

Sistema de diagnóstico computadorizado para la clasificación del estrés oxidativo en un modelo de sepsis peritoneal en ratas

Dailen Guanche Gallardo, Frank Hernández Rosales, Zullyt B. Zamora Rodríguez y Yaima Alonso González.

Departamento de Biomedicina, Centro de Investigaciones del Ozono, Centro Nacional de Investigaciones Científicas, Calle 230 y Avenida 15, Reparto Siboney, Playa, Apartado Postal 6414, Ciudad de La Habana, Cuba. Correo electrónico: dailen.guanche@cnic.edu.cu

Recibido: 7 de marzo de 2008. Aceptado: 19 de diciembre de 2008.

Palabras clave: estrés oxidativo, sistema diagnóstico, choque endotóxico, actividad antioxidante.
Key words: oxidative stress, system diagnoses, endotoxic shock, antioxidant activity.

RESUMEN. Gran número de estudios experimentales han argumentado acerca del papel relevante del estrés oxidativo en el fallo de órganos que ocurre durante la sepsis y el choque endotóxico. Sin embargo, la clasificación del grado de estrés oxidativo de los órganos afectados no ha sido estudiada, siendo esta elucidación importante para el conocimiento de los mecanismos involucrados en la secuencia del fallo multiorgánico. El presente estudio compara el resultado de la evaluación convencional de biomarcadores redox con la utilización de un sistema computacional para clasificar el grado de estrés oxidativo presente en hígado y pulmón de ratas con sepsis peritoneal inducida mediante inoculación de materia fecal. Se determinaron marcadores de la actividad antioxidante y prooxidante a las 12 h de inducida la sepsis. En el análisis convencional, se encontró que solamente las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico y la enzima catalasa estaban significativamente aumentadas en el tejido hepático de los animales con sepsis, en tanto que no se obtuvieron cambios en los biomarcadores de dienos conjugados, glutatión peroxidasa y superóxido dismutasa. En las muestras de pulmón no se hallaron diferencias significativas en ninguno de los biomarcadores estudiados, respecto de los animales sin sepsis. La introducción en el sistema computacional de los valores de tales biomarcadores, mostró estrés oxidativo con diferencias significativas desde el punto de vista estadístico y biológico, tanto en el hígado como en el pulmón de los animales con sepsis. El sistema arrojó una clasificación de grado 3 (estrés oxidativo severo) para el hígado y grado 2 (estrés oxidativo moderado) para el pulmón. Estos resultados sugieren que la secuencia de propagación del daño orgánico sucede primero en el tejido hepático antes que en el pulmonar, así como la utilidad del sistema computacional para la evaluación del estrés oxidativo *in vivo*.

ABSTRACT. Great numbers of experimental studies have argued about the relevant role of the oxidative stress to the organ failure occurring in sepsis and endotoxic shock. However, there are no reports about the classification of oxidative stress grade of the affected organs. This elucidation is very important for the knowledge of involved mechanisms in the sequence of multi-organ failure. The present study compares results from conventional evaluation of redox biomarkers with those obtained from utilization of a computer system for diagnosis to classify the grade of oxidative stress present in liver and lung. Liver and lung were the organs studied from rats with peritoneal sepsis induced by faecal material. Organs were extracted 12 h after induction of sepsis. Conventional analysis showed that only thiobarbituric acid reactive substances and catalase were significantly increased in the hepatic tissue of septic animals. No significant changes in conjugated dienes, glutathione peroxidase and superoxide dismutase were found. In the lung of these animals were found no significant difference in all biomarkers. Values from such biomarkers were introduced in the computer system. Evaluation by the system showed oxidative stress with significant differences from statistical and biological point of view in the liver and lung of septic animals. A classification of grade 3 (severe oxidative stress) in the liver and grade 2 (moderated oxidative stress) in the lung was obtained from the system. These results suggest that hepatic tissue is before affected than the lung in the sequence of organic failure propagation, and demonstrate the utility in using the computer system for oxidative stress evaluation *in vivo*.

INTRODUCCIÓN

La peritonitis fecal en el hombre puede ser originada por diversas causas, dentro de las cuales se encuentra la perforación intestinal patológica como resultado de diverticulitis, carcinoma de colon y trauma abdominal penetrante.¹ Los diferentes modelos animales que imitan

los signos y hallazgos vistos en la sepsis humana²⁻⁷ son corrientemente utilizados en la evaluación de medicamentos y diferentes terapias.⁸⁻¹¹ La sepsis que lleva al choque endotóxico por materia fecal es una condición patofisiológica progresiva que puede conducir a la disfunción múltiple de órganos y la muerte. El modelo de

peritonitis inducido por materia fecal ha sido utilizado para estudiar varios aspectos de la sepsis severa.¹²⁻¹⁴ Este proceso da lugar a que se liberen en la cavidad peritoneal una elevada cantidad de agentes microbianos que inician los signos, síntomas, anormalidades fisiológicas y bioquímicas que caracterizan a la sepsis y al choque séptico. El organismo responde a la infección bacteriana mediante el llamado síndrome clínico de respuesta inflamatoria sistémica,¹⁵ que se desencadena por la liberación de mediadores proinflamatorios, en el cual las citocinas factor de necrosis tumoral alfa (FNT- α) e interleucina-1 beta (IL-1 β) tienen un papel protagónico.¹⁶⁻¹⁹ Estas citocinas son principalmente liberadas por los macrófagos tisulares los cuales se activan por el reconocimiento a través de sus receptores de membrana específicos para patógenos.^{20,21} Los macrófagos del tejido hepático incluyendo a las células de Kuffer y los macrófagos alveolares del pulmón, contribuyen relevantemente en el proceso séptico por ser células fijas que tienen un papel preponderante en el fenómeno de la inflamación.²² La secuencia de eventos que se producen provocan la formación y liberación de especies reactivas del oxígeno que reaccionan rápidamente con los lípidos poliinsaturados, proteínas y ácidos nucleicos, con el consiguiente establecimiento de un estado de estrés oxidativo²³⁻²⁵ responsable del daño en el tejido de los órganos del hospedero.^{26,27} Por tanto, el grado de estrés oxidativo durante la instauración de la sepsis y el choque endotóxico va a ser un detonante relevante en el proceso hacia la extensión de la morbilidad y la mortalidad del hospedero. Hoy día, muchas de las terapias que se han ensayado en este síndrome van dirigidas a la eliminación de las especies reactivas del oxígeno y con ello al control del grado de estrés oxidativo no deseado.^{8,28-31} Esto presupone que el grado de estrés oxidativo que experimentan los diferentes órganos en la sepsis y el choque séptico, puede ser un indicador importante para el conocimiento de la secuencia de los daños a los diferentes órganos afectados.

En la actualidad, los estudios para determinar la presencia de estrés oxidativo en alguna patología se realizan mediante el análisis estadístico de los valores obtenidos en las determinaciones realizadas. En este método solo se tiene en cuenta el valor que ofrece la significación estadística para la interpretación de los resultados. Su validez solo se apoya en la interpretación matemática, siendo esta su principal desventaja, pues no toma en cuenta la significación biológica.

El presente trabajo se propuso como objetivo comparar la efectividad del sistema computadorizado para el diagnóstico y clasificación del grado de estrés oxidativo con el análisis estadístico convencional, en órganos de animales empleando para ello un modelo de sepsis peritoneal.

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales

Se emplearon en el estudio ratas macho adultas Wistar de 200 a 250 g de peso corporal, provenientes del Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio. Las ratas fueron mantenidas bajo condiciones controladas de temperatura (20-22 °C), humedad relativa (50-52 %) y ciclos de luz-oscuridad de 12 h. Se alimentaron con una dieta estándar y agua *ad libitum*.

Diseño experimental

Los animales fueron distribuidos en dos grupos experimentales. El primero (n = 5) fue seleccionado

como control al cual no se le indujo la sepsis, pero se le realizó una inyección intraperitoneal de una disolución de Ringer lactato (1 mL/animal). Al segundo (n = 10) se le indujo la sepsis mediante la inoculación intraperitoneal de una suspensión de 0,5 g/kg de peso, de materia fecal diluida en disolución Ringer lactato, esta materia fecal fue extraída del ciego de una rata seleccionada como donante.¹⁰

Doce horas después, a ambas inoculaciones (disolución Ringer lactato y suspensión de materia fecal), se practicó la eutanasia bajo atmósfera de éter, con el objetivo de tomar muestras del lóbulo mayor del hígado y del pulmón derecho para realizar las determinaciones de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (SRATB) y dienos conjugados (DC), como indicadores de actividad prooxidante y la actividad de las enzimas superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT) y glutatión peroxidasa (GPx), como marcadores de la actividad antioxidante.

Determinaciones bioquímicas

Los homogenados para cada órgano (10 %, p/v) fueron obtenidos empleando un homogenizador de tejido Ultraturax T25 Polytron a 4 °C. Se emplearon diferentes disoluciones amortiguadoras. Una disolución de sacarosa 0,25 mol/L con 5 mmol/L de EDTA, una de KCl 100 mmol/L con EDTA 0,3 mmol/L, otra de fosfato con Tritón X-100 al 1 %, y una de KCl 1,15 % para las determinaciones de DC, SOD, CAT y GPx, respectivamente. Para las SRATB, después del pesaje de la fracción de tejido se adicionó una mezcla de TCA al 5 % y butilato hidroxitolueno en hexano. Todos los homogenados fueron centrifugados durante 30 min a 4 °C y posteriormente fue desechado el precipitado. Los diferentes sobrenadantes se emplearon para las determinaciones.

Las SRATB se determinaron espectrofotométricamente mediante el método modificado de Botsoglou y cols.³² Para la SOD se utilizó una versión modificada del método de Minami y Yoshikawa.³³ La CAT se determinó de acuerdo con el método de Rice-Evans y Diplock³⁴ y para la GPx se utilizó una adaptación del método de Faraji y cols.³⁵ Los DC se determinaron mediante la técnica de Hu y cols. y Rao y Recknagel.^{36,37} La concentración de proteínas fue determinada por el método de Bradford.³⁸

Sistema de diagnóstico de estrés oxidativo (SDEO)

Para determinar el grado de estrés oxidativo patológico se empleó un sistema recientemente desarrollado para este fin.³⁹ Este sistema cuenta con un programa computacional que consta de un algoritmo diseñado según el sistema de redes neuronales artificiales, teniendo en cuenta que el estrés oxidativo es un fenómeno biológico de gran complejidad. El programa utiliza los resultados obtenidos en las determinaciones de los indicadores de estrés oxidativo medidos en el estudio. Como respuesta del programa resultan cuatro nuevos biomarcadores que son:

- Actividad antioxidante total (que representa la total y completa actividad de defensa antioxidante del sistema).
- Actividad prooxidante total (que representa todo el conjunto de actividades oxidantes del sistema).
- Índice redox (expresión cuantitativa del vector resultante entre ambas actividades anteriores).
- Grado (que es la medición cualitativa del estado redox).

El grado se clasifica desde el punto de vista clínico desde 0 hasta 4. Grado 0 significa *no existencia de estrés oxidativo patológico*, Grado 1 *estrés oxidativo ligero*, Grado 2 *estrés oxidativo moderado*, Grado 3 *estrés oxi-*

dativo severo y Grado 4 estrés oxidativo muy severo. El SDEO está registrado en el Centro de Derechos de Autor de la República de Cuba con el No. de Registro 3313-2006.

Análisis estadístico

Los resultados se expresan mediante la media aritmética más menos la desviación estándar. El análisis estadístico entre grupos se realizó mediante el empleo del programa estadístico comercial STATISTICA 6.0 para PC, empleando la prueba de Mann-Whitney para muestras independientes.

RESULTADOS

Al evaluar los resultados mediante análisis estadístico convencional para la determinación de biomarcadores de estrés oxidativo, se observó un incremento estadísticamente significativo para la SRATB y CAT en el grupo con sepsis (Grupo 2) (Tabla 1).

En el tejido pulmonar (Tabla 2) no se observaron diferencias significativas de ninguno de los biomarcadores.

Para el análisis empleando el SDEO, se introdujeron los valores de los biomarcadores de cada animal, para su posterior evaluación y se obtuvo el promedio

aritmético por grupo. En el tejido hepático (Tabla 3) se observó que en el grupo 1, las medias para cada uno de los indicadores del SDEO (actividad antioxidante total, actividad prooxidante total, índice redox y Grado), se encontraban dentro de los rangos de referencia, donde el indicador de Grado, se corresponde con la no existencia de estrés oxidativo patológico a nivel de este órgano. En este grupo, dos animales mostraron un Grado 1, ligero, de estrés oxidativo. En el grupo 2, se muestra que la actividad antioxidante total se encontraba dentro del rango de referencia, la actividad prooxidante total estuvo por encima del rango de referencia, mientras que el índice redox se situó por debajo del rango de referencia. Ambos indicadores mostraron significación estadística con relación al grupo 1, lo que indicó la existencia de un estrés oxidativo patológico. El cambio en el índice redox se clasifica en el indicador del Grado, el cual mostró estar biológica y estadísticamente elevado, con un valor de 2.7 clínicamente representativo de un estrés oxidativo severo. El análisis individual por animal fue el siguiente: una rata con Grado 1; tres con Grado 2; cuatro con Grado 3 y dos con Grado 4.

La evaluación mediante SDEO del tejido pulmonar (Tabla 4), mostró que en el grupo 1 ninguno de los indicadores del sistema tuvo medias fuera de los rangos

Tabla 1. Estrés oxidativo empleando el análisis estadístico convencional en hígado de ratas.

Biomarcadores	Grupo	
	1	2
DC ($\mu\text{mol/L}$)	$6,82 \pm 1,76$	$8,19 \pm 3,31$
SRATB ($\mu\text{mol/g}$ proteína)	$1,38 \pm 0,65$	$3,58 \pm 1,11^{**}$
SOD (U/mg proteína)	$44,98 \pm 17,25$	$38,92 \pm 28,94$
CAT (K/mg proteína)	$4,68 \pm 1,62$	$15,47 \pm 6,61^{**}$
GPx (K/mg proteína)	$557,19 \pm 139,16$	$391,91 \pm 143,06$

****** $p < 0,01$.

Tabla 2. Estrés oxidativo empleando el análisis estadístico convencional en pulmón de ratas.

Biomarcadores	Grupo	
	1	2
DC ($\mu\text{mol/L}$)	$7,49 \pm 1,45$	$8,36 \pm 3,10$
SRATB ($\mu\text{mol/g}$ proteína)	$2,05 \pm 0,81$	$3,36 \pm 1,69$
SOD (U/mg proteína)	$33,54 \pm 12,97$	$38,82 \pm 16,71$
CAT (K/mg proteína)	$7,97 \pm 3,77$	$13,94 \pm 8,51$
GPx (K/mg proteína)	$372,96 \pm 220,96$	$186,46 \pm 91,13$

Tabla 3. Evaluación del estrés oxidativo empleando el SDEO en hígado de ratas.

Biomarcadores	Valores de referencia	Grupo		Probabilidad (p) (2 vs. 1)
		1	2	
Actividad antioxidante total	136,75 – 172,37	154,45	170,21	0,220
Actividad prooxidante total	126,58 – 165,44	152,51	267,09	0,007
Índice redox	0,940 – 1,362	1,030	0,660	0,002
Grado	0 – 0,5	0,4	2,7	0,003

$p < 0,05$.

Tabla 4. Evaluación del estrés oxidativo empleando el SDEO en pulmón de ratas.

Biomarcadores	Valores de referencia	Grupo		Probabilidad (p) (2 vs. 1)
		1	2	
Actividad antioxidante total	136,75 – 72,37	151,79	153,28	0,806
Actividad prooxidante total	126,58 – 165,44	148,94	208,03	0,014
Índice redox	0,940 – 1,362	1,021	0,769	0,019
Grado	0 – 0,5	0,2	2,0	0,012

p < 0,05

de referencia, indicando al igual que en el hígado la no existencia de estrés oxidativo patológico. En este grupo solamente un animal tuvo Grado 1 de estrés oxidativo. Para el grupo 2, la actividad antioxidante total estuvo dentro del rango de referencia del sistema, mientras que la prooxidante se incrementó marcadamente respecto a la referencia y estadísticamente significativa. El índice redox mostró medias por debajo del rango de referencia, indicando la existencia de un estrés oxidativo patológico en este órgano. El indicador de Grado también mostró un incremento desde el punto de vista biológico y estadístico que se corresponde con un estrés oxidativo patológico moderado. La evaluación por animal fue la siguiente: cuatro ratas con Grado 1, tres con Grado 2, una con Grado 3 y dos con Grado 4.

DISCUSIÓN

Está bien demostrado que la sepsis experimental mediante el modelo de la inoculación intraperitoneal de materia fecal produce un choque séptico con el consiguiente fallo múltiple de órganos,^{1-3,5,23,40} en el que el tejido hepático y pulmonar desempeñan un papel primordial. Por tal razón, en el presente trabajo se reprodujo dicho modelo sin necesidad de repetir las determinaciones que demuestran el fallo orgánico, dirigiendo la atención al diagnóstico y clasificación del estrés oxidativo asociado al fallo de los órganos afectados por el proceso séptico.

En el análisis estadístico convencional de los resultados obtenidos con los biomarcadores de las actividades antioxidante y prooxidante no se pudo obtener una interpretación concluyente de la existencia de estrés oxidativo patológico en los órganos estudiados, debido a que la mayoría de los indicadores no mostraron cambios estadísticamente significativos. Es de señalar, que si se analizan las tendencias, se observa que los biomarcadores de la actividad antioxidante mostraron disminución de la enzima GPx de ambos tejidos, decremento de la enzima SOD en hígado y aumento de la actividad de CAT tanto en hígado como en pulmón. Sin embargo, la validez en la interpretación de estos resultados carece del potencial que aporta la significación estadística, ya que solamente las SRATB y CAT tuvieron tal significación. Este tipo de análisis tiene como desventaja el hecho de caer en errores como el de favorecer una hipótesis o exagerar la importancia de pequeñas diferencias,⁴¹ así como no tomar en cuenta la significación biológica, o sea, la relación que existe entre los biomarcadores evaluados y su comportamiento dentro de la célula como una unidad funcional viva.

Mediante el SDEO se pudo determinar, en primer lugar, la existencia o no de estrés oxidativo patológico y después el grado de afectación. Se demostró que el

hígado fue afectado con mayor estrés oxidativo que el pulmón a las 12 h de provocada la sepsis. El grupo 2 mostró un estrés oxidativo *severo* para el hígado y *moderado* para el pulmón, así, se obtuvo que el 70 % de los hígados mostraron estrés oxidativo *severo* y *muy severo*; mientras que solo el 30 % de los pulmones presentaron estrés oxidativo entre *severo* y *muy severo* y el 70 % entre *ligero* y *moderado*. Si se toma en consideración que en este modelo de sepsis peritoneal a partir de las 18 hasta las 24 h de provocada la sepsis mueren del 40 al 50 % de los animales por fallo multiórgano,^{23,40} es de suponer que la cascada de eventos que conducen a estos fallos va a estar muy relacionada al grado de estrés oxidativo que presenta cada órgano en cada momento del proceso séptico,⁴² pues es conocido que la superproducción de especies reactivas del oxígeno en la sepsis guía a un estrés oxidativo *severo*, expresado hasta hoy por elevada peroxidación lipídica, elevadas concentraciones en sangre de SRATB y de DC, aumento del consumo o disminución de vitamina C, E y enzimas antioxidantes.⁴³⁻⁴⁶

La aplicación en este trabajo del sistema de diagnóstico y clasificación del estrés oxidativo, permitió determinar con gran significación biológica y estadística, la variación en los estados de oxidación-reducción de los tejidos afectados en la sepsis peritoneal.

CONCLUSIONES

La aplicación del Sistema computadorizado SDEO para diagnosticar y clasificar el estrés oxidativo, permitió evaluar de manera específica y segura la existencia y clasificación del grado de estrés oxidativo en el hígado y pulmón de ratas con sepsis peritoneal comparado con el análisis estadístico convencional. El análisis mediante este sistema también permitió comprobar que la afectación del estado redox es mayor en el tejido hepático, al sugerir que el hígado se afecta antes que el pulmón en la secuencia temporal del fallo multiorgánico.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Perdue PW, Kazarian KK, Nevola J, Low WR, Williams T. The use of local and systemic antibiotics in rat faecal peritonitis. *J Surg Res.* 1994; 57: 360-365.
2. Giantomasso DD, May CN, Bellomo R. Vital blood flow during hyperdynamic sepsis. *Chest.* 2003; 124: 1053-9.
3. Mathiak G, Szewczyk D, Abdullah F, Ovadia P, Feuerstein G, Rabinovici R. An improved clinically relevant sepsis model in the conscious rat. *Crit Care Med.* 2000; 28: 1947-52.
4. Taylor FB. Staging of the pathophysiologic responses of the primate microvasculature to *Escherichia coli* and endotoxin: Examination of the elements of the compensated response and their links to the corresponding uncompensated lethal variants. *Crit Care Med.* 2001; 29: 78-89.

5. Garrido AG. Efeitos hemodinâmicos sistêmicos e regionais da infusão de cristalóides em modelo experimental de choque séptico hipodinâmico [Tese - Doutorado] Universidade de São Paulo – Faculdade de Medicina; 2003.
6. Goldfarb RD, Marton A, Szabó E, Virág L, Salzman AL, Glock D, *et al.* Protective effect of a novel, potent inhibitor of poly (adenosine 5'-diphosphate-ribose) synthetase in a porcine model of severe bacterial sepsis. *Crit. Care Med.* 2002; 30: 970-80.
7. Pittet JF, Pastor CM, Morel DR. Spontaneous high systemic oxygen delivery increases survival rate in a wake sheep during sustained endotoxemia. *Crit Care Med.* 2000; 28: 496-503.
8. Zamora ZB, Borrego A, López OY, Delgado R, González R, Menéndez S, *et al.* Effects of ozone oxidative preconditioning on TNF- α release and antioxidant-prooxidant intracellular balance in mice during endotóxico shock. *Mediat. Inflamm.* 2005; 1: 16-22.
9. Zamora ZB, Borrego A, Lopez OY, Delgado R, Menéndez S, Schulz S. Inhibition of tumor necrosis factor alpha release during endotóxico shock by ozone oxidative preconditioning in mice. *Arzneim-Forsch/Drug Res.* 2004; 12: 906-909.
10. Bette M, Nusing RM, Mutters R, Zamora ZB, Menendez S, Schulz S. Efficiency of tazobactam/piperacillin in lethal peritonitis is enhanced after preconditioning of rats with O₃/O₂ pneumoperitoneum. *SHOCK.* 2006; 25: 23-29.
11. Añel RL, Kumar A. Experimental and emerging therapies for sepsis and septic shock. *Expert Opin. Investing Drugs.* 2001; 10: 1471-1485.
12. Motew SJ, Sam AD, Mourelatos MG, Sharma AC, Alden KJ, Ferguson JL, *et al.* Adenosine receptor antagonism affects regional resting vascular resistance during rat peritoneal sepsis. *J Surg Res.* 1998; 80: 326-332.
13. Jacobi CA, Ordemann J, Zieren HV, Volk HD, Bauhofer A, Halle E, *et al.* Increased systemic inflammation after laparotomy vs. laparoscopy in our animal model of peritonitis. *Arch Surg* 1998; 133: 258-262.
14. Nakao A, Yasui M, Shen S, Takagi H. Immunohistochemical staining for endotoxin using horseshoe crab factor C in faecal peritonitis. *Eur Surg Res.* 1995; 27: 216-221.
15. Hotchkiss R, Kart I. The pathophysiology and treatment of sepsis. *New England J. Med.* 2003; 9: 138-149.
16. Zanotti S, Kumar A. Cytokine modulation in sepsis and septic shock. *Expert Opin Invest Drugs.* 2002; 11: 1-15.
17. Cavaillon JM, Adib-Conquy, Fitting C. Cytokine cascade in sepsis. *Scand J Infect Dis.* 2003; 35: 535-544.
18. Pérez A, Fernández L, Pérez CL, Sosa A. Mediadores de la inflamación. *Rev. Invest. Medicoquirúrgicas II.* 2004; 46-52.
19. González R, Zamora Z, Alonso Y. Citocinas inflamatorias, sus acciones y efectos en la sepsis y el choque séptico. *Rev. Cub Invest Biomédicas.* 2007; 26: 1-9.
20. Van Amersfoort ES, Van Berkel TJ, Kulper J. Receptors, mediators and mechanisms involved in bacterial sepsis and septic shock. *Clin Microbiol Rev.* 2003; 16: 379-414.
21. Vallespi MG, Ojeda M, Rodríguez I, Colas M, Magdariaga A, Hernández H. Fisiopatología y tratamiento de la sepsis. *Rev Invest Medicoquirúrgicas II.* 2004; 16-23.
22. Pérez A, Fernández L, Pérez CL, Sosa A. Factores celulares. *Rev Invest Medicoquirúrgicas II.* 2004; 3-9.
23. Jacobs S, Sobki S, Morais C, Tariq M. Effect of pentaglobin and piperacillin on survival in a rat model of faecal peritonitis: importance of intervention timings. *Acta Anaesthesiologica Scandinavica.* 2000; 44: 88-95.
24. Khinev S, Dafinova K, Koinova G, Dimitrov P, Ivanov A, Bakalova R. The induction of lipid peroxidation in the serum of patients with acute peritonitis. *Khirurgia.* 1996; 49: 27-29.
25. Koniukhova SG, Dubikaitis AI, Shabunovich LV, Strashnov VI, Belotserkovskii MV. Effects of plasmapheresis on the activity of lipid peroxidation in peritonitis. *Anesteziol Reanimatol.* 1993; 3: 62-65.
26. Victor VM, de la Fuente M. Several functions of immune cells in mice changed by oxidative stress caused by endotoxin. *Physiol Res.* 2003; 52: 789-796.
27. Goode HF, Cowley HC, Walker BE, Howdle PD, Webster NR. Decreased antioxidant status and increased lipid peroxidation in patients with septic shock and secondary organ dysfunction. *Crit Care Med.* 1992; 23: 646-651.
28. Broner CW, Shenep JL, Stidham GL, Stokes DC, Fairclough D, Schombaum GR, *et al.* Effect of antioxidants in experimental *Escherichia coli* septicemia. *Circ Shock.* 1989; 29: 77-92.
29. French GF, Thomas CE, Downes TR, Ohweiler DE, Carr AA, Dage RC. Protective effects of a cyclic nitron antioxidant in animal models of endotóxico shock in chronic bacteremia. *Circ Shock.* 1994; 43: 130-136.
30. Leach M, Frank S, Olbrich A, Pfeilschifter J, Thiermermann C. Decline in the expression of copper/zinc superoxide dismutase in the kidney of rats with endotoxic shock: Effects of the superoxide anion radical scavenger, tempol, on organ injury. *Brit J Pharmacol.* 1998; 125: 817-825.
31. Cuzzocrea S, Imperatore F, Constantino G, Luongo C, Mazzon E, Scafaro MA. Role of hyperbaric oxygen exposure in reduction of lipid peroxidation and in multiple organ failure induced by zymosan administration in the rat. *Shock.* 2000; 13: 197-203.
32. Botsoglou NA, Fletouris DJ, Papageorgiou GE, Vassilopoulos VN, Mantis AJ, Trakatellis A. Rapid, sensitive and specific thiobarbituric acid method for measuring lipid peroxidation in animal tissue, food and feedstuff samples. *J Agric Food Chem.* 1994; 42: 1931-1937.
33. Minami M, Yoshikawa H. A simplified assay method of superoxide dismutase activity for clinical use. *Clin Chim Acta.* 1991; 92: 337-342.
34. Rice-Evans CA, Diplock AT. Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology. *Techniques in free radical research.* Van Knippenber PH Burdon RH, Ed., 22, Elsevier, Amsterdam, 1979:199-201.
35. Faraji B, Kang HK, Valentine JL. Methods compared for determining glutathione peroxidase activity in blood. *Clin Chem.* 1987; 33(4): 539-543.
36. Hu ML, Frankel E N, Leibovitz B E, Tappel A. L. Effect of dietary lipids and vitamin E on *in vitro* lipid peroxidation in rat liver and kidney homogenates. *J Nutr.* 1989; 119: 1574-1582.
37. Rao KS, Recknagel RO. Early onset of lipoperoxidation in rat liver after carbon tetrachloride administration. *Exp Mol Pathol.* 1968; 9: 271-278.
38. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry.* 1976; 72: 248-254.
39. Hernández F. To what extent does ozone therapy need a real biochemical control system? Assessment and importance of oxidative stress. *Arch Med Res.* 2007; 38: 571-578.
40. Zamora Z, Cepero S, González R, Schulz S. Efecto de la mezcla ozono/oxígeno combinado con levofloxacina en un modelo de sepsis peritoneal en rata. *REDVET.* 2007; 9 [Consultada: 23 de noviembre de 2007]. Disponible en: <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet.pdf>
41. Bioestadística: Métodos y Aplicaciones. versión electrónica del manual de la Universidad de Málaga: U.D. Bioestadística. Facultad de Medicina. Universidad de Málaga. [consultado 10 de noviembre del 2008] Disponible: <http://www.bioestadistica.uma.es/libro/html.htm>.
42. Mac Donald HF, Webster NR. Oxidative stress and gene expression in sepsis (Review). *Brit J Anaesth.* 2003; 90: 221-232.
43. Astiz ME, Rackow EC. Septic shock. (Review). *Lancet.* 1998; 351: 1501-1505.
44. Taylor DE, Ghio AJ, Piantadosi CA. Reactive oxygen species produced by liver mitochondria of rats in sepsis. *Arch Biochem Biophys.* 1995; 316: 70-76.
45. Novelli GP. Role of free radical in septic shock. *J Physiol Pharmacol.* 1997; 48: 517-527.