

Trabajo científico

Aplicación intraperitoneal del ozono aplicado en un modelo de sepsis postoperatoria en ratas**Intraperitoneal application of ozone in a postoperative sepsis model in rats**Zullyt Zamora R¹, Siegfried Schulz², Yousy González C¹ y Silvia Menéndez C¹.

1. Centro de Investigaciones del Ozono. Centro Nacional de Investigaciones Científicas

2. Universidad Philipps de Marbug, Alemania.

Resumen

La sepsis continúa siendo la mayor causa de muerte en muchas de las unidades quirúrgicas de cuidados intensivos; por tanto, aún se continúan desarrollando nuevos modelos experimentales para descifrar esta compleja patogenia y encontrar nuevas formas terapéuticas. En este estudio, se emplearon ratas Wistar macho (180 a 200 g) con el objetivo de evaluar el efecto profiláctico de diferentes concentraciones de ozono en un modelo de choque séptico letal. Los animales fueron divididos en cinco grupos experimentales: grupo I, no se le aplicó tratamiento; grupo II, recibió una inyección intraperitoneal de aire estéril; los grupos III, IV y V, recibieron ozono en concentraciones de 10, 50 y 100 µg/mL respectivamente, por vía intraperitoneal. El ozono aplicado profilácticamente en concentraciones de 10 y 50 µg/mL y con un tiempo de reposo de 72 h, produjo un incremento significativo en la supervivencia de los animales. Este estudio demuestra que el tratamiento previo con ozono, por vía intraperitoneal, puede proteger al 62,5 % de los animales contra la muerte.

Palabras clave: ozono, sepsis postoperatoria, peritonitis, rata, modelo experimental.

Abstract

Sepsis continues to be the major cause of death in most surgical intensive care units, therefore new experimental models are still being developed to figure out this complex pathology and to find new therapeutically methods. In this study Wistar male rats (180 to 200 g) were used to evaluate the prophylactic effect of different concentrations of ozone in septic shock model. The animals were taken at random and divided into five experimental groups: Group I, without treatment; group II, intraperitoneal injection with sterile air; and groups III, IV and V with ozone at concentrations of 10, 50 and 100 µg/mL respectively by intraperitoneal route. The results demonstrated that ozone applied prophylactically at 10 and 50 µg/mL with 72h time of resting showed a significant increase of animals survival. Ozone pretreatments intraperitoneally could protect 62,5 % of the animals against death.

Key Words: ozone, postoperative sepsis, peritonitis, rat, experimental model.

Fecha de recepción: 29 de diciembre del 2000

Fecha de aceptación: 7 de enero del 2002

Correspondencia
Zullyt Zamora R.
Centro de Investigaciones del Ozono. Centro Nacional de Investigaciones Científicas
Apartado 6412.
Teléfono 21-1335.
Fax:210233
Correo Electrónico: ozono@infomed. sld. cu

Introducción

El choque séptico continúa siendo la causa principal de muerte en la mayor parte de las unidades quirúrgicas de cuidados intensivos. El choque no es más que el resultado de la respuesta sistémica ante infecciones severas. Este síndrome se ha ido incrementando desde 1930 (1), y se pronostica que continuará en aumento su incidencia. Entre las causas que provocan un incremento en la incidencia de este síndrome, se incluyen el uso indiscriminado de fármacos citotóxicos e inmunosupresores en la práctica terapéu-

tica, así como el aumento en la incidencia de infecciones causadas por organismos resistentes a antibióticos (2-4).

La patogénesis del choque séptico es extraordinariamente compleja. Diversos microorganismos pueden generar toxinas, estimulando la liberación de potentes mediadores que actúan sobre el sistema vascular y el miocardio (5).

En la terapia se ha hecho énfasis en el empleo de antibióticos específicos, el seguimiento cuidadoso y la hiperalimentación intravenosa. Si el choque persiste, son empleados agentes inotrópicos y vasopresores. Para aumentar la sobrevivencia a este síndrome letal (6), se utilizan sustancias farmacológicas e inmunológicas antagonistas de endotoxinas (7,8) y otros mediadores (9-12) en particular el de antagonistas de receptores para IL-1 (IL-1RA), anticuerpos monoclonales contra TNF y receptores de TNF- α ligados a inmunoglobulinas (IgG). Los resultados de estos ensayos clínicos son aun insatisfactorios. Los beneficios de esta nueva inmunoterapia no han podido ser demostrados aún.

Los antibióticos, son claramente, la primera elección en la terapia, pero también se emplean con frecuencia inadecuada en pacientes inmunocomprometidos (13).

Existen numerosos modelos animales disponibles para el estudio de la fisiopatología de procesos infecciosos, de curso séptico, *shock* y muerte (14,15).

En la mayoría de los modelos, el choque séptico es inducido por eliminación (exclusión) o ligadura del intestino, instilación de material fecal o inyección de microorganismos viables (16).

El ozono es un fuerte agente oxidante, el cual posee propiedades bactericidas. Otros estudios recientes han demostrado que el acondicionamiento con ozono previene el daño renal por isquemia (17) y el daño hepático en ratas por tetracloruro de carbono (18). A través de estudios *in vitro* también se ha confirmado que el ozono actúa como un inductor de citoquinas (19-23).

Recientemente en los estudios del choque séptico ha sido demostrado que cuando un hospedero es sometido a un estrés oxidativo determinado, éste es capaz de desarrollar un mecanismo de defensa intracelular que lo hace tolerante ante las infecciones, los daños tisulares y la muerte (24-32). El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto profiláctico o acondicionamiento de diferentes concentraciones de ozono, en un modelo de choque séptico letal.

Materiales y métodos

En el estudio se emplearon ratas Wistar macho de 180 a 200 g de peso corporal, procedentes del Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB), Habana, Cuba. Estos animales se mantuvieron durante todo el experimento en condiciones de temperatura y humedad controladas, incluyendo ciclos de luz-oscuridad, con alimentación y agua *ad libitum*. Todos los procedimientos quirúrgicos fueron realizados bajo anestesia con Rompun® 2 % (Bayer AG, Leverkusen) (10 mg/kg) y Keta-

vet® (Pharmacia, Alemania) (100 mg/kg).

El ozono se obtuvo mediante un equipo OZOMED, (Centro de Investigaciones del Ozono, Habana, Cuba).

Procedimiento experimental

Inducción de peritonitis

Se realizó una incisión pequeña en la línea media de la región abdominal para localizar y exponer el ciego, en el que se hizo una pequeña incisión, por su zona más gruesa, para extraer y pesar las heces, según la dosis calculada. Se diluyó la materia fecal con una disolución de Ringer lactato en partes iguales. Después de suturar el ciego y colocarlo en su cavidad, la disolución de la materia fecal se vertió en la cavidad abdominal. Inmediatamente se realizó la sutura de los tejidos (peritoneo, pared muscular y piel). En el periodo, los animales se observaron durante cinco días con el objetivo de registrar el tiempo de muerte.

Efecto del ozono profiláctico sobre la mortalidad

Se utilizaron 72 ratas que fueron distribuidas en cinco grupos experimentales: grupo I (control sin pretratamiento), grupo II (pretratados con aire estéril, 80 mL/kg), los grupos III, IV y V fueron pretratados con cinco aplicaciones de diferentes concentraciones de ozono: 10, 50 y 100 μ g/mL, respectivamente, por vía intraperitoneal, utilizando volúmenes del gas de 80 mL/kg). Otros estudios demuestran, que el ozono a dosis similares a las del presente experimento y aplicado por vía intraperitoneal en animales (ratas) sanos, no provoca alteraciones estructurales ni ultraestructurales en los órganos estudiados (hígado, bazo, corazón, pulmones, riñones), que pudieran ser atribuibles a la acción del ozono, demostrando la inocuidad del ozono aplicado por vía intraperitoneal y en estas condiciones experimentales (33, 34).

Después de la última aplicación de ozono, los animales se subdividieron en dos grupos (a y b). En el grupo (a), la peritonitis fue inducida 24 h después del último tratamiento con ozono, mientras que, en el subgrupo (b) esta se indujo 72 h después de la aplicación del ozono. Los animales se observaron durante 5 días posteriores a la inducción de la peritonitis. Los animales que sobrevivieron fueron sacrificados mediante dislocación cervical.

Análisis estadístico

Los resultados se procesaron estadísticamente, mediante la prueba exacta de Fisher para la comparación entre grupos ($p < 0.05$).

Resultados y discusión

Los grupos que fueron pretratados a concentraciones de ozono 10 y 50 μ g/mL y con un tiempo de reposo de 72 h antes de inducir la peritonitis, presentaron índices de so-

Tabla 1. Índice de sobrevivencia y significación estadística de los resultados

Grupo	Concentración (ozono) ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Dosis vol. (ozono) (mL/kg)	Sobrevivencia / total de animales	Sobrevivencia (%)
I	S/T	-	1/14	7
II	aire	80	4/15	26.6
III (a)	10	80	5/9	55.5
III (b)	10	80	5/8	62.5
IV (a)	50	80	3/9	33.3
IV (b)	50	80	5/8	62.5
V (a)	100	80	3/9	33.3
V (b)	100	80	2/9	22.2
$p < 0.05$	III / IV-V (a)	0.045		
$p < 0.05$	III - IV/ V (b)	0.0002		

La inducción de peritonitis fue realizada 24 h (a) y 72 h (b) después del último tratamiento.
S/T sin tratamiento.

brevivencia significativamente mayores que el resto (control sin tratamiento, tratados con aire y con elevadas concentraciones de ozono 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) (Tabla 1). Los efectos positivos del ozono se observaron en los grupos de animales que recibieron pretratamientos a bajas concentraciones de este gas, lo que pudiera indicar que ellas tienen un efecto modulador sobre la respuesta inflamatoria sistémica del organismo; lo cual se indica en un elevado índice de sobrevivencia de los animales

La importancia principal del desarrollo de estudios clínicos de peritonitis, radica en la posible prevención del elevado índice de mortalidad que dicha patología representa hoy día. La elevada mortalidad en la peritonitis séptica justifica la búsqueda de nuevas estrategias profilácticas y terapéuticas con nuevas sustancias, tales como el ozono, que constituye una nueva terapia en desarrollo. Se ha demostrado que la terapia con oxígeno hiperbárico disminuye la mortalidad en sepsis polimicrobial experimental en ratas (35). Algunos estudios han demostrado, que la disolución salina ozonizada, empleada como irrigante de la cavidad abdominal, es eficaz en el tratamiento de la peritonitis experimentalmente inducida en rata por microorganismos (36). El gas ozono posee un gran número de efectos biológicos en un amplio espectro de sistemas. Han sido muy estudiados los efectos tóxicos del ozono por vía inhalatoria (37-39), sin embargo, los estudios realizados sobre los efectos benéficos del ozono utilizando otras vías terapéuticas (40-43), aún son pobres, puesto que existen muchos prejuicios con respecto a la utilización de este gas oxidante como una terapia alternativa posible. Se han desarrollado diversos modelos experimentales de peritonitis séptica con diferente eficacia letal. La importancia del modelo que aquí se incluye los criterios siguientes:

1. La materia fecal fresca inoculada proviene individualmente de cada uno de los animales, lo cual provee una buena imitación de la situación clínica iniciada quirúrgicamente (laparotomía y cecotomía).
2. La muerte de los animales no ocurre tempranamente

entre (4 y 12 h), el máximo de mortalidad se presenta entre las 24 y 48 h, durante la fase de desarrollo de la peritonitis.

3. Hay otras formas en que se puede observar esta imitación de la situación clínica abdominal (peritonitis), tales como la formación de abscesos y diferentes formas de adherencia intraabdominal en los animales sobrevivientes.

En este estudio se obtuvo un sorpresivo efecto protector sobre la incidencia de muerte con un 62,5 % de sobrevivencia de los animales para dos de las condiciones estudiadas. Esto sólo puede ser comparado con el efecto de los antibióticos a dosis clínicas. ¿Cómo se puede explicar que el tratamiento preoperatorio con ciertas dosis de ozono aumente el porcentaje de sobrevivencia de los animales?. Es conocido que el ozono, por ser un fuerte agente oxidante, actúa como biorregulador, incrementando el metabolismo celular, activando los macrófagos pulmonares y del sistema peritoneal, estimulando los neutrófilos y la migración de monocitos en sangre humana (44-47), lo cual es beneficioso, puesto que ayuda a la eliminación de la infección. Además, el ozono activa la liberación y producción de citoquinas en los leucocitos y células epiteliales (48). Hasta el momento, todos los estudios en los que se demuestran los efectos del ozono sobre el sistema inmune celular, se corroboran que actúa como un inductor de citoquinas algunas de ellas con actividad antiinflamatoria, pero la mayoría ellos han sido realizados en células aisladas *in vitro*. Por otra parte, se ha demostrado un aumento de la capacidad fagocítica y la quimiotaxis de macrófagos alveolares de ratas expuestas al ozono (49), dado que este gas activa los mecanismos de defensa de los macrófagos, esto pudiera dar explicación a los resultados del presente estudio. El ozono al ser aplicado por vía intraperitoneal, activaría la fagocitosis de los macrófagos peritoneales y al inocular la infección esta se eliminaría rápidamente.

El amplio desarrollo del conocimiento sobre la activación de vías intracelulares, la tolerancia intracelular y los

mecanismos de estrés, se ha concluido que existe un mecanismo intracelular (entre otros) que restaura la homeostasis celular después que ésta es sometida a un estrés y choque séptico, referido específicamente a la Respuesta de Choque Térmico (RCHT) mediado por las proteínas de Choque Térmico (PCHT). La inducción de la RCHT con la subsecuente expresión de las PCHT, es uno de los mecanismos básicos inmunológicas que balancean y compensan una respuesta dominante proinflamatoria o antiinflamatoria (24). La rápida síntesis de las PCHT, le proporciona a la célula tolerancia ante un estrés que pudiera ser letal para ella. Este mecanismo de defensa puede ser iniciado por una amplia variedad de agentes, incluyendo isquemia, estrés metabólico de diferentes tipos, provocado por metales pesados (zinc) y por inyección de citoquinas como Factor de Necrosis Tumoral (TNF) e Interleuquina 1 (IL-1), la clásica hipertermia y por inyección de lipopolisacárido (LPS) (25-27). Recientes estudios han demostrado que la inducción de PCHT-70 por arsenato de sodio y calor (28, 29), reduce el índice de mortalidad y daño orgánico en un modelo de daño pulmonar inducido por sepsis. Ha sido investigado también el efecto del zinc sobre la función inmune, provocando resistencia del hospedero ante la infección (30). Se ha encontrado que el estrés térmico agudo puede proteger a la rata contra el efecto letal de LPS (31). También fue demostrado que en ratas expuestas a estrés térmico o arsenito de sodio se produce una inhibición en la inducción de la síntesis de TNF por LPS (32).

Actualmente se considera que el Factor nuclear- κ B (FN- κ B) activado se encuentra prominentemente implicado en la regulación de diversos genes involucrados en la inflamación tales como óxido nítrico sintasa inducible (ONSI), citoquinas, factores tisulares y moléculas de adhesión (50, 51). Este pudiera ser un posible mecanismo sobre el que el ozono actúe.

Conclusiones

El modelo experimental empleado fue efectivo para el estudio del ozono como nueva forma terapéutica para prevenir la muerte por choque séptico letal experimental. Este gas, aplicado intraperitonealmente y de forma profiláctica en ratas, pudo prevenir la mortalidad en la mayoría (62,5 %) de los animales tratados.

Referencias bibliográficas

1. Finland M. 1970. Changing ecology of bacterial infections as related to antibacterial therapy. *J Infect Dis*, 122: 419-31.
2. Parrillo J.E. 1983. Sepsis shock in humans: clinical evaluation, pathophysiology, and therapeutic approach. In: Shoemaker W.C., Thompson W.L., Holbrook P, and Eds. *Textbook of Critical Care*. 2d ed. Philadelphia: Saunders, 1006-23.
3. Parker M.M., Parrillo J.E. 1983. Septic shock. Hemodynamics and pathogenesis. *JAMA* 250: 3324-7.
4. Parrillo J.E. 1989. The cardiovascular response to human sepsis shock. In: Fuhrman B.P, Shoemaker WC, eds. *Critical Care:*

State of the Art. v. 10. Fullerton, California: *Society of Critical Care Medicine* 285-314.

5. Joseph E.P., Margaret M.P., Charles N., Anthony F.S., Robert L.D., Robert E.C., Frederick P.O. 1990. Septic Shock in Humans. Advances in the Understanding of pathogenesis, cardiovascular dysfunction, and therapy. *Ann Intern Med* 113: 227-242.
6. Keith A.W., Arthur E.B., Irshad H.C. 1980. Sepsis and Septic Shock- A review of Laboratory Models and a proposal. *J. Surg. Res.* 29: 189-201.
7. Greenman R.L., Schein R.M., Martin M.A., Wenzel R.P., MacIntyre N.R., Emmanuel G., Chmel H., Kohler R.B., McCarthy M., Plouffe J. And Russel J.A. 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.
8. Ziggler E.J., Fisher I.J.Jr, Sprung C.I., Straube R.C., Sadoff J.C., Foulke G.E., Wortel C.H., Fink M.P., Dellinger R.P., Teng N.N., Allen I.E., Berger H.J., Knatterud G.L., LoBuglio A.F. And Smith C.R 1991. Treatment of gram negative bacteremia and septic shock with HA-1A human monoclonal antibody against endotoxin: a randomized, double blind, placebo-controlled trial. The HA-1A Septic Study Group. *N. Engl. J. Med.*, 324: 429-436.
9. Abraham E., Wunderink R., Silverman H., Perl T. M., Naraway S. T., Levy H., Bone R., Wenzel R. P., Balk R., Allred R., Pennington J. E. And Wherry J.C. 1995. Efficacy and safety of monoclonal antibody to human tumor necrosis factor a in patients with sepsis syndrome: a randomized, controlled, multicenter clinical trial. TNF-a Mab Sepsis Study Group. *JAMA*, 273: 934-941.
10. Fisher I.J., Dhainaut J.F.A., Opal S.M., Pribble J.P., Balk R.A., Slotman G.J., Iberti T.J., Rackow E.C., Shapiro M.J., Greenman R.L., Reines H.D., Shelly M.P., Thompson B.W., LaBrecque J.F., Catalano M.A., Knaus W.A. And Sadoff J.C. 1994. Recombinant human interleukin 1 receptor antagonist in the treatment of patients with sepsis syndrome: results from a randomized, double blind, placebo-controlled trial. Phase III rhIL-1RA Sepsis Syndrome Study Group. *JAMA*, 271: 1836-1843.
11. McCloskey R.V., Straube R.C., Sanders C., Smith S.M and Smith C.R. 1994. Treatment of septic shock with human monoclonal antibody HA-1A: a randomized, double blind, placebo-controlled trial. CHES Trial Study Group. *Ann. Intern. Med.*, 121: 1-5.
12. Warren H.S., Danner R.L. And Munford R.S. 1992. Anti-endotoxin monoclonal antibodies. *N. Engl. J. Med.* 326: 1153-1157.
13. Christopher C. Baker, M.D., Irshad H. Chaudry, Harold O. Gaines, B.S, Arthur E, 1983. Base evaluation of factors affecting mortality rate after sepsis in a murine cecal ligation and puncture model. *Surg* 2(94): 331-335.
14. Wichterman K.A., Baie A.E., Chaudry I.H. 1980. Sepsis and septic shock- a review of laboratory models and a proposal. *J Surg Res*, 29: 189-201.
15. Baker Ch.C., Chaudry I.H., Gaines H.O., Baue A.E. 1983. Evaluation of factors affecting mortality rate after sepsis in a murine cecal ligation and puncture model. *Surg*, 94: 331-334.
16. Sven M.A., Kenneth N., Kjetil M., Bjarne O., Karl- Erick G. 1985. Fecal peritonitis in the rat. *Acta Chir Scand*, 151: 213-216.
17. Barber. E., Menéndez.S., León O.S., Barber M.O., Merino. N., Calunga J.L., Cruz E and Bocci V. 1999. Prevention of renal injury after induction of ozone tolerance in rats submitted to warm ischaemia. *Mediat. Inflamm.*, 8: 37-41.

18. León O.S., Menéndez S., Merino N., Castillo R., Sam S., Pérez I., Cruz E and Bocci V. 1998. Ozone oxidative preconditioning: a protection against damage by free radicals. *Mediat. Inflamm*, 7: 289-294.
19. Bocci V. 1992. Ozonization of Blood for the therapy of viral diseases and Immunodeficiencies. *A hypothesis, Med Hypoth*, 39: 30-34.
20. Bocci V., Luzzi E., Corradeschi F., Paulesu L., Di Stefano A. 1993. Studies on the biological effects of ozone: 3. An attempt to define conditions for optimal induction of cytokines, *Lymph Cytok Res* 12: 121-126.
21. Bocci V., Luzzi E., Corradeschi F., Paulesu L., Rossi R., Cardaioli E., Di Simplicio P. 1993. Studies on the biological effects of ozone: 4 Cytokine production and glutathione levels in human erythrocytes, *J. Biol. Regul. Homeost. Agents* 7: 133-138.
22. Bocci V., Paulesu L. 1990. Studies on the biological effects of ozone: 1 Induction of interferon gamma on human leukocytes, *Haematg* 75: 510-515.
23. Bocci V., Luzzi E., Corradeschi E., 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 Agents*, 8: 108-1.
24. Klosterhalfen B and Bhardwa J. 1998. Review, Septic Shock. *Gen. Pharmac.* 31:25-32.
25. Lindquist S and Craig E.A. 1988. The heat shock proteins. *Annu. Ev. Genet.* 22: 631-677.
26. Nover L. 1984. Heat Shock Response of Eukaryotic Cells. *Springer-Verlag, Berlin*. 7-10.
27. Schlesinger M. J. 1990. Heat shock proteins. *J. Biol. Chem.* 265, 12111-12114.
28. Ribeiro S.P., Villar J., Downey G., Edelson J.D. and Slutsky A.S. 1994(*). Sodium arsenite induces heat protein-72 kilodalton expression in the lungs and protects rats against sepsis. *Crit. Care Med* 22: 922-929.
29. Villar J., Ribeiro S.P., Mullen B.M., Kuliszewski M., Post M and Slutsky A.S. 1994. Induction of heat shock response reduces mortality rate and organ damage in a sepsis-induced acute lung injury model. *Crit. Care. Med* 22: 914-921.
30. Singh K.P., Zaidi S.I., Raisuddin S., Saxena A.K., Murthy R.C and Ray P.K. 1992. Effect of zinc on immune functions and host resistance against infection and tumor challenge. *Immunopharmac. Immunotoxicol* 14: 813-840.
31. Rayn A.J., Flanagan S. W., Moseley P.L. and Gisolfi C.V. 1992. Acute heat stress protects rats against endotoxin shock. *J. Appl. Physiol* 73: 1517-1522.
32. Ribiero S. P., Villar J., Li J. and Slutsky A.S. 1994(b). Stress response decreases tumor necrosis factor (TNF) protein levels in septic rats and down regulates TNF gene expression in LPS-stimulated alveolar macrophages. *Am. Rev. Respir. Dis* 149, A720.
33. González A., Aguilera J., Salgado A., Vingut J.I., Valenti J., Alerm A., Vega I., González G., Wotzkow V., González T., Menéndez S., Gómez m., Rivero R., Aragón M., Wong R., Ramírez y Limonta M. 1990. Estudio toxicológico agudo y crónico del ozono administrado por vía intraperitoneal en distintas especies. Primer Congreso Iberoamericano de Aplicaciones del Ozono. 15.
34. Barry G.H., Barber E., Menéndez S y Gómez M. 1990. Estudio estructural y ultraestructural de órganos de ratas sometidas a la administración intraperitoneal de ozono. Primer Congreso Iberoamericano de Aplicaciones del Ozono. 15-16.
35. Thom S.R., Laurermann W.M., Hart G.B. 1986. Intermittent hyperbaric oxygen therapy for reduction of mortality in experimental polymicrobial sepsis. *J. Infect. Dis.* 154: 504-510.
36. Ozmen V., Thomas W.O., Healy J.T., Fish J.M. 1993. Irrigation of the abdominal cavity in the treatment of experimentally induced microbial peritonitis: efficacy of ozonated saline. *Am. Surg* 59: 297-303.
37. Mustafa M.G., DeLuca A.J., York G.K. 1973. Ozone interaction with rodent lung. II. Effects on oxygen consumption of mitochondria. *J. Lab. Clin. Med.* 82: 357-365.
38. Menzel D.B. 1984. Ozone: an overview of toxicity in man and animals. *J. Toxicol. Environ. Health* 13: 183-204.
39. Witschi H.P. 1991. Effects of oxygen and ozone on mouse lung tumorigenesis. *Exp Lung Res* 17: 473-483.
40. Schulz S. 1986. The role of ozone-oxygen in clindamycin-associated enterocolitis in the Djungarian hamster (*phodopus sungorus*). *Lab Anim* 20: 41-48.
41. Barber E., Menéndez S., Barber M.O., Merino N., Calunga J.L. 1998. Morphological and functional renal study in kidneys of pretreated rats with ozone and submitted to warm ischemia. *Revista CENIC Ciencias Biológicas* 29(3): 178-180.
42. Zamora Z.R., Turrent J.F., Menéndez S.C., Carballo A.R. 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.
43. Lezcano I., García G., Martínez G., Molerio J., Zamora Z. 1998. Efectividad de la manteca de cacao ozonizada para el tratamiento de la candidiasis vaginal en ratas. *Revista CENIC Ciencias Biológicas* 29 (3): 206-208.
44. Bocci V. 1993. Ozone as a bioregulator. Pharmacology and toxicology of ozone today. *J. Bio Regul. Homeost. Agents* 10: 31-53.
45. Christman C.A., Schwartz L.W., 1982. Enhanced phagocytosis by alveolar macrophages induced by short-term ozone insult. *Environ. Res* 28: 241-250.
46. Tredaniel J. 1994. The increased pulmonary alveolar macrophage (PAM) population after ozone inhalation: relative contribution of monocyte migration and PAM proliferation. Inhaled Part. VII, Proc. Int. Symp, 7th 1991: 961-967.
47. Driscoll K.E., Schlessinger R.B. 1988. Alveolar macrophage-stimulated neutrophil and monocyte migration: effects of *in vitro* ozone exposure. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 93: 312-318.
48. Bromberg P.A., Koren H.S. 1995. Ozone - induced human respiratory dysfunction and disease. *Toxicol. Letter* 82/83: 307-316.
49. Creutzenberg O., Bellmann B., Klingebiel R., Heinrich U. and Muhl E. 1995. Phagocytosis and chemotaxis of rats alveolar macrophages after a combined or separate exposure to ozone and carbon black. *Exp. Toxic. Pathol.* 47: 202-206.
50. Baeuerle P.A. and Henkel T. 1994. Function and activation of NF- κ B in the immune system. *Annu. Rev. Immunol.* 12: 141-179.
51. Barnes P.J and Karin M. 1997. Nuclear factor- κ B: a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. *N. Engl. J. Med.* 336: 1066-1071.