirigidos hacia la recuperación o la destrucción del organismo. En décadas recientes se ha dedicado esfuerzos a la investigación y desarrollo de numerosos modelos experimentales de choque séptico para estudiar los aspectos fisiopatológicos de la enfermedad. Este síndrome no es más que el resultado de una respuesta sistémica del organismo ante cualquier estímulo infeccioso severo, como por ejemplo bacterias Gram-negativas que contiene en su estructura a la endotoxina lipopolisacárido (LPS), que es el componente mayoritario de la pared celular de estas bacterias, el peptidoglicano y la flagelina (Gram-positivas) entre otros antígenos de agentes infecciosos, los cuales estimulan a las células inflamatorias (monocitos y macrófagos), para dar origen a la respuesta inflamatoria (Wan y cols., **2003**).

La respuesta del hospedero ante estos componentes estructurales bacterianos, incluyen la activación de la cascada de la coagulación, así como de los sistemas fibrinolíticos y del complemento. También se activa la liberación de citocinas (Van der Poll y cols **1999; 2001**), el factor activador de plaquetas (PAF) y otros metabolitos del ácido araquidónico, los compuestos derivados del óxido nítrico (ON) y las especies reactivas del oxígeno (EROs) (Wan y cols., **2003**).

Los eventos moleculares involucrados en esta reacción comienzan con la unión del LPS a una proteína específica, la proteína de unión al LPS (LBP). El complejo LPS-LBP interactúa con el receptor transmembrana CD-14 presente en las células polimorfonucleares, los macrófagos y las células mesangiales. Esta interacción provoca la fosforilación de un complejo formado por el factor nuclear kappa B (FN- κ B) y su inhibidor (I- κ B), lo que provoca la liberación del FN- κ B (Lance y col, **2002**) que se traslada hacia el núcleo, donde se une a secuencias específicas de regiones

promotoras de genes blanco. Estos genes que se transcriben para la expresión de varias citocinas y quimiocinas como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), el interferón gamma, interleucinas (IL) como IL-1, IL-6, IL-8 e IL-12 y los metabolitos de ácido araquidónico como el PAF, leucotrienos (LTs) y prostaglandinas (PGs). **(Anexo. 2).**

También la molécula CD-14 puede ser liberada de la membrana celular y circular en el suero, allí se une al LPS y estimula las células endoteliales y epiteliales. Estas células, además de liberar citocinas y quimiocinas, liberan y expresan moléculas de adhesión VCAM, ICAM, selectinas y proteínas quimioatrayentes de monocitos-1 (MCP-1). Estas sustancias son las responsables de la adhesión de los polimorfonucleares y los monocitos a las células endoteliales. Dichos mediadores también incrementan la permeabilidad vascular, lo que genera disminución del volumen intravascular, hipotensión, hipoperfusión tisular, necrosis celular, disfunción orgánica y muerte. (Schor y cols., **2002**). También se produce la activación del endotelio con generación de óxido nítrico (NO) y de enzimas pro-oxidantes como las oxidasas vasculares (xantina-oxidasa y NADPH oxidasa) capaces de generar el anión radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$).

La activación del sistema inmunológico está constituida por el complejo monocito-macrófago-neutrófilo, entre estas células, el macrófago se destaca por su gran capacidad de producción de citocinas y el neutrófilo por la síntesis de EROs (fenómeno conocido como explosión respiratoria), así como de especies reactivas del nitrógeno (Babior, **2000**). Las citocinas desarrollan una cascada inflamatoria, ya que una vez comenzada la liberación de algunas de ellas, se induce la formación y liberación de otras, multiplicándose y amplificándose su producción y efectos.

1.4. Mediadores pro-inflamatorios.

1.4.1 Citocinas.

Durante los últimos 15 años, se han acumulado evidencias convincentes que demuestran que las citocinas son mediadores que forman parte de la respuesta de defensa del hospedero y de esta forma protegen contra la infección experimental, pero por otra parte, su descontrolada liberación conlleva el deterioro del organismo. Esto se ha demostrado mediante el uso de citocinas pro-inflamatorias recombinantes, particularmente el TNF, IL-1 e Interferón gamma (IFN) y los anticuerpos de citocinas. Investigaciones realizadas en modelos experimentales de choque endotóxico o infeccioso, demostraron el efecto letal de TNF, IL-1 β , IL 12, IL-18, IFN- γ , el factor estimulador de colonias granulocitos-macrófagos (GM-CSF) así como el factor inhibidor de la migración de macrófagos (Cavaillon y cols., **2003**).

El **TNF- α** , fue la primera citocina identificada en la patogénesis del choque séptico (Bone, **1991**). Es una proteína de 17 kDa producida principalmente por los macrófagos y tiene la capacidad de activar monocitos, macrófagos y neutrófilos y de inducir la producción de proteínas de fase aguda por intermedio de la IL-6 (Zanotti y col., **2002**). La administración de endotoxina a seres humanos de forma experimental se manifiesta con un incremento marcado de la concentración sérica de TNF- α , lo que se acompaña de trastornos cardiovasculares (taquicardia e hipotensión con decremento de la resistencia vascular periférica) y fiebre, escalofríos, acidosis metabólica, leucopenia, trombocitopenia, entre otros trastornos metabólicos muy similares a los que ocurren en la sepsis y el choque séptico humano. Se ha demostrado en ensayos clínicos que la administración de TNF- α induce hipotensión refractaria e incrementa la permeabilidad vascular (Brouckaert y cols., **2004**). Cuando es aplicado en animales, el TNF- α provoca un síndrome de choque letal, donde el

colapso cardiovascular esta centralmente provocado por el ON (Makino y cols., **1996**).

En pacientes ancianos, se encontró que niveles elevados de TNF- α en suero se correlacionaron con el diagnóstico de bacteriemia y un mal pronóstico de la enfermedad (Martí y cols., 2003).

La interleucina-1 β (IL-1 β) es un polipéptido de 17 kDa producido por los fagocitos mononucleares y los neutrófilos. Actualmente se les reconoce a la IL-1 β y al TNF- α un papel protagónico en la cascada de citocinas que se liberan en la sepsis. La mayoría de los efectos biológicos que induce la IL-1 β son también similares a las acciones del TNF- α , la cual cuando se inyecta en los animales y seres humanos produce fiebre con escalofríos, trastornos cardiacos y vasculares con leucopenia, trombocitopenia, hemorragia y edema pulmonar. (Zanotti y cols., **2002**). También, se ha encontrado que niveles elevados en suero de estas citocinas se correlacionan con bacteriemia y un mal pronóstico de la enfermedad (Martí y cols., **2003**). Tanto la IL-1 β como el TNF- α parecen actuar de forma sinérgica y producen depresión del miocardio, durante la primera etapa del choque séptico con una rápida influencia directa sobre este órgano (Remick, **2007**).

El Interferón gamma (IFN γ) es producido por las células asesinas activadas (las T auxiliaadoras y las células T citotóxicas) (Zanotti y cols., **2002**). La producción de IFN γ se incrementa por la acción de varias citocinas (TNF- α , IL-1, IL-8, IL-12 e IL-18), a su vez, el IFN γ puede incrementar los efectos hemodinámicos adversos de esas citocinas en el choque séptico. Recientemente, se ha demostrado la efectividad de un anticuerpo monoclonal anti-IFN γ humano en un modelo de bacteriemia letal inducida en primates, donde se evidenció el incremento de la sobrevivencia de los animales

acompañada de una reducción del daño multiorgánico en los grupos tratados con este anticuerpo (Lainee y cols., **2005**).

La **interleucina 6 (IL-6)** también es considerada una citocina pro-inflamatoria, esta ha sido reportada en pacientes ancianos con bacteriemia, en que concentraciones elevadas de la misma se correlacionan con un mal pronóstico de la enfermedad (Martí y col., **2003**), por lo que ha sido considerado un marcador independiente de esta enfermedad (Remick y cols., **2002**). Sin embargo, otros autores señalan que la IL-6 también es considerada una citocina anti-inflamatoria, ya que induce una amplia gama de proteínas de fase aguda que modulan la inflamación, tales como la α -1 ácido-glicoproteína y/o la proteína C reactiva. Así, se ha demostrado que la IL-6 también puede reducir la depresión del miocardio durante la septicemia por meningococos (Pathan y cols., **2004**).

1.4.2. Mediadores derivados del ácido araquidónico.

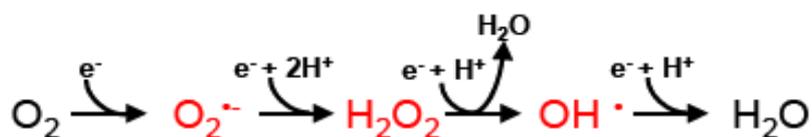
Los mediadores lipídicos, tales como, el PAF (Alexander y col., **2001**), las PGs, los LTs y los tromboxanos (TX) están implicados en la patogénesis de enfermedades inflamatorias, entre las que se encuentra el síndrome de disfunción respiratoria aguda y la sepsis (Bulger y col., **2000**).

En tal sentido, Nakae y cols., **1994**, demostraron la correlación que existe entre el incremento de la liberación de citocinas proinflamatorias tales como el TNF- α e IL-8, con la producción de leucotrieno B₄ (LTB₄). Además, se ha demostrado que la inhibición de receptores de LTs, disminuye el proceso inflamatorio inducido por ligadura y punción cecal (LPC) en ratas, lo que corrobora el papel importante que tienen los LTs en la fisiopatología del choque séptico (Sener y cols., **2005**). Durante la sepsis, se demostró que se produce un incremento en la formación de estructuras lipídicas en los leucocitos en comparación con pacientes sanos (Pacheco y cols.,

2002). En concordancia con este hallazgo, en ratones con endotoxemia, se demostró la inducción de la formación de lípidos con la consiguiente expresión de enzimas formadoras de eicosanoides tales como LTB₄ y PGE₂ (Pacheco y cols., **2002**), lo cual es otro argumento que sustenta el papel de estos mediadores en la patogénesis del choque séptico.

1.4.3. Especies Reactivas del Oxígeno (EROs) en el choque séptico.

Las EROs juegan un papel fundamental dentro de la compleja patogénesis del SRIS, la sepsis, el choque séptico y el SDMO. Dentro de las EROs se encuentran el anión radical superóxido (O₂⁻), el radical hidroxilo (OH[·]), el peróxido de hidrógeno (H₂O₂) y el Oxígeno singlete (O_{2s}).



Estos compuestos, son moléculas intermediarias altamente reactivas, producto de la reducción mono y divalente de la molécula de oxígeno, debido a la presencia de un electrón no apareado en su última órbita. Las EROs reaccionan con las moléculas más cercanas, iniciando una serie de procesos bioquímicos que provocan cambios en la célula como la peroxidación lipídica y desnaturalización de proteínas, despolarización de los polisacáridos y desestabilización de la estructura tanto celular como intersticial. La generación de pequeñas cantidades de EROs es un proceso fisiológico, el cual es neutralizado por sustancias secuestradoras que forman parte de los sistemas antioxidantes endógenos, tanto enzimático como no enzimático, tales como: las enzimas superóxido dismutasa (SOD), la catalasa (CAT) y la glutatión peroxidasa (GPx), así como los no enzimáticos, alfa-tocoferol (Vit E), el ácido ascórbico (Vit C) y

la Metionina, entre otros, evitando que ocurran daños agudos. Cuando la generación de EROs se incrementa masivamente, falla el balance de estos con los sistemas de defensa y ocurre el daño celular (Novelli., **1997**).

Existen evidencias que demuestran que los radicales de oxígeno (O_2^- y OH^{\cdot}) son mediadores de la inflamación, SRIS, sepsis, choque séptico y SDMO. (Cuzzocrea., **2005**). Así, se ha descrito que en el choque séptico, la generación de EROs se encuentra directamente vinculada a la liberación de mediadores pro-inflamatorios, mediante la activación de células del sistema de defensa. Por tanto, se ha demostrado que el balance fisiológico intracelular oxidación /reducción que es un factor crítico para la respuesta inmune, se encuentra afectado bajo condiciones sépticas (Macdonald y cols., **2003**).

Por otra parte, se demostró que el daño intestinal ocurrido durante el choque séptico tiene como consecuencia la transferencia de endotoxinas desde el lumen intestinal hacia la circulación sistémica y que este daño no es producido por la acción directa de la endotoxina, sino por los EROs (Turnage y cols., **1997**) liberados a partir de la estimulación de los granulocitos y monocitos por estos componentes microbianos (Jajdaesy-Balla y cols., **1996**). En tal sentido se ha establecido que las citocinas IL-1 y TNF- α estimulan a las células del sistema inmune innato (granulocitos y monocitos) para la producción de EROs (Lloyd y cols., **1993**).

El O_2^- producido por la enzima NADPH oxidasa entre otras fuentes, oxida a las proteínas y fosfolípidos de los ácidos grasos insaturados. Sin embargo, algunos fosfolípidos oxidados pueden prevenir la inflamación inducida por endotoxina mediante el bloqueo de la interacción entre el LPS y la LBP que se une al receptor CD-14, entre otros mecanismos (Bochkov y cols., **2002**). Por lo que el grado de alteración del balance redox y la ruptura del equilibrio celular que como consecuencia

de su alteración se produzca, constituye un aspecto fundamental en el papel de los procesos oxidativos durante el daño inducido por la sepsis.

1.4.4. Especies reactivas del nitrógeno (ERN) en el choque séptico.

El óxido nítrico (ON) es un radical altamente reactivo. Dentro de sus características se encuentra que es un gas producido en el endotelio vascular, que tiene vida corta y que tiene como acción fundamental la relajación del músculo liso (Palmer, **1987**). Esta ERN es producida enzimáticamente por tres isoformas de la enzima óxido nítrico sintetasa (ONS), la neuronal (ONSn), la endotelial (ONSe) y la inducible (ONSi). La ONSn y la ONSe son constitutivas y participan en el mantenimiento de los procesos homeostáticos celulares como la neurotransmisión y el tono vascular, respectivamente. Ellas producen pequeñas cantidades de ON en respuesta a un incremento del calcio intracelular. Las enzimas ONS producen ON y L-citrulina en una reacción equimolar. El ON se forma a partir del nitrógeno guanidino terminal del aminoácido L-arginina en una reacción que ocurre por etapas (Ketcher y cols., **1998**). Bajo condiciones fisiológicas, el ON producido activa la guanilato ciclasa soluble (GCs) para la transformación del glutamilo trifosfato (GTP) en glutamilo monofosfato cíclico (GMPc), que es el responsable de la relajación muscular y de esta forma se mantiene el tono vascular, lo cual garantiza la perfusión de los tejidos (Lucas y cols., **2000**). También al ON se le adjudican diferentes efectos biológicos descritos en el **anexo 3** (Grishan y cols., **1999**).

Entre los efectos beneficiosos del ON, se encuentra su actividad anti-inflamatoria (Tedgui y col., **2001**); puesto que su síntesis endógena inhibe la adhesión de los leucocitos circulantes y las citocinas que inducen moléculas de adhesión intercelular y

vascular (ICAM-1 y VCAM-1), e inhibe la activación del NF- κ B (De Caterine y cols., **1995**; Spiecker y cols., **1997**).

Por otra parte, se ha demostrado que la inhibición crónica de la síntesis de ON por la N-Nitro-L-arginina metylester (L-NAME), induce la infiltración vascular de monocitos, la expresión de IL-6, MCP1, ICAM-1 y VCAM-1, así como la activación del NF- κ B (González y cols., **2000**; Cobb y cols., **2001**), lo que produce un incremento del O_2^- . Otro de los efectos beneficiosos del ON es que actúa como antioxidante, esto fue demostrado mediante la inhibición por la L-NAME, (Cauwels y cols., **2005**), lo cual produjo un incremento del metabolito hydroxy-2-nonenal (2HN), el cual es considerado un marcador de la peroxidación lipídica (Zarcovic., **2003**). Los mecanismos que explican el efecto antioxidante del ON son varios. Esta molécula puede contrarrestar el estrés oxidativo y la peroxidación lipídica, mediante la inhibición de varias fuentes enzimáticas productoras de O_2^- y también puede actuar como un secuestrador directo de superóxido o radicales lipídicos (Rubbo y cols., **2000**; Botti y cols., **2004**). Otro de los mecanismos antioxidantes del ON es la activación de vías apoptóticas y la inducción de la expresión de genes antiinflamatorios (Cauwels, **2007**).

Sin embargo, recientemente, se demostró que la ONSi puede ser regulada por diversos factores (Fleming y cols., **2003**). Esta enzima inducible no es normalmente expresada, puede ser sintetizada *de novo* durante la respuesta inflamatoria activada por estímulos como el LPS y citocinas proinflamatorias, tales como el TNF- α y la IL-1, entre otros (Annane y cols., **2000**). Esta enzima es calcio independiente y produce grandes cantidades de ON por largos períodos de tiempo (Morris y cols., **1993**). Así, bajo condiciones en se produce una cantidad excesiva de ON, se pone de manifiesto el papel dual de esta molécula. De este modo el ON puede inducir

excesiva vasorelajación y producir cardiodepresión, sin embargo, es indispensable para la sobrevivencia de ratones tratados con TNF a altas dosis (Cauwels, **2007**). Además, en condiciones patológicas el exceso de ON produce la acumulación de GMPc, responsable principal de la relajación vascular, la depresión del miocardio y la inhibición de la agregación y adhesión plaquetaria (Lucas y cols., **2000**). El aumento del ON también contribuye al daño microvascular, la hiporeactividad vascular y la disfunción orgánica, probablemente por la inducción de apoptosis (Sharshar y cols., **2003**). Tales aspectos se corresponden con la correlación existente entre la expresión de ONSi en los cardiomiocitos, y la disfunción en la contractilidad del miocardio (Rossi y cols., **2007**).

Por otro lado, la superproducción de ON favorece su reacción con el O_2^- dando como resultado el peroxinitrito ($ONOO^-$), especie altamente reactiva capaz de oxidar y nitrar componentes celulares y tisulares, como los residuos de tirosina de las proteínas celulares y plasmáticas, el ADN y lípidos o enzimas críticas del metabolismo intermediario. El $ONOO^-$ también produce un daño estructural y funcional a nivel mitocondrial, que se torna irreversible debido a la oxidación y nitración de componentes mitocondriales (Radi y cols., **2000**). De esta forma, está bien documentado que el $ONOO^-$ también oxida y produce depleción de los antioxidantes endógenos como ascorbato, glutatión y SOD (Radi y cols., **2000**).

El $ONOO^-$ tiene un importante papel en el desarrollo del choque endotóxico inducido por LPS (Cuzzocrea y cols., **2006**). También se ha demostrado que grandes cantidades de $ONOO^-$ son capaces de reproducir muchas de las alteraciones cardiovasculares asociadas con el choque endotóxico (Hauser y cols., **2005**).

De este modo, tales evidencias en su conjunto sustentan el papel del ONOO^- como un potente mediador de la inflamación y del choque séptico (Cuzzocrea., **2005**; Cuzzocrea y cols., **2006**; Alves Fiho y cols., **2008**).

1.5. Mediadores anti-inflamatorios.

1.5.1 Citocinas.

Interleucina -10 (IL-10). Las citocinas anti-inflamatorias y los receptores solubles son producidos en grandes cantidades durante la sepsis. Estas proteínas disminuyen la producción de citocinas proinflamatorias y tienen un efecto protector contra los daños producidos durante la sepsis y el choque séptico inducido por endotoxemia. Inicialmente se les identificó como un producto de las células auxiliares T tipo 2 en ratones, las cuales inhiben la liberación de las citocinas pro-inflamatorias producidas por las células auxiliares tipo 1, tanto en ratones como en humanos (Romagnani., **1992**). De esta forma, se demostró en un modelo de endotoxemia en ratones inducido por LPS que la IL-10 inhibió la producción del TNF- α y la activación de los neutrófilos en el daño agudo pulmonar, reduciendo el daño agudo en el tejido e incrementando la sobrevivencia de los animales ([Inoue.](#), **2000**; Nalos y cols., **2006**).

Sin embargo, no en todas las condiciones esta citocina cumple un papel protector. Así, Remick y cols., **1998** demostraron que la IL-10 administrada en un modelo de sepsis experimental inducido por ligadura y punción cecal (LPC) en ratones, no redujo la mortalidad en la sepsis polimicrobiana, la cual parece estar relacionado con un efecto inmunodepresor de la IL-10 bajo estas condiciones, que explican el por qué la infección persiste en los animales sépticos aunque se les administre una terapia a priori con antibióticos.

Interleucina-4 (IL-4). Se ha demostrado que la IL-4 es capaz de reducir la mortalidad en varios modelos de choque séptico o endotóxico (Newton y cols., **2000**; Cluitmans y

cols., 2005). Sin embargo, también se demostró que mientras el pretratamiento con IL-4 tiene un efecto protector cuando se administró durante el periodo de la infección, se incrementó la mortalidad (Giampietri y cols., 2000). Este hecho argumenta la importancia que tiene la selección del período de tiempo para su administración y producir el efecto deseado.

Factor transformador del crecimiento β (FTC β). Altos niveles de esta citocina se han detectado en pacientes con sepsis (Lekkou y cols., 2004). En modelos experimentales se ha demostrado su utilidad terapéutica en la sepsis (Bauhofer y cols., 2004). Así, en un modelo de choque endotóxico inducido por LPS, el tratamiento con FTC β produjo una reversión de la hipotensión e incrementó la sobrevivencia y se demostró además, que el FTC β inhibe la ONSi (Imai y cols., 2000), lo cual puede traer aparejado la disminución del daño producido por el incremento en la producción de ON.

Factor estimulante de colonia granulocitos /macrófagos (GM-CSF)

Esta citocina es producida por los macrófagos, los monocitos y las células endoteliales en respuesta a estímulos diversos (Ping y cols., 2001). El FEC-GM induce la proliferación, diferenciación y el proceso de maduración de los leucocitos polimorfonucleares (Ping y cols., 2001). Además, incrementa las funciones del neutrófilo, tales como la quimiotaxis, la fagocitosis y la acción bactericida (Gurleyik y cols., 2007). Sin embargo, estas propiedades del GM-CSF pueden también producir efectos nocivos a través de la producción de especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno y por su efecto como activador de los leucocitos polimorfonucleares durante el curso de la infección (Gurleyik y cols., 2007).

No obstante, a pesar de estos efectos nocivos, también se ha demostrado que el GM-CSF no sólo mejora las funciones fisiológicas e inmunológicas, sino también la

calidad de vida del paciente (Lyman, **2002**; Bauhofer, **2007**). Su capacidad para incrementar las funciones del neutrófilo ha constituido el fundamento para investigar su potencialidad como fármaco en la sepsis y el choque séptico (Ping y cols., **2001**). Así, estudios preclínicos realizados en cerdos tratados con GM-CSF mostraron una disminución de la respuesta hemodinámica, lo que se acompañó de la reducción de los niveles de TNF- α y endotoxina en suero. (Bauhofer y cols., **2002**; Hareng y cols., **2002**). Recientemente, se demostró que el tratamiento con GM-CSF combinado con antibióticos mejoró el comportamiento de la sepsis en un modelo en ratas (Bauhofer y cols., **2009**).

La sobreexpresión de estos mediadores anti-inflamatorios conllevan al estado de de parálisis del sistema inmune, en el cual el paciente no responde y se hace susceptible a infecciones nosocomiales (Hotchkis y col., **2003**), esto contribuye a la muerte del paciente en una fase tardía (Volk y cols., **2000**).

1.5.2. Acción anti-inflamatoria de las proteínas de choque térmico (HSPs).

A pesar de los avances en el conocimiento de los mecanismos moleculares que subyacen en la inflamación, es aún limitado el conocimiento acerca de los mecanismos a través de los cuales la respuesta anti-inflamatoria modula la cascada pro-inflamatoria inicial para restablecer la homeostasis del sistema inmune. Sin embargo, diversas investigaciones señalan que cuando la célula es sometida a un estrés determinado, esta es capaz de restablecer su homeostasis, mediante la activación de varios mecanismos protectores intracelulares.

Uno de los mecanismos establecidos es la inducción de una respuesta de choque térmico (HSR), que no es más que la rápida y casi exclusiva síntesis de un número pequeño de proteínas intracelulares, llamadas proteínas de estrés, incluyendo las proteínas de choque térmico (HSPs), las cuales están subdivididas en 5 familias, en

dependencia de su peso molecular (10, 20, 60,70 y 90 kDa) (Klosterhalfen y col., **1998**). La síntesis de estas proteínas puede iniciarse por diversos trastornos como la isquemia y el estrés metabólico (de diferentes tipos como el causado por el arsénico y el zinc), así como por las citocinas TNF- α y la IL-1, la hipertermia y el LPS (Nover, **1991**).

Por otro lado, también se ha descrito que las HSPs tienen propiedades citoprotectoras contra los efectos dañinos causados por un estrés ambiental (Klosterhalfen y col., **1998**). Las HSPs ejercen diversas funciones que mantienen la homeostasis celular, una de sus características fundamentales es la de unirse a proteínas desnaturalizadas o polipéptidos y guiarlas hacia su destino intracelular, transportándolas a través de la membrana celular o proporcionándoles otras proteínas (Hartl, **1996**). Otra de sus propiedades es actuar como inmunomoduladoras, inhibiendo la expresión génica de citocinas proinflamatorias y de la ONSi (Chan y cols., **2004**), mediante la inhibición de la actividad del factor de transcripción NF- κ B (Kohn y cols., **2002**) inducida por la estabilización de su subunidad inhibitoria (Pritts y cols., **2002**). Ambos mecanismos, inmunológico y citoprotector, hacen de la HSR un potente candidato para futuras consideraciones y estrategias terapéuticas (Li y cols., **2001**; Chan y cols., **2004**).

Estudios recientes han demostrado que la HSP-70 confiere protección contra el choque endotóxico en cardiomiocitos de roedores (Lau y cols., **2000**). Además, se demostró que las HSP-70 inducidas durante el preconditionamiento térmico produjeron cardioprotección mediante la potenciación de la respuesta refleja de los baroreceptores (Chan y cols., **2002**).

1.6 Intervenciones terapéuticas en el choque séptico.

1.6.1. Los antibióticos.

Los antibióticos constituyen la terapéutica principal para el tratamiento de la sepsis. Por tanto, la industria farmacéutica continúa en la búsqueda e investigación para el desarrollo de nuevas formulaciones de antibióticos más eficaces y con menos reacciones adversas. Sin embargo, a pesar de ello, datos *in vivo* (Lepper y cols., **2002**), han demostrado que éstos son capaces de inducir la liberación de la endotoxina (componente principal de la pared celular de las bacterias) la cual promueve una intensa respuesta inflamatoria con niveles altos de TNF- α , causante principal de los cambios hemodinámicos ocurridos en el organismo después de la infección (Holhaimer, **2001 a**) y sus efectos perjudiciales. Esta capacidad de los antibióticos para liberar endotoxina está determinada por la composición química del antibacteriano, el modo específico de eliminar el agente infeccioso, la densidad de bacterias y la concentración del antibacteriano. Estos efectos pueden ser perjudiciales en los pacientes que se encuentren bajo la antibiotico terapia (Holhaimer y col., **2001 b**).

A pesar de estos efectos adversos de los antibióticos, ellos continúan siendo utilizados como la terapia de elección para la sepsis polimicrobiana. Tal afirmación fue demostrada por O'Sullivan y cols., **2008** en el modelo de sepsis polimicrobiana, donde se observó que aunque la inhibición de NF-kB mejoró la sobrevivencia de los animales con choque endotóxico, el incremento en la sobrevivencia requirió el tratamiento concomitante con antibióticos. Por otra parte, Lehmann y cols., **2008**, demostraron que el efecto de los antibióticos como tratamiento de la sepsis severa es incuestionable, pero que estos deben ser bien seleccionados teniendo en cuenta sus efectos adversos sobre la microcirculación intestinal, la cual tiene un papel importante en la patogénesis de la sepsis y el fallo múltiple de órganos.

1.6.2. Inhibidores de la cascada de citocinas.

Se ha considerado que la modulación de la liberación de las citocinas constituye una estrategia y prometedora como opción terapéutica para reducir la morbilidad y la mortalidad elevadas que caracterizan el choque séptico (Zanotti y cols., **2002**). Sin embargo, debe tenerse en cuenta que el bloqueo de las citocinas proinflamatorias sólo será beneficioso si el agente bloqueador es administrado antes del reto infeccioso (Heumann y col., **1996**). La regulación de la producción de citocinas es efectiva si el reto infeccioso es hiperagudo, como por ejemplo con la administración de concentraciones elevadas de *E. coli* o de endotoxina. Sin embargo, si el reto es subagudo, como en el caso del modelo de ligadura y punción cecal (LPC), la eficacia lograda mediante el bloqueo de las citocinas ha resultado en la mayoría de los casos insatisfactorio (Heumann y col., **1996**).

Teniendo en cuenta que desde el punto de vista fisiopatológico de la sepsis, los mediadores que inician el desarrollo del SRIS son el TNF- α , IL-1, IL-6 y la endotoxina, se han diseñado ensayos preclínicos y clínicos, con anticuerpos monoclonales de anti-endotoxinas (Greenman y cols., **1991**; Warren y cols., **1992**). También se han evaluado inmunoterapias con el uso de antagonistas del receptor de IL-1 (IL-1RA), anticuerpos monoclonales contra TNF- α y el receptor de TNF- α (Panacek y cols., **2000**; Arnalich y cols., **2002**; Alejandria y cols., **2001**). Sin embargo, los resultados de estos ensayos clínicos son aún insatisfactorios.

De acuerdo a ello, otra alternativa que se ha evaluado, es la terapia combinada con varios agentes como fue la inmunoterapia con el uso de antagonistas del receptor soluble de TNF- α y antagonistas del receptor de IL-1, los que disminuyeron la mortalidad hasta un 45 % en un modelo de sepsis inducido por LPC en ratones (Remick y cols., **2001**).

1.6.3. Compuestos con efectos antioxidantes.

Teniendo en cuenta el papel preponderante que desempeñan las EROs en el desarrollo de la sepsis, se ha demostrado que el uso de terapias antioxidantes, tanto preventivas como terapéuticas, puede ser beneficioso en la peritonitis letal (Wu, **2006**). Estas intervenciones terapéuticas incluyen el uso de la Vitamina E como un antioxidante (Cuzzocrea y cols., **1999 a**), la Superóxido dismutasa (Cuzzocrea y cols., **1999 b**) y un destructor catalítico del ONOO^- , terapias que disminuyen la hipotensión, el daño tisular y la muerte inducida por endotoxemia (Cuzzocrea y cols., **2006**). Otros reportes de laboratorio han demostrado que el uso de dosis altas de glutatión reducido (500 mg/kg) muestra una acción protectora contra el choque traumático o endotóxico en ratas (Falsini y cols., **1994**).

Además, se comprobó que el uso de la combinación de antioxidantes como la SOD, CAT y la Vit C, indujo una reversión de la hipotensión sistémica, redujo los niveles de ON y el daño pulmonar agudo en un modelo de endotoxemia, mediante la inhibición de la expresión de RNAm para la ONSi e IL-1 β (Feng y cols., **2004**). Por otra parte el tratamiento con N-acetil cisteína antes de inducir la endotoxemia disminuyó el daño pulmonar agudo y redujo los niveles de moléculas de adhesión intercelular-1 (ICAM-1) y de malondialdehído (MDA) (Birbaum y cols., **2008**)

1.6.4 Inhibidores de la ONS.

La implicación del ON en el desarrollo de la hipotensión producida durante el choque séptico, permite sugerir que el tratamiento con inhibidores de la ONS puede ser beneficioso. De hecho, ha sido demostrada la reversión de la hipotensión tanto en modelos experimentales (Fahey y cols., **1996**) como en humanos (López y cols., **2004**) por la inhibición de esta enzima. Otros estudios han demostrado que la inhibición selectiva de la ONSi, mejoró la endotoxemia y el choque séptico tanto en animales como en humanos, incrementándose la presión arterial y la resistencia

vascular (Cobb y cols., **2001**; López y cols., **2004**). Sin embargo, los resultados obtenidos en algunos ensayos clínicos fase III con estos tipos de inhibidores son aún no concluyentes, por lo que se ha sugerido que la terapia combinada con inhibidores de esta enzima y antioxidantes, podieran ser eficaces al lograr un efecto sinérgico mas beneficioso que el obtenido con la inhibición de esta enzima solamente (Wu, **2006**).

1.6.5. Oxígeno Hiperbárico (O₂ HB).

Los efectos beneficiosos del pretratamiento con oxígeno hiperbárico (O₂ HB), en un modelo modelo de choque endotóxico inducido por LPS en ratas sugieren su posible uso terapéutico. En esta investigación se demostró una disminución significativamente de la hipotensión, la acidosis, la producción de ON, la actividad de la mieloperoxidasa (MPO) en pulmón y de la expresión de la ONSi (Pedoto y cols., **2003**). Otros autores también demostraron las acciones beneficiosas del O₂ HB en la peritonitis, el choque endotóxico y el fallo múltiple de órganos inducidos experimentalmente (Cuzzocrea y cols., **2000**). Sin embargo, las evidencias preclínicas y clínicas para este tipo de abordaje terapéutico son aún limitadas.

1.6.5. Proteína C activada (PCA).

La PCA es una proteasa sérica que se encuentra elevada en estados de sepsis grave y SRIS. Esta proteína constituye uno de los principales reguladores de la microcirculación y de la función endotelial por su acción anti-trombótica, profibrinolítica y anti-inflamatoria (Yan y col., **2001**; Gondon y cols., **2001**).

Los efectos beneficiosos de la PCA se han reportado en diferentes modelos experimentales de choque séptico. Por ejemplo, se demostró que la administración de PCA durante la endotoxemia mejoró la microcirculación intestinal y ejerció un efecto anti-inflamatorio mediante la reducción de la adhesión de leucocitos al endotelio de

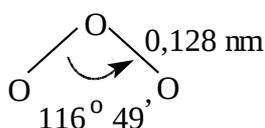
las vénulas submucosales (Lehmann y cols., **2006**), además de disminuir la liberación de IL-1 sistémica (Lehmann y cols., **2008**). Este efecto anti-inflamatorio de la PCA fue también demostrado en un modelo de isquemia/ reperfusión y sepsis (Hoffmann y cols., **2005**).

1.7. Ozonoterapia. Generalidades.

1.7.1. Propiedades físico-químicas del Ozono.

El ozono es una variedad alotrópica del oxígeno con un átomo adicional. Es particularmente inestable, se descompone de forma espontánea en oxígeno diatómico, lo que impide su transporte y almacenamiento, por lo que es necesario que su obtención se efectúe en el lugar y momento de su empleo. El ozono es un gas perceptible por su olor penetrante, ligeramente azulado a elevadas concentraciones y diamagnético.

Los átomos de oxígeno que componen la molécula de ozono se enlazan entre sí formando un ángulo de $116^{\circ} 49' \pm 35'$, con una distancia de enlace ($0,128 \pm 0,003$ nm) intermedia entre el correspondiente a un simple enlace O-O ($0,149$ nm) y a un doble enlace O=O ($0,121$ nm), lo que le proporciona un marcado carácter de doble enlace (80 %). (Viebahn, **1994**; Bocci, **1994**):



La molécula de ozono se descompone en oxígeno con una constante de velocidad del orden de 10^{-4} s^{-1} y ocurre con desprendimiento de energía. La historia relata que alrededor de 1785 el físico alemán Van Marum (1750-1837) se percató del peculiar olor que se generaba en zonas cercanas a máquinas que funcionaban con electricidad. Sin embargo, fue Christian Friedrich Schönbein (1799-1868) quien en

1840 descubrió al ozono y le dio el nombre que hoy posee. Ozono es una palabra que viene del griego "ozein" que significa oloroso (Bocci y cols., **1994**)

El primer equipo generador de ozono fue desarrollado por el ingeniero e inventor Werner Von Siemens en el año 1857. Con este primer equipo generador de ozono, el investigador Kleinman, realizó los primeros ensayos bacteriológicos sobre gérmenes patógenos y la primera insuflación de este gas, estudiando además, la influencia del ozono sobre las mucosas de humanos y animales (Viebahn, **1994**; Bocci y cols., **1994**).

En 1872, Sir Benjamin Collins Brodie (1817-1880) dio a conocer la naturaleza química del ozono. Posteriormente, en 1873, Fox descubrió la capacidad de eliminación de los microorganismos por este agente químico. Muchas décadas de silencio pasaron desde su descubrimiento hasta que durante la Primera Guerra Mundial, el ozono fue utilizado por primera vez por Albert Wolf, con fines terapéuticos, para la curación de heridas y fístulas. Wolf también empleó el ozono atendiendo a sus propiedades desodorantes durante el examen a pacientes con cáncer rectal y ginecológico. Posteriormente, la no disponibilidad de materiales adecuados para las aplicaciones del gas, el descubrimiento de nuevas drogas antibióticas (sulfonamidas y penicilinas) y cierto escepticismo que siempre ha estado asociado a las aplicaciones del ozono en el campo de la medicina, repercutieron de forma negativa en el desarrollo y aplicación de este proceder. A finales de la década del 50 con la introducción de los materiales plásticos y el diseño del primer ozonizador con fines terapéuticos, por el Dr. Joachim Hänsler en Alemania, se abrieron nuevos caminos para la aplicación y extensión de la ozonoterapia (Viebahn, **1994**).

La ozonoterapia se ha extendido a países como Austria, Suiza, Francia, Japón, Estados Unidos, Italia, España, Rusia, México, India, Egipto y otros. Actualmente

existen sociedades nacionales de ozonoterapia en muchos países que permanecen afiliadas a la Asociación Internacional del Ozono. A pesar de esto, la ozonoterapia continúa provocando controversia y dudas, motivadas por el hecho de que el ozono es uno de los peores contaminantes ambientales y el tercer oxidante más poderoso que se puede encontrar en la naturaleza.

Existen suficientes investigaciones sobre las bases biológicas de la ozonoterapia que han permitido su utilización en gran número de países y se sigue ampliando cada vez más. Sin embargo, el hecho de que no todos los mecanismos biológicos involucrados en la eficacia de la ozonoterapia estén lo suficientemente esclarecidos, es sumamente importante continuar investigando y profundizando en estos aspectos.

1.7.2. Mecanismos biológicos asociados a la eficacia de la Ozonoterapia.

La solubilidad del ozono (O_3) en agua es 10 veces mayor que la del oxígeno (Viebahn., **1994**). Cuando el O_3 se disuelve en el plasma se descompone rápidamente al reaccionar con las biomoléculas como los antioxidantes, proteínas, carbohidratos y preferentemente los ácidos grasos poliinsaturados, que se encuentran en un porcentaje elevado en los fluidos y estructuras celulares del organismo. En estas reacciones se generan peróxidos orgánicos, peróxido de hidrógeno (H_2O_2), ozónidos y aldehídos como el 4 hidroxialquenal (Pryor y col, **1994**), los cuales en cantidades adecuadas y controladas ejercen diferentes acciones biológicas que le confieren al O_3 un conjunto de propiedades terapéuticas (Lettieri y cols., **1991**; Carpendale y cols., **1993**; Bocci, **1994a**; Basabe y cols., **1995**; Menéndez y cols., **1995**).

Esta cascada de ERO, generada por la reacción del O₃ con las biomoléculas, origina efectos sobre las células y su metabolismo (Cross y cols., **1992**; O'Neill y cols., **1993**; Prior., **1994**; Viebahn., **1994**). Se reporta que los mecanismos de acción de este agente están relacionados con la generación de productos secundarios (Gabrielson y col., **1994**) a partir de una interacción selectiva con los dobles enlaces carbono-carbono (C=C) de los compuestos orgánicos presentes en el plasma y las membranas celulares.

El gran poder oxidante del O₃ le permite reaccionar con casi todas las biomoléculas. Dentro de los constituyentes orgánicos que más reaccionan con el ozono se encuentran los ácidos grasos poli-insaturados presentes en los fosfolípidos y triacilglicéridos, las vitaminas antioxidantes (alfa tocoferol y el ascorbato), los grupos sulfhidrilo, los enlaces disulfuro, y los aminoácidos de las proteínas. El compuesto con mayor velocidad de reacción con el O₃ es la cisteína, seguida por los ácidos grasos poli-insaturados, la metionina, el triptófano, la tirosina, el ácido 3-hexanoico y la histidina. Los nucleótidos, aunque en menor grado con respecto a los compuestos anteriormente mencionados, también pueden reaccionar con el O₃ (Gabrielson y col., 1994; Pryor y col., 1994).

Se reporta que la acción del O₃ sobre las células sanguíneas va más allá de su reacción con componentes de la membrana. La ozonoterapia es capaz de activar el metabolismo del eritrocito, haciéndolo más flexible y elástico, de manera que se deforma más fácilmente, lo cual le permite oxigenar mejor el tejido (Bocci, **1994 a**). Los compuestos formados por la reacción del O₃ con las biomoléculas potencian la actividad antioxidante, lo cual tiene un efecto positivo sobre el consumo de glucosa por parte el eritrocito, incrementándose la vía glicolítica con el aumento de la

actividad de la glucosa 6 fosfato deshidrogenasa (G6PDH). Todo ello trae como resultado un mayor aporte de NADPH, por lo que mejora el metabolismo eritrocitario y se incrementan los niveles de adenosil trifosfato (ATP), favoreciéndose el funcionamiento de ATPasas como la bomba ATPasa Na/K. Al mejorar el funcionamiento de la ATPasa Na/K, se favorece el mantenimiento del potencial de membrana en reposo (PMR), confiriéndole al eritrocito una mayor flexibilidad y funcionalidad (Bocci, **2002**). También se ha demostrado que en la sangre humana expuesta a dosis terapéuticas de O₃ (10 a 80 µg/mL) se activan vías metabólicas que favorecen la formación del 2,3 difosfoglicerato (2,3 DPG), el cual favorece la liberación de oxígeno a los tejidos y mejora la reología de los eritrocitos (Hernández, **1989**).

El O₃ también activa monocitos y linfocitos, estas células a través de varios mecanismos celulares (Bocci., **2002**), comienzan a liberar sustancias bioactivas tales como: citocinas (McKinney y cols., **1998**), factores de crecimiento, ATP y eicosanoides (Bocci, **1994a**).

Una de las propiedades más relevantes del ozono es su poder germicida (Viebahn, **1999**). Al reaccionar el ozono con los ácidos grasos poliinsaturados de la capa fosfolipídica de la membrana de los eritrocitos, se originan peróxidos de cadena corta hidrofílicos. La célula infectada por microorganismos patógenos produce como función defensiva peróxido de hidrógeno, de forma tal que no soportaría la formación adicional de peróxidos y se destruiría, o los nuevos peróxidos formados provocan un efecto sinérgico destruyendo a los microorganismos que han penetrado en la célula.

Se ha demostrado que la eficacia de la ozonoterapia está mediada por la capacidad del ozono de estimular los sistemas antioxidantes endógenos. Este mecanismo fue denominado Precondicionamiento Oxidativo por Ozono (POO), (León y cols., **1998**).

Este POO fue invocado en analogía al reconocido mecanismo de Precondicionamiento Isquémico enunciado por Murry y cols., **1986**, el que refiere que la aplicación de cortos períodos de I/R protegen el miocardio contra una I/R sostenida, como aquellas que se originan en entidades nosológicas como el infarto del miocardio y en los trasplantes de órganos. La veracidad de este mecanismo cardioprotector ha sido demostrada en estudios experimentales y en la práctica clínica (Cochrane y cols., **1999**).

El tratamiento con O₃ por vía de la autohemoterapia mayor en pacientes asmáticos, fue capaz de reducir los niveles de IgE y la expresión de HLA-DR en células mononucleares de sangre periférica, mediante la activación de los sistemas antioxidantes (Hernández y cols., **2005**).

Diversas investigaciones han revelado la eficacia del POO en modelos experimentales donde se reproducen enfermedades en las cuales el deterioro de órganos es inducido por la alta generación de ERO no controladas (Barber y cols., **1999**; Al-Dalain y cols., **2001**; Candelario-Jalil y cols., **2001**). Fue demostrado que el POO fue capaz de revertir los daños inducidos por I/R hepática, mediante el incremento de la síntesis de proteínas intracelulares y la disminución en la producción del ON (Ajamiéh y cols., **2004**; Ajamiéh H y cols., **2005**). Otros estudios en modelos experimentales de daño renal inducido por cisplatino en ratas, demostró que el POO fue capaz de proteger al tejido renal, a través de la activación de los sistemas antioxidantes endógenos en el tejido (Borrego y cols., **2004**; González y cols., **2004**). A su vez, en un modelo experimental de daño renal, inducido por I/R, el tratamiento con O₃ por vía rectal, favoreció la recuperación de la función y la estructura del riñón, mediante el mantenimiento del balance redox intracelular (Calunga y cols., **2009**).

Existen reportes, tanto en animales como en humanos, en los cuales se ha demostrado el efecto beneficioso del ozono en la peritonitis (Ozmen y col., **1993**; Kudriavtsev y cols., **1997**). Experimentalmente se ha demostrado que tratamientos con O₃ por vía intraperitoneal en ratas con endotoxemia produjo la reversión de la formación de radicales libres y normalizó la actividad de los sistemas antioxidantes (Madej y cols., **2007**). Por otra parte, se ha evidenciado que el O₃ aplicado precozmente en pacientes en estado crítico, evitó en gran medida la sepsis respiratoria y cuando se hace manifiesta fue de menor magnitud y de más fácil control (Rabel y cols., **1989**).

En la actualidad existen diferentes estrategias terapéuticas que se expusieron en el acápite **1.6** con el objetivo de controlar la muerte por choque séptico, la eficacia de muchas de ellas aún se cuestiona, lo cual sustenta la validez de nuestros estudios.

2. Materiales y Métodos.

2.1. Materiales.

2.1.1. Reactivos.

LPS. *Escherichia coli*, serotipo 055:B5 (Sigma-Aldrich Chemic, Steinheim, Alemania). **Daxahexal**® 4 (Dexametasona, HEXAL AG, Holzkerchen, Alemania). **Rompum**® 2 % (Xilaxina, Bayer AG, Leverkusen, Alemania) y **Ketavet**® (**Ketamina**, Pharmacia, Alemania). **Opticef**® (Cefodicina, B.R.A.H.M.S, Arzneimittel GmbH, Wiesbaden). **Claforan**® (Cefatoxina, B.R.A.H.M.S, Arzneimittel GmbH, Wiesbaden). **Tavanic**® (Levofloxacin, Hoechst Marion Roussel, Alemania GMBH). **Tazobac**® (Piperacillin/Tazobactam, Lederle Arzneimittel GmbH & CO, Wolfartshausen, Alemania). **T 61**® Embutramida y tetracaina (Hoechst Roussel Vet, Alemania). **Halotano** (Fluothane, Zenez Ltda, Reino Unido). El resto de los reactivos utilizados eran de calidad para análisis de los laboratorios Merck (Alemania), BDH (Reino Unido) o Sigma (USA).

2.2. Métodos.

2.2.1. Obtención y administración de la Mezcla Ozono/Oxígeno (MOO).

La mezcla ozono/oxígeno (MOO) se generó mediante un equipo OZOMED 01, diseñado, construido y registrado por el Centro de Investigaciones del Ozono, Cuba. También fue utilizado el generador de ozono Ozonosan, PTN 60, Dr. Hänsler GmbH, Iffezheim, Alemania. El ozono se obtiene mediante oxígeno de calidad medicinal, y su concentración varía de acuerdo al voltaje aplicado y el flujo de oxígeno escogido en el equipo. La mezcla gaseosa generada por este procedimiento es utilizada inmediatamente. La concentración de ozono se estimó mediante la lectura de la absorbancia a 254 nm en un espectrofotómetro con lámpara de deuterio (Ozonosan, Dr. Hänsler GMBH, Alemania). La dosis de la MOO utilizada es el resultado del producto de la concentración de ozono, expresada en mg/L, y el volumen de la mezcla gaseosa (L), y conociendo el peso corporal de cada especie animal (León y cols., 1998). Conociendo el peso corporal de los animales se calculó la dosis de la

MOO usada en los ensayos. Teniendo en cuenta una dosis mínima, una dosis media y una dosis máxima, en los ratones las dosis empleadas para el acondicionamiento oxidativo con ozono (POO) fueron de 0,2; 0,4; 1,2 mg/kg por vía intraperitoneal (i.p), estas dosis se corresponden con las concentraciones de la MOO de 5, 10 y 30 mg/L y un volumen del gas de 1mL/animal. Para las ratas las dosis de POO empleadas fueron de 0,8; 2,4; 4 y 8 mg/kg por vía i.p, las que se corresponden con las concentraciones de la MOO de 10, 30, 50 y 100 mg/L con un volumen a insuflar de 80 mL/kg. Los niveles de dosis para cada uno de los biomodelos estudiados, fueron seleccionados según los reportes realizados por Zamora y cols., **1998**; Schulz y cols., **2003**.

La MOO se extrajo del equipo OZOMED 01 y Ozonosan mediante una jeringuilla de cristal y se inyectó por vía i.p en el lado derecho de la línea media del animal, con una aguja 20 G. Todos los tratamientos con la MOO se aplicaron de forma profiláctica. Se realizaron 5 aplicaciones (una cada 24 h) antes de inducir la sepsis intraperitoneal con materia fecal para el caso de las ratas y la endotoxemia en el modelo de ratón.

2.2.2. Biomodelos.

Se utilizaron ratones Balb/c machos (n= 70) con un peso corporal entre 20 y 25 g y ratas Wistar macho (n= 248) con un peso corporal entre 200 y 250 g. Todos los animales procedían del Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB), Carretera del Cacahual Km 2 ½, Bejucal, Habana, Cuba. Los animales se mantuvieron durante todo el estudio a una temperatura de 20-22 °C y una humedad relativa entre 50-55 %, con un ciclo de 12 horas de luz/oscuridad y la disponibilidad de agua y comida *ad libitum*. Los experimentos se realizaron de acuerdo al Código de Ética para la experimentación en animales de laboratorio, por el

Comité de Ética para la experimentación animal del Centro Nacional de Investigaciones Científicas, Ciudad de la Habana, Cuba. Los estudios de sobrevivencia se ejecutaron de acuerdo con la Guías de la Unión Europea para la experimentación animal y se aprobaron por El Comité Institucional de Cuidados de los Animales (ARCA No 015) y contó también con la aprobación del Comité de Ética de la Facultad de Veterinaria de Giessen, Alemania.

2.2.3 . Procedimientos para la instauración de una sepsis intraperitoneal en ratas.

2.2.3. a. Procedimiento quirúrgico.

Se realizó una incisión pequeña en la línea media de la región abdominal, el ciego se localizó y se expuso. Se le realizó al ciego una incisión por su zona más gruesa para extraer y pesar la materia fecal según las dosis a analizar (0,5; 0,63 y 0,75 g/kg) para determinar la curva de mortalidad y de esta forma seleccionar la dosis óptima de materia fecal que produzca el 80 % de mortalidad en 120 h. La materia fecal pesada se colocó en una jeringuilla de 3 mL y se diluyó a partes iguales (1:1) con una solución de Ringer lactato. Después de suturado el ciego con sutura continua (material de sutura no absorbible 6.0), e introducido en su cavidad, la preparación de materia fecal se vertió en la cavidad abdominal e inmediatamente se realizó la sutura de las partes escindidas al inicio (peritoneo-pared muscular y piel). Todo este procedimiento se realizó bajo anestesia con Rompum ® 2 % (10 mg/kg) y Ketavet ® (100 mg/kg) por vía intramuscular. Los animales se observaron durante 120 h con el objetivo de registrar el tiempo de muerte.

2.2.3. b. Procedimiento no quirúrgico.

Se extrajo la materia fecal del ciego (aproximadamente 4g) de una rata, previo anestesia bajo atmósfera de Halotano. Esta materia fecal se pesó según la dosis

optima seleccionada en el método quirúrgico, como optima para lograr una letalidad alta. La materia fecal pesada se diluyó en solución Ringer Lactato estéril 1:10 y se inyectó con una aguja 14 G por vía i.p en el lado derecho del abdomen. Para el análisis de la mortalidad los animales se observaron durante 120 h.

La composición de organismos fecales que contenía la materia fecal proveniente del ciego de la rata donante fue expresados en (Unidades formadoras de colonia [UFC]/g): *Escherichia coli* (1×10^2 a 1×10^7), *Bacteriodes distasonis* ($0,5 \times 10^7$ a 1×10^8), *Prevotella oralis* ($0,5 \times 10^7$ a 1×10^8), *Proteus mirabilis* (1×10^5 a 1×10^7) y *Enterococcus faecalis* (1×10^6 a 1×10^7) con alta frecuencia y *Streptococcus sp* (1×10^7), *Staphylococcus aureus* (1×10^4), *Bacillus sp* (1×10^1) y *Micrococcus* (3×10^1) con menor frecuencia.

2.2.3. c. Inducción de la endotoxemia en ratones.

La endotoxemia en los ratones Balb/c macho, se indujo mediante la inyección de lipopolisacárido (LPS, *Escherichia coli*, 055:B5) por vía i.p, a la dosis de 30 mg/kg, dosis descrita como subletal (Witzenbichler y cols., **2005**). El LPS fue disuelto en agua estéril y se inyectó un volumen de 0,2 mL/animal.

2.3. Diseños experimentales.

2.3.1. Diseño No 1. Efecto del POO sobre los niveles de TNF- α y ON en el suero, actividad de la MPO en pulmón y parámetros de estrés oxidativo en el tejido hepático de ratones con choque endotóxico.

Se emplearon 60 ratones machos de la línea Balb/c, los cuales se distribuyeron aleatoriamente en 6 grupos de 10 animales cada uno. El primer grupo fue un control,

al cual se le aplicó solución salina y no se le indujo la endotoxemia; al segundo grupo solamente se le indujo la endotoxemia con LPS (30 mg/kg); el tercer, cuarto y quinto grupo, recibieron POO (0,2; 0,4 y 1,2 mg/kg) respectivamente y la endotoxemia es inducida 24 h después de la última aplicación del POO; el sexto grupo se trató con dexametasona (30 mg/kg) como fármaco de referencia, esta se aplicó por vía i.p 30 min antes del LPS.

Una hora después de la inyección del LPS, se les tomó muestra de sangre a 5 animales de cada uno de los grupos, a través del plexo-retro-orbital mediante un capilar estéril heparinizado, se colectó la sangre en viales estériles de 1,5 mL y centrifugadas a 1500 rpm durante 15 minutos. Los sueros se conservaron a -20°C , para la posterior determinación de los niveles del factor de necrosis tumoral-alfa (TNF- α). Los hígados también se extrajeron y se conservaron a -20°C , para el posterior análisis bioquímico de la actividad de las enzimas superóxido dismutasa (SOD), glutatión peroxidasa (GPx) y glutatión S transferasa (GST) así como el contenido de sustancia reactiva al ácido tiobarbitúrico (SRATB). A los cinco animales restantes de cada grupo, se les extrajo la sangre 24 h después de la inyección con LPS, siguiendo el método anterior, los sueros fueron obtenidos y conservados a -20°C para la determinación de niveles de óxido nítrico (ON). Los pulmones se extrajeron y fueron conservados a -20°C , para la posterior determinación de la actividad de la enzima mieloperoxidasa (MPO). Igualmente se conservaron los hígados para determinaciones de la actividad enzimática de las (GPx, GST y SOD) y el contenido de SRATB. También se tomaron muestras de hígado para estudio histopatológico.

.2.3.2. Diseño No 2. Efecto del POO sobre la mortalidad en ratas inducida por sepsis peritoneal.

Con el objetivo de realizar una curva dosis-respuesta que permita obtener una alta mortalidad en 120 h en nuestras condiciones experimentales, se emplearon 30 ratas Wistar macho a las cuales se les indujo la sepsis peritoneal mediante el método quirúrgico descrito anteriormente (epígrafe 2.2.3 a). Las ratas se distribuyeron aleatoriamente en tres grupos de nueve animales cada uno y se emplearon dosis de materia fecal de 0,5; 0,63 y 0,75 g/kg de peso corporal. La mortalidad se registró diariamente durante 120 h y se calculó el porcentaje de mortalidad obtenido para cada uno de los grupos experimentales.

En una segunda etapa se utilizaron 50 ratas Wistar machos para evaluar en nuestras condiciones experimentales la dosis de POO capaz de reducir la mortalidad inducida por sepsis intraperitoneal letal post-operatoria. Los animales se agruparon aleatoriamente en cinco grupos de diez animales cada uno, donde los grupos uno, dos y tres recibieron POO con las dosis de 0,8; 4,2 y 8 mg/kg respectivamente más sepsis peritoneal, mientras que los grupos cuatro y cinco se seleccionaron como controles, uno tratado con aire filtrado más sepsis y el segundo no-tratado con sepsis peritoneal. El POO y el aire filtrado se aplicaron por vía i.p, con un volumen de 80 mL/kg y se realizaron 5 aplicaciones (una diaria). Las dosis de POO (0,8; 4 y 8 mg/kg) se corresponden con las concentraciones de ozono de 10, 50 y 100 mg/L respectivamente. La sepsis peritoneal se indujo mediante el método quirúrgico 24 h después de la última aplicación de ozono, con el inóculo de materia fecal 0,65 g/kg (dosis que produce > 90% de mortalidad en 120 h). Los animales fueron observados durante 120 h posteriores a la inducción de la sepsis peritoneal. Se determinó el porcentaje de mortalidad. Se realizó también análisis hematológico en los animales que solamente recibieron POO (0,8 mg/kg), se realizó en dos tiempos, antes del POO y 24 h después de la última aplicación de POO.

2.3.3. Diseño No 3. Efecto del POO sobre parámetros indicadores de estrés oxidativo y daño orgánico, la actividad de la MPO y la liberación de citocinas (IL-1 β y TNF- α) en un modelo de sepsis peritoneal en ratas.

Se utilizó un total de 60 animales, los cuales fueron divididos en seis grupos experimentales de diez animales cada uno. Al primero se le inyectó i.p solución salina fisiológica solamente; grupo dos, se le indujo la sepsis peritoneal solamente según se describió en el método no quirúrgico; en los grupos tres, cuatro y cinco los animales recibieron POO (0,8; 2,4 y 4 mg/kg) y se les indujo la sepsis peritoneal 24 h después de la última aplicación del POO, se induce la sepsis y el grupo seis fue escogido como un control, el cual se preconditionó con oxígeno y se le indujo la sepsis peritoneal.

Para las determinaciones realizadas en la sangre, los animales se anestesiaron bajo atmósfera de halotano. Se extrajeron 2 ml de sangre por el plexo-retro-orbital, 1 y 12 horas después de inducida la sepsis, los sueros se obtuvieron mediante centrifugación a 1500 rpm durante 15 min y se conservaron a -20°C para la determinación de posterior de los niveles TNF- α e interleucina 1-beta (IL-1 β). Además, transcurridas las 12 horas se realizó una extracción de sangre total a través de la vena cava abdominal, los plasmas se obtienen mediante centrifugación a 1500 rpm durante 15 min de la sangre mezclada con heparina, para determinaciones del contenido SRATB en plasma y de la actividad de la SOD y GPx en eritrocitos. Por otra parte en los sueros se determinó la actividad de las enzimas indicadoras de daño orgánico, como la alanina amino transferasa (ALAT), aspartato amino transferasa (ASAT) indicadoras de daño hepático y la creatinina (CRE) como daño renal. También se determinó la actividad de la MPO en pulmón, como un indicador de infiltración de neutrófilos en el tejido.

2.3.4. Diseño No 4. Efecto del POO combinado con Piperacilina/Tazobactam sobre la sobrevivencia de las ratas con sepsis peritoneal y la expresión de IL-1 β y TNF- α en tejido.

Se emplearon ratas Wistar de 209 a 215 g de peso corporal, procedentes de Harlan (Borchen, Alemania). Los animales se dividieron en nueve grupos experimentales de 12 animales cada uno. La sepsis peritoneal se indujo mediante el método no quirúrgico (epígrafe 2.2.3. b) 24 h después de la última aplicación de POO i.p (0,8 mg/kg). Simultáneamente a la infección, se realizó la aplicación intramuscular de una dosis de Piperacilina/Tazobactam (PTZ) (65 mg/kg). Esta dosis es baja en comparación con la aplicada en humanos (Tjandramaga y cols., **1978**). Al primer grupo se le indujo la sepsis peritoneal solamente; al segundo grupo se le aplicó POO y no se le indujo la sepsis peritoneal sin sepsis; al tercer grupo se le indujo la sepsis peritoneal y es tratado con una sola aplicación de PTZ (65 mg/kg); al cuarto grupo se le produjo la sepsis peritoneal y se le aplicó dos dosis de PTZ (130 mg/kg) y al quinto grupo se le aplicó el POO y se le indujo la sepsis peritoneal. En otros cuatro grupos se combinó el POO con el tratamiento de PTZ una (65 mg/kg) y dos (130 mg/kg) dosis de la siguiente forma: un primer grupo de animales con POO, se les indujo a sepsis y se le aplicaron dos dosis de PTZ; un segundo grupo con POO, sepsis y una dosis de PTZ, al tercer grupo se le aplicó preconditionamiento con Oxígeno, se le produjo la sepsis y se les aplicó dos dosis de PTZ y al cuarto grupo se le aplicó preconditionamiento con aire filtrado, se le indujo la sepsis y se le aplicó dos dosis de PTZ. Para el análisis de mortalidad los animales fueron observados durante 120 h. También se realizó las determinaciones de expresión de RNAm para TNF- α e IL-1 β tanto en tejido hepático como esplénico mediante método inmunohistoquímico, para lo cual, se les practicó la eutanasia a tres animales por cada uno de los grupos

experimentales, 4h después de la inducción de la sepsis peritoneal. Los animales se anestesiaron bajo atmósfera de Halotano y se les realizó la inyección letal intracardíaca con T 61 ®.

2.4. Determinaciones bioquímicas de parámetros de estrés oxidativo en tejido hepático y la actividad de la mieloperoxidasa (MPO) en pulmón.

2.4.1. Homogenado de hígado.

El tejido se homogenizó (10 % peso /Vol) en una solución KCL 1,15 %, mediante un homogenizador de tejido (Ultraturrax T25 Polytron, Alemania), la muestra se mantuvo en baño de hielo. Este homogenado se utilizó para las determinaciones de la actividad de la Glutation peroxidasa (GPx) y la Glutation-S-transferasa (GST). Para las determinaciones del contenido de sustancia reactiva del ácido tiobarbitúrico (SRATB), se pesaron 2 g de la muestra, se le adicionó 4 mL de ácido tricloroacético acuoso (ATC) al 5% y tolueno hidróxido butilado (THB) al 0,8% en hexano (2,5mL) y se realizó la homogenización del tejido como se describe anteriormente. Los homogenados de todos los procedimientos se centrifugados a 600 g durante 60 minutos a 4 ° C. Finalmente los sobrenadantes se utilizaron para las determinaciones bioquímicas descritas más adelante.

2.4.2. Homogenado de pulmón.

El pulmón reperfundido previamente con solución salina (0.9%) fría, se utilizó para el análisis de la actividad de la enzima MPO como indicadora de la infiltración de neutrófilos. Se pesaron 100 mg del tejido y se homogenizaron en 1mL de una disolución K₂ HPO₄ a 50 mM pH-6, mediante un homogenizador (Ultraturrax T-25

Polytron, Alemania) a una velocidad de 24 000 rpm, durante 30 segundos en baño de hielo.

2.4.3. Sustancia reactiva con el ácido tiobarbitúrico (SRATB).

La SRATB en el homegenado de hígado se determino mediante el método de (Botsoglou y cols, **1994**) y tiene como principio fundamental determinar espectrofotométricamente los compuestos formados que reaccionen con el ácido tiobarbitúrico. Para lo cual, el homogenado de tejido hepático se desproteinizó mediante la centrifugación a 12 000 rpm durante 3 min, posteriormente la capa superior de hexano es eliminada y la fase inferior es extraída y se resuspendió en 5 mL de ácido tricloroacético (ATC) al 0,5 %, de esta resuspensión se extrajeron 2,5 mL y se añadieron a un tubo de cristal con tapa, se le adicionó también 2,5 mL de ácido tiobarbitúrico (ATB) 0,8 %, además 1,5 mL de ATC 5%, 0,2 mL de duodecil sulfato de sodio (DSS) 8,1 % y 0,6 mL de agua destilada. Posteriormente esta mezcla se incubó durante 30 min en baño termostataado (VEB, Alemania) a 70 °C. Los tubos se enfriaron con agua a temperatura ambiente y se les adicionó 5mL de la mezcla butanol-piridina (15:1). El contenido del tubo se agitó en un agitador (Bioblock Scientific, max-mix [™] 92615, USA) y se centrifugó a 2 000 rpm durante 15 min a temperatura ambiente. La densidad óptica de la capa superior se leyó a 532 nanómetros. Se utilizó 1,1,3,3 tetrametoxipropano como patrón, que se preparó a las concentraciones de 0,5; 1; 1,56; 2; 2,5; 3,01; 4,03 y 5 $\mu\text{mol/L}$.

2.4.4. Actividad enzimática de la GSH: H₂O₂ oxidoreductasa (GSH-Px).

Se utilizó una versión modificada del método de Faraji y cols, **1987**, en el cual se utilizó la reacción acoplada de la GSH reductasa, que reduce el glutatión oxidado por

la GSH-Px, tomando los equivalentes de reducción del NADPH, el gasto del NADPH se midió en un espectrofotómetro a 340 nm, como equivalente a la actividad de la GSH-Px que reduce los hidroperóxidos, mediante los equivalentes de reducción del GSH. La mezcla de reacción consistió en 0,0988 mL de tampón Na₂PO₄ 20 mM con EDTA 6 mM (pH 7), 0,7 mL de GSH 2,86 mM disuelto en el mismo tampón, 0,1 mL de azida sódica 1 mM, 0,1 mL de NADPH 1mM disuelto en el mismo tampón que el GSH y 0,0012 ml de GSH reductasa (0,5 U, Randox). Posteriormente, se adicionaron 0,010 mL del sobrenadante de la muestra del homogenado de tejido hepático a esta mezcla de reacción, conjuntamente con 0,010 ml de tert-butilhidroperóxido 30 mM. La actividad enzimática se expresó en UI/ mg de proteínas.

2.4.5. Determinación de la GST (Glutation S- transferasa).

La actividad de la GST se determinó con el uso del Glutation (GSH) y 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) como segundo sustrato, según el método de (Habig y cols, **1974**). Una alícuota de 0,015 mL del sobrenadante de la muestra de homogenado de tejido hepático se adicionó a la mezcla de reacción que contiene 0,2380 mL de 0.1M del tampón K₂ HPO₄ pH 6,5 y 0,1 mL de CDNB 1 mM en solución etanólica. Luego 0,5 mL de GSH 10 mM se adicionaron a la mezcla de reacción y la densidad óptica se midió durante 5 min en un espectrofotómetro (Pharmacia, Ultrospec III, England). El coeficiente de extinción molar de $9,6 \times 10^3$ fue usado para determinar la actividad enzimática de la GST.

2.4.6. Actividad enzimática de la SOD Cu-Zn dependiente (superóxido oxidoreductasa).

La determinación de la actividad enzimática se realizó a través del una versión modificada del método de Minami y Yoshikawa, **1979**. Este método se basa en la generación de aniones superóxido por autooxidación del pirogalol, los cuales forman

compuestos de formazán con el azul de nitrotetrazolio (NBT), midiéndose la inhibición del desarrollo de color por la eliminación de radicales superóxido por la SOD. Para este ensayo se tomaron 0,5 mL del sobrenadante de homogenado de tejido hepático, se mezclaron con 0,45 mL de agua desionizada fría, 0,125 mL de cloroformo y 0,25 mL de etanol. Seguidamente, la mezcla se centrifugó a 8 000 rpm durante 2 min a 4° C. Se utilizaron 0,25 mL del extracto y se añadieron a una mezcla de reacción que contenía 0,5 mL de tampón tris cacodilato 72,4 mM con 3,5 mM de ácido dietilenpentaacético (pH 8,2), 0,1 mL de tritón X-100 al 16 % y 0,25 mL de NBT 0,9 mM. La mezcla de reacción se incubó durante 5 min a 37° C, se le añadió 0,010 mL de pirogalol 9 mM. Se incubó nuevamente durante 5 min a 37° C. La reacción se detuvo por adición de 0,3 mL de tampón de ácido fórmico 2M (pH 3,5), que contiene tritón X-100 al 16 %. Finalmente la absorbancia de la mezcla se leyó en un espectrofotómetro (Pharmacia, ultrospec III, England) a 540 nm.

2.4.7. Determinación de la Actividad de la enzima mieloperoxidasa (MPO).

La actividad de la enzima MPO, fue determinada por el método de (Bradley y cols **1982**). El homogenado de pulmón se centrifugó a 6 000 rpm durante 1 h a 4 °C, el sobrenadante se eliminó, el precipitado se resuspendió en 1 mL del Buffer 50mM K_2HPO_4 pH-6 que contiene 0,5% de bromuro de hexadeciltrimetilamonio (BHTA; Sigma, St. Louis, EU). Las muestras se congelaron a – 20 °C y se descongelaron, este proceso fue realizado tres veces. Posteriormente se les aplicó ultrasonido (Bandelin, Sonorex, Alemania) durante 90 seg y se incubaron durante 1 h en baño termostático (VEB, Alemania) a 60 °C, se centrifugaron a 6 000 rpm durante 1 h a 4 °C. Se extrajo de cada muestra de sobrenadante 0,1 mL y se les adicionó 2,9 mL del Buffer de K_2HPO_4 50mM a pH-6, el cual contenía 0,167 mg/mL de o-dianisidina (Sigma, USA). La reacción se inició mediante la adición de 0,5 mL de H_2O_2 al 0,005%.

La absorbancia de la muestra fue medida en un espectrofotómetro (Pharmacia, Ultrospec III, England) a 460 nm durante 1 min. Fue expresada en U/g de tejido seco.

2.5. Determinaciones de parámetros bioquímicos e inmunológicos en sangre.

2.5.1. Procedimiento para la obtención de muestras de sangre de rata.

Los animales se anestesiaron bajo atmósfera de halotano, se realizó una incisión en la cavidad abdominal y la vena cava fue expuesta, se realizó un corte brusco a la vena y 5 mL de sangre se colectaron en cristal (para la obtención de suero) para el análisis de indicadores de daño orgánico (ASAT, ALAT y CRE) y 1,5 mL de la sangre se colectaron en viales heparinizados en proporción 10 µL de heparina por cada mL de sangre (para obtención de plasma) según el método de Hoffman y Viebahn, **2001**, para la determinación de SRATB. Después de la obtención del plasma previa centrifugación de la muestra de sangre heparinizada, la capa inferior de eritrocitos se utilizó para las determinaciones de la actividad enzimática de la GPx y SOD.

Preparación de eritrocitos.

La preparación de los eritrocitos se realizó según el método descrito por (Hoffman y Viebahn, **2001**). En un tubo eppendorf se mezclaron 150 µL de eritrocitos y 500 µL de solución salina fisiológica, de este hemolizado, se extrajeron 200 µL y se les añadió 800 µL de agua desionizada. Se congeló a -20°C y después se descongeló, se mantuvo en baño de hielo a 4°C , se centrifugó y el sobrenadante fue utilizado para realizar las siguientes determinaciones:

Determinación de hemoglobina.

La hemoglobina se determinó según el método descrito por (Watanabe et al **1990**; Hoffman y Viebahn, **2001**). Se mezclaron 20 µL de sangre total en solución salina (0,9%) con 5 mL de solución de Drabkin. La mezcla se mantuvo en reposo durante

10 min y se realizó la lectura de la absorbancia en un espectrofotómetro (Pharmacia, Ultrospec III, England) a 540 nm. El valor se expresó en g/L.

2.5.2. Sustancia reactiva al ácido tiobarbitúrico (SRATB) en plasma.

Las SRATB se determinó según el método de Knight y cols., **1987**. Se utilizaron 250 μ L de plasma sanguíneo y se mezclaron con 1,25 mL de ácido tricloroacético 1,23 M, después de 10 min en reposo. Se obtuvo el sobrenadante, al que se le adicionó 1,25 mL de ácido sulfúrico 5 mM, se agitó y se le añadió 1,5 mL de solución de ácido tiobarbitúrico (ATB) 15,97 mM. Esta mezcla se incubó en baño termostático a 60 ° C durante 1h, se le adicionó 2 mL de N-butanol y después de centrifugado, se realizó la lectura a 532 nm. El valor se expresó en μ moles/L

2.5.3. Actividad de la superóxido dismutasa (SOD) en eritrocitos.

Para la actividad enzimática de la SOD se utilizó el método de Minami y Yoshikawa, **1979**; Bolam y Ulvik, **1991**. Se mezclaron 50 μ L de la suspensión de eritrocitos con 450 μ L de agua desionizada fría y 400 μ L de solución de extracción compuesta por etanol absoluto y cloroformo en proporción (2:1). Esta mezcla se agitó y se centrifugó. Posteriormente a la capa acuosa superior se le adicionó 500 μ L de buffer tris cacodilato 111 mM pH 8,2, 100 μ L de tritón X-100 al 16 % y 250 μ L de solución de NBT 0,98mM. Se adicionó la solución de pyrogallol 0,9 mM y la reacción se detuvo con ácido fórmico y se realizó la lectura a 540 nm y el valor se expresó en UI/gHb.

2.5.4. Actividad de la glutatión peroxidasa (GPx) en eritrocitos.

Actividad enzimática de la GPx según el método de Faraji y cols., **1987**. En cubetas se agregaron 500 μ L de buffer de Na₂HPO₄ 20 mM, 100 μ L de Glutation 2 mM, 10 μ L de NADPH 2 mM y 2,5 μ L de Glutation reductasa (100 U). A esta mezcla se le adicionaron 100 μ L del bemozido de eritrocitos y 200 μ L de ter-butilhidroperóxido 15 mM. La lectura se realizó a 340 nm. Los valores fueron expresados en UI/gHb.

2.5.5. Análisis hematológico.

Para los análisis hematológicos, se tomaron las muestras de sangre del plexo retro-orbital mediante un capilar estéril heparinizado, la sangre se mezcló con 50 μ L de EDTA, este procedimiento se realizó bajo previa anestesia de las ratas con halotano. Las muestras se procesaron automáticamente en un contador de células (Vet abc™ ABX Diagnostics, Goettingern, Germany), validado para el análisis de sangre de ratas. El análisis hematológico incluyó: el conteo de células rojas (CRS) y conteo diferencial de células blancas (CBS), que incluyen la clasificación en linfocitos, monocitos, granulocitos y plaquetas.

2.5.6. Determinación de nitratos como método indirecto para la evaluar de la inducción de la Oxido nítrico sintasa inducible (ONSi).

La determinación de los productos oxidados del ON se logró a partir de la reducción enzimática de los nitratos a nitritos en las muestras ensayadas, mediante la reacción de Griess. (Rockett KA y cols, **1992**). Las muestras de suero y el sobrenadante de cultivo de células RAW264.7 y N9 se desproteinizaron antes de su utilización y se mezclaron con 159 μ L de las muestras con 30 μ L de ZnSO₄ al 30 %. Posteriormente, los nitratos fueron transformados en nitritos con el empleo de un preparado celular de *Escherichia coli* (cepa 25922) que tenía la enzima nitrato reductasa previamente inducida. En una placa de 96 pozos se depositaron 30 μ L de suero desproteinizado, 15 μ L de la suspensión bacteriana y 15 μ L de la disolución tampón de reacción (2,5 mL de HEPES 100 mM con 2,5 mL de formiato de amonio 300 mM en 10 mL de agua destilada). Seguidamente las muestras se incubaron a 37 °C durante 90 min. Posteriormente, se añadieron 60 μ L de reactivo de Griess (naftiletildiamina 0,1 %, sulfanilamida 1 % en ácido fosfórico 2,5 %). Se incubaron durante 10 min a

temperatura ambiente y se realizó la medición de la absorbancia a 550 nm en un lector de microplacas (PR-521SUMA, Cuba).

2.5.7. Ensayo inmunoenzimático para la cuantificación de IL-1 β y TNF- α .

La cuantificación de los niveles de citocinas en el suero de las ratas, se realizó mediante un ensayo tipo ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) para TNF- α e IL-1 β específico para suero de ratas (GE Healthcare, UK).

Las determinaciones de los niveles del TNF- α en el suero de los ratones se determinaron, mediante un ensayo de citotoxicidad con la línea celular L929 de fibroblastos de murinos (Aggawal y cols, **1985**). Los niveles de TNF- α fueron determinados usando TNF- α recombinante humano (BASF/Knoll, Ludwigshafen, Alemania) con actividad específica de 10^7 U/mg. Los resultados se expresaron en pg/mL.

2.5.8. Determinaciones de parámetros indicadores de daño orgánico.

La determinación de la creatinina (CRE) en suero, fue determinada mediante el método de Jaffé. Las determinaciones de aspartato amino transferasa (ASAT), alanino amino transferasa (ALAT), todos los métodos son espectrofotométricos y se usaron los juegos diagnóstico (Centis Diagnósticos, Cuba).

2.6. Análisis inmunohistoquímico.

Para este análisis, se tomaron muestras de tejido tanto hepático como esplénico de tres animales de cada grupo experimental, 4 h después de inducida la sepsis peritoneal en las ratas. Para lo cual, a los animales se les practicó la eutanasia previa anestesia bajo atmósfera de halotano e inyección letal intracardíaca de T 61. Posteriormente, se les realizó una incisión en la cavidad abdominal y el hígado y el bazo se extrajeron, de cada uno de estos órganos se extrajo una porción fina de 4

mm, la cual se colocó en un molde (Tissue-Tek ® Cryostat, USA) y embebido en un medio ((Tissue-Tek ®, USA) para la congelación de los tejidos. Estos moldes se sumergieron en un recipiente con metanol que estaba incluido en hielo seco. La muestra congelada se conservó a - 70 °C, hasta su utilización para el análisis de la expresión de RNAm para la interleucina 1 β (IL-1 β) y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α).

2.6.1. Hibridización *in situ*.

La hibridización *in situ* se realizó para las sondas de ARNm de los genes de IL-1 β y TNF- α marcados con S³⁵ en cortes de 14 μ m, según se describe por (Schulz y cols., **2003**). Brevemente, los vectores pGEM-T (Promega, Mannheim, Alemania) con fragmentos de ADNc específicos para IL-1 β o TNF- α de rata, se digirieron con las enzimas de restricción indicadas y se generaron fragmentos de ribonucleótidos marcados con S³⁵ mediante la transcripción *in vitro* en presencia de UTP-S³⁵ (Amersham Life Science, Germany) y de las polimerasas SP6 o T7 (Boehringer Mannheim, Alemania). Las RNAc obtenidos se purificaron en columnas cromatográficas Micro Bio-Spin® (Bio Rad, Germany) y posteriormente se diluyeron a 50.000 cpm/ μ l en la solución de hibridización (100mM Tris pH 7.5, 600mM NaCl, 1mM EDTA, 0.5 mg/ml ARNt, 0.1 mg/ml ADN de esperma de salmón sonicado, solución Denhardt 1x, sulfato de dextrana al 10% y formamida al 50%). Luego, las láminas de las secciones marcadas se autorradiografiaron por rayos X (Hyperfilm- β max, Amersham, Dreieich, Germany) durante 1-3 días hasta su revelado. Como control de especificidad de la hibridización *in situ* se utilizaron RNAc para IL-1 β o TNF- α marcados con S³⁵, los cuales no mostraron señales en ninguno de los grupos experimentales evaluados. Los experimentos de hibridización *in situ* se realizaron dos

veces. Para el análisis semi-cuantitativo se digitalizaron las imágenes de las autorradiografías y se determinó la media de la densidad óptica relativa (DOR) mediante el uso del sistema de análisis de imágenes MCID.

2.7. Análisis histopatológico.

Las muestras de órgano fueron lavadas suavemente con NaCl al 0.9% frío y secadas con papel de filtro. Los tejidos son conservados en formaldehído tamponado al 10%. Posteriormente el tejido es embebido en parafina. La identificación de los cambios morfológicos ocurridos en los tejidos se realizó por un especialista en Anatomía Patológica, quien empleó la técnica de tinción con hematoxilina y eosina y utilizó un microscopio óptico. Este análisis fue realizado a ciegas.

2.8. Análisis estadístico

- Para analizar las diferencias estadísticas para los valores del contenido de SRATB, CRE, TNF- α e IL-1 β en suero y la actividad enzimática de la SOD, GPx, GST, ASAT, ALAT se aplicaron las pruebas no paramétrico de Mann-Whitney y Kruskal Wallis, a través del programa estadístico Statistica 6.
- El análisis estadístico para los resultados de expresión de RNAm para las citocinas proinflamatorias y parámetros hematológicos, se utilizó la prueba t-estudent seguido de un ANOVA.
- Los datos de mortalidad se analizaron mediante la prueba de Chi cuadrado (χ^2).

3. Resultados.

3.1. Efecto del POO sobre los niveles de TNF- α y ON en el suero, actividad de la MPO en pulmón y parámetros de estrés oxidativo en el tejido hepático de ratones con choque endotóxico.

En la tabla 1 se observó un incremento significativo en los niveles de TNF- α en el suero una hora después de la inyección con LPS. El POO redujo los niveles de TNF- α inducidos por el LPS en una forma dependiente de la dosis. Esta reducción fue estadísticamente significativa para todos los niveles de dosis utilizados.

El efecto del POO aplicado por vía i.p a las dosis de 0,4 y 1,2 mg/kg fue muy similar a la inhibición obtenida por la dexametasona, fármaco antiinflamatorio esteroidal que es un reconocido inhibidor del TNF- α . En cuanto a los niveles de ON para cada uno de los grupos experimentales, se observó que el tratamiento con LPS incrementó los niveles de ON mientras que en los grupos con POO se produjo una disminución significativa en los niveles de ON, con porcentajes de reducción de hasta el 50 %. La dexametasona como fármaco de referencia, alcanzó un porcentaje de reducción de los niveles de ON de un 77 %.

Tabla 1. Niveles de TNF- α y ON en suero de ratones tratados con POO y LPS.

Grupos (mg/kg)	TNF- α (pg/ml) (Inhibición %)	NO ₂ (mM)
Salina	0	0
LPS (30 mg/kg)	9,83 \pm 1,89 ^a	1 087, 67 \pm 204,34 ^a
POO i.p (0,2) + LPS	5,20 \pm 1,89 ^a (47,10)	533,92 \pm 156,02 ^b (50.91)
POO i.p (0,4) + LPS	3,75 \pm 0,95 ^b (61,87)	573 \pm 162,95 ^b (47.31)
POO i.p (1,2) + LPS	1,75 \pm 0,95 ^b (82,19)	711 \pm 121,95 ^b (34,58)
Dexametasona (30) + LPS	0,26 \pm 0,22 ^b (97,35)	240,36 \pm 57,57 ^c (77,90)

Los animales fueron pretratados con 5 aplicaciones de POO (una diaria) a la dosis de 0,2; 0,4 y 1,2 mg/kg, 24 h después de la última aplicación de POO, se indujo el choque endotóxico (LPS), La sangre fue extraída una hora y 24 h después, para las determinaciones de los niveles de TNF- α y ON en suero respectivamente. La Dexametasona (30 mg/kg i.p) se aplicó 30 min. antes del inóculo con LPS. Letras diferentes, diferencias significativas con respecto al control (LPS) por la prueba de t- student (n=5), para p<0,05. El valor 0 se corresponde con valores no detectables por el método utilizado. Los valores fueron expresados como las medias \pm la desviación estándar.

La actividad de la MPO disminuyó significativamente en los animales tratados con POO después de recibir el reto con el LPS (**Tabla 2**). La dosis de 0,2 mg/kg redujo significativamente la actividad de MPO hasta un 36 % mientras que la dosis de 0,4 mg/kg produjo una inhibición de hasta un 31 % comparable con el grupo tratado con la dexametasona. En general los datos demostraron que el POO fue capaz de reducir significativamente la actividad de la MPO en el tejido pulmonar.

Tabla 2. Actividad de la MPO en pulmón de ratones tratados con POO y LPS.

Tratamientos (mg/kg)	MPO (U/g de tejido)	Inhibición (%)
Salina	73,32 \pm 9,08 ^a	-
LPS (30)	518,74 \pm 16,99 ^b	-
POO i.p (0,2) + LPS	330,60 \pm 55,26 ^c	36,27
POO i.p (0,4) + LPS	356,65 \pm 37,46 ^c	31,25
POO i.p (1,2) + LPS	430,73 \pm 8,71 ^c	16,97
Dex (30) + LPS	356,85 \pm 11,01 ^c	31,20

Los animales se trataron con 5 aplicaciones de POO (una diaria) a la dosis de 0,2; 0,4 y 1,2 mg/kg y 24 h después de la última aplicación de POO, se indujo el choque endotóxico con LPS (30 mg/kg). Los pulmones se extrajeron y se conservaron a -20°C hasta realizar las determinaciones de la actividad de la MPO (24 h después del LPS). Letras diferentes, diferencias significativas con respecto al control (LPS) por la prueba no paramétrica Kruskal Wallis. (n=5), para p<0,05. Los valores fueron expresados como las medias \pm la desviación estándar.

Los resultados de los efectos del POO sobre los parámetros de estrés oxidativo se muestran en las tablas 3 y 3.1. La **Tabla 3** muestra el incremento esperado de los

niveles de SRATB en el tejido hepático en el grupo de animales tratados con LPS con respecto al grupo tratado con solución salina, mientras que los grupos que recibieron POO a diferentes dosis, evidenciaron una disminución significativa del contenido de SRATB con respecto al grupo tratado solo con LPS, una hora después de inducido el choque endotóxico. La dexametasona también disminuyó significativamente los niveles de SRATB en este mismo período (una hora). Sin embargo, cuando se analizó el comportamiento del contenido de SRATB a las 24 horas, no se observaron diferencias significativas entre los grupos estudiados, a diferencia de lo que ocurre a la hora. En este caso, las concentraciones de SRATB del grupo tratado con LPS fueron prácticamente similares a las del grupo al cual se le administró salina solamente. En los grupos tratados con POO, tampoco se apreciaron diferencias significativas en los niveles de SRATB, comparado con los grupos tratados con LPS y salina a las 24 h.

Tomando en cuenta este hecho, realizamos la comparación entre ambos tiempos experimentales (una hora y 24 h). Esta comparación arrojó que las concentraciones de SRATB disminuyeron tanto en el grupo tratado con LPS solamente como en los restantes grupos experimentales al compararlas con las concentraciones a la hora. Sin embargo, tal disminución alcanza niveles de significación estadística en el grupo tratado con LPS solamente.

El análisis del comportamiento entre ambos períodos (una hora y 24h), mostró que a las 24 h el contenido de SRATB disminuyó significativamente en el grupo tratado con LPS.

Sin embargo, la actividad de la SOD se comporta diferente a las concentraciones de SRATB. Así, la actividad de la SOD del grupo tratado con LPS tuvo un comportamiento inverso con respecto a los niveles de SRATB tanto a una hora como

a las 24 h, ya que se observó una disminución significativa de la actividad una hora posterior a la administración del LPS, con respecto al grupo tratado con solución salina, mientras que a las 24 h la actividad de la enzima se incrementó significativamente con respecto este grupo (**Tabla 3**). Por otro lado, los grupos tratados con POO, mostraron una disminución significativa de la actividad de esta enzima con respecto al grupo tratado con LPS en ambos tiempos estudiados. Sin embargo, cuando se realizó la comparación entre los dos tiempos experimentales (una hora y 24 h), se observó un incremento significativo de la actividad de esta enzima al cabo de las 24 h en el grupo tratado con LPS, lo que también se observó en los grupos tratados con POO (0,4 y 1,2 mg/kg). La dexametasona igualmente disminuyó significativamente la actividad de la enzima una hora después del reto con LPS, mientras que la actividad de dicha enzima se incrementó significativamente a las 24 h.

Tabla 3. Parámetros bioquímicos de estrés oxidativo (SRATB y SOD) en tejido hepático de ratones tratados con POO.

Tratamientos (mg/kg)	SRATB (mmol/mg de proteína)		SOD (UI/mg proteína)	
	1h	24h	1h	24h
Salina	0,30±0,04 ^a	0,30± 0,04 ^a	18,40 ± 2,08 ^a	18,40 ± 2,69 ^a
LPS (30)	2,0 ± 0,32 ^b	0,33 ± 0,15 ^{a**}	6,38 ± 0,52 ^b	24,71 ± 1,16 ^{b*}
POO (0,2) + LPS	0,79 ± 0,22 ^c	0,56 ± 0,10 ^a	4,21 ± 0,59 ^c	14,35 ± 2,54 ^c
POO (0,4) + LPS	0,76 ± 0,23 ^c	0,52 ± 0,14 ^a	1,30± 0,04 ^c	12,51± 2,59 ^{c*}
POO (1,2) + LPS	0,63 ± 0,16 ^c	0,37 ± 0,04 ^a	1,86± 0,47 ^c	12,13 ± 1,96 ^{c*}
Dex. (30) + LPS	0,99 ± 0,24 ^c	0,45 ± 0,13 ^a	3,43 ± 0,66 ^c	20,41 ± 12,61 ^{b*}

Los animales fueron pretratados con 5 aplicaciones de POO (una diaria) a la dosis de 0,2; 0,4 y 1,2 mg/kg, 24 h después de la última aplicación de POO, se indujo el choque endotóxico con LPS (30 mg/kg) y 1h y 24 h después los hígados se extrajeron y se conservaron a -20°C hasta realizar las determinaciones del contenido de SRATB y actividad de la SOD.

Letras diferentes representan las diferencias estadísticamente significativas entre los grupos y *p < 0.05, ** p<0.01 comparación entre ambos tiempos 1h y 24 h, n=5. Los valores son expresados como las medias ± desviación estándar. Se utilizó la prueba no paramétrico Mann Whitney para la comparación entre dos grupos y para la comparación entre los dos tiempos.

La **Tabla 3.1** muestra los valores de la actividad enzimática de la GST y la GPx. En el caso de la GST, el grupo tratado solamente con LPS, no mostró un incremento significativo de la actividad de esta enzima respecto al grupo tratado con solución salina, al cabo de la hora posterior a la administración del LPS, mientras que en los grupos tratados con POO, se observó una tendencia al incremento de la actividad de la GST, aunque este incremento no alcanzó niveles de significación estadística. Sin embargo, contrariamente a lo que ocurre al transcurrir la primera hora, a las 24 h disminuyó significativamente la actividad enzimática en el grupo tratado con LPS y con respecto al grupo administrado con salina solamente.

Teniendo en cuenta los resultados anteriores, decidimos comparar las actividades de la GST entre ambos tiempos experimentales (una hora y 24 h). Esta comparación evidenció una disminución significativa de la actividad de la enzima a las 24 h en el grupo tratado con LPS y los grupos con POO (0,4 y 1,2 mg/kg) en relación a los valores de actividad observados en la primera hora. Sin embargo, es válido señalar que en los grupos tratados con POO a las dosis de 0,4 y 1,2 mg/kg, a pesar de que se produce esta disminución significativa en relación a la actividad observada a la hora, los valores de actividad enzimática se mantienen a un nivel tal que resultan superiores a los del grupo tratado con LPS e incluso superiores a los del grupo control salina. La dexametasona por otro lado, también mostró un incremento de la actividad enzimática en ambos tiempos, aunque solamente alcanzó niveles de significación a las 24 h, lo que también fue extensivo al resto de los grupos.

En cuanto al comportamiento de la actividad de la GPx, en el grupo tratado con LPS se produjo un incremento significativo de la actividad de dicha enzima (una hora) con respecto al grupo tratado con solución salina. La comparación de las actividades enzimáticas de los grupos tratados con POO con respecto al grupo LPS, en el caso

de las dosis de 0,2 y 0,4 mg/kg, mientras que el grupo que recibió la dosis de 1,2 mg/kg mostró una disminución significativa de la actividad de la GPx.

Por otra parte, inversamente a lo que sucede a tras la primera hora de inducirse el choque endotóxico con LPS, al transcurrir las 24 horas en el grupo tratado con LPS se produjo una disminución significativa de la actividad de la enzima en relación con el tratado con salina. Sin embargo, en los grupos de ratones que recibieron POO (0,2 y 0,4 mg/kg) se produce lo contrario al compararlos con el grupo tratado con LPS, puesto que lejos de disminuir la actividad de la enzima, se produce un incremento que resultó significativo, aunque no resultó significativo en la dosis máxima ensayada de 1,2 mg/kg.

Por su parte, en la comparación de las actividades enzimáticas entre ambos tiempos experimentales (una hora y 24 h), se observó una disminución significativa de la actividad enzimática al transcurrir las primeras 24 h posterior a la inducción del choque, tanto al grupo al cual se le administró LPS solamente como en los grupos tratados con POO. Sin embargo, es importante destacar que al igual que lo que ocurre con la GST, la actividad enzimática aunque disminuida en relación al primer tiempo experimental, es superior, como habíamos señalado anteriormente, al grupo tratado solamente con LPS en los grupos administrados con POO a las dosis de 0,2 y 0,4 mg/kg.

En el caso de la dexametasona, se observaron incrementos significativos de la actividad GPx en relación al grupo tratado con LPS solamente a las 24 h de inducido el choque endotóxico, a pesar de que se produce una disminución significativa de dicha actividad cuando comparamos las actividades a la hora y transcurridas las primeras 24 h de administrado el LPS

Tabla 3.1. Parámetros bioquímicos de estrés oxidativo (GST y GPx) en tejido hepático de ratones tratados con POO.

Tratamientos	GST (UI/mg proteína)		GPx (UI/mg proteína)	
	1h	24h	1h	24h
Salina	128,32± 29,31 ^a	128,32± 29,31 ^a	1 024,99 ± 168,05 ^a	1 024,99 ± 168,05 ^a
LPS (30 mg/kg)	179,41 ± 33,91 ^a	73,83 ± 9,87 ^{b*}	3 164,90 ± 445,28 ^b	636,29 ± 25,06 ^{b*}
POO (0,2 mg/kg)	226,93± 25,59 ^a	168,92± 27,37 ^c	2 051,27 ± 565,78 ^b	1 205,32 ± 212,01 ^{a**}
POO (0,4 mg/kg)	267,46 ± 13,01 ^a	147,84 ± 20,36 ^{c*}	3 477,84± 351,82 ^b	1 125,93± 247,46 ^{a*}
POO (1,2 mg/kg)	299,18 ± 55,55 ^a	135,67 ± 13,60 ^{c*}	1 837,45 ± 297,50 ^a	820,19 ± 99,24 ^b
Dex. (30 mg/kg)	215,07 ± 26,84 ^a	121,30 ± 11,20 ^a	3 134,18± 665,89 ^b	1 504,80± 266,51 ^{a*}

Los animales fueron pretratados con 5 aplicaciones de POO (una diaria) a la dosis de 0,2; 0,4 y 1,2 mg/kg, 24 h después de la última aplicación de POO, se indujo el choque endotóxico con LPS (30 mg/kg) y 1h y 24 h después los hígados se extrajeron y se conservaron a -20°C hasta realizar las determinaciones de la actividad de la GST y GPx. Los valores son expresados como las medias ± desviación estándar para n=5. Letras diferentes representan las diferencias estadísticamente significativas entre los grupos y *p < 0.05, ** p<0.01 la comparación entre ambos tiempos 1h y 24 h para cada grupo experimental. Para ambas comparaciones se utilizó la prueba no paramétrica Mann Whitney.

Los resultados del estudio histológico se muestran en la figura 1. Cómo puede apreciarse, la figura muestra las alteraciones histopatológicas producidas en el tejido hepático después del tratamiento con LPS y se observa la presencia de zonas necróticas (**Fig. 1 B**). Sin embargo, en los grupos de ratones que recibieron POO no se detectó áreas de necrosis en dicho tejido (**Fig. 1 C**).

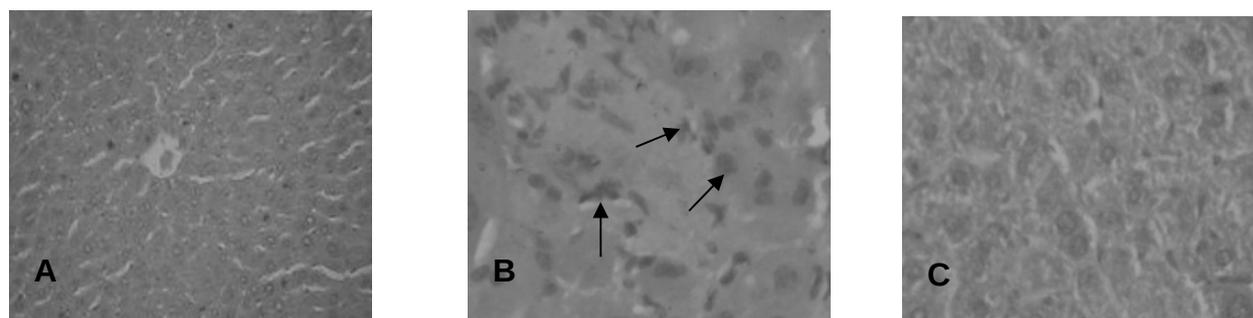


Figura 1. Alteraciones histopatológicas del tejido hepático de ratones tratados con LPS y precondicionado con Ozono (POO). Coloración Hematoxilina Eosina (H.E 100X). Cortes de tejido hepático. Figura A, animal sano: Aspecto normal del tejido. B, animal tratado con LPS: presencia de foco de necrosis inflamatoria (indicadas con flechas). C: animal con POO: No se observan zonas de necrosis.

3.2. Efecto del POO sobre la mortalidad en ratas inducida por sepsis peritoneal.

Primeramente, con el objetivo de determinar la dosis de materia fecal que producía un elevado porcentaje de mortalidad al cabo de las 120 h de inducida la sepsis, se realizó una curva dosis respuesta en ratas tratadas con diferentes dosis de materia fecal. La **Figura 2** muestra estos resultados. Como se aprecia, a las dosis de materia fecal equivalentes a 0,50; 0,63 y 0,75 g/kg de peso corporal produjeron un 66, 88 y 100 % de mortalidad respectivamente. De esta forma, en nuestras condiciones experimentales se observó una respuesta dependiente de la dosis, lo cual nos brindó información sobre la dosis óptima de materia fecal a utilizar para lograr un modelo de sepsis peritoneal letal en ratas. La dosis seleccionada para utilizar en el resto de los diseños experimentales, fue la DL₉₀ (0,65 g/kg) la cual produjo aproximadamente un 90 % de mortalidad en 120 h.

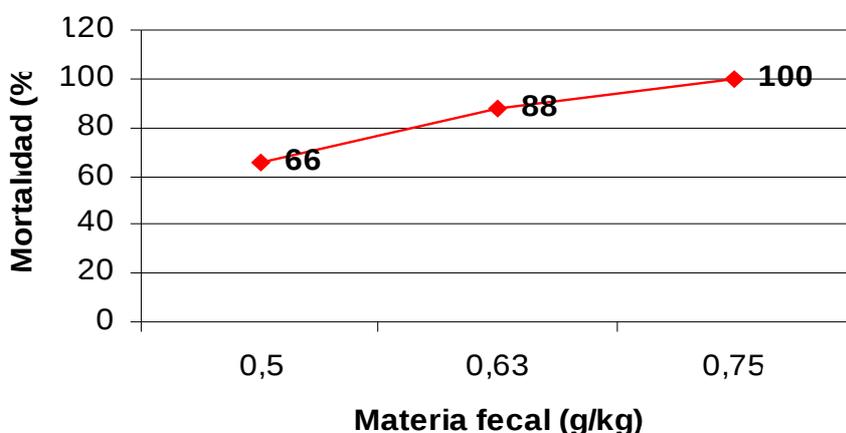
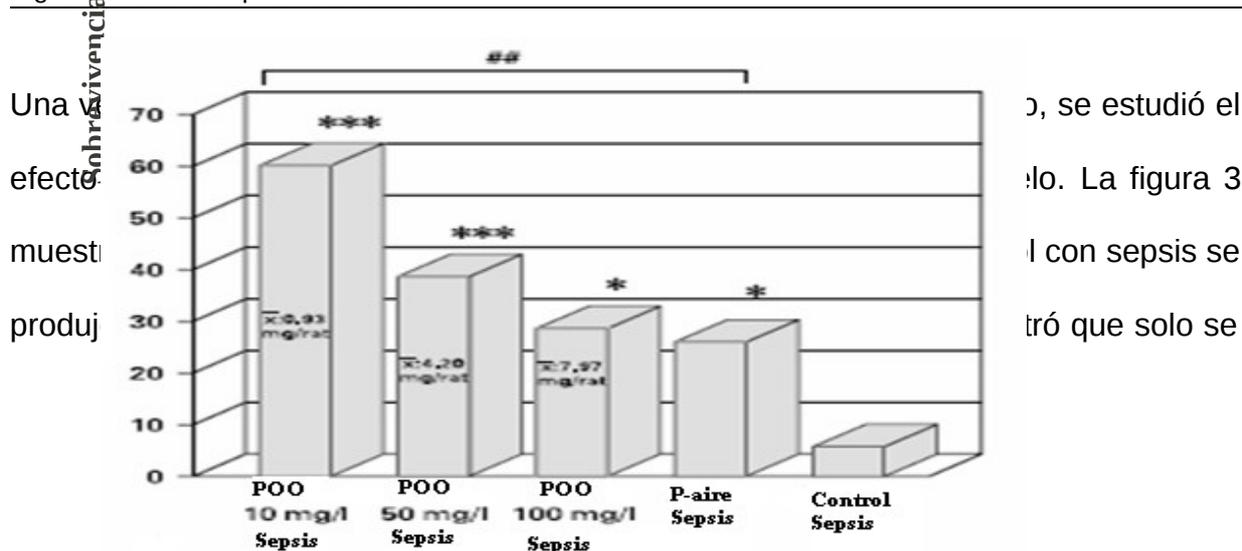


Figura 2. Comportamiento de la mortalidad para cada una de las dosis de materia fecal administradas. Las ratas se dividieron en tres grupos con una n= 9. Se les aplicó una suspensión de materia fecal por vía i.p a las dosis de 0,50; 0,63 y 0,75 g/kg respectivamente. La mortalidad se registró durante un período de 120h.



alcanzó un 5% de sobrevivencia. El pretratamiento de las ratas con aire resultó en un incremento de la sobrevivencia en un 26 % de los animales con respecto al control con aire. Cuando las ratas recibieron POO, se obtuvo un incremento significativo en la sobrevivencia de las ratas con respecto al grupo control con sepsis, lo cual demostró una relación inversa entre la dosis de POO y el porcentaje de sobrevivencia de los animales, que fue de 61,5% para 10 mg/L; 39% para 50 mg/L y 25,8 % para 100 mg/L de la mezcla ozono/oxígeno (MOO). El porcentaje de sobrevivencia de los animales, fue altamente significativo solo con la concentración de 10 mg/L de la MOO.

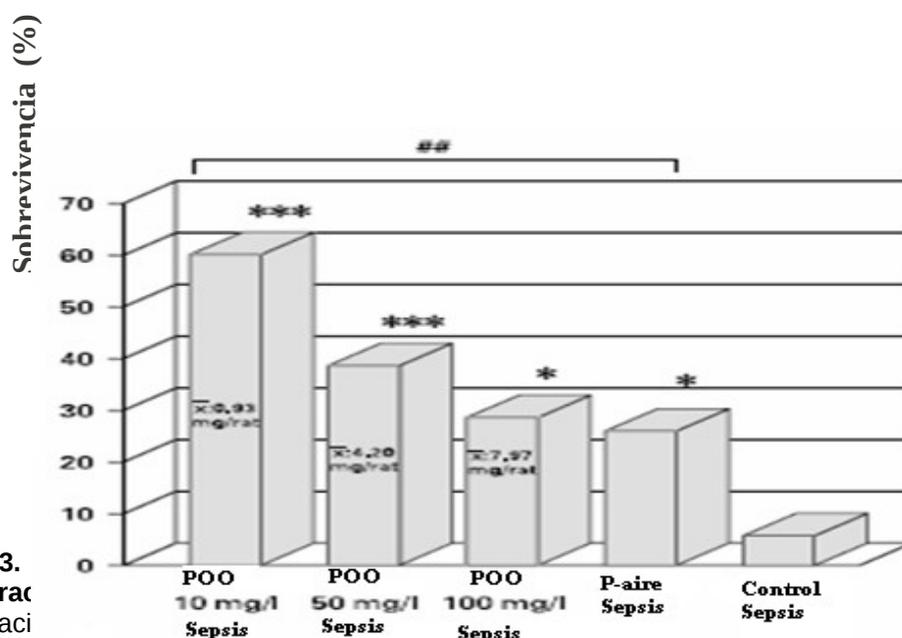


Figura 3. concentración

concentración a diferentes ritoneal por el método quirúrgico con una dosis de materia fecal de 0,05 g/kg. Se incluyó un grupo control con sepsis sin tratamiento y otro que recibió precondicionamiento con aire filtrado. El cálculo de los niveles de significación se realizó mediante el ensayo de χ^2 (grupos con POO contra control con sepsis: *p<0,05; **p<0,01 y *** p<0,001; para POO contra control con aire: ## p<0,01,### p<0,001).

Como hemos observado en la experiencia precedentemente, el POO protegió a los animales contra la muerte producida por una sepsis letal inducida por materia fecal. Con el objetivo de demostrar si el efecto beneficioso del POO, pudiera estar mediado por una alteración del estado inmunológico de los animales, se determinaron varios parámetros hematológicos en aquellos animales administrados con POO. Sin

embargo, en estas experiencias no se incluyeron animales a los cuales se indujo al sepsis, puesto que éstos fueron diseñados con el objetivo de determinar si la administración de POO *per se* modificaba el patrón de células inmunológicas sanguíneas. Así, estas determinaciones mostraron en los animales administrados con POO bajo un esquema de administración análogo al de los experimentos precedentes, un incremento significativo en el número de células blancas de la sangre (CBS) 24 h después de la última aplicación del POO (**Fig. 4**). Adicionalmente, el análisis del tipo de células blancas, reveló la presencia fundamentalmente de linfocitos (**Fig. 4 C**) y granulocitos (**Fig. 4 D**) como las células involucradas en este tipo de cambio.

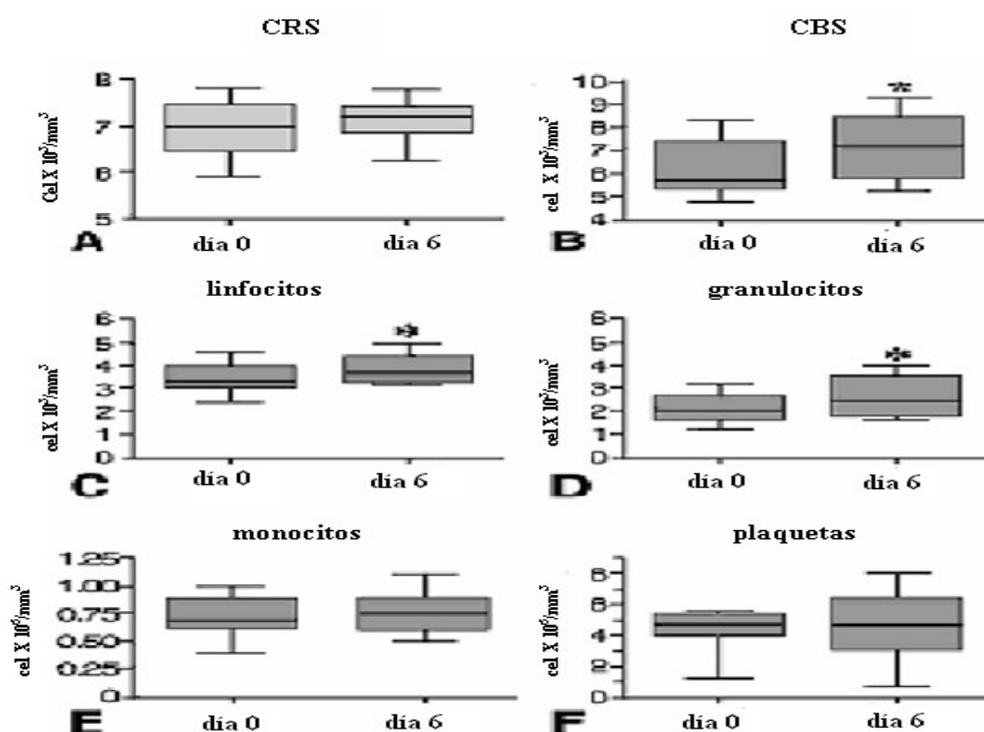


Figura 4. Análisis del conteo de células rojas y blancas, linfocitos, granulocitos, monocitos y plaquetas en animales con POO. Efecto del POO sobre el número de células rojas (A) y células blancas de la sangre (B). Las células blancas de la sangre fueron diferenciadas en linfocitos (C), granulocitos (D), monocitos (E), y plaquetas (F). El número de células fue determinado el día 0, antes de la primera aplicación del POO y a los 6 días después de la última aplicación de la POO. Los datos fueron expresados como la media de los valores \pm el error estándar de la media. Los asteriscos indican las diferencias estadísticas (* $p < 0.05$) en cuanto al número de células entre el día 0 y el día 6. Las diferencias significativas fueron determinadas usando la prueba estadística de t de student ($n = 6$). Abreviaturas: CRS, células rojas de la sangre; CBS células blancas de la sangre.

3.3. Efecto del POO sobre parámetros indicadores de estrés oxidativo y daño orgánico, la actividad de la MPO y la liberación de citocinas (IL-1 β y TNF- α) en un modelo de sepsis peritoneal en ratas.

En la **Tabla 4** se muestra el efecto del POO sobre la actividad enzimática de diferentes enzimas vinculadas al sistema de defensa antioxidante endógeno y sobre las concentraciones de SRATB. Los resultados demuestran que, el grupo control positivo (sepsis) se produjo un incremento significativo de la SRATB, como indicador de estrés oxidativo, lo que se correspondió con una disminución significativa de la actividad de las enzimas antioxidantes SOD y GPx, con respecto al control negativo (sin sepsis). Por otro lado, los valores de concentraciones de SRATB en plasma de las ratas tratadas con POO, disminuyeron significativa con respecto al grupo control con sepsis, mientras que en el grupo pretratado con oxígeno no se observaron diferencias significativas. Con relación al comportamiento de la actividad de las enzimas antioxidantes (SOD y GPx), se observó que en ambas se produjo un incremento significativo de su actividad en los grupos de animales que recibieron POO con respecto al control con sepsis.

Tabla 4. Efecto del POO sobre parámetros indicadores de estrés oxidativo en ratas con sepsis inducida por inculo de materia fecal.

Tratamientos (mg/kg)	SRATB (nmol/L)	SOD (UI/g Hb)	G-Px (UI/g Hb)
Control no tratado	1,29 \pm 0,24 ^a	1607,78 \pm 192,44 ^a	74,88 \pm 9,57 ^a
Control con sepsis	5,36 \pm 0,45 ^b	237,45 \pm 89,57 ^b	36,21 \pm 10,92 ^b
POO (0,8) + Sepsis	1,46 \pm 0,28 ^a	956,06 \pm 128,18 ^c	67,75 \pm 9,50 ^a
POO (2,4) + Sepsis	1,48 \pm 0,17 ^a	998,34 \pm 118,27 ^c	61,62 \pm 9,60 ^a
POO (4) + Sepsis	0,63 \pm 0,18 ^a	782,18 \pm 85,22 ^c	62,22 \pm 8,01 ^a
PO-Oxígeno + Sepsis	4,47 \pm 0,93 ^b	513,29 \pm 182.81 ^b	48,15 \pm 9,35 ^b

.Las ratas recibieron POO y PO con oxígeno, 5 aplicaciones (una diaria) y 24 h después de la última aplicación, se indujo la sepsis peritoneal mediante la inyección de un inculo de materia fecal (0,55 g/kg). A las 12 h y bajo anestesia, se extrajeron las muestras de sangre para su posterior análisis del contenido de SRATB y las actividades SOD y GPx. Las letras diferentes indican la significación estadística para un el valor de $p < 0,05$. Los datos fueron expresados en las medias \pm desviación estándar (n=10) y se compararon mediante la prueba no paramétrica Kruskal Wallis.

La actividad de la enzima MPO como un indicador de la infiltración de neutrófilos en el tejido pulmonar. Como se observa (**Tabla 5**), la actividad de la enzima se incrementó significativamente a las 12 h después de la inducción de la sepsis peritoneal. Sin embargo, el POO a la dosis de 0,8 mg/kg de peso redujo la actividad de la enzima en el pulmón hasta un 34 %, mientras que la dosis de 2,4 mg/kg produjo una reducción equivalente a un 15,7 % que no alcanzó niveles de significación estadística.

Tabla 5. Efecto del POO sobre la actividad MPO en muestras de pulmón de ratas sometidas a sepsis inducida por inóculo de materia fecal.

Tratamientos	MPO (U/g de tejido seco) MED ± SD	Porcentaje de reducción (%)
Control no tratado	70,23 ± 7,57 ^a	-
Control con sepsis	221,91 ± 23,44 ^b	-
POO (0,8 mg/kg) + Sepsis	145,53 ± 52,90 ^c	34,4
POO (2,4 mg/kg) + Sepsis	187,09 ± 29,25 ^b	15,7
POO (4mg/kg) + Sepsis	204,07 ± 22,70 ^b	8,0
PO-Oxígeno + Sepsis	219,24 ± 24,88 ^b	1,2

Las ratas recibieron POO y PO con oxígeno, a razón de 5 aplicaciones (una diaria) y 24 h después de la última administración, se indujo la sepsis peritoneal mediante la inyección de un inóculo de materia fecal (0,55 g/kg). A las 12 h y bajo anestesia, se extrajeron los pulmones para su posterior análisis de la actividad de la MPO. Los datos fueron expresados como las medias ± desviación estándar y se compararon mediante la prueba no paramétrica de Kruskal Wallis.

Las letras diferentes, muestran la significación estadística para el valor de $p < 0,05$. $n = 10$

En la **Tabla 6**, muestra los valores de actividad enzimática de algunas de las enzimas indicadoras de daño orgánico. Se observó un incremento significativo de los tres indicadores (ASAT, ALAT y CRE) evaluado en el grupo control con sepsis, lo cual demuestra que existe fallo orgánico. Por otra parte, se demostró que los grupos que recibieron POO en los tres niveles de dosis, mostraron una disminución significativa de estos parámetros con respecto al control con sepsis.

Tabla 6. Valores de indicadores de daño orgánico (ASAT, ALAT y Creatinina) en ratas tratadas con POO y sepsis peritoneal.

Tratamientos	ASAT (U/L) Med± SD	ALAT(U/L) Med± SD	Creatinina (mmol/L) Med± SD
Control no tratado	50.41 ± 1.78 ^a	19.98±1.36 ^a	19.86± 5.21 ^a
Control con sepsis	103.76 ± 2.74 ^b	26.97 ± 1.35 ^b	67.90± 5.26 ^b
POO (0,8 mg/kg) + Sepsis	71.66 ± 3.23 ^c	21.13± 0.61 ^a	45.34± 1.51 ^c
POO (2,4 mg/kg) + Sepsis	95.89 ± 5.58 ^b	22.40 ± 1.87 ^a	43.4 ± 3.20 ^c
POO(4 mg/kg) + Sepsis	55.04± 3.21 ^a	20.36± 1.56 ^a	39.51 ± 1.85 ^c
PO-Oxígeno + Sepsis	70.26 ± 1.44 ^c	33.07± 1.46 ^b	42.9 ± 3.75 ^c

Las ratas recibieron POO y PO con oxígeno, a razón de 5 aplicaciones, una diaria, y 24 h después de la última aplicación, se indujo la sepsis peritoneal mediante la inyección de un inóculo de materia fecal (0,55 g/kg). A las 12 h y bajo anestesia, se extrajeron las muestras de sangre y se determinó la actividad de la aspartato amino transferasa (ASAT), alanino amino transferasa (ALAT) como indicadores de daño hepático y los niveles de Creatinina en el suero. Los datos fueron expresados como las medias ± desviación estándar y se compararon mediante la prueba no paramétrica de Kruskal Wallis. Las letras diferentes, muestran la significación estadística para el valor de $p < 0,05$. $n=10$.

En la **figura 5** se muestran las concentraciones de TNF- α e IL1- β en el suero de ratas con sepsis peritoneal que recibieron POO. Se observó como en los animales con sepsis las concentraciones de TNF- α en suero se encuentran incrementados significativamente una hora después de inducida la sepsis peritoneal, mientras que el POO redujo significativamente las concentraciones de dicha citocina. Los mayores niveles de inhibición de la liberación del TNF- α , se alcanzaron con las dosis de POO de 0,8 y 2, 4 mg/kg. Con relación a las concentraciones de IL-1 β en el suero de ratas con POO y sepsis peritoneal, se observó que en las ratas con sepsis peritoneal, los niveles de la IL-1 β , se incrementaron significativamente a las 12 h después de inducida la sepsis peritoneal, mientras que en los grupos de animales que recibieron POO, se obtuvo una disminución significativa de los niveles de dicha citocina.

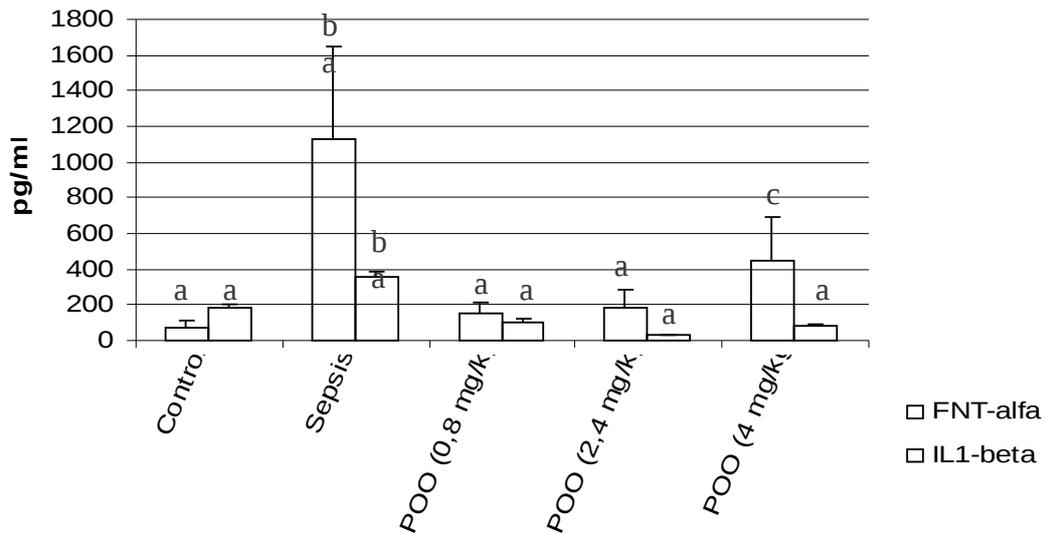


Figura 5. Valores de concentraciones de TNF- α e IL-1 β en suero de ratas con sepsis peritoneal y con POO. Las ratas recibieron POO y PO con oxígeno, 5 aplicaciones (una diaria) y 24 h después de la última aplicación de POO se indujo la sepsis peritoneal mediante la inyección de un inóculo de materia fecal (0,55 g/kg). Transcurrida 1h y 12 h después de la inducción de la sepsis peritoneal y bajo anestesia, se extrajo la sangre para la obtención de suero y se conservó a -70°C hasta realizar las determinaciones de los niveles de TNF- α e IL1- β , respectivamente. Los datos fueron expresados como las medias \pm desviación estándar y se compararon mediante la prueba no paramétrica de Kruskal Wallis. Letras diferentes indican diferencias significativas para un valor de $p < 0,05$. $n=10$.

3.4. Efecto del POO combinado con Piperacilina/Tazobactam en la sobrevivencia de las ratas con sepsis peritoneal y la expresión de IL-1 β y TNF- α en tejido.

En la figura 6, se ilustran los resultados de este estudio. Como se aprecia, la dosis simple de PTZ aplicada al mismo tiempo de iniciada la infección, puesto que todos los animales murieron antes de las 24h (**Fig. 6 A**), mientras que la administración de las dos dosis de PTZ prolongaron el tiempo medio de sobrevivencia hasta las 48 h, trayendo como resultado neto que la muerte de todos los animales se observara solamente tras transcurrir 72h de iniciada la sepsis peritoneal (**Fig. 6 A**). Sin embargo, en los animales en que se aplicó el POO (0,8 mg/kg) y se trataron con una dosis de PTZ hubo una sobrevivencia superior (78%) a la observada con el

antibiótico solamente (0%), mientras que el porcentaje de supervivencia se incrementó aún más (hasta un 93 %) cuando se duplicó la dosis de PTZ (**Fig. 6 B**). Si se compara el efecto del POO en combinación con PTZ (130 mg/kg) con el efecto del Oxígeno puro y aire atmosférico (**Fig. 6 B**), se observó que en el grupo tratado con PTZ y que recibió preconditionamiento con aire atmosférico filtrado, todos los animales murieron durante las primeras 24 h posteriores a la infección, mientras que los animales que se preconditionaron con oxígeno, el tiempo de muerte se prolongó hasta las 120 h, aunque todos los animales murieron dentro de este período de tiempo.

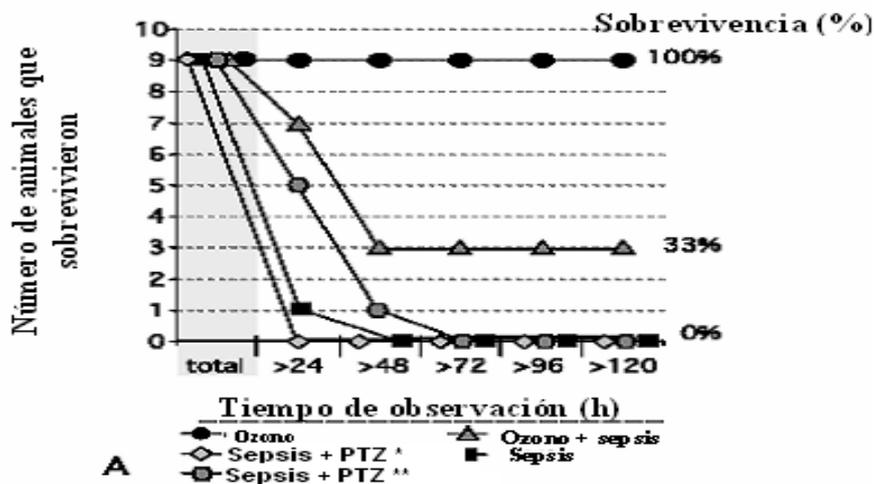


Figura 6 A. Efecto del POO y PTZ sobre la supervivencia de ratas infectadas con dosis letal de materia fecal. El porcentaje de supervivencia fue observado a intervalos de 24 h hasta las 120 h. El número de animales está señalado por grupos en la figura indicado al inicio como "Total" (n=9). El Efecto del POO (ozono + sepsis) y de PTZ aplicado en dosis simple en paralelo a la inoculación de la infección (sepsis + PTZ*) o aplicado dos veces 0 h y 1 h después de la infección (sepsis + PTZ**) estos grupos son comparados con el grupo control de ratas sépticas (sepsis) las cuales no recibieron POO ni antibiótico. Fue utilizado otro grupo control al cual solo se le aplicó POO, pero no se le indujo la sepsis (ozono). Asteriscos indican: * (una dosis de PTZ) ** (dos dosis de PTZ).

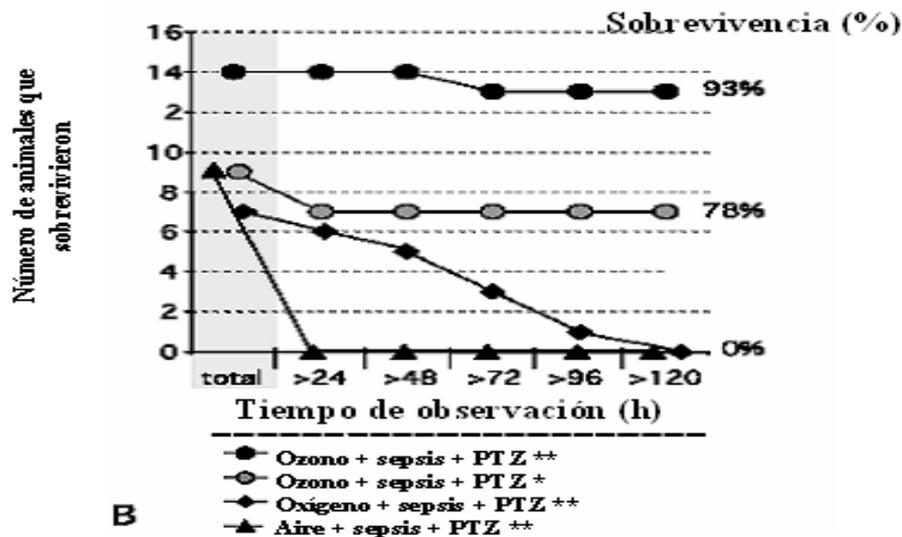


Figura. 6 B, Efecto de la terapia combinada de POO y aplicación simple (*) o doble () de PTZ (ozono + sepsis + PTZ) en la sobrevivencia de los animales.** Se emplearon grupos controles uno pretratado con oxígeno + sepsis + PTZ y el otro con aire filtrado + sepsis + PTZ). El número de animales está señalado por grupos en la figura indicada al inicio como "Total". n=7-14.

Los resultados de los experimentos en que se determinó la expresión de RNAm para la IL-1 β y TNF- α , se muestran en la **Figura 7**. Estos resultados indicaron que en el grupo de ratas tratadas solamente con PTZ, la expresión de estas citocinas no se afectó (**Fig. 7 A, B**). Sin embargo, la aplicación del POO en combinación con PTZ incrementó significativamente los niveles de expresión de RNAm para IL-1 β y TNF- α RNAm en el bazo al ser comparado con el control no tratado y no infectado (**Fig. 7 A, B**). En el hígado la expresión de IL-1 β se incrementó significativamente por el tratamiento con PTZ en combinación con POO mientras que la expresión del TNF- α no mostró influencia alguna (**Fig. 7**). Bajo condiciones sépticas el tratamiento con PTZ, incrementó significativamente la expresión de RNAm para IL-1 β y TNF- α tanto en el bazo como en el hígado al cabo de las cuatro horas de realizada la inoculación de la materia fecal, mientras que en las ratas que recibieron POO y se trataron con PTZ, se observó una disminución significativa de la expresión de RNAm para IL-1 β y

TNF- α tanto en el bazo como en el hígado, con respecto al grupo con sepsis y tratado con PTZ solamente.

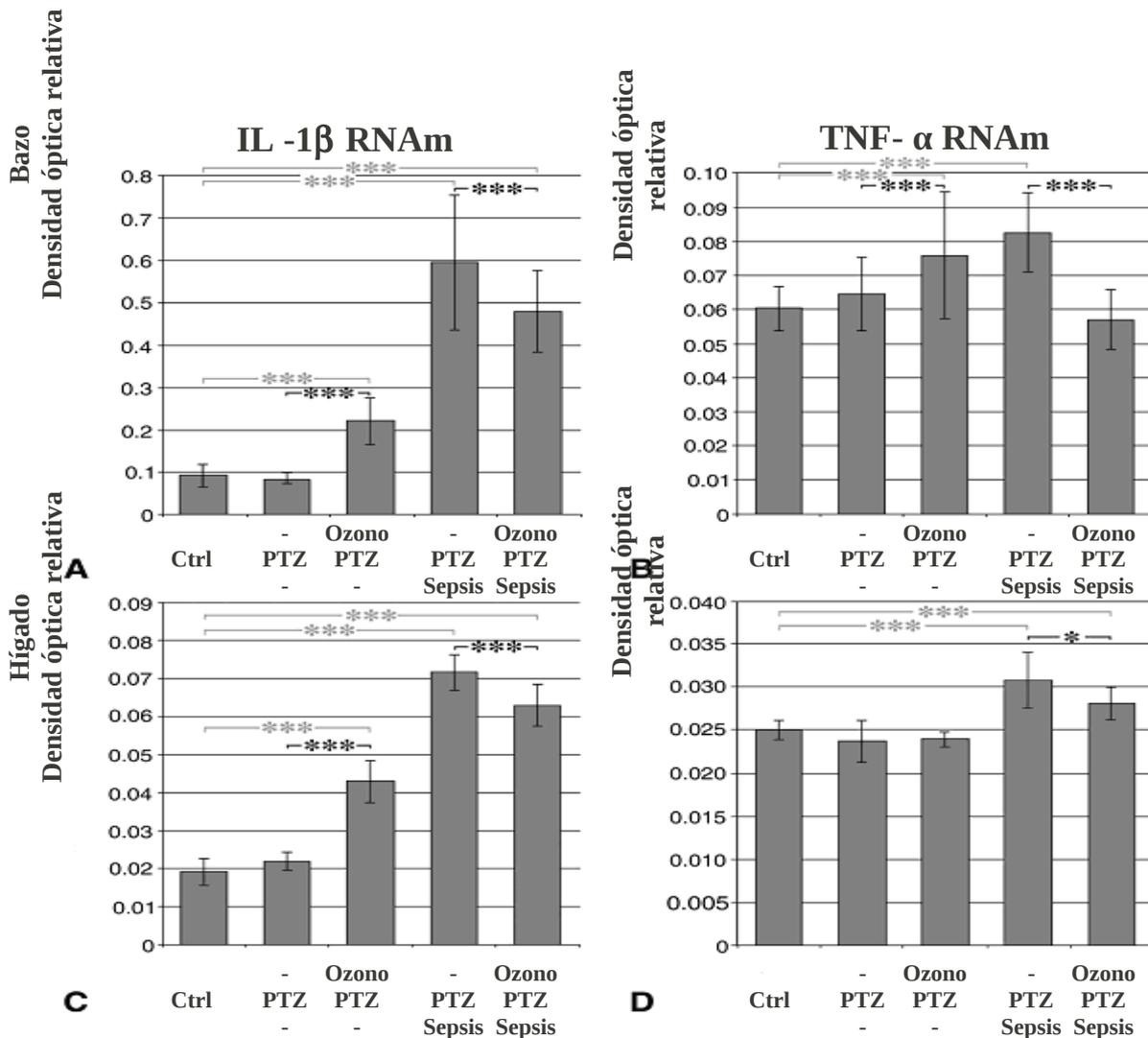


Figura 7. Análisis semicuantitativo de la expresión de IL-1 β y TNF- α RNAm en tejido de ratas con POO, sepsis peritoneal y tratadas con PTZ. Expresión de IL-1 β RNAm (A y C) y TNF- α RNAm (B y D). Los niveles de RNAm para ambas citocinas fueron determinados en bazo (A y B) e hígado (C y D) de animales controles (ctrl), animales que recibieron dosis simple de de PTZ en combinación con POO o sin POO, en ratas con sepsis peritoneal y tratadas con PTZ con o sin POO. Los datos fueron expresados como la media de la densidad óptica relativa (DOR) \pm Desviación estándar, calculadas para 12 mediciones por grupo. Los asteriscos indican la significación estadística entre los grupos marcados (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$) para el análisis estadístico se empleó la prueba de t-estudent, seguido de Anova.

4. Discusión.

Teniendo en cuenta la alta letalidad que, aún a pesar de los avances de la industria farmacéutica, prevalece en las Unidades de Cuidados Intensivos a causa de la sepsis y el choque séptico, se siguen desarrollando nuevos diseños experimentales con vistas al reconocimiento de la fisiopatogénesis del choque séptico y a la búsqueda de nuevas estrategias terapéuticas que puedan proteger y prevenir los daños y la muerte causada por dicha patología.

En el presente trabajo se evaluó el efecto del POO en un modelo de choque endotóxico inducido en ratones por la administración de una dosis de LPS (30 mg/kg). Se demostró que esta dosis, reportada como subletal (Witzenbichler y cols., **2005**), incrementó significativamente los niveles de TNF- α en el suero de los ratones, lo que coincide con los resultados de otros investigadores que obtuvieron resultados similares (Victor y cols., **2003**; Arribas y cols., **2009**). Sin embargo, los niveles de TNF- α disminuyeron significativamente en el suero de los ratones que recibieron POO, lo que demostró que el POO (1,2 mg/kg) fue capaz de inhibir la liberación de esta citocina en los ratones tratados con LPS, con un porcentaje de inhibición de hasta un 82,2 % (**Tabla 1**). Estos resultados nos sugieren que el POO puede actuar como un agente modulador de la respuesta inflamatoria sistémica inicial, que podría contribuir a la disminución del daño celular inducido por esta citocina proinflamatoria (Brouckaert y cols., **2004**).

Por otra parte, la dosis de LPS utilizada también incrementó significativamente los niveles de ON en el suero de los ratones (**Tabla 1**), lo cual coincide con una reducción en la actividad de las enzimas del sistema del glutatión (**Tabla 3.1**), determinado por un decremento significativo de la actividad tanto de la GST como la GPx en el tejido hepático, 24 h después de inducido el choque endotóxico con LPS.

Estos resultados se encuentran en concordancia con lo reportado por [Payabvash y cols.](#), **2006**, que demostraron que a las 24 h de inducido el choque endotóxico, el incremento de los niveles de ON produjo un efecto similar a un agente depletor del glutatión en el tejido hepático. Sin embargo, en el propio modelo el POO disminuyó los niveles de ON (**Tabla 1**), lo cual coincide con un restablecimiento de la actividad de las enzimas del sistema del glutatión (**Tabla 3,1**). Estos resultados apoyan lo mostrado en la (**Tabla 2**), donde se demostró que el POO también produjo una disminución significativa de la actividad de la MPO como indicador de la infiltración de neutrófilos en el tejido pulmonar durante la inflamación (Exner y col., **2006**). Lo que refleja que el POO produjo un efecto protector frente a la respuesta inflamatoria (inducida por LPS), mediado al menos parcialmente, por la disminución, de algunos mediadores proinflamatorios tales como TNF- α y una disminución de las concentraciones de ON. Así si tenemos en cuenta que bajo las condiciones de choque séptico, la inducción de la ONSi es la causa fundamental del incremento de las concentraciones de ON (Cauwels., **2007**), resulta lógico pensar que la administración de POO reduzca su producción a través de la interacción con esta enzima (**Tabla 1**). En tal sentido, estudios recientes han demostrado que el POO fue capaz de prevenir el daño renal inducido por isquemia/reperfusión, a través de la disminución de la enzima ONSi y la supresión de la expresión de la endotelina-1 en el tejido renal (Chen y cols., **2008**), resultados que sustentan nuestra hipótesis.

Similarmente, se ha demostrado que el efecto hepatoprotector de otros fármacos como la ketamina en un modelo de choque endotóxico en ratas, estuvo vinculado a una disminución en la expresión de la ONSi en el tejido hepático (Suliburk y cols., **2005**).

El restablecimiento del balance redox intracelular prooxidante/antioxidante es una de las vías fundamentales para el manejo y la prevención del choque séptico, por tal razón se continúan realizando investigaciones con el objetivo de evaluar la efectividad de otros agentes antioxidantes en el choque séptico (Ozdemir y cols., **2007**).

Nuestros experimentos también demostraron que la administración de POO a ratones con choque endotóxico, disminuía significativamente las SRATB. Teniendo en cuenta que este parámetro es considerado un marcador de peroxidación lipídica y por tanto de daño oxidativo, su disminución puede ser considerada por ende, una disminución del daño oxidativo y la peroxidación lipídica. Hallazgos similares se han observado al administrar otros agentes antioxidantes como es el caso de la melatonina en un modelo de choque endotóxico en ratas (Ozdemir y cols., **2007**).

En cuanto al comportamiento del contenido de las SRATB en el tiempo (una hora y 24h), nuestros resultados mostraron que el LPS (30mg/kg) indujo altos niveles de las SRATB una hora después de inducido el choque, mientras que a las 24 h los niveles de estas sustancias se encontraron disminuidos. Este resultado esta en concordancia con lo descrito por Catala, **2002** en tejido hepático con daño inducido por LPS.

Las señales redox sensibles requieren de un incremento de las concentraciones de EROS. Se ha comprobado que estas señales son producidas por eventos oxidantes que son capaces de activar tanto la generación de EROs como la expresión de proteínas que poseen actividad antioxidante o producen un incremento en el sistema de transporte de cisteína, facilitando en ciertas células el aumento del glutatión endógeno (Dröge, **2002**). Similares respuestas pueden ser inducidas bajo condiciones de estrés oxidativo generado por el peróxido de hidrógeno y el tratamiento con MOO en dosis controladas (Ajamieh y cols., **2002**). En nuestras experiencias el preconditionamiento con MOO indujo una disminución de las SRATB.

Estos resultados, coinciden con lo reportado por (Madej y cols., **2007**), que encontraron una normalización de la producción de EROs en el tejido hepático de ratas precondicionados con la MOO y tratados con LPS. Así, podemos decir que esta disminución del contenido de las SRATB en los grupos precondicionados con la MOO, pudiera estar determinada por una activación de los sistemas antioxidantes.

La enzima SOD constituye la primera línea de defensa antioxidante, ella cataliza la dismutación del anión superóxido en peróxido de hidrógeno. En nuestro modelo experimental de choque endotóxico en ratones, el POO mostró una disminución significativa en la actividad de la SOD en ambos tiempos (una y 24 h) después de inducida la endotoxemia con respecto al grupo tratado con LPS (**Tabla 3**). Si tenemos en cuenta que la actividad de la SOD es fundamentalmente inducida por citocinas tales como IL-1 β y TNF- α y no por el sustrato propiamente dicho (Catala M., **2002**), nuestros resultados sugieren que la disminución de la actividad de esta enzima observada en nuestras experiencias puede deberse al decremento en los niveles de TNF- α producido por el POO (**Tabla 1**). Por otra parte, también podemos decir que esta disminución en la actividad de la SOD estuvo determinada por la disminución del contenido de SRATB en los grupos que recibieron POO (**Tabla 3**).

Estudios realizados sobre la acción directa del LPS (*in vivo*) sobre los sistemas antioxidantes, han demostrado que la endotoxina causa disminución de la actividad de la SOD citosólica en la fase de instauración del choque endotóxico (primeras cinco horas), restableciéndose después su actividad en concordancia con la disminución del contenido de la SRATB (Catala, **2002**). Otros estudios, igualmente demostraron que el daño inducido por LPS en el tejido hepático de ratas, estuvo determinado por una disminución en la actividad de la SOD (El-Beshbischy, **2008**). Es conocido que la actividad de la SOD citosólica es el doble de la SOD mitocondrial, pero la que es

esencial para la supervivencia de los organismos aeróbicos y el desarrollo de resistencia celular a la toxicidad inducida por EROS es la SOD dependiente de manganeso (SOD-Mn) mitocondrial (Fridovich, **1998**). En estudios realizados en un modelo de isquemia/reperfusión hepática se demostró que el POO incrementaba la actividad de la isoforma SOD-Mn y de esta forma se preservó la función mitocondrial (Al Dalain y cols., **2001**, Ajamieh y cols., **2004, 2005**).

La GPx es una enzima importante en la defensa antioxidante por su localización en todos los órganos y tejidos. Su actividad antioxidante es dependiente del glutatión reducido y constituye un sistema junto con la glutatión reductasa, que regenera GSH a expensas del NADPH. En condiciones basales la eliminación de los hidroperóxidos por esta enzima constituye un mecanismo de protección contra la peroxidación. En nuestros resultados se demostró que en el grupo de animales tratados solamente con LPS, la actividad de la GPx se incrementó significativamente una hora posterior al reto, mientras que a las 24 h se produjo una disminución también significativa de la actividad de la enzima. Así, se ha comprobado que el LPS es un inhibidor directo de la actividad de esta enzima (Catalá, **2002**). Este resultado coincide con los datos *in vivo* reportados por El-Beshbischy, **2008** que demostró que la actividad de las enzimas antioxidantes endógenas en el tejido hepático, especialmente las del sistema del glutatión (GSH y GPx), se encontraron disminuidas en un modelo de choque endotóxico inducido por LPS en ratas.

Por otra parte, se ha descrito que las enzimas GPx dependiente de selenio y la GST son biomarcadores de la ozonoterapia endovenosa (Dierickx y cols., **2003**; Hernández y cols., **2005**). Por tanto, se comprobó que uno de los mecanismos protectores que induce el POO es el incremento de la actividad de la SOD, GPx y enzimas relacionadas con la regeneración del GSH como responsables de la supervivencia en

células eucariotas (Archibald, **2003**). Estos resultados anteriores coinciden con los nuestros, en que encontramos que a las 24 h la actividad de la GPx está aumentada significativamente en los grupos con POO (0,4 y 1,2 mg/kg), lo que esta en concordancia con la disminución de las SRATB indicativa de una baja peroxidación lipídica.

En cuanto a la glutatión S-transferasa (GST), esta es una enzima muy abundante en el hígado. La GST es una familia de enzimas que tienen amplias especificidades hacia los sustratos hidrofóbicos electrofílicos, esta característica les permite detoxificar tanto a compuestos xenobióticos, incluyendo antihelmínticos (Solana y cols., **2001**) como endobióticos originados en el estallido respiratorio de los neutrófilos, como constituyente del proceso de defensa antimicrobiana. Nuestros resultados demostraron que en el grupo tratado con LPS, la actividad de la GST disminuyó significativamente a las 24 h (**Tabla 3,1**), lo cual está en correspondencia con la disminución de la SRATB determinada al mismo tiempo (**Tabla 3**), mientras que en los grupos que recibieron POO, a las 24 h la actividad de la enzima se incrementó significativamente, lo que evidencia que el POO fue capaz de favorecer la actividad detoxificadora.

Teniendo en consideración que el TNF- α ejerce un efecto inhibitor sobre el sistema del glutatión (Catalá, **2002**), podemos plantear, que el POO fue capaz de incrementar la actividad del sistema del glutatión, lo cual se acompañó de una disminución tanto de los niveles de TNF- α como de ON en el suero de los ratones con choque endotóxico (**Tabla 1**).

Los cambios histopatológicos observados en el tejido hepático de los ratones, son característicos del daño inducido por LPS, en el cual se observan zonas necróticas en el tejido (**Fig. 1 B**). Sin embargo, en los grupos que recibieron POO se observó la

preservación del tejido con la ausencia de zonas necróticas (**Fig. 1 C**). La presencia de áreas necróticas en el tejido hepático constituyen evidencias del daño inducido por LPS (Lomnitski y cols., 2000), estas han sido también observadas en otros modelos experimentales de choque séptico y durante la sepsis en seres humanos (Demirhan y cols., **2008**).

Teniendo en cuenta, que el daño mediado tanto por el estrés oxidativo como el nitrosativo en la sepsis, producen una disfunción mitocondrial, mediada directamente por la generación del ONOO^- , el cual al producir la ruptura de las cadenas de ADN, activa la enzima nuclear Poly-ADP ribosil polimerasa (PARP) reparadora del ADN, la cual produce una disminución intracelular del NAD con la consiguiente disminución de la producción de la adenosina trifosfato (ATP) (Liaudet y cols., **2003**), esto conlleva a la muerte de la célula y a la disfunción multiorgánica. Es importante destacar como ya ha planteado Heumann y col., **1996**; Hurtada y cols., **2005**, que el uso de agentes terapéuticos moduladores tanto del estrés oxidativo como nitrosativo, deben formar parte fundamental de la estrategia terapéutica a seguir con el objetivo de disminuir el daño celular, el fallo multiorgánico y la muerte producida por el choque séptico.

En un estudio reportado recientemente, se demostró que durante el choque endotóxico inducido en ratas, se produjo un daño mitocondrial, en el que se demostró una disminución significativa de la expresión de la enzima succinato deshidrogenasa (SDH), vinculada con el proceso de respiración celular, esto se acompañó de un incremento de la expresión de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH), la cual se eleva en estados anaeróbicos con el objetivo de mantener la generación citosólica de NAD a partir del NADH. Por otra parte, también hubo una disminución de la expresión de la enzima ATPasa, la cual interviene en el transporte de numerosas sustancias y de metabolitos desde la sangre hacia la célula y viceversa (Madej y cols., **2007**),

todos estos cambios producidos en la expresión de estas enzimas, marcadoras de la función mitocondrial, durante el daño inducido por LPS en ratas, fueron revertidos por la ozonoterapia (Madej y cols., **2007**).

Teniendo en consideración los resultados obtenidos con el POO en el modelo de choque endotóxico inducido por LPS (30 mg/kg) en ratones, nos propusimos evaluar los efectos del POO en un modelo de sepsis peritoneal inducido por materia fecal en ratas, dicho modelo lo consideramos mucho más relevante puesto que es capaz de reproducir lo que ocurre en la práctica clínica.

Bajo nuestras condiciones experimentales, se obtuvo que con las dosis de materia fecal (proveniente del ciego de la rata) entre 0,5 y 0,75 g/kg, se alcanzaron porcentos de mortalidad entre el 66 y el 100 % en 120 h respectivamente (**Fig. 2**). Con dicho resultado obtuvimos una curva dosis respuesta en un modelo de sepsis peritoneal altamente letal, la cual será utilizada para evaluar la efectividad de nuevas estrategias terapéuticas (POO). Resultados similares se obtuvieron por Jacob., **2000**, con este modelo experimental de sepsis peritoneal inducido por una suspensión de materia fecal. Este método también ha sido utilizado para estudiar diversos aspectos dentro de la fisiopatología de la sepsis severa producida por una peritonitis fecal (Motew y cols., **1998**; Jacobi y cols., **1998 a**). Dentro de los modelos de choque séptico en animales inducido por peritonitis, se encuentran los inducidos por perforación del intestino que permite la contaminación por el contenido gastrointestinal y por inóculos de materia fecal o mediante la infusión de una carga bacteriana en la cavidad peritoneal (Parker y col., **2001**).

El modelo de ligadura y punción cecal (LPC) es ampliamente utilizado (Freise., **2001**), en el cual el ciego es sometido a una ligadura en su porción distal y perforado usando una aguja, por lo que la severidad de la sepsis alcanzada en este modelo

esta determinado por el diámetro de la aguja empleada. Este modelo fue originalmente descrito en ratas, pero ha sido extendido exitosamente a otras especies (Hollenberg y cols., **2001**). Las ventajas de dicho modelo están dadas porque no requiere preparación del inóculo y la sepsis es producida por la contaminación de una flora mixta. De esta forma se refleja lo que sucede en los casos clínicos como son las apéndices perforadas y la diverticulitis (Parker y col., **2001**).

Por otra parte, este modelo de LPC tiene la dificultad de no poder controlar la magnitud de la sepsis. La peritonitis polimicrobiana inducida en ratas, por un inóculo estándar de materia fecal de otros animales, produce una respuesta séptica hiperdinámica con una alta mortalidad. Este modelo tiene como ventajas una buena reproducibilidad y posibilidades para estudios de dosis-respuesta, tanto sistémicamente como en sistemas de órganos y la intensidad de la respuesta inflamatoria depende del tamaño de la carga bacteriana (Stamme y cols., **1999**). Nuestro modelo igualmente demostró que la respuesta (mortalidad) depende de la dosis del inóculo, donde el porcentaje de mortalidad alcanzó hasta un 100 % en un período de 120 h, coincidiendo con lo reportado por Brocco y cols., **2008**.

Los métodos para la inducción de la sepsis peritoneal por materia fecal, mencionados hasta el momento, se realizan bajo condiciones quirúrgicas con la utilización de anestésicos. Recientemente, se demostró que los anestésicos son capaces de alterar la susceptibilidad a la endotoxina y la evolución de la sepsis severa (Suliburk y cols., **2005**), específicamente la ketamina la cual se demostró que tiene efecto hepatoprotector en un modelo de endotoxemia, mediado por un incremento en la expresión de la hemooxigenasa (HO-1) y una disminución de la expresión de ONSi (Suliburk y cols., **2005**). Otros autores demostraron la influencia de diferentes anestésicos sobre el sistema inmune celular de ratas, lo cual fue determinado por

cambios en la expresión de citocinas proinflamatorias tales como IL-1 β , IL-2, IL-6 y TNF- α (Bette y cols., 2004). Por tanto, el uso de anestésicos en modelos animales de choque séptico debe ser previamente valorado y bien seleccionado. Ante tal dificultad nosotros realizamos una modificación del modelo quirúrgico para la inducción de la sepsis peritoneal por materia fecal, dicha modificación está descrita en el método no quirúrgico en el cual prescindimos del uso de anestésicos, con el objetivo de poder realizar estudios de expresión y liberación de citocinas tanto en tejido como en suero, logrando que nuestros resultados no se afectados o enmascarados por la influencia de los anestésicos, como ya fue demostrado por Bette y cols., 2004.

Nuestros resultados demostraron que el POO incrementó significativamente la sobrevivencia de los animales (**Fig. 3**), siendo las dosis más efectivas la de 0,8 mg/kg de peso corporal, con la cual se alcanzó hasta un 61,5% de sobrevivencia con respecto al control con sepsis. Este efecto beneficioso de reducción de la mortalidad inducido por el POO en la sepsis peritoneal letal en ratas, pudiera estar en concordancia con los resultados obtenidos con el uso del POO en el modelo de choque endotóxico en ratones, en el que demostramos que el POO, produjo una modulación de la respuesta inflamatoria sistémica, mediada por una disminución significativa tanto de la liberación de TNF- α como del ON en el suero de los ratones (**Tabla 1**), acompañado de una disminución de la infiltración de neutrófilos en el tejido pulmonar (**Tabla 2**), también se produjo un incremento de la actividad del sistema antioxidante del glutathion (**Tabla 3,1**), lo cual condujo a una disminución de la peroxidación lipídica en el tejido hepático (**Tabla 3**). De esta forma, se demostró que el POO a través de estas vías fue capaz de modular la respuesta inflamatoria, el estrés oxidativo, el daño celular, el fallo multiorgánico y reducir la mortalidad inducida por el choque séptico.

Otro de los resultados obtenidos que pudiera estar vinculado con el efecto beneficioso del POO en el modelo de sepsis peritoneal, es el incremento observado de los niveles de 6-keto-PGF_{1α} (metabolito de la prostaciclina (PGI₂)) en el suero de ratas que recibieron POO (4 mg/kg) por vía i.p (Schulz y col **2005**). La prostaciclina es un mediador lipídico originado por la cascada del ácido araquidónico y su función fundamental es el mantenimiento de la homeostasis, mediante su efecto vasodilatador y antiagregante plaquetario. Por tanto, su función en el choque séptico es entre otros la de mantener una adecuada perfusión tisular y de esta forma mantiene el aporte de oxígeno a las células y preserva su función. Esto sugiere que una de las vías por las que el POO atenúa las graves consecuencias del choque séptico, pudiera estar dada por el incremento de la prostaciclina produciendo vasodilatación e inhibición de la agregación plaquetaria y por tanto disminuiría el daño endotelial y la coagulación intravascular diseminada como consecuencias deletéreas del choque séptico.

Teniendo en cuenta, los resultados de sobrevivencia alcanzados por el POO en el modelo de sepsis peritoneal en ratas, nos propusimos demostrar la influencia del POO con relación al comportamiento de las enzimas indicadoras de estrés oxidativo y de daño orgánico en la sangre en este mismo modelo. Nuestros resultados evidenciaron que se produjo una depresión en el sistema antioxidante dado por una disminución significativa de los niveles de SOD, GPx y un incremento en el contenido de SRATB (**Tabla 4**) en las ratas con sepsis peritoneal, reafirmando el papel del estrés oxidativo en el proceso de choque séptico, lo cual coincide con lo informado por Jacobs y cols., **2000** y Sener y cols., **2005**. Sin embargo, en los grupos de animales con POO se produjo un incremento significativo de la actividad de las enzimas SOD y GPx, con una disminución concomitante del contenido de SRATB

(Tabla 4) como indicador de peroxidación lipídica. En otro estudio se demostró que en un modelo de endotoxemia en ratas el POO ejerció un efecto protector a través de la disminución de los niveles de EROs en el tejido hepático en comparación con el grupo tratado con LPS (Madej y cols., **2007**).

Por otra parte, se observó un deterioro en la función tanto renal como hepática en las primeras 12 h después de inducida la sepsis peritoneal (**Tabla. 6**), dichos resultados coinciden con los obtenidos por Jacobs y cols., **2000**. Este incremento de la actividad de las enzimas indicadoras de daño hepático y el contenido de creatinina como indicador de función renal, se encontraron disminuidas en los grupos de ratas que recibieron POO (**Tabla 6**). Igualmente la actividad de la MPO en el tejido pulmonar, se incrementó en las ratas con sepsis peritoneal (**Tabla 5**), lo que coincide con lo demostrado por Sener y cols., **2005** en un modelo de LPC en ratas. El incremento de la infiltración de neutrófilos en el tejido pulmonar, fue revertido por el POO, produciendo una reducción de la actividad de la MPO hasta un 34,4 %.

Nuestros resultados demuestran que la SOD y la GPx, desempeñan un importante papel dentro de los mecanismos protectores ejercidos por el POO. El incremento de la actividad de las enzimas antioxidantes SOD y GPx (**Tabla 4**) producen como consecuencia la preservación de la función celular, lo cual conllevó en este caso a una disminución en la actividad de los marcadores de daño orgánico, tales como ALAT, ASAT y el contenido de CRE (**Tabla 6**). Esta disminución de los valores de parámetros indicadores de daño orgánico en una fase temprana de la sepsis, conducen a un pronóstico de incremento de la sobrevivencia (Levy y cols., **2005**), lo cual esta en concordancia con los resultados informados por nosotros (**Fig. 3**).

Actualmente, existe consenso de opiniones de que la terapia antioxidante se está convirtiendo en una terapia fundamental para el tratamiento de enfermedades

inflamatorias y en el daño inducido por isquemia/reperfusión (Cuzzocrea y cols., **2001**) y esto está basado en el papel importante que ejercen los sistemas antioxidantes endógenos, representados por las enzimas (SOD, CAT y GPx entre otras) en el control molecular de las especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno y de esta forma se logra prevenir los efectos dañinos (Matés, **2000**). Recientemente, Ozdemir y cols., **2007**, demostraron que el daño endotóxico está mediado por un incremento de las EROs y en el contenido de las SRATB, lo cual coincide con los resultados obtenidos en nuestro modelo experimental de sepsis peritoneal (**Tabla 4**). Existen evidencias que demuestran que el efecto beneficioso de algunas sustancias como la Melatonina, empleada como terapéutica con vistas a atenuar los daños inducidos por el choque endotóxico, está mediado por un incremento de la actividad de las defensas antioxidantes tales como SOD y GPx (Ozdemir y cols., **2007**). Este resultado está en concordancia con los nuestros (**Tabla 4**) utilizando el POO.

En cuanto a la liberación de citocinas en el suero se demostró un incremento de TNF- α y de IL-1 β en el suero de ratas con sepsis peritoneal (**Fig. 5**), coincidiendo con lo informado por Sener y cols., **2005** en sus estudios. En resumen el POO fue capaz de reducir el incremento en la liberación de ambas citocinas de forma significativa.

Estudios recientes han demostrado que los fosfolípidos oxidados ejercen efecto anti-inflamatorio e incrementan la sobrevivencia en ratones con endotoxemia inducida por LPS (Kochkov y col., **2003**; Leitinger, **2003**), por lo cual pudiéramos sugerir la posibilidad de que el POO produzca la oxidación de diferentes fosfolípidos, mayoritarios en el plasma o cavidad peritoneal, los cuales pudieran influir tanto en la modulación de la respuesta inflamatoria como en el daño orgánico y oxidativo inducido por la sepsis polimicrobiana.

Teniendo en cuenta, nuestros resultados y los hallazgos de otros autores relacionados con el POO (Madej y cols., **2007**), también podemos decir que el POO en el modelo de sepsis peritoneal fue capaz de producir una adaptación del organismo ante un estrés oxidativo agudo, lo que pudiera estar mediado por la activación de la producción de proteínas de choque térmico-70 (HSP-70), lo que se demostró por Bocci, **2007**, en sangre humana tratada con ozono. Estas moléculas, son proteínas de fase aguda que tienen efecto protector celular y se comportan como moléculas chaperonas de proteínas desnaturalizadas bajo un estrés térmico y ejercen efecto inmunomodulador, a través de la inhibición de la expresión génica de citocinas pro-inflamatorias. También se ha demostrado que las HSPs inhiben la síntesis, producción y expresión génica de las citocinas proinflamatorias, mediante inhibición de la degradación de la subunidad inhibitoria κ B (I- κ B) del factor de transcripción nuclear NF- κ B, estabilizando esta subunidad inhibitoria (Wong y cols., **1997**).

Por otra parte, se demostró el efecto protector de las HSPs tanto en modelos experimentales de sepsis en porcinos como en humanos, en que fueron capaces de atenuar la reacción hemodinámica y disminuir la liberación de varios mediadores de la inflamación incluyendo citocinas pro-inflamatorias y metabolitos del ácido araquidónico (Klosterhalfen y cols., **1996, 1997 b**).

Con respecto al uso de los antibióticos en un modelo de choque séptico, se demostró que inducen la liberación de endotoxinas y la producción de IL-6, dependiendo estos efectos del tipo de antibiótico aplicado, así por ejemplo los β -lactámicos provocaron la mayor liberación, le siguió la ciprofloxacina y el que provocó menor liberación de la citocina fue la gentamicina (Daniel y cols., **1996**).

Por tanto, el POO constituye un procedimiento que pudiera atenuar algunos de los efectos adversos de los antibióticos, como agentes inductores de la liberación de la

endotoxina y de la liberación de citocinas proinflamatorias que son en parte responsables de iniciar la respuesta inflamatoria sistémica.

En un estudio preliminar en que se demostró el efecto de la combinación del POO con diferentes antibióticos (cefodicina, cefatocina, levofloxacina y Piperazilina/tazobactam) se obtuvo un incremento en el porcentaje de sobrevivencia de los animales con los tres últimos antibióticos que fue de: 66,6; 72,2 y 88,8 % respectivamente (**Anexo 4**). Estos porcentajes de sobrevivencia se correlacionaron con una disminución cualitativa en la expresión de la IL-1 β en el tejido hepático (**Anexo 5**). Estos resultados constituyeron la base fundamental para estudiar el efecto del POO en combinación con Piperazilina/Tazobactam (PTZ). El efecto de la PTZ como un agente bactericida de amplio espectro, ha sido demostrado en estudios *in vitro* (Young y col., **2001**). Sin embargo en humanos con infección intraabdominal, no se reportó una alta eficacia del tratamiento con PTZ con más del 34 % de mortalidad, lo que fue extensivo a otros antibióticos en ensayos clínicos (Holzheimer, **2001 a**).

Sin embargo el uso combinado del POO con PTZ (130 mg/kg) alcanzó porcentajes significativos de sobrevivencia en el modelo de sepsis polimicrobiana hasta un 93% (**Fig. 6 B**). Por tanto el POO pudiera ser aplicado preventivamente durante el período preparatorio en pacientes que serán sometidos a una cirugía abdominal, de esta forma pudiera reducir el riesgo de la aparición de sepsis postoperatoria específicamente cuando el POO sea usado en combinación con un antibiótico β -lactámico tal como el PTZ.

Nuestros resultados demuestran que el grupo con sepsis y tratados con PTZ, hubo un incremento significativo en la expresión de IL-1 β y TNF- α RNAm tanto en tejido hepático como esplénico, tal incremento fue revertido cuando los animales recibieron

POO en combinación con PTZ (**Fig. 7 A- D**), aunque no a los niveles normales del control sin sepsis.

El incremento que se observó en la expresión de citocinas proinflamatorias después del POO (**Fig. 7 A, B y C**), pudiera ser el resultado del incremento en el número de linfocitos y granulocitos observado en los animales que recibieron POO solamente (**Fig. 4**).

Ha sido documentado que los fosfolípidos oxidados tal como 1-palmitoyl-2-arachidonoyl-sn-glycero-3-phosphorilcolina (PAPC) se demostró que induce la expresión de genes de inflamación *in vivo* e *in vitro* (Kadl y cols., **2002**). Tomando en consideración este hallazgo, podemos decir que la presencia de fosfolípidos oxidados pudiera explicar el incremento significativo de los niveles de expresión de IL-1 β y TNF- α RNAm, tanto en hígado como en bazo de ratas no infectadas y tratadas con POO y PTZ. Sin embargo, se demostró también que la presencia de estos fosfolípidos oxidados (PAPC) bajo condiciones de inflamación pueden inhibir dicho proceso e incluso proteger a los ratones contra el choque endotóxico letal (Ma y cols., **2004**).

Este efecto protector de los PAPC oxidados, se ha demostrado que es en parte mediado por el bloqueo de la interacción del complejo LPS-LBP con el receptor de membrana CD-14 y no por la interferencia de la inducción de TNF- α e IL-1 β RNAm mediado por el NF- κ B encargado de regular la expresión génica de estas moléculas proinflamatorias (Bochkov y cols., **2002**). Teniendo en cuenta, la importancia de la presencia del receptor CD14 de monocitos, en la activación de estas células para la síntesis de citocinas ante un estímulo inflamatorio, se demostró que la ozonoterapia aplicada por la vía de autohemo mayor, en un grupo de bovinos que presentaban enfermedades inflamatorias, el contenido de células CD-14 disminuyó gradualmente

en estos animales después del tratamiento con la ozonoterapia (Ohtsuka y cols., **2006**). Por tanto se puede hipotetizar que el POO, a través de la formación de sustancias oxidadas disminuye la respuesta inflamatoria por la vía de la interacción de la endotoxina con el receptor de membrana CD-14 para la activación de células inflamatorias, y de esta forma disminuir la expresión de citocinas proinflamatorias (**Fig. 7 A-D**).

Existen reportes que demuestran que el incremento en la sobrevivencia de animales sometidos a LPC, ha estado asociada a una disminución en los niveles de TNF- α e IL-6 tanto en plasma como en fluido peritoneal, en animales tratados con antibióticos (Vianna y cols., **2004**), a una supresión del sistema inmune por dihidroepiandrosterona (DHEA) (Hildebrand y cols., **2003**) y por una reducción de la respuesta inflamatoria sistémica (Watanabe y cols., **2004**). Esto apoya nuestras observaciones de que el POO produce una inhibición temprana de la respuesta inmune mediada por la reducción en la expresión de citocinas proinflamatorias, lo que le permite al organismo desarrollar una respuesta inflamatoria sistémica controlada y de esta forma incrementar la sobrevivencia de los animales (**Fig. 3, 6 B**).

Teniendo en cuenta el efecto beneficioso demostrado por el POO sobre los sistemas antioxidantes endógenos y su efecto modulador de la respuesta inflamatoria, incluso cuando se aplicó en combinación con antibióticos, nos permite concebir y proponer al POO como una nueva alternativa terapéutica capaz de prevenir las complicaciones causadas por una peritonitis y contribuir a reducir la mortalidad en el choque séptico. Al igual que lo demostrado por (Kotake y cols., **2003**), de que los antioxidantes aplicados en combinación con antibióticos, amplifican respuesta de estos por medio del incremento de la liberación de citocinas anti-inflamatorias como la IL-10.

Nuestros resultados que mostraron un incremento significativo de la actividad de las enzimas del sistema antioxidante endógeno (SOD y GPx) en los grupos que recibieron POO (**Tablas 3,1 y 4**), por lo que podemos sugerir que el POO le confiere protección a la mitocondria celular, lo que la hace más resistente al daño inducido por el estrés oxidativo y nitrosativo generado tanto por la sepsis peritoneal en ratas como por la endotoxemia en ratones, representado por una disminución en el contenido de SRATB y de los niveles de ON en suero. Así, al obtener un menor daño oxidativo celular, la reacción inflamatoria es moderada, disminuye la activación de células inflamatorias y por tanto inhibe la expresión y liberación de citocinas proinflamatorias (**Tabla 1, Fig. 5 y 7**). Y de esta forma se preservó tanto la función celular como la función orgánica (**Tabla 6**), lo cual conllevó a un incremento de la sobrevivencia de los animales (**Fig. 3, 6 B**).

En el **Anexo 6** proponemos un resumen de los mecanismos de acción del POO en la prevención de la muerte por choque séptico. Se muestra de forma general la fisiopatología del choque séptico, iniciado por un insulto infeccioso, el cual conduce a la activación del sistema inmune celular con la consiguiente liberación de mediadores proinflamatorios que conllevan al daño orgánico. En resumen, nuestros resultados demuestran en primer lugar que el POO incrementa la actividad antioxidante endógena (SOD y GPx), mediante la cual se produce una disminución del estrés oxidativo, de la infiltración de neutrófilos en el tejido y de los niveles de ON, lo que conlleva a una disminución de la vasodilatación y la depresión del miocardio. En segundo lugar, el POO disminuye tanto la expresión como la liberación de citocinas proinflamatorias, lo que conduce igualmente a una disminución del daño endotelial y orgánico. Todos estos mecanismos producen de forma general una modulación de la

respuesta inflamatoria sistémica, la cual se traduce en el incremento de la sobrevivencia de los animales.

Actualmente, se ha confirmado la afectividad de agentes bloqueadores de la liberación de citocinas pro-inflamatorias, los cuales deben ser aplicados de forma profiláctica, con el objetivo de prevenir el desarrollo de la lesión oxidativa. En este sentido hemos demostrado mediante nuestros resultados, que el POO es una alternativa terapéutica con grandes perspectivas de ser el tratamiento de elección para la prevención del daño inducido por el choque séptico y la disminución de la mortalidad, ejerciendo el POO de forma simultanea tanto una reducción del estrés oxidativo como nitrosativo, acompañado de la modulación de la respuesta inflamatoria sistémica. De esta forma, el POO también incrementa la actividad terapéutica de los antibióticos, cuando ambos son aplicados de forma combinada. Por tanto el POO posee grandes ventajas sobre otros agentes terapéuticos antioxidantes e inmunomoduladores.

5. CONCLUSIONES

1. Se demostró que el POO tuvo un efecto **protector sobre el balance redox intracelular**, tanto en un modelo de sepsis peritoneal como en un modelo de choque endotóxico, a través del incremento de la actividad de las enzimas del sistema antioxidante endógeno (GPx y SOD), lo cual produjo una disminución de la liberación de las citocinas proinflamatorias (IL-1 β y TNF- α) en el suero de ratas y el TNF- α y ON en suero de los ratones, así como la reducción de la infiltración de neutrófilos en el tejido pulmonar y el incremento de la sobrevivencia en el modelo experimental con ratas. Este hallazgo novedoso refleja el alcance de esta alternativa terapéutica en la regulación tanto del estrés

oxidativo y el nitrosativo, así como del proceso inflamatorio sistémico generado durante la sepsis.

2. Tanto el POO como su combinación con antibióticos, incrementó la sobrevivencia de los animales con sepsis peritoneal letal, demostrando su efecto **inmunomodulador**, a través de la disminución de la expresión la IL-1 β y el TNF- α . Todo lo anteriormente citado confirma lo novedoso de este resultado, que constituye la primera evidencia de su utilidad en modelos experimentales de choque séptico.

5.1. RECOMENDACIONES

1. Con el objetivo de ampliar los conocimientos sobre el efecto del POO sobre la liberación de otras citocinas proinflamatorias, nos proponemos evaluar en estos modelos la liberación de IL-6 e IL-8, así como algunas citocinas antiinflamatorias (IL-10 e IL-4). También evaluar la expresión del NF- κ B y las proteínas de choque agudo como la HSP-70.
2. Evaluar la posible vía de acción del POO sobre la interacción del complejo LPS-LBP con el receptor CD-14 de monocitos.
3. Estudiar el efecto de POO sobre algunos parámetros del sistema de la coagulación y su comportamiento en el choque séptico.
4. Evaluar el tratamiento con la mezcla ozono/oxígeno en un modelo de choque séptico experimental.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.

1. **Aggawal B.B**, Kohr WJ, Hass PE. **(1985)**. Human tumor necrosis factor production purification and characterization. **J. Biol. Chem**: 260, 2345.
2. **Ajamieh H**, Berlanga J, Merino N, Martínez G, Carmona A, Menéndez S, Giuliani A, Re L and Leon OS **(2005)**. Role of protein synthesis in the protection conferred by ozone-oxidative-preconditioning in hepatic I/R. **Transplant International** 18; 604-612.
3. **Ajamieh H**, Menéndez S, Martínez G, et al. **(2004)** Effect of ozone oxidative preconditioning on nitric oxide generation and redox cellular balance in a rat model of hepatic ischaemia/reperfusion. **Liver** 24:55.
4. **Ajamieh H**, Merino N, Candelario-Jalil E, et al. **(2002)**. Similar protective effect of ischaemic and ozone oxidative preconditioning in liver ischemia/reperfusion injury. **Pharmacol Res** 45: 333.
5. **Alberti C**, Brun- Buisson C, Burchardi H. **(2002)**. Epidemiology of sepsis and infection in ICU patients from an international multicentre cohort study. **Intensive Care Med**; 28: 108-121.
6. **Al-Dalain SM**, Martínez G, Candelario-Jalil E, Menéndez S, Re L, Giuliani A, León OS **(2001)**. Ozone treatment reduces markers of oxidative and endothelial damage in an experimental diabetes model in rats. **Pharmacol Res** 44:391-396.
7. **Alejandria MM**, Lansang MA, Dans LF, Mantaring JB. **(2001)** Intravenous immunoglobulin for treating sepsis and septic shock. **Cochrane Database Syst Rev** 2, CD001090.
8. **Alexander C**, Rietschel ET. **(2001)** Bacterial lipopolysaccharides and innate immunity. **J Endotoxin Res.** 7:167.

9. **Alves fiho JC**, de Freitas A, Spiller F, Souto FO, Cunha FQ. (2008) The role of neutrophils in severe sepsis. **Shock**; 30 (1):3-9.
10. **Annane D**, Sanquer S, Sebille V, et al. (2000) Compartmentalised inducible nitric oxide synthase activity in septic shock. **Lancet** 355: 1143-48.
11. **Añel R**, Dellinger RP. (2001) Sepsis and bacteremia. In: Conn's Current Therapy, Rakel RE, Bope ET (Eds.), WB Saunders Co.: 56-62.
12. Archibald, F. (2003). **Oxygen toxicity and the health and survival of eukaryote cells: a new piece is added to the puzzle**. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **100:10141–10143**.
13. **Arnalich F**, Lopez - Maderuelo D, Codoceo R, Lopez J, Solis-Garrido LM, Caopiscol C, et al. (2002) Interleukin -1 receptor antagonist gene polymorphism and mortality in patients with severe sepsis. **Clin Exp immunol** 127:331-6.
14. [Arribas B](#), [Rodríguez-Cabezas ME](#), [Comalada M](#), [Bailón E](#), [Camuesco D](#), [Olivares M](#), [Xaus J](#), [Zarzuolo A](#), [Gálvez J](#). (2009) Evaluation of the preventative effects exerted by *Lactobacillus fermentum* in an experimental model of septic shock induced in mice. **Br J Nutr** 101(1):51-8.
15. **Babior BM**. (2000) Phagocytes and oxidative stress. **Am J Med**109:33-44.
16. **Barber E**, Menéndez S, León OS, Barber MO, Merino N, Calunga JL, Cruz E, Bocci V. (1999) Prevention of renal injury after induction of ozone tolerance in rats submitted to warm ischemia. **Mediat. Inflamm** 8:37-42.
17. **Basabe E**, Menéndez S, Segarra F, Ponce de León M (1995). Ozone therapy like a favouring element in the rehabilitation of children with hearing loss. Proceedings 12th World Congress of the Int Ozone Association. **Ozone in Medicine, Lille, France** 275-278.

18. **Bauhofer A** Plaul U, Torossian A, Koller M, Stinner B, Celik I et al. (2007) Perioperative prophylaxis with granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) in high-risk colorectal cancer patients for an improved recovery: A randomized, controlled trial. **Surgery** 141:501-10.
19. [Bauhofer A, Celik I, Plaul U, Wulf H, Torossian A.](#) (2004) Effects of G-CSF and antibiotic prophylaxis in a 2 x 2 factorial design on outcome in septic rats. **Inflamm Res** 53: S126-129.
20. **Bauhofer A**, Y-J. Ho, A. Schmitt, M. Köster, R. K. W. Schwarting, C. R. Pawlak. (2009) Individual behavioural differences in recovery from abdominal sepsis in rats. **Inflamm Res** 58:1-9.
21. **Bauhofer A**, Stinner B, Kohlert F, Reckzeh B, Lorenz W and Celik I. (2002) Granulocyte colony-stimulating factor but not peritoneal lavage increases survival rate after experimental abdominal contamination and infection. [British Journal of Surgery](#) 89:1457-1464.
22. **Bette M** Schlimme S, Mutters R, Menendez S, Hoffmann S and Schulz S. (2004) Influence of different anaesthetics on pro-inflammatory cytokine expression in rats spleen. **Lab Animals** 38:272-279.
23. **Bette M**, Shafer MK, Van RN, Weihe E, Fleischer B. (1993). Distribution and kinetics of super-antigen-induced cytokine gene expression in mouse spleen. **J. Exp. Med;** 178: 1531-1539.
24. **Birnbaum J**, Lehmann CH, Klotz E, Hein OV, Blume A, Jubin F, Polzc N, Luther D, Spies CD. (2008) Effects of N-acetylcysteine and tirilazad mesylate on intestinal functional capillary density, leukocyte adherence, and mesenteric

- plasma extravasation and cytokine levels in experimental endotoxemia in rats. **Clin Hemorheol Microcirc** 39 (1-4):99-111.
25. **Bocci V. (1994a)** Autohemotherapy after treatment of blood with ozone. A Reappraisal. **J Intern Med Res** 22 131-144.
 26. **Bocci V. (2002)** Oxygen–Ozone Therapy. A critical evaluation. **Kluwer Academic Publishers**. AH Dordrecht. The Netherlands.
 27. Bocci V, Luzzi L, Corradeschi F, Silvestri S. (1994) **Studies on the biological effects of ozone: 6. Production of transforming growth factor by human blood after ozone treatment.** *J. Biol. Regul. Homeost A* **8: 108-112.**
 28. **Bocci V. (2007)** Ozonation of human blood induces a remarkable upregulation of heme oxygenase-1 and heat stress protein-70. **Mediators Inflamm** 26785.
 29. **Bochkov VN, Kadl A, Huber J, Gruber F, Binder BR, Leitinger N. (2002)** Protective role of phospholipids oxidized products in endotoxin induced tissue damage. **Nature** 419:77-81.
 30. **Bolann BJ, Ulvik RJ. (1991)** Improvement of a direct spectrophotometric assay for routine determination of superoxide dismutase activity. **Clin.Chem** 37: 1993-1999.
 31. **Bone RC. (1991)** The pathogenesis of sepsis. **Ann. Intern. Med.** 115,457-469.
 32. **Borrego A, Z. Zamora, R. González, Romay Ch, Menéndez S, Hernández F, Montero T, Rojas E. (2004)** Protection by ozone preconditioning in mediated by the antioxidant system in CDDP-induced nephrotoxicity in rats. **Mediators of inflammation** 13 (1) 13-19.
 33. **Botsoglou NA, Dimitrios JF, Georgios EP, Vassilios NV, Antonios JM and Antonios GT. (1994)** Rapid, sensitive and specific thiobarbituric acid Method for

- Measuring lipid Peroxidation in Animals Tissue, Food, and Feedstuff Samples.
J. Agric. Food Chem **42**: 1931-1937.
34. **Botti H**, Batthyany C, Trostchansky A, Radi R, Freeman B, Rubbo H . **(2004)** Peroxynitrite-mediated α -tocopherol oxidation in low-density lipoprotein:a mechanistic approach. **Free Rad Biol Med** 36:152-162.
35. **Bradley PP**, Priebe DA, Christensen RD, Rothstein G. **(1982)** Measurement of cutaneous inflammation. Estimation of neutrophil content with an enzyme marker. **J. Invest Dermatol.** 78:206-209.
36. **Bratton AC**, Marshall EK **(1939)**. A new coupling component for sulfanilamide determination. **J Biol Chem** 128:537-544.
37. **Brocco CM**, Paulo SDN, Abreu Batista JF, Ferrari TA, Asevedo CT, Silva LA. **(2008)** Effects of peritoneal lavage with lidocain on surgical of rats with faecal peritonitis. **Acta Cirurgica Brasileira** 223 (1):42.
38. **Brouchkaert P**, Takahashi N, van Tiel ST, Hostens J, Eggermont AM, Seynhaeve AL, Fiers W, ten Hagen TL. **(2004)** Int. J. Cancer 109: 442-448.
39. **Bulger EM**, Maier RV. **(2000)**. Lipid mediators and the pathophysiology of critical illness. **Crit Care Med** 28: N27.
40. **Calunga JL**, Trujillo Y, Menéndez S, Zamora Z, Alonso Y, Merino N, Montero T. **(2009)** Ozone oxidative post- conditioning in acute renal failure. **Journal of Pharmacy and Pharmacology** 61: 1-7.
41. **Candelario-Jalil E**, Mohammed-Al-Dalain S, Fernández OS, Menéndez S, Pérez-Davison G, Merino N, Sam S, Ajamieh HH. **(2001)** Oxidative preconditioning affords protection against carbon tetrachloride-induced glycogen depletion and oxidative stress in rats. **J Appl Toxicol** 21:297-301.

42. **Carpendale MT**, Freeberg J, Griffiss JM. (1993) Does ozone alleviate AIDS diarrhea? **J Clinic Gastroenterol** 17:142-145.
43. **Carrillo-Esper R**, Nunez-Monroy FN. (2001) Systemic inflammatory response syndrome: new concepts. **Gac Med Mex**137:127-34.
44. Catalá M. (2002) **Mecanismos Bioquímicos del shock endotóxico: Respuesta hepática al estrés oxidativo. Tesis de doctorado Universidad Complutense de Madrid.**
45. **Cauwels A**, Bultinck J, Broukaert P. (2005). **Cell Mol. Life Sci** 62: 1632-1640.
46. **Cauwels A.** (2007) Kidney International Nitric Oxide in shock. **Review** 1-9.
47. **Cavaillon JM**, adib-Cunquy M, Fitting C, Adrie C, Payen D. (2003) Cytokine cascade in sepsis. **Scand J Infect Dis**35:535-44.
48. **Chan JYH**, Ou Chen-Chun, Wang L, Chan SHH. (2004) Heat shock protein 70 confers cardiovascular protection during endotoxemia via inhibition of NF- κ B activation and inducible ONs expression in the rostral ventral medulla. **Circulation.** 110:3560-3566.
49. **Chan SHH**, Chang KF, Ou CC, et al. (2002) Upregulation of glutamate receptors in nuclear tractus solitarii underlies potentiation of baroreceptor reflex by heat shock protein 70. **Mol Pharmacol** 61:1097-1104.
50. **Chen H**, Xing B, Liu X, Zhan B, Zhou J, Zhu H, Chen Z. (2008) Ozone oxidative preconditioning protects the rat kidney from reperfusion injury: the role of nitric oxide. **J Surg Res.** 149 (2): 287-295.
51. **Cluitmans FHM**, Esendam BHJ, Landegent JE, Willemze R and Falkenburg JHF. (2005) IL-4 down-regulates IL-2-, IL-3-, and GM-CSF-induced cytokine gene expression in peripheral blood monocytes. **Annals of haematology.** 68:293-298.

52. **Cobb JP. (2001)** Nitric oxide synthase inhibition as therapy for sepsis: a decade of promise. **Surg Infect.** 2:93-100.
53. **Cochrane J, Williams BT, Banerjee A, Harken AH, Burke TJ, Cairns CB, Chapiro JI. (1999)** Ischemic preconditioning attenuates functional, metabolic and morphologic injury from ischemic renal failure in the rat. **Renal Failure** 21:135-145.
54. **Crosb H A, Bion JF, Penn CW, Elliot SJ. (1994)** Antibiotic-induced release of endotoxin from bacteria in vitro. **J Med Microbiol** 40: 23-30.
55. **Cross CE, Reznick AZ, Packer L, Davis PA, Suzuki YJ, Halliwell B. (1992)** Oxidative damage to human plasma proteins by ozone. **Free Rad Res Commun** 15:347-352.
56. **Cuzzacrea S. (2005)** Shock, inflammation and PARP. **Pharmacol Res** 52(1):72-82.
57. **Cuzzocrea S, Costantino G, Mazzon E and Caputi AP. (1999a)** Beneficial effects of raxofelast (IRFI 016), a new hydrophilic vitamin E like antioxidant in carrageenen-induced pleurisy. **Br J Pharmacol.** 126:407-414.
58. **Cuzzocrea S, Imperatore F, Costantino G, Luongo C, Mazzon E, Scafuro MA, Mangoni G, Caputi AP, Rossi F and Filippelli A. (2000)** Role of hyperbaric oxygen exposure in reduction of lipid peroxidation and in multiple organ failure induced by zymosan administration in the rat. **Shock** 13:197-203.
59. **Cuzzocrea S, Mazzon E, Di Paola R, Esposito E, Macarthur H, Matuschak GM, Salvemini D. (2006)** A role for nitric oxide-mediated peroxynitrite formation in a model of endotoxin-induced shock **J Pharmacol Exp Ther** 319(1):73-81.

60. **Cuzzocrea S**, Riley DP, Capute AP, Salvemini D. **(2001)** Antioxidant therapy; a new pharmacological approach in shock, inflammation, and ischemia/reperfusion injury. **Pharmacol Rev** 53:135-159.
61. **Cuzzocrea S**, Zingarelli B, Costantino G and Caputi AP. **(1999 b)** Beneficial effects of Mn (III) tetrakis (4-benzoic acid) porphyrin (Mn TBP), a superoxide dismutase mimetic, in carrageenan-pleurisy. **Free Radc. Biol. Med** 26: 26-33.
62. **Daniel PH**, Cynthia LVB, Chris EC, Alice NN, Ian AH. **(1996)** Influence of drug class and dose size on antibiotic-induced endotoxin/IL-6 release and impact on efficacy of anti-endotoxin antibody. **J. Endotoxin Res** 3: 219-227.
63. **De Caterine R**, Libby P, Peng HB, Thannickel VJ, Rajavashisth TB, Gimbrone MJr, Schin WS, Liao JK. **(1995)** Nitric oxide decreases cytokine-induced endothelial activation: nitric oxide selectively reduces endothelial expression of adhesion molecules and proinflammatory cytokines. **J Clin Invest.** 96:60-68.
64. **Demirhan B**, Bilezikci b, Haberal AN, Sevmis S, Arat Z, Haberal M. **(2008)** Hepatic parenchymal changes and histological eosinophilia as predictors of subsequent acute liver allograft rejection. **Liver transplantation**, 14 (2): 214-9.
65. **Dierickx PJ**, Nuffel GV, Alvarez I. **(2003)** Glutathione protection against hydrogen peroxide, ter-butylhydroperoxide and diamide cytotoxicity in rat hepatoma –derived Fa32 cells. **Hum Exp Toxicol** 18 (10): 627-633.
66. Dröge W. (2002) **Free radicals in the physiological control of cell function.** **Physiol REV** 82: 47.
67. [El-Beshbishy HA](#). **(2008)** Aqueous garlic extract attenuates hepatitis and oxidative stress induced by galactosamine/lipopolysaccharide in rats [Phytother Res](#) 22(10):1372-9.

68. **Exner M**, Minar MD, Mlekush MD, Sabeti MD, Amighi MD, Lalouschek MD. **(2006)** Myeloperoxidase predict progression of carotid stenosis in states of low high –density lipoprotein cholesterol. **JACC** 47: 2212-2218.
69. **Fahey TJ**, Yoshioka T, Shires GT, et al. **(1996)** The role of tumor necrosis factor and nitric oxide in the acute cardiovascular response to endotoxin. **Ann Surg** 223:63-69.
70. **Falsini S**, Cellar MP, Angiolini P, Cavuta M, Novelli GP. **(1994)** Glutathione ridotto e L-cisteine nello shock endotossico nel ratto. **Min Anest** 60: 413-418.
71. **Faraji B**, Kang HK, Valentine JL. **(1987)** Methods for determining Glutathione peroxidase activity in blood. **Clin Chem** 33:539-43.
72. **Feng NH**, Chu SJ, Wang D, Hsu K, Lin CH, Lin HI, Chin J. **(2004)** **Physiol** 47: (3) 111-20.
73. **Fink MP**. **(2001)** Cytopathic hypoxia. Mitochondria dysfunction as mechanism contributing to organ dysfunction in sepsis. **Crit Care Clin** 17:219-37.
74. **Fleming I**, Busse R. **(2003)** Molecular mechanism involved in the regulation of the endothelial nitric oxide synthase. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**; 284:R1-R12.
75. **Freise H**. **(2001)** Animal models of sepsis. **J Invest Surg**; 14:195-212.
76. **Fridovich I**. **(1998)** Oxygen toxicity: a radical explanation. **J Exp Biol** 201: 1203-1209.
77. **Fritz S**, [Hartwig W](#), [Lehmann R](#), [Will-Schweiger K](#), [Kommerell M](#), [Hackert T](#), [Schneider L](#), [Büchler MW](#), [Werner J](#). **(2008)** Prophylactic antibiotics treatment is superior to therapy on-demand in experimental necrotizing pancreatitis. **Crit Care** 16;12(6):R141.

78. **Gabrielson EW**, Yu XY, Spannhake WE. (1994) Comparison of the toxic effects of hydrogen peroxide and O₃ on cultured human bronchial epithelial cells. **Env Health Perspective** 102:972-974.
79. **Giampietri A**, Grohmann U, Vacca C, Fioretti MC, Puccetti P and Campanile F. (2000) Dual effect of IL-4 on resistance to systemic gram-negative infection and production of TNF- α . [Cytokine 12](#): 417-421.
80. **Glauser MP**, Zanetti G, Baumgartner JD and Cohen J. (1992) Septic shock: pathogenesis. **Lancet** 338. 732-736.
81. **Gonzalez W**, Fantaine V, Pueyo ME, Laquay N, Messika-Zeitoun D, Philippe m, Arnal JF, Jacob MP, Michel JB. (2000) Molecular plasticity of vascular wall during N-nitro-L-arginine-methyl ester-induced hypertension: modulation of proinflammatory signals. **Hypertension** 36:103-310.
82. **González R**, Borrego A, Zamora Z, Romay Ch, Menendez S, Hernandez F, Montero T, Rojas E. (2004) Reversion by ozone treatment of acute nephrotoxicity induced by CDDP in rats. **Mediators of inflammation** 13 (1) 13-19.
83. **Goode HF**, Cowley HC, Walker BE, Howdle PD, Wester NR. (1995) Decreased antioxidant status and increased lipid peroxidation in patients with sepsis and secondary organ dysfunction. **Crit Care Med** 23:646-51.
84. **Gordon B**, Artigas A, Dellinger P, et al. (2001) Clinical expert round table discussion at the Margaux Conference on Critical Illness: the role of activated protein C in severe sepsis. **Crit Care Med** 29: S75-S77.
85. **Greenman RL**, Schein RM, Martin MA, Wenzel RP, MacIntyre NR, Emmanuel G, Chmel H, Kohler RB, McCarthy M, Plouffe J and Russel JA. (1991) A controlled clinical trial of E5 murine monoclonal IgM antibody to endotoxin in

- the treatment of gram- negative sepsis. The XOMA Sepsis Study Group. **JAMA** 266, 1097-1102.
86. **Gurleyik G**, Yanikkaya G, Gurleyik E , Ozturk E , Dulundu E and Saglam A . (2007) Effects of Granulocyte-Colony Stimulating Factor on the Polymorphonuclear Leukocyte Activity and the Course of Sepsis in Rats with Experimental Peritonitis. [Surgery Today](#) 37: 401-405.
87. **Habing WH**, Pabst MJ, Jakoby WB. (1974) Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. **Journal of Biological Chemistry** 149: 7130-633.
88. **Hareng L**, Hartung T. (2002) Induction and regulation of endogenous granulocyte colony stimulating factor formation. **Biol Chem** 383: 1501-17
89. **Hartl FU**. (1996) Molecular Chaperons in cellular protein folding. **Nature** 381, 571-580.
90. [Hauser B](#), [Bracht H](#), [Matejovic M](#), [Radermacher P](#), [Venkatesh B](#). (2005) Nitric oxide synthase inhibition in sepsis? Lessons learned from large-animal studies. [Anesth Analg](#) 101(2):488-98.
91. **Hernández F**, Calunga JL, Figueras JT, Menéndez SC, Perdomo MA. (2005) Ozone therapy effects on blood biomarkers and lung function in asthma. **Arch Med Res**. 36: 549-554.
92. Hernández F, **Menéndez S**, **Gómez M** y **Eng L**. (1989) **Efecto de la ozonoterapia intravascular sobre el sistema de la Glutati6n peroxidasa**. Revista CENIC Ciencias Biol6gicas **20 (1-2-3): 37-40**.

93. **Heumann D**, Glauser MP. **(1996)** Anticytokine strategies for the treatment of septic shock: relevant of animal models. **Curr Top Microbiol Immunol** 216: 299-311.
94. **Hildebrand F**, Pape HC, Hoevel P, Krettek C and van Griensven M. **(2003)** The importance of systemic cytokines in the pathogenesis of polymicrobial sepsis and dehydroepiandrosterone treatment in a rodent model. **Shock** 20:338-346.
95. **Hoffman A**, Viebahn R. **(2001)** The influence of ozone on 2,3-diphosphoglycerate synthesis in red blood cell concentrates. Proceedings of the 15th World Congress of International Ozone Association in London **2001**. Medical Therapy Conference. Pp. 10.
96. **Hoffmann JN**, Vollmar B, Laschke MW, Fertmann JM, Jauch KW, Menger MD. **(2005)** Microcirculatory alterations in ischemia-reperfusion injury and sepsis: effects of activated protein C and thrombin inhibition. **Crit Care**, 9 (4) S33-S37.
97. **Hollenberg SM**, Damasius A, Eassington C, Colilla SA, Neuman A, Parrillo JE. **(2001)** Characterization of a hyperdynamic murine model of resuscitated sepsis using echocardiography. **Am J Respir Crit Care Med** 164:981-5.
98. **Holzheimer RG** and Dralle H. **(2001b)** Antibiotic therapy in intra-abdominal infections--a review on randomised clinical trials. **Eur J Med Res** 6:277-291.
99. **Holzheimer RG**. **(2001a)** Antibiotics induced endotoxin release and clinical sepsis: a review. **J Chemother**. 1(1): 159-172.
100. **Hotchkiss RS**, Kart IE. **(2003)** The pathophysiology and treatment of sepsis. **N. Engl. J. Med** 348:138-50.
101. **Hubacek JA**, Stüber F, Frohlich C, et al. **(2001)** Gene variants of the bactericidal/permeability increasing protein and lipopolysaccharide binding

- protein in sepsis patients: gender- specific genetic predisposition to sepsis. **Crit Care Med** 29:557-61.
102. **Hurtado FJ**, Gutiérrez AM, Silva N, Fernández E, Khan AE, Gutiérrez G. **(1992)** Role of tissue hypoxia as the mechanism of lactic acidosis during *E. coli* endotoxemia. **J Appl Physiol** 72: 1895-901.
103. **Hurtado FJB**, Nin VN, Rubbo AH. **(2005)** Estrés oxidativo y nitrosativo en la sepsis. **Med Intensiva** 29 (3): 159-165.
104. **Imai K**, Takeshita A, and Hanazawa SH. **(2000)** Transforming Growth Factor- β Inhibits Lipopolysaccharide-Stimulated Expression of Inflammatory Cytokines in Mouse Macrophages through Downregulation of Activation Protein 1 and CD14 Receptor Expression. **Infection and Immunity** 68:2418-2423.
105. **Inoue G.** **(2000)** Effect of interleukin-10 (IL-10) on experimental LPS-induced acute lung injury. **J Infect Chemother** 6 (1): 51-60.
106. **Jacobi CA**, Ordemann J, Zieren HV, Volk HD, Bauhofer A, Halle E et al. **(1998a)** Increased Systemic inflammation after laparotomy vs laparoscopy in our animal model of peritonitis. **Arch Surg**: 133: 258-262.
107. **Jacobs S**, Sobki S, Morais C, Tariq M. **(2000)** Effect of pentaglobin and piperacillin on survival in a rat model of faecal peritonitis: importance of intervention timings. **Acta Anaesthesiol Scand** 44:88-95.
108. **Jajdaesy-Balla A**, Doi EM, Lerner MR, et al. **(1996)** Dose response effect of in vivo administration of endotoxin on polymorphonuclear leukocytes oxidative burst. **Shock** 5: 357-361.
109. **Kadl A**, Huber J, Gruber F, Bochkov VN, Binder BR and Leitinger N. **(2002)** Analysis of inflammatory gene induction by oxidized phospholipids in vivo by

- quantitative real-time RT-PCR in comparison with effects of LPS. **Vascul Pharmacol.** 38:219-227.
110. **Ketcher M**, Cetto C, Kirdorf M. (1998) Nitric oxide in sepsis syndrome: potential treatment of septic shock by nitric oxide antagonists. **Kidney Int Suppl** 660-667.
 111. **Klosterhalfen B**, Bhardwaj RS. (1998) Septic shock, review. **Gen Pharmac.** 31(1): 25-32.
 112. **Klosterhalfen B**, Hauptmann S, Tietze L, Töns C, Winkeltau G, Küpper W and Kirkpatrick C. J. (1997b) The influence of heat shock proteins 70 induction on hemodynamic variables in a porcine model of recurrent endotoxemia. **Shock** 7: 358-363.
 113. **Klosterhalfen B**, Töns C, Hauptmann S, Tietze L, Offner F.A, Küpper W and Kirkpatrick C. J. (1996) Influence of heat shock proteins 70 and metallothionein induction by zinc-bis-(DL-hydrogenaspartate) on the release of inflammatory mediators in a porcine model of recurrent endotoxemia. **Biochem Pharmac** 52:1201-1210.
 114. **Knight JA**, Smith SE, Kinder VR, Anstall HB. (1987) Reference intervals for plasma lipoperoxides: age, sex and specimen-related variations. **Clin. Chem** 33:2289-2291.
 115. Kochkov VN and Leitinger N. (2003) **Anti-inflammatory properties of lipid oxidation products.** J. Mol. Med **81:613-626.**
 116. **Kohn G**, Wong HR, Bshesh K, et al. (2002) Heat shock inhibits TNF induced ICAM-1 expression in human endothelial cells via I kappa kinase inhibition. **Shock**17:91-97.

117. **Kotake Y**, Moore DR, Vasquez-Walden A, Tabatabaie T and Sang H .**(2003)** Antioxidant amplifies antibiotic protection in the cecal ligation and puncture model of microbial sepsis through interleukin-10 production. **Shock**, 19:252-256.
118. **Kudriavtsev EP**, Miroshin SI, Semenov, Snigorenko AS, Sidorovich IA. **(1997)** Ozone therapy of diffuse peritonitis in the early postoperative period. **Khirurgiia (Mosk)**; 36-41.
119. **Lainee P**, Ebron P, Tschoeke SK. **(2005)** Delayed neutralization of interferon gamma prevents lethality in primates with gram negative bacteremic shock. **Crit Care Med** 33:797-805.
120. **Lance S**, Terada MD. **(2002)** Oxidative stress and endothelial activation. **Crit Care Med** 30(Suppl):S186-S191.
121. **Lau SS**, Griffin TM, Mestrlil R. **(2000)** Protection against endotoxemia by HSP 70 in rodent cardiomyocytes. **Am J Physiol**, 278: H1439-H1445.
122. **Lehmann C**, Meissner K, Knoeck A, Diedrich S, Pavlovic D, Gründling M, Usichenko T, Wendt M, Birnbaum J. **(2006)** Activated protein C improves intestinal microcirculation in experimental endotoxemia in the rats. **Crit Care** 10 (6): R 157.
123. **Lehmann C**, Scheibe R, Achade M, Meissner K, Gründling M, Usichenko T, Wendt M, Hung O, Whynot S, Murphy M, Pavlovic D. **(2008)** Effects of activated protein C on the mesenteric microcirculation and cytokine release during experimental endotoxaemia. **Can J Anaesth** 55(3): 155-162.
124. **Lehmann C**, Whynot S, Mcgrath N, Atkinson C, Hung O, Issekutz T, Murphy M. **(2008)**. Antiinflammatory effects of antibiotics within the intestinal microcirculation in experimental sepsis in rats. **Can J. Anesth** 55 (1): 47.

125. Leitinger N. (2003). **Oxidized phospholipids as modulators of inflammation in atherosclerosis**. *Curr Opin Lipidol* **14:421-430**.
126. **Lekkou A**, Karakantza M, Mouzaki A, Kalfarentzos F and Gogos CA. (2004). Cytokine Production and Monocyte HLA-DR Expression as Predictors of Outcome for Patients with Community-Acquired Severe Infections. **Clin and Diag Lab Imm** 11:161-167.
127. **León OS**, Menéndez S, Merino N, Castillo R, Sam S, Pérez L, Cruz E, Bocci V (1998). Ozone oxidative preconditioning: a protection against cellular damage by free radicals. **Med Inflamm** 7:289-294.
128. **Lepper PM**, Held TK, Scheneider EM, Bolke E, Gerlach H, trautmann M. (2002) Clinical implantations of antibiotics- induced endotoxin release in septic shock. **Intensive Care Med.** 28: 824-33.
129. **Lettieri B**, Chiefari M, Vicario C. (1991) Cardiopatie ischemiche ed ozono terapia. **Giornate Meridionali di Ossigeno-Ozonoterapia**. p .6-11.
130. **Levy MM**, Macias WL, Vicent JL, Russell JA, Silva E, Trzaskoma B, Williams MD. (2005) Early changes in organ function predict eventual survival in severe sepsis. **Crit Care Med.** 33:2194-2201.
131. **Li PL**, Chao YM, Chan SHH et al. (2001). Potentiation of baroreceptor reflex response by heat shock protein 70 in nuclear tractus solitarii confers cardiovascular protection during heat stroke. **Circulation** 103:2114-2119.
132. **Liaudet L**, Oddo M. (2003) Role of Poly (adenisine diphosphate-ribose) polymerase 1 in septic peritonitis. **Curr Opin Crit Care.** 9:152-158.
133. **Lin MT**, Albertson TE. (2004) Genomic polymorphism in sepsis. **Crit Care Med**; 32:569-79.

134. **Lloyd SS**, Chang AK, Taylor FB, Janzen EG, McCay PB. (1993) Free radicals and septic shock in primates: the role of the tumor necrosis factor. **Free Rad Med** 14 223-242.
135. **Lombardo TA**, Lezcano E (2001) Morbilidad y mortalidad por peritonitis bacteriana secundaria. **Rev Cubana Med Milit** 30 (3): 145-150.
136. [Lomnitski L](#), [Nyska A](#), [Ben-Shaul V](#), [Maronpot RR](#), [Haseman JK](#), [Harrus TL](#), [Bergman M](#), [Grossman S](#). (2000). Effects of antioxidants apocynin and the natural water-soluble antioxidant from spinach on cellular damage induced by lipopolysaccharide in the rat. **Toxicol Pathol**. 28(4):580-7.
137. **Lopez A**, Lorente JA, Steingrub J, et al. (2004) Multiple-center, randomized, placebo-controlled, double –blind, study of the nitric oxide inhibitor 546C88: effect on survival in patients septic shock. **Crit Care Med**. 32:21-30.
138. **Lowry**. OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. (1978) Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J Biol Chem** 1951: 193: 165-75.
139. **Lucas KA**, Pitari GM, Kazerounian S et al. (2000). Guanylyl cyclases and signaling by cyclic GMP. **Pharmacol Rev**; 52: 375-414.
140. **Lyman GH**, Kuderer NM. (2002) Filgastrim in patients with neutropenia: potential effects on quality of life. **Drugs** 62 Suppl 1: 65-78.
141. **Ma P**, Danner RL (2002) The many faces of sepsis-induced vascular failure. **Crit Care Med**. 30:947-9.
142. **Ma Z**, Li J, Yang L, Mu Y, Xie W, Pitt B and Li S. (2004) Inhibition of LPS- and CpG DNA-induced TNF-alpha response by oxidized phospholipids. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol**. 286:L808-816.
143. **Macdonald J**, Galley HF and Webster NR. (2003) Oxidative stress and gene expression in sepsis. **Br J Anaesth** 90:221-232.

144. **Mackenzie IMJ. (2001)** The haemodynamics of human septic shock. **Anaesthesia** 56: 130-144.
145. **Madej P**, Plewka A, Madej JA, Plewka D, Mroczka W, Wilk K, Dobrosz Z. **(2007)** Ozone therapy in an induced endotoxemic shock II. The effect of ozone therapy upon selected histochemical reactions in organs of rats in endotoxemic shock. **Inflammation**. 30 (3-4):69-86.
146. **Madej P**, Plewka A, Madej JA. , Nowak M, Plewka D, Franik G and Golka D. **(2007)** Ozone therapy in an Induced Septic Shock. I. Effect of Ozonotherapy on Rat Organs in Evaluation of Free Radical Reactions and Selected Enzymatic Systems. **Inflammation**: 30 (1-2):52-58.
147. **Makino M**, Lodato RF, Stephens LC, Strelbel FR, Jenkins G, Ohmo S, Sakaguchi Y, Kostergaard J, Tomasovic SP, Bull JM. **(1996)** **Int. J. Hyperthermia** 12:617-634.
148. **Martí L**, [N. Benito](#), [José María Gatell](#), [X. Filella](#), [J. L. Marín](#), [M. Almela](#), [A. Moreno](#), [M. Sánchez](#). **(2003)** Valor de las citocinas proinflamatorias como factor de predicción de sepsis y mortalidad en el anciano con fiebre. [Med Clín 121 \(10\)](#). 361-366.
149. **Martin GS**, Mannino DM, Eaton S, Moss M. **(2003)** The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. **N. Engl. J Med**, 348:1546 -54.
150. **Matés JM. (2000)** Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species in toxicology. **Biogenic Amines** 16:53-62.
151. **McKinney WJ**, Jaskot R H, Richards JH, Costa DL, Dreher KL. **(1998)** Cytokine mediation of ozone-induced pulmonary adaptation. **Am J Respir Cell Mol Biol** 18:696–705.
152. **Medzhitov R**, Janeway CJ. **(2000)** Innate immunity. **N Engl. J. Med** 343:338.

153. **Menéndez S**, Iglesias O, Bidot C, Puga A, Carballo A. **(1995)** Application of ozone therapy in children with humoral immunity deficiency. Proceedings 12th World Congress of the International Ozone Association. **Ozone in Medicine. Lille, France**, 221-274.
154. **Minami M**, Yoshikawa H. **(1979)** A simplified assay method of superoxide dismutase activity for clinical use. **Clin. Chim. Acta** 92:337-372.
155. **Morales IA**, Perez L, Perez I. **(2000)** Peritonitis bacteriana difusa. Analisis de 4 años (1995-1999). **Rev Cubana Cir** 39 (2) 160-166.
156. **Morris Jr SM**, Billiar TR, **(1994)**. New insights into the regulation of inducible nitric oxide synthesis. **Am J Physiol** 266: E829-E839.
157. **Motew SJ**, Sam AD, Mourelatus MG, Sharma AC, Alden KJ, Ferguson JL **(1998)** Adenosine receptors antagonism affects regional resting vascular resistance during peritoneal sepsis. **J Surg Res** 80: 326-332.
158. **Muckart DJ**, Bhagwanjee S. **(1997)**. American College of Chest Physicians/ Society of Critical Care Medicine Consensus Conference definitions of the systemic inflammatory response syndrome and allied disorders in relation to critically injured patients. **Crit Care Med.** 25: 1789-95.
159. **Murry CE**, Tennings RB, Reimer KA **(1986)**. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. **Circulation** 74:1124-1136.
160. **Nakae H**, Endo S, Inada K, Takakuwa T, Kasai T, Yoshida M. **(1994)** Relationship between cytokines and leukotriene B₄ in sepsis. **Chem Path and Pharm.** 83 (2): 151-156.
161. **Nalos M**, Huang SJ, Pandit R and McLean AS. **(2006)** Endotoxin stimulated interleukin-10 production is enhanced by adenosine. Possible key to septic

- shock associated with immune deficiency? **Anaesth Intensive Care.** 34:719-723.
162. **Newton C**, McHugh SH, Widen R, Nakachi N, Klein T and Friedman H. (2000) Induction of Interleukin-4 (IL-4) by *Legionella pneumophila* Infection in BALB/c Mice and Regulation of Tumor Necrosis Factor Alpha, IL-6, and IL-1 β . **Infect Immun** 68: 5234–5240.
163. **Novelli GP.** (1997) Role of free radicals in septic shock. **Journal of Physiology and Pharmacology**, 48, 4, 517-527.
164. **Nover L.** (1991) Heat Shock Response. CRC Press, Boca Raton. FL.
165. **O’Sullivan AW**, Wang JH, Redmond HP. (2008) NF-kappaB and P38 MAPK Inhibition Improve Survival in endotoxin shock and in cecal ligation and puncture model of sepsis in combination with antibiotic therapy. **J Surg Res**; 16: Epub ahead of print.
166. **O’Neill CA**, Van der Vliet A, Hu ML, Kaur H, Cross CE, Lovie S, Halliwell. (1993) Oxidation of biologic molecules by ozone: The effect of pH. **J Lab Clin Med** 122:497-505.
167. **Ohsuka H**, Ogata A, Terasaki N, koiwa M, Kawamura S. (2006) Changes in leukocytes population after ozonated autohemoadministration in cows with inflammatory diseases. **J. Vet Med. Sci.** 68 (2): 175-178.
168. **Ozdemir D**, UysalM, Togyan k, Gonenc S, Acikgoz O, Aksu I, Ozkan H. (2007) The effect of melatonin on endotoxic-induced intestinal apoptosis and oxidative stress in infact rats. **Intensive Care Med** 33(3):511-516.
169. **Ozmen V**, Thomas WO, Healy JT, Fish JM, Chambers R, Tacchi E, et al. (1993) Irrigation of the abdominal cavity in the treatment of experimentally

- induced microbial peritonitis: efficacy of ozonated saline. **Am Surg**; 59: 297-303.
170. **Pacheco P**, [Bozza FA](#), [Gomes RN](#), [Bozza M](#), [Weller PF](#), [Castro-Faria-Neto HC](#), [Bozza PT](#). (2002) Lipopolysaccharide-induced leukocyte lipid body formation in vivo: innate immunity elicited intracellular Loci involved in eicosanoid metabolism. **J Immunol** 169(11):6498-506.
171. **Palmer RM**, Ferrige AG, Moncada S. (1987). Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. **Nature**; 327:524-526.
172. **Panacek EA**, Marshall J, Fischkoff S, et al. (2000). Neutralization of TNF by a monoclonal antibody improves survival and reduces organ dysfunction in human sepsis: results of the MONARCS trial. **Chest** 118:88S.
173. **Parker SJ**, Watkins PE. (2001) Experimental models of gram-negative sepsis. **Br J Surg** 88:186-96.
174. **Paterson R**, Galley H, Webster N. (2003). The effect of N-acetylcysteine on nuclear factor- κ B activation, Interleukin -6, interleukin 8, and intercellular adhesion molecule-1 expression in patients with sepsis. **Crit Care Med** 31:2574-8.
175. **Pathan N**, Hamingway CA, Alizadeh AA et al. (2004). Role of Inteleukin-6 in myocardial dysfunction of meningococcal septic shock. **Lancet** 363:203-09.
176. [Payabvash S](#), [Ghahremani MH](#), [Goliaei A](#), [Mandegary A](#), [Shafaroodi H](#), [Amanlou M](#), [Dehpour AR](#). (2006) Nitric oxide modulates glutathione synthesis during endotoxemia. **Free Radic Biol Med**. 15;41(12):1817-28.
177. **Pedoto A**, Nandi J, Yang ZJ, Wang J, Bosco G, Oler A, HakimT S, Camporesi EM. (2003). Beneficial effect of hyperbaric oxygen pretreatment on

- lipopolysaccharide-induced shock in rats. **Clin Exp. Pharmacol Physiol** 30 (7): 482-488.
178. **Ping Z**, Gregory JB, Jay KK, David AW, Warren R S, Jeff A and Steve N (2001). The Effects of Granulocyte Colony-Stimulating Factor and Neutrophil Recruitment on the Pulmonary Chemokine Response to Intratracheal Endotoxin. **The Journal of Immunology** 166: 458-465.
179. **Prior WA**, Uppu RM. (1993). A kinetic model for competitive reactions of ozone with amino acid residues in proteins in reverse micelles. **J Biol Chem** 268:3120-3127.
180. **Pritts TA**, Wang Q, sun X, et al. (2002) The stress response decreases NF- κ B activation in time of endotoxemia mice. **Shock** 18:33-37.
181. **Pryor WA** (1994). Mechanisms of radical formation from reaction of ozone with target molecules in the lung. **Free Rad Biol Med** 17:451-465.
182. **Rabell A**, S. Menéndez, P.L Alonso, F Gutiérrez, J Valdés, A Díaz, A. Ruibal, M Gómez, S Menéndez. (1989) La terapia con ozono y la prevención de la sepsis en el enfermo crítico. **Revista CNIC de Ciencias Biológicas**, 20, 1-2-3, 124-127.
183. **Radi R**, Denicola A, Ferrer G, Alvarez B, Rubbo H. (2000) The biological chemistry of peroxynitrite. En: Ignarro L, editor. Nitric Oxide Biology and Pathobiology. San Diego: Academic Press: 57-82.
184. **Remick DG**, Bolgos GR, Siddiqui J, Shin J, Nemzek JA. (2002) Six at six: interleukin -6 measured 6 h after the initiation of sepsis predict mortality over 3 days. **Shock**, 17:104-8.

185. **Remick DG**, Douglas R Call, Samuel J E, David EN, Pia N, Jean AN, Gerald EB. **(2001)** Combined immunotherapy with soluble tumor necrosis factor receptors plus interleukin 1 receptor antagonist decreases sepsis mortality. **Crit Care Med Vol 29 (3) 473-481.**
186. **Remick DG**, Garg SJ and Newcomb DE. **(1998)** Exogenous interleukin-10 fails to decrease the mortality or morbidity of sepsis. **Crit Care Med**; 26: 895-904.
187. **Remick DG. (2007)** Pathophysiology of sepsis. **American Journal of Phathology.** 170: 1435, 1444.
188. **Roche Y**, Fay M, Gougerot Poccidalo MA. **(1988)** Interleukin-1 production by antibiotic treated human monocytes. **J Antimicrob. Chemother** 21 (5): 597-607.
189. **Rockett KA**, Awburn MM, Aggarwal BB, Cowden WB, Clark IA **(1992)**. In vivo induction of nitrite by tumor necrosis factor, lymphotoxin and interleukin 1: possible roles in malarial. **Infect Immune** 60:3725-30.
190. **Romagnani S (1992)** Type 1 T helper and type 2 T helper cells: Functions, regulation and role in protection and disease. **International Journal of Clinical & Laboratory Research**; 21:152-158.
191. **Rossi MA**, Celes MR, Prado CM, Saggiro FP. **(2007)** Myocardial structural changes in long-term human severe sepsis/septic shock may be responsible for cardiac dysfunction. **Shock** 27 (1): 10-18.
192. **Rubbo H**, Radi R, Anselmi D, Kirk M, Barnes S, Butler J, Eiserich JP, Freeman BA. **(2000)** **J Biol Chem** 275: 10812-10818.
193. **Russel JA. (2008)** The current management of septic shock. **Minerva Med** 99(5): 431-458.

194. **Schor N. (2002)** Acute renal failure and the sepsis syndrome. **Kidney International** 61:764-776.
195. **Schulz S, Nüsing RM. (2005)** Ozone treatment stimulates vascular prostacyclin synthesis. Memorias del 14 congreso Científico Internacional del Centro Nacional de Investigaciones Científicas. 27-30 de junio. Ciudad de La Habana.
196. **Schulz S, Rodriguez Z, Mutters R, Menéndez S, Bette M. (2003)** Repetitive pneumoperitoneum with ozonized oxygen as a preventive in lethal polymicrobial sepsis in rats. **Eur Surg Res**; 35: 26-34.
197. **Sener G, Sehirli O, Letinel S, Ercan F, Yuksel M, Gedik N, Yegen BC. (2005)** Amelioration of sepsis –induced hepatic and ileal injury in rats by the leukotriene receptor blocker montelukast. **Prostaglandins leukot Essent Fatty Acids** 73 (6):453-63.
198. **Sharshar T, Gray F, Lorin de la Grandmaison G, et al. (2003)** Apoptosis of neurons and cardiovascular autonomic centres triggered by inducible nitric oxide synthase alter death from septic shock. **Lancet** 362:1799-1805.
199. **Smith HW, Tinkelstin N. (1945)** The renal clearance of substitute hipuric acid derivative and other aromatics acids in dog and man. **J Clin Invest** 24:380–88.
200. **Solana H, Rodriguez J, Lanusse C. (2001)** Comparative metabolism of albendazole sulphoside by different helminto parasites. **Parasitol Res** 87: 275-280.
201. **Spieker M, Peng HB, Liao JK. (1997)** Inhibition of endothelial vascular cell adhesion molecule-1 expression by nitric oxide involves the induction and nuclear translocation of I κ B α . **J Biol Chem** 272: 30969-30974.

202. **Stamme C**, Bundschuh DS, Hartung T, Gebert U, Wollin L, Neusing R, Wendel A, Uhlig S. **(1999)** Temporal sequence of pulmonary and systemic inflammatory response to grade of polymicrobial peritonitis in mice. **Infect Immun.** 67:5642-50.
203. [Suliburk JW](#), [Gonzalez EA](#), [Kennison SD](#), [Helmer KS](#), [Mercer DW](#). **(2005)** Differential effects of anaesthetics on endotoxin-induced liver injury. [J Trauma.](#) 58(4):711-716.
204. [Suliburk JW](#), [Helmer KS](#), [González EA](#), [Robinson EK](#), [Mercer DW](#). **(2005)** Ketamine attenuates liver injury attributed to endotoxemia: role of cyclooxygenase-2. [Surgery.](#) 138(2):134-40.
205. **Tedgui A** Maklat Z. **(2001)** Anti-inflammatory mechanism in the vascular wall. **Circ Res** 88:877-887.
206. **Tjandramaga TB**, Mullie A, Verbesselt R, De Schepper PJ and Verbist L: **(1978)** Piperacillin: human pharmacokinetics after intravenous and intramuscular administration. **Antimicrob Agents Chemother** 14:829-837.
207. **Turnage RH**, Magee JC, Guice KS, Myers SI Oldham KT. **(1997)** Complement activation by the hydroxyl radical during intestinal reperfusion. **Shock**; 7: 98-104.
208. **Vallet B.** **(2002)** Endothelial cell dysfunction and abnormal tissue perfusion. **Crit Care Med** 30:S229-34.
209. **Van der Poll T**, van Deventer SJH. **(1999)** Cytokines and anticytokines in the pathogenesis of sepsis. **Infec. Dis Clin. N. Am.** 13: 413-426.
210. **Van der Poll T.** **(2001)** Immunotherapy of sepsis. **Lancet Infect Dis** 1:165-174.

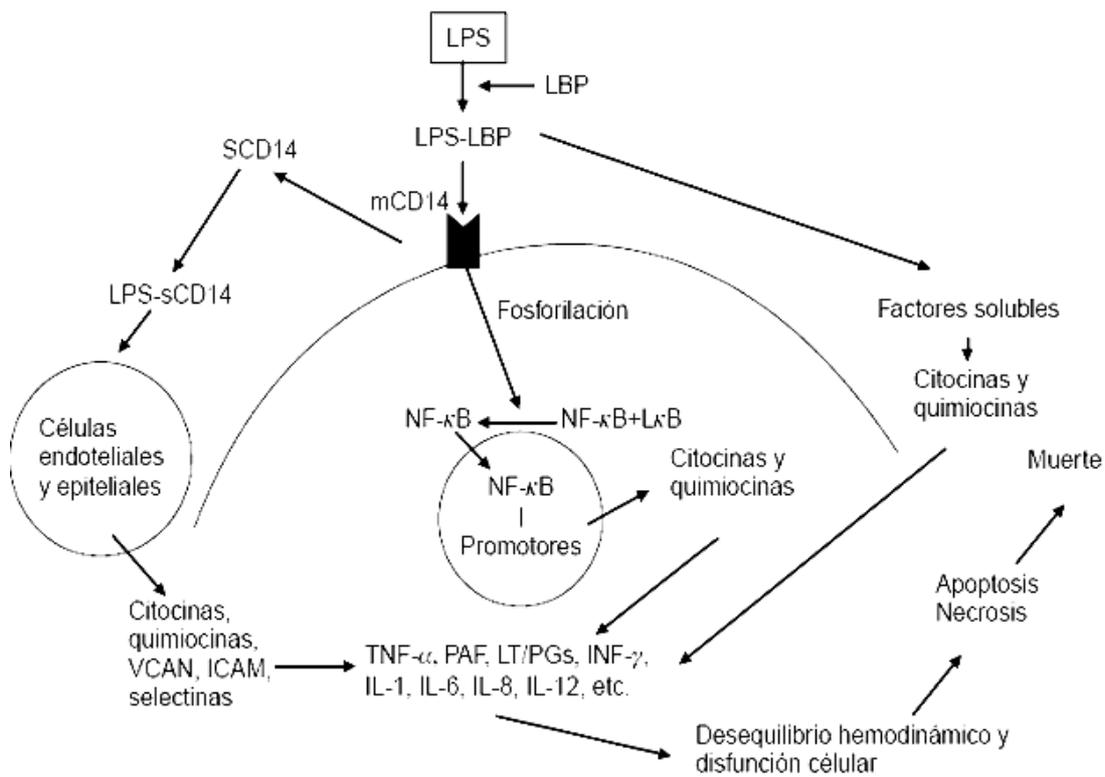
211. **Vianna RC**, Gomes RN, Bozza FA, Amancio RT, Bozza PT, David CM and Castro-Faria-Neto HC (2004). Antibiotic treatment in a murine model of sepsis: impact on cytokines and endotoxin release. **Shock**. 21:115-120.
212. **Victor VM**, De la Fuente M. (2003) Several Functions of Immune Cells in Mice Changed by oxidative stress Caused by endotoxin. **Physiol. Res**: 52: 789-796.
213. **Viebahn R.** (1994) The use of ozone in Medicine. 2nd Rev. Hang Heidelberg Ed. Germany, 22, 71.
214. **Viebahn R.** The use of ozone in medicine. 3rd English ed. Iffezheim, Germany: ODREI-publishers, 1999:95-119.
215. **Volk HD**, Reinke P, Docke WD. (2000) Clinical aspect: from systemic inflammation to "immunoparalysis". **Chem. Immunol.** 74:162-77.
216. **Wan L**, Bellomo RA, Ronco CB. (2003) The pathogenesis of septic acute renal failure. **Current Opinion in Critical Care. Crit Care Med** 9:496-502.
217. **Warren HS**, Danner RL and Munford RS. (1992) Antiendotoxin monoclonal antibodies. **N. Engl. J. Med.** 326, 1153-1157.
218. **Watanabe H**, Kobayashi A, Yamamoto T, Suzuki S, Hayashi H, Yamazaki N. (1990) Alterations of human erythrocyte membrane fluidity by oxygen-derived free radicals and calcium. **Free Rad. Biol. Med.** 9: 507-514.
219. **Watanabe H**, Numata K, Ito T, Takagi K and Matsukawa A. (2004) Innate immune response in Th1- and Th2-dominant mouse strains. **Shock** 22:460-466.
220. **Wheeler A**, Bearnard G. (1999) Treating patients with severe sepsis. **N Engl J Med** 340:207-14.
221. **Witzenbichler B**, Westermann D, Kneuppel S, Schultheiss HP, Tschope C (2005). Protective role of Angiopoietin-1 in endotoxic shock. **Circulation.** 111:97-105.

222. **Wong HR**, Ryan M and Wispe H. **(1997)** The heat shock response inhibits inducible nitric oxide synthase gene expression by blocking I- κ B degradation and NF- κ B nuclear translocation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 231: 257-263.
223. **Wu CC. (2006)** Possible therapies of septic shock: Based on animal studies and clinical trials. **Current Pharm Design.** 12:3535-3541.
224. **Yan SB**, Dhainaut JF **(2001)**. Activated protein C versus protein C in severe sepsis. **Crit Care Med** 29:S69-S74.
225. **Young M** and Plosker GL. **2001)** Piperacillin/tazobactam: a pharmacoeconomic review of its use in moderate to severe bacterial infections. **Pharmacoeconomics** 19:1135-1175.
226. **Zamora Z, J** Turrent, S. Menéndez, A Carballo. **(1998)** Anafilaxia cutánea pasiva en ratas usando suero de ratones previamente tratados con ozono mediante insuflación rectal. **Revista CENIC Ciencias Biológicas** 29 (3): 125-127.
227. **Zanotti S**, Kumar A, Kumar A. **(2002)** Cytokine modulation in sepsis and septic shock. **Expert Opin. Investig Drugs** 11:1-15.
228. **Zarcovic N. (2003)** **Mol Aspect Med**; 24: 281-291.

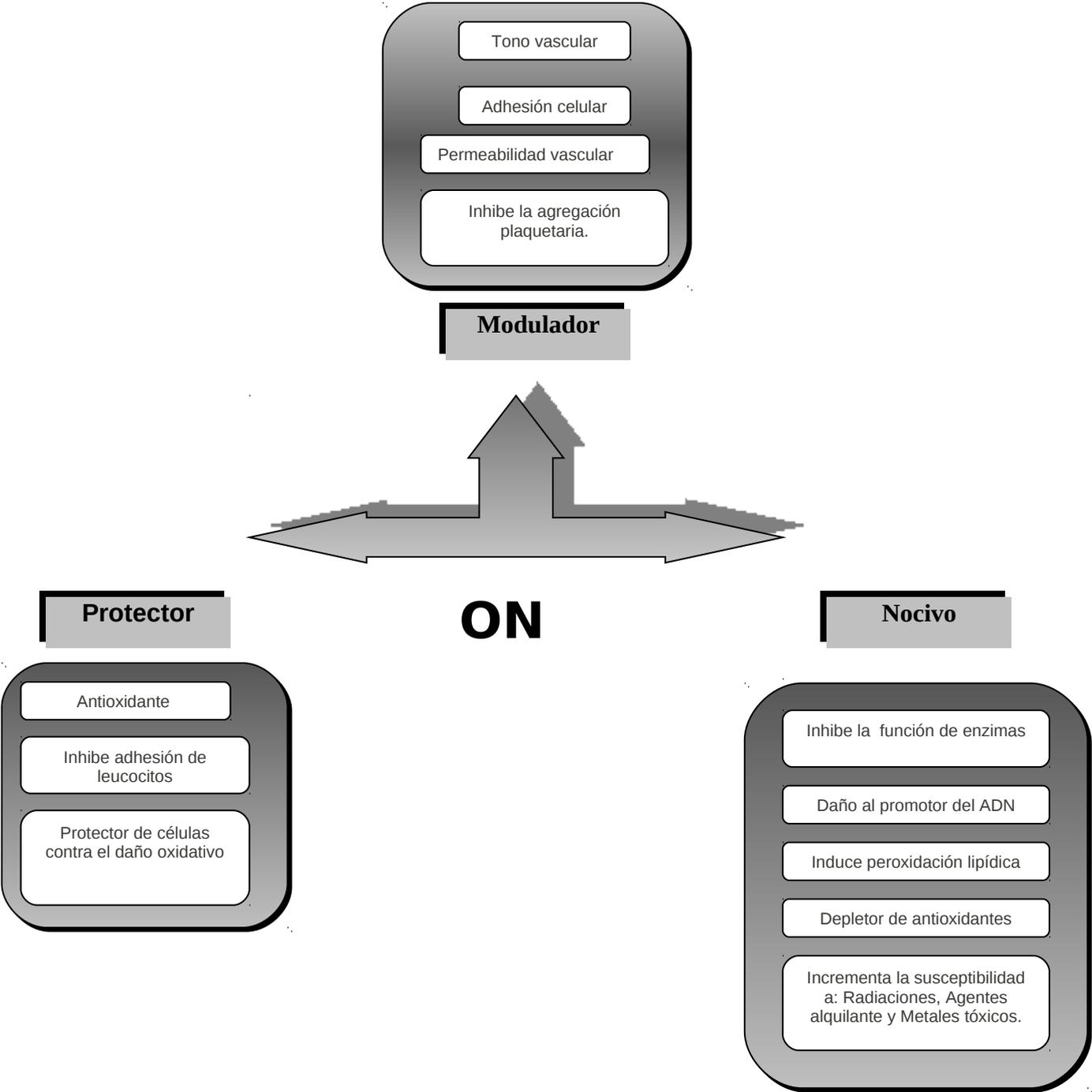
Anexo 1. Definiciones relacionadas con la sepsis (2001, Colegio Americano de Farmacología Clínica y la Sociedad de Cuidados Críticos)

Concepto	Descripción
Síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SRIS)	Es la respuesta sistémica a una gran cantidad de estímulos manifestada por dos o más de los siguientes criterios: <ol style="list-style-type: none"> 1. F.Card. >90/min 2. F. Resp. >20/min o Pa CO₂ < 32 mmHg. 3. Leucocitos > 12,000 mm³, < 4,000mm³ o < 10% de bandas 4. Temp. >38 o C o < 36 o C
Sepsis	Es la Respuesta Inflamatorio Sistémica (RIS). El diagnóstico requiere al menos dos criterios del SRIS más un proceso infeccioso evidente.
Sepsis severa	Sepsis asociada con disfunción orgánica, hipo perfusión o hipotensión que responde a hidroterapia. La hipoperfusión puede incluir, deficiente utilización de oxígeno con acidosis láctica, oliguria o alteraciones agudas en el estado mental.
Choque séptico	Hipotensión inducida por sepsis (tensión arterial sistólica <90 mmHg o una diferencia de 40 mmHg en relación al basal) a pesar de la reanimación hídrica hay hipoperfusión, inflamación sistémica, puede incluir, acidosis láctica, oliguria o alteraciones agudas en el estado mental
Disfunción orgánica Múltiple (DOM)	Función orgánica alterada en un paciente críticamente enfermo en la que la hemostasia no puede mantenerse sin intervención, caracterizado por una acidosis profunda, hiporespuesta vascular, fallo multiorgánico y muerte como fase terminal.

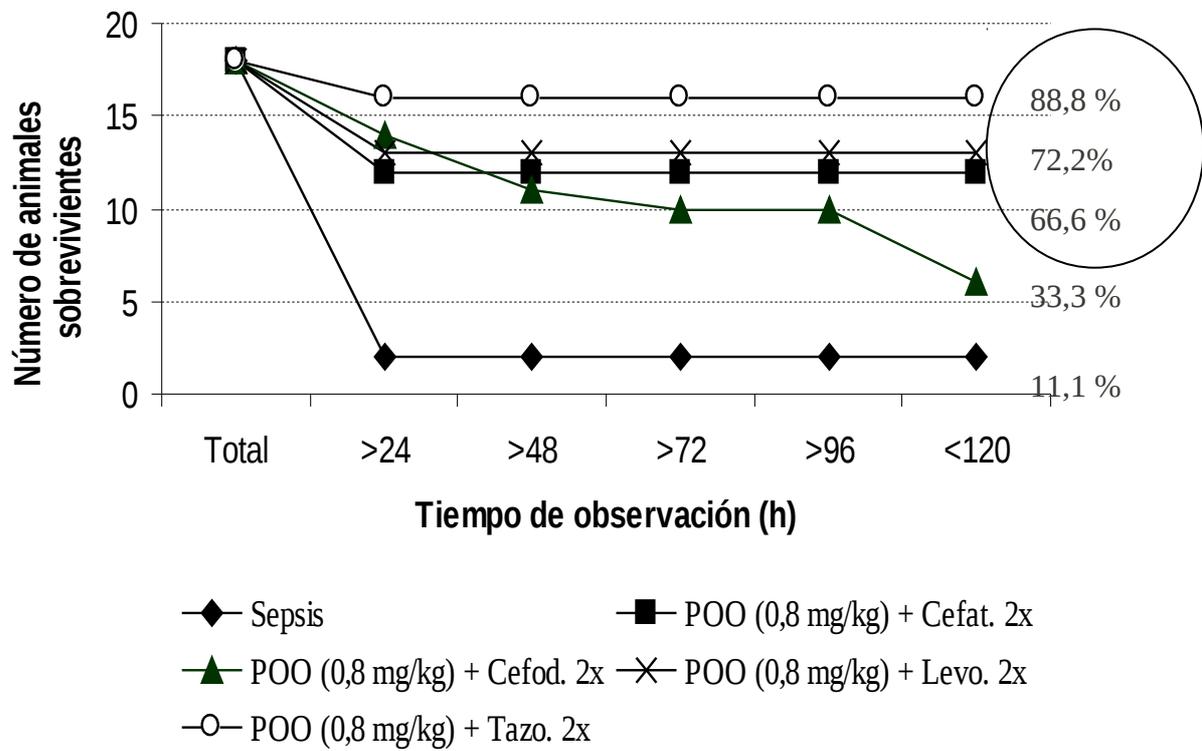
Anexo 2. Eventos moleculares involucrados en la patogénesis del choque séptico. LPS- Lipopolisacárido, LBP-Proteína que une al LPS, mCD14- Receptor de membrana CD14, sCD14- Receptor soluble CD14. **Revista Mexicana Med Crit yTerapia Intensiva Vol XVIII, No 6, 2004**



Anexo 3. Efectos biológicos protectores, moduladores y nocivos del óxido nítrico.
Grisham 1999.



Anexo 4. Efecto del POO combinado con diferentes antibióticos sobre la sobre la supervivencia hasta las 120 h en ratas con sepsis peritoneal.



Sepsis+Antibiótico

POO + Sepsis+Antibiótico

Cefodicina

A

E

B

F

Cefatoxina

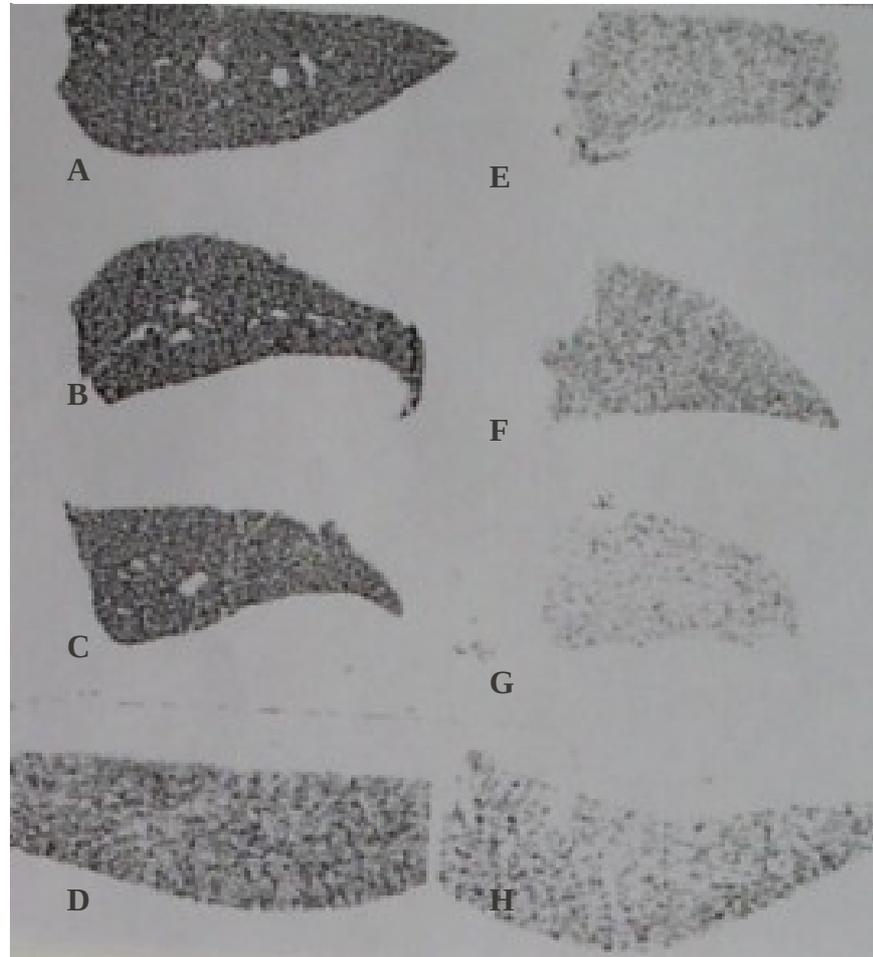
C

G

Levofloxacin

D

H



Anexo 5. Expresión de IL1- β RNAm en el tejido hepático de ratas.

Detección autoradiográfica de IL-1 β ARNm en el tejido hepático por análisis de hibridación in situ. Muestras representativas de tejido hepático de los grupos experimentales tratados con antibiótico (A-D) y los preconditionados con Ozono en combinación con los antibióticos (E-H).

Taxobactam

Anexo 6. En documento PPT.

Publicaciones del tema de tesis

1. **Zamora Z**, S. Schulz, Y González, S. Menéndez. **(2002)**. Aplicación intraperitoneal del ozono aplicado en un modelo de sepsis postoperatoria en ratas. *Revista Mexicana de Ciencias farmacéuticas* 33 (2), 13-17.
2. Schulz S, **Zamora Z**, B Mutters R, Menéndez S, Bette M. **(2003)** Repetitive pneumoperitoneum with ozonized oxygen as a preventive in lethal polymicrobial sepsis in rats. **Eur Surgery Res.** 2003; 35:26–34.
3. **Zamora Z**, A. Borrego, O López, R. Delgado, S. Menéndez, S. Schulz. Inhibition of TNF. **(2004)** Alpha release during endotoxic shock by Ozone Oxidative preconditioning in Mice. **ArzneimForsch Drug Res.**, 54, No.12, 906-909.
4. **Zamora ZB**, Borrego A, López OY, et al. **(2005)** Effects of Ozone Oxidative Preconditioning on TNF- α Release and Antioxidant-Prooxidant Intracellular Balance in mice during Endotoxic Shock. **Mediators Inflamm.**; 1:16-22.
5. Bette M, Nusring RM, Mutters R, **Zamora Z**, Menéndez S, Schulz S. **(2006)** Efficiency of Tazobactam/Piperacillin in lethal peritonitis is enhanced after preconditioning of rats with O₃/O₂-pneumoperitoneum. **Shock**; 1:26-29.
6. González R, **Zamora ZR**, Alonso Y. Citocinas inflamatorias y sus acciones y efectos en la sepsis y el choque séptico. **Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas 2007, Vol 26 No 4.**
7. **Zamora Z**, Menéndez S, González R y Schulz S. **(2007)** Efecto de la Mezcla ozono/oxígeno combinado con levofloxacina en un modelo de sepsis peritoneal en ratas. **REDVET Vol VIII, No 9.** <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n090907.html>.
8. **Zamora Z**, D Guanche, R González, F Hernández, Y Alonso and S Schulz. **(2009)** Preconditioning with Ozone/Oxygen mixture induces reversion of some indicators of oxidative stress and prevents organic damage in rats with faecal peritonitis. **Inflammation Research.** 58 (7): 371 - 375
9. González R, **Zamora Z**, A Borrego, R Delgado, S Schulz and Y Alonso. **(2009)** Ozone Oxidative Preconditioning Reduced Nitrite Levels in Blood Serum in LPS - Induced Endotoxic Shock in Mice **Inflammation Research** 58 (8): 441 – 443.
10. González R, **Zamora Z** y Alonso Y. **(2009)** Citocinas anti-inflamatorias y sus acciones y efectos en la sepsis y el choque séptico. **REDVET (Revista Electrónica Veterinaria); Vol 10 (8). BDPI.**

Eventos más importantes en los que se han presentado trabajos relacionados con el tema de tesis.

1. 15th Ozone World Congress, Inglaterra, Londres. 10-15 de septiembre 2001.
2. Biotecnología 2003, CIGB, 24-28 de noviembre 2003.
3. 4to Simposio Internacional de Aplicaciones del Ozono. 6- 9 de abril 2004.
4. Pharmacology Havana 2004, Cuba 12-15 octubre del 2004.
5. 17h Ozone World Congress, Strasbourg, France 27-30 de junio, 2005
6. I International Congress of Therapeutics. Caracas, Venezuela. 27-29 de octubre. 2005.
7. FAPRONATURA 2006, Varadero, Cuba, 20-24 de noviembre.
8. HAVANA REDOX 2007, 25-27 de Enero.
9. Pharmacology Havana 2007. 11-14 de diciembre.
10. 5to Internacional Simposio Internacional de aplicaciones del Ozono Habana, Cuba 23-26 de abril 2007.