

03068

19
23



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

COLEGIO DE CIENCIAS Y HUMANIDADES
UNIDAD ACADÉMICA DE LOS CICLOS
PROFESIONAL Y DE POSGRADO

EFFECTOS DE LA INHALACIÓN CRÓNICA DE OZONO SOBRE
LA ONTOGENIA DEL SUEÑO EN LA RATA

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS FISIOLÓGICAS

P R E S E N T A

REYES HARO, VALENCIA

DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGIA
CENTRO DE NEUROBIOLOGIA

TUTOR DE TESIS: DR. CARLOS PAZ TRES



UNAM-CCH

MAYO DE 1995



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Neurofisiología del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía "Dr. Manuel Velazco Suárez".

La parte inicial de este trabajo, correspondiente a los 3 primeros grupos experimentales, comparados con el primer grupo control, ha sido publicada previamente en: Haro, R. and Paz, C. Effects of ozone exposure during pregnancy on ontogeny of sleep in rats. *Neurosc. Lett.*, 164:67-70, 1993.

Se contó con el apoyo de CONACYT. Registros 82230 y 1440-M9207.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Dr. Jesús Rodríguez Carbajal, Director General del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía (INNNyN) y al Dr. Julio Sotelo Morales, Subdirector General de Investigación del mismo Instituto por las facilidades otorgadas para la realización de este trabajo.

Al Dr. Carlos Paz Tres, Jefe del Departamento de Neurofisiología del INNNyN y Director de esta tesis. Por fomentar y apoyar el desarrollo académico de todos sus estudiantes.

A la Dra. Sofia Díaz Miranda. Coordinadora del Proyecto de Maestría y Doctorado en Ciencias Fisiológicas del Centro de Neurobiología de la UACPyP, CCH, UNAM. Por la oportunidad.

A mis compañeros de laboratorio: Verónica Custodio, Alfonso Feria, Rigoberto Gouzález, Saul Gutiérrez, Adrián Hernández, Juana Ma. Hinojosa, Ulises Jiménez, Carmen Membrillo, Eric Murillo y Manuel Ruiz. Por su apoyo y convivencia diaria.

A mis compañeros de grupo: Marcela Arteaga, Dolores González, Elizabeth Hernández, Adriana Morales, Jonathan Romero y Carmen Vilchis. Por haber compartido y hecho divertido durante dos años el estudio de la maestría.

Al Biólogo Francisco Gutiérrez Baeza quien con la gran destreza que le caracteriza, realizó todas las cirugías del presente proyecto.

Mi agradecimiento para los Miembros del Jurado:

Dr. Fructuoso Ayala Guerrero

Dr. León Cintra McGlone

Dra. Rosalinda Guevara Guzmán

Dr. Salvador Huitrón Reséndiz

Dr. Carlos Paz Tres

A mis Padres.

**A mis hermanos: Angeles,
Felipe, Guadalupe, Jesús,
Socorro, Rosa Ma., Virginia,
Apolonio y Juan.**

A Susy y Reyesin.

ÍNDICE

Resumen.....	1
Introducción.....	2
Fisiología del sueño.....	4
Neurotransmisores del ciclo sueño-vigilia.....	7
Sueño paradójico.....	12
Sueño de ondas lentas y factor promotor de sueño.....	14
Ontogenia del sueño.....	15
Desarrollo del sistema nervioso central.....	19
Ozono.....	24
Radicales libres de oxígeno.....	29
Acción de los radicales libres sobre el sistema nervioso central.....	33
Hipótesis y objetivos.....	37
Método.....	39
Resultados.....	47
Discusión.....	54
Conclusiones.....	66
Bibliografía.....	67

RESUMEN.

Existen pocos estudios en relación a los efectos de la inhalación crónica del ozono sobre el sistema nervioso central (SNC), en particular, en etapas tempranas del desarrollo. El estudio del sueño en ratas expuestas durante la gestación y en diferentes momentos de su desarrollo, representa un modelo para conocer algunos de los efectos de este gas sobre las funciones del SNC. Se estudió la organización del sueño en ratas cuyas madres fueron expuestas durante toda la gestación y en diferentes intervalos de la misma, a la inhalación crónica de 1 parte por millón (ppm) de ozono durante 12 horas diarias en el período de oscuridad. Asimismo, se estudió el sueño en ratas de 30 días de edad y ratas adultas expuestas a 3 concentraciones diferentes de ozono (0.35, 0.75 y 1.5 ppm) durante 24 horas. Encontramos que estas condiciones, producen severas alteraciones en los estados de vigilancia. En las ratas cuyas madres fueron expuestas durante la gestación por 12 horas diarias, destacan la disminución en la cantidad del sueño paradójico y la inversión del ciclo luz-oscuridad. En las ratas expuestas durante la gestación temprana, media y tardía no se observó esta inversión en el ciclo luz-oscuridad, aunque los cambios en la duración del sueño paradójico fueron claros. Las ratas jóvenes y adultas que no fueron expuestas durante la gestación también presentan cambios importantes en la arquitectura de sueño al momento del estudio, particularmente, disminución en la duración del sueño paradójico. Estos resultados sugieren que la exposición al ozono durante la gestación puede afectar los mecanismos generadores del sueño paradójico, así como la regulación de los ritmos circadianos en la rata y que la exposición a este contaminante después del nacimiento, produce cambios en el patrón de sueño dependientes tanto de la edad como de las concentraciones de ozono a las que sean expuestas las ratas.

INTRODUCCIÓN.

En los últimos años ha crecido el interés por el estudio de los efectos del ozono sobre el organismo, principalmente en las grandes ciudades que se ven afectadas por éste y otros contaminantes ambientales (Environmental Protection Agency - EPA, 1986; United States Environmental Protection Agency - USEPA, 1986, 1988; Bravo y cols., 1988). De esta manera, se han estudiado en detalle algunos de los efectos del ozono sobre la salud humana (Stockinger, 1965; Hackney y cols., 1975). Destacan las variaciones que la exposición a ozono produce sobre los sistemas respiratorio y cardiovascular, aunque también existen algunos reportes acerca de las acciones del ozono sobre los sistemas nervioso central y periférico (Menzel, 1984; Jones y cols., 1988).

El patrón del sueño sufre modificaciones por la acción de diversas sustancias que presentan efectos neurotóxicos. Se sabe también que el ozono es conocido como el contaminante ambiental más común y sus efectos sobre diferentes organismos han sido estudiados ampliamente, sin embargo, hasta el momento existen pocos estudios tendientes a investigar los efectos de este gas sobre el sistema nervioso central. Experimentalmente se ha establecido que el ozono es capaz de afectar este sistema y en particular, la organización del sueño (Graham y cols., 1981, 1982; Arito y cols., 1992; Paz y Bazán-Perkins, 1992). Por otro lado, los estudios acerca de la ontogenia del sueño indican que ésta puede verse afectada por manipulaciones experimentales, como son los modelos de desnutrición ó la exposición prenatal a agentes neurotóxicos (Salas y cols., 1983; Cintra y cols., 1988). Lo anterior, además de alterar el desarrollo

fetal, produce cambios en la aparición y presentación de diferentes formas de conducta. Estos cambios regularmente son irreversibles (Hicks y cols., 1959). Hasta el momento, no existen evidencias claras acerca del daño cerebral producido en el hombre, como tampoco se sabe si el feto humano es más sensible al de otros mamíferos que han sido estudiados bajo la exposición a agentes neurotóxicos.

SUEÑO. FISIOLOGÍA.

Desde principios del presente siglo se sabe que las estructuras del tallo cerebral participan en la regulación del ciclo sueño-vigilia. En primer lugar, se demostraron las proyecciones de las células del campo tegmental gigante celular (FTG) de la formación reticular del tallo cerebral y del puente hacia diferentes estructuras, particularmente hacia las vías paramediales y las estructuras de la formación reticular. También se describieron las neuronas de los núcleos del rafe que corren a lo largo de la línea media del tallo cerebral y que están conectadas con otras estructuras paramediales que también proyectan hacia estructuras corticales y subcorticales. Por último, Cajal sugirió que las células estrelladas que se localizan lateralmente en el tallo cerebral son importantes para recibir la estimulación que es transmitida a la formación reticular. Estos trabajos fueron ampliados por Brodal en 1957 y en 1967 por Scheibel; quienes mostraron que la médula espinal y el tálamo reciben proyecciones amplias de las neuronas del FTG, de donde proyectan directamente hacia la corteza cerebral en las áreas frontales, parietales y occipitales; hacia los núcleos oculomotores, en el tallo cerebral y tanto a las motoneuronas inferiores como a las interneuronas inhibitorias de las astas ventrales de la médula espinal (Hobson y McCarley, 1972).

Las vías sensoriales clásicas fueron señaladas también a principios de siglo como las responsables para el mantenimiento del estado de vigilia; el sueño entonces, como una clase de desaferentación de la corteza, era

considerado como el estado resultante de la interrupción de la estimulación sensorial a la corteza. Lo anterior motivó a Bremer, quien en 1935 realizó estudios seccionando el tallo cerebral por debajo del locus coeruleus a nivel pontomedular, dando como resultado un estado de hiperalerta ó insomnio. Moruzzi y Magoun en 1949 demostraron que la estimulación de la formación reticular producía despertar acompañado de desincronización en el electroencefalograma (EEG). Más tarde se encontró que la sección total del puente no sólo producía un estado de hiperalerta, sino que además daba lugar a movimientos oculares fásicos repetitivos, lo que sugería la ocurrencia de un estado particular de sueño, acompañado de movimientos oculares rápidos, y que en la actualidad se conoce como sueño de movimientos oculares rápidos (MOR) ó sueño paradójico (SP) (Battini y cols., 1958).

Por otro lado, Jouvet en 1965 encontró que las lesiones de la formación reticular pontina eliminan la ocurrencia del sueño paradójico, y que las secciones parciales realizadas por arriba del puente ó la sección total del tallo cerebral no afectan la periodicidad ó la duración de las manifestaciones musculares u oculares de esta fase de sueño en animales. Estos estudios llevaron a la conclusión de que los mecanismos generadores, disparadores y reguladores del sueño paradójico se encuentran en el puente. Asimismo, se describió que sí se producían pequeñas lesiones del puente anterior ó dorsal que afectan al locus coeruleus, se elimina la atonía muscular característica del sueño paradójico en gatos, pero no se modifica la ocurrencia de otras variables fisiológicas que acompañan a este estado de sueño (Jouvet, 1965; Hobson y cols., 1975). Con lesiones más precisas, como la estimulación del locus coeruleus, se demostró que los dos tercios caudales de este núcleo son los

responsables de la atonía muscular durante el sueño paradójico y que el tercio medio ó anterior es el responsable de la activación cortical, de los eventos fásicos y de las descargas integradas en el puente, cuerpo geniculado y corteza (Jouvet, 1967).

La idea de que el sueño es un fenómeno pasivo, resultado de la fatiga y de la interrupción de la entrada de estimulación sensorial, data también de principios de siglo. Los experimentos en que se seccionaba la médula oblongada mostraron que el encéfalo presenta señales de vigilia, mientras que la sección a nivel del tallo cerebral superior, es seguida por actividad EEG y ocular parecida a la de narcosis profunda por acción de barbitúricos. En ese momento se concluyó que el tono cerebral es sostenido por un flujo constante de entradas sensoriales entre la médula y el cerebro medio, y que el sueño es el resultado de la suspensión de dichas entradas. Esta idea implicaba la participación de vías sensoriales para el mantenimiento de la vigilia, y después fue reemplazada por la noción de la participación de una estructura no específica como lo es la formación reticular del tallo cerebral. Desde entonces se han realizado una gran cantidad de trabajos al respecto, entre los que destacan los de Moruzzi y Magoun, quienes en 1949 describieron trastornos de la vigilia y el sueño posteriores a las lesiones del tegmento pontomesencefálico, a lesiones bilaterales de los núcleos intralaminares del tálamo, ó bien, a ambos tipos de lesiones. En la actualidad se sabe de acuerdo a estudios morfológicos y electrofisiológicos, que las neuronas intralaminares talámicas son excitadas monosinápticamente a partir de la formación reticular mesencefálica y que proyectan ampliamente hacia áreas corticales, lo cual sugiere una participación encefálica en los sistemas de activación (Glenn y

Steriade, 1982).

Por otro lado, la teoría del sueño como fenómeno activo, se generó a partir de experimentos en los que se demostró que las lesiones del hipotálamo anterior que corresponden al área preóptica y al núcleo supraquiasmático, producen insomnio, con lo cual se postuló la existencia de una estructura promotora de sueño (Lerma y García-Aust, 1985).

Posteriormente se demostró que no era posible establecer una "teoría localizacionista" del sueño y se demostró que las funciones del sueño no se limitaban al tallo cerebral. La corteza cerebral y otras áreas subcorticales tienen participación importante en la regulación del sueño mediada por la acción de neurotransmisores (Prospero y cols., 1990).

NEUROTRANSMISORES QUE PARTICIPAN EN LA REGULACIÓN DEL CICLO SUEÑO-VIGILIA.

Los principales sistemas moduladores que activan al tálamo y a la corteza cerebral incluyen a las neuronas colinérgicas que se encuentran principalmente en dos áreas localizadas a nivel de la unión mesopontina, como son el área peribraquial del núcleo pedunculopontino tegmental y el núcleo laterodorsal tegmental. El neurotransmisor que participa en la actividad de las neuronas tálamo corticales es el glutamato; mientras que las proyecciones colinérgicas a las áreas corticales, se originan en los núcleos basales del cerebro anterior. En la parte rostral del cerebro anterior, existe un área en donde las proyecciones talámicas tienen propiedades activadoras. Se ha descrito que muchas células

en esta área emplean aminoácidos excitadores; el glutamato actúa a través de algunos receptores que median acciones excitatorias prolongadas, similares a las mediadas por acetilcolina (Drucker-Collin y Prospero-García, 1990; Steriade y McCarley, 1990).

El locus coeruleus contiene neuronas cuyo neurotransmisor es la norepinefrina y proyecta al tálamo y a la corteza cerebral. Otras células monoaminérgicas son las neuronas histaminérgicas de la región tubero-infundibular del hipotálamo posterior, las cuales también proyectan hacia algunos núcleos talámicos y hacia la corteza cerebral (Gaillard, 1985).

Las regiones mencionadas anteriormente, no contienen un tipo particular de neurotransmisor, por ejemplo, algunas neuronas gabaérgicas, coexisten con células colinérgicas en los núcleos basalis, pedúnculo pontino tegmental y latero dorsal tegmental, y algunas células colinérgicas de estos dos últimos núcleos coexisten con acetilcolintransferasa y glutamato. Los neurotransmisores liberados por estos sistemas producen un aumento en la excitabilidad y una reducción ó supresión de los procesos inhibitorios a largo plazo de las células tálamo corticales. Los sistemas colinérgicos del tallo cerebral ejercen dos acciones principales en el tálamo: una excitación directa y una desinhibición de las células tálamo-corticales como resultado de la inhibición de las neuronas gabaérgicas talámico reticulares (McCormick, 1992).

Los estudios in vivo e in vitro han aportado datos que han permitido un mejor entendimiento de la forma en que actúan estos sistemas, por ejemplo, se ha reportado que la estimulación de los núcleos mesopontinos colinérgicos induce dos tipos de eventos excitatorios en las células tálamo corticales: una despolarización de corta duración, mediada por receptores nicotínicos, asociada

con un incremento en la conductancia membranal y que es responsable de los eventos fásicos presentes en la vigilia y en el sueño paradójico; y una despolarización de mayor duración, mediada por receptores muscarínicos, asociada con un incremento en la resistencia de entrada y acompañada por una prolongada respuesta de activación del EEG (Curró y cols., 1991).

Los estudios en que se ha registrado la actividad de las células de los núcleos pedúnculo pontino tegmental y laterodorsal tegmental con proyecciones talámicas durante la vigilia y el sueño, en gatos no anestesiados, apoyan el concepto de que los sistemas colinérgicos son los mejores candidatos para iniciar y mantener los procesos de activación en los sistemas talámicos. De hecho, estas neuronas no sólo aumentan su frecuencia de disparo y su excitabilidad durante la vigilia y durante el SP en comparación con el sueño de ondas lentas (SOL), sino que sus signos de actividad incrementada aparecen de 20 a 60 segundos antes de que aparezca cualquier signo de desincronización del EEG, con transición del SOL a la vigilia ó al SP, aunque algunas células como las neuronas serotoninérgicas e histaminérgicas del rafe dorsal, dejan de disparar durante el SP. Estos datos indican que las neuronas noradrenérgicas y otras monoaminérgicas pueden actuar conjuntamente con neuronas colinérgicas para alcanzar niveles de alta excitabilidad durante la vigilia en las células talámicas y corticales, y que los sistemas colinérgicos también inducen procesos de activación durante el SP. A este respecto, las neuronas colinérgicas del tallo cerebral, se comportan de una manera similar a las neuronas del cerebro medio y tálamo corticales, las cuales utilizan al glutamato como neurotransmisor, que a su vez, aumenta las tasas de disparo espontáneo y la excitabilidad durante ambos estados de activación cerebral, la vigilia y el SP

(Glenn y Steriade, 1982).

Anteriormente se consideraba que los efectos excitadores del glutamato eran a corto plazo y que sus acciones no podrían explicar el mantenimiento del estado de vigilia, sin embargo, ahora se ha demostrado que el glutamato induce acciones excitatorias prolongadas mediadas por receptores metabotrópicos, causadas tanto por la suspensión de la conductancia de potasio, como por la acción de la acetilcolina. De esta manera, las neuronas glutamatérgicas tienen características propias de los sistemas activadores e intervienen de manera importante en la regulación del ciclo sueño-vigilia (McCormick, 1992).

Por otro lado, se sabe que las neuronas de los núcleos pedúnculo pontino lateral tegmental y laterodorsal tegmental disminuyen sus tasas de disparo aproximadamente 10 ó 20 segundos antes de que aparezca la primer secuencia de husos, característica del inicio del SOL. Las neuronas del locus coeruleus también disminuyen su frecuencia de descarga durante la transición vigilia-SOL. La disminución en la liberación de acetilcolina y norepinefrina produce cambios en las actividades de las células corticales y tálamocorticales como una reducción dramática en la respuesta a señales aferentes. Debido a que la acetilcolina inhibe a las neuronas gabaérgicas del núcleo talámico reticular, el cual es el marcapasos de los husos; se ha planteado que una disminución en la liberación de acetilcolina al inicio del sueño, es un factor promotor para el desarrollo de los husos, los cuales se han asociado con los potenciales inhibitorios a largo plazo en las células tálamocorticales (Lidbrink, 1973).

Aunque la participación de los sistemas anteriores es importante en la regulación del ciclo sueño-vigilia, se sabe que además, entre los procesos neurales que producen sueño y vigilia, se encuentran las interconexiones entre

estructuras del cerebro medio basal, hipotálamo y la formación reticular del tallo cerebral. El concepto de que el hipotálamo anterior está relacionado con la inducción del sueño y de que el hipotálamo posterior con la vigilia fue validado mediante inyecciones de análogos de glutamato que destruyen el pericario y dejan intactos los axones. Estas lesiones neuronales selectivas, especialmente las del área preóptica media y los núcleos de la banda diagonal, inducen insomnio a largo plazo, con una duración de dos a tres semanas (Sallanon y cols., 1989). Sin embargo, las lesiones con muscimol (agonista gabaérgico que inactiva reversiblemente las neuronas) en el hipotálamo posterior de gatos insomnes con lesiones preópticas, produjeron una recuperación transitoria del sueño. De esta manera, se concluye que la integridad del área preóptica del hipotálamo anterior no participa en el inicio del sueño, puesto que éste puede ser restablecido por la inhibición posterior. La conclusión tentativa a este respecto es que la función promotora de sueño del hipotálamo anterior, es el resultado de la inhibición de las neuronas hipotalámicas que se encuentran activas en el estado de vigilia (probablemente las neuronas histaminérgicas con proyección cortical). De hecho, los receptores antagonistas histamínicos H1 producen un incremento en el SOL, sin modificar la aparición de los husos de sueño generados a nivel del tálamo. Estos experimentos sustentan la idea reciente de que el sueño es el resultado de una inhibición de las células histaminérgicas del hipotálamo posterior (células tubero-infundibulares) y que no depende directamente del efecto hipnagógico del hipotálamo anterior (Lin y cols., 1988).

SUEÑO PARADÓJICO.

Existen ciertas similitudes entre el SP y la vigilia, las cuales han sido demostradas mediante el registro de neuronas talámicas, del tallo cerebral, cortico-talámicas y de varios tipos de neuronas corticales con proyecciones largas (Steriade y Glenn, 1982). De acuerdo a lo anterior se ha postulado que el SP al igual que la vigilia es un estado de activación cerebral, a pesar de la gran supresión de la actividad motriz y los cambios en el contenido mental presente durante este estado de sueño (Dement, 1960).

De la misma manera, existen diferencias entre ambos estados conductuales. En primer lugar, la inhibición durante el SP en células corticales no es tan efectiva como durante la vigilia. Además, las respuestas tardías a la estimulación sensorial, desaparecen durante el SP (Velasco y cols., 1980). Este hallazgo aunado al hecho de que los animales con lesiones pontinas que evitan la atonía muscular durante el SP, puedan ejecutar movimientos complejos sin responder a la estimulación sensorial, ha permitido proponer que la principal diferencia entre la vigilia y el SP se encuentra en la forma en que la entrada de información es procesada (Llinás y Paré, 1991).

Por otro lado, se han descrito también diferencias neuroquímicas entre ambos estados conductuales; existen neuronas monoaminérgicas que actúan en presencia de norepinefrina, histamina ó serotonina y que son muy activas durante la vigilia y se inactivan durante el SP, en el momento en que las otras células cerebrales se encuentran muy activas (Hobson y cols., 1975).

Una de las características más peculiares del SP es la atonía muscular

(Pompeiano, 1967). Es causada por potenciales postsinápticos inhibitorios en las motoneuronas espinales y que son mediados por glicina; la atonía es inducida por un circuito que inicia cerca del locus coeruleus y es relevado por neuronas medulares (Sakai y Jouvet, 1980). Estos eventos durante el SP muestran un estado de alta excitabilidad neuronal, parecido al de la vigilia. El EEG se encuentra igualmente activado; la respuesta de las células colinérgicas, talamocorticales y corticofugales del tallo cerebral es tan alta como en la vigilia; y durante las ensoñaciones se activan una serie de vías excitatorias que se originan en la región mesopontina y que son transferidas a los sistemas tálamo-corticales (particularmente al núcleo geniculado lateral y a la corteza occipital). Las lesiones pontinas ventrales que interrumpen la circuitería neuronal que va al locus coeruleus, producen inhibición de las motoneuronas de la médula espinal y dan como resultado la presencia del SP sin atonía muscular (Jouvet, 1965).

Existen ondas de alto voltaje que indican que el SP está por iniciar, cuya latencia de aparición es de aproximadamente 30 a 90 segundos. Se conocen como ondas ponto genículo occipitales (PGO), las cuales se originan en los núcleos colinérgicos mesopontinos, así como en otras regiones de la formación reticular mesencefálica, que a su vez, establecen contacto con neuronas de los núcleos pedúnculo pontino y tegmental laterodorsal; estas últimas neuronas representan la vía final común de transferencia de las ondas PGO hacia el tálamo (Gaillard, 1985).

SUEÑO DE ONDAS LENTAS.

Se trata de un estado cualitativamente diferente al SP. Estructuras nerviosas superiores se encuentran en constante actividad oscilatoria, producida por potenciales rítmicos inhibitorios-excitatorios que producen ondas EEG sincronizadas que presentan gran amplitud y baja frecuencia. La transición de vigilia a sueño de ondas lentas se asocia con procesos neurales que transforman el estado de alerta del cerebro, a otro en el que neuronas talámicas y corticales ejercen acciones inhibitorias que producen un estado de baja respuesta. De manera distinta, se ha descrito al SP como un estado de gran activación cerebral en el que sin embargo, existe inhibición a nivel de las motoneuronas de la médula espinal, lo cual da como resultado una incapacidad para producir respuestas motoras en un estado fisiológico en el que el cerebro se encuentra muy excitable (Katsuda y cols., 1993).

FACTOR PROMOTOR DE SUEÑO.

La idea de que existe un factor inductor de sueño data de principios de siglo. En la actualidad, la lista de factores promotores de sueño es muy larga. Hasta el momento se han descrito aproximadamente 30 sustancias con propiedades inductoras de sueño, entre las que destacan el péptido inductor de sueño de ondas lentas, el factor liberador de hormona del crecimiento y los péptidos muramiles. Se ha reportado que las prostaglandinas D2 y E2 que se

sintetizan y metabolizan activamente en el cerebro, tienen participación importante en la regulación del ciclo sueño-vigilia, y se ha postulado que la primera es inductora de sueño, mientras que la segunda, induce vigilia (Prospero y cols., 1990; Hayaishi y cols., 1991).

ONTOGENIA DEL SUEÑO.

Los estados de vigilancia presentan modificaciones en la medida en que el sistema nervioso central se desarrolla. En los mamíferos, las características cualitativas y cuantitativas del sueño pasivo y activo, como precursores del sueño de ondas lentas y del sueño paradójico respectivamente, se encuentran directamente relacionadas con el grado de maduración cerebral (Jouvet-Mounier y cols., 1969). En algunas especies de mamíferos precociales como el cobayo ó la oveja, el cerebro presenta un alto grado de desarrollo al momento del nacimiento y el patrón de sueño es muy parecido al de los animales adultos. Por otro lado, los mamíferos altriciales, tales como la rata, el gato, el conejo y el humano, presentan cantidades elevadas de sueño activo en el período perinatal. En estas especies, durante el curso de las primeras semanas posnatales, las cantidades de sueño activo, disminuyen progresivamente, mientras que el sueño pasivo aumenta. Al mismo tiempo, la actividad electrocortical llega a diferenciarse de acuerdo a los estados de vigilancia. En la medida en que los episodios de sueño pasivo aumentan su duración, aparecen las ondas lentas corticales, a la vez que éstas aumentan en número y amplitud. En la rata, estas modificaciones ocurren durante la segunda semana de vida, y a las tres

semanas, el EEG exhibe patrones morfológicos similares a los del adulto (Gramsbergen, 1976).

Los estudios de la ontogenia del sueño en mamíferos, han permitido el establecimiento de diferentes estados electrofisiológicos y conductuales, así como los momentos en que éstos se generan. Se han descrito con gran detalle, las características electrofisiológicas y conductuales en diferentes especies como la rata, el conejo y el gato. El desarrollo del sueño en estas especies sigue un curso similar al descrito en humanos. El SP se presenta predominantemente al momento del nacimiento, después decrece y da lugar a un aumento tanto en la vigilia como en el sueño de ondas lentas; estos cambios ocurren de acuerdo al grado de madurez de los organismos y suceden con mayor rapidez en los mamíferos pequeños. Al momento del nacimiento, la rata y el conejo son muy inmaduros, su desarrollo cerebral corresponde al de un bebé prematuro de 26 semanas (Coons, 1987; Alfoldi y cols., 1990). En el caso de la rata, un signo importante que refleja esta inmadurez lo representan los constantes brotes musculares, los cuales ocupan el 70% del día. No existen movimientos oculares, ni actividad muscular en el cuello, aunque el EEG se presenta intermitentemente activo pero no se pueden establecer aún los ritmos electroencefalográficos descritos para animales maduros. Este estado evoluciona rápidamente durante los primeros días y aproximadamente en el décimo día de edad surgen los movimientos oculares. El EEG es más activo la mayor parte del tiempo. Aparece el control muscular en el cuello y alrededor de los 18 días de edad es posible diferenciar electrofisiológicamente dos estados de sueño: el sueño MOR y el sueño de ondas lentas. Algunos autores sugieren que a partir de este momento, las características morfológicas del EEG no

sufren más cambios en el desarrollo de los animales (Gramsbergen, 1976).

Una de las teorías más aceptadas acerca de la función del sueño MOR en neonatos, es que este estado de sueño favorece el desarrollo del SNC (Jouvet-Mounier y cols., 1969).

Existen pocos estudios tendientes a conocer los efectos de algunas manipulaciones experimentales sobre la ontogenia del sueño. Una de las líneas de investigación que se ha desarrollado en los últimos años es la que tiende a estudiar los efectos de la desnutrición sobre los estados de vigiliencia. A este respecto, se ha reportado principalmente una disminución en la cantidad de sueño paradójico durante el período de luz, produciendo también efectos a largo plazo en el ciclo sueño-vigilia; una de las conclusiones tentativas de los autores de estos trabajos es que se estén afectando probablemente las estructuras que controlan los estados de vigiliencia y las que regulan la ritmicidad circadiana (Forbes y cols., 1977; Salas y cols., 1983; Cintra y cols., 1988).

Debido a que se han estudiado varios de los substratos bioquímicos y fisiológicos del sueño en animales normales, el estudio de los ciclos de sueño y sus características proporciona las bases para conocer el posible significado funcional de los efectos de la inhalación de ozono sobre la ontogénesis del sueño durante el período gestacional y posnatal en ratas.

Como se ha mencionado, existen pocos estudios referentes a la ontogénesis del sueño en mamíferos, tanto en condiciones normales como experimentales (Jouvet-Mounier y cols., 1969; Mirmiran, 1986); asimismo, se ha reportado una alta susceptibilidad a alteraciones del sueño por cambios medio ambientales (Paz y Bazán-Perkins, 1992). El ozono está bien caracterizado como un agente neurotóxico y se ha reportado que su inhalación produce

alteraciones del sueño (Arito y cols., 1990, 1992; Paz y Bazán- Perkins, 1992).

DESARROLLO DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL.

Los estudios acerca de la ontogenia del SNC han permitido conocer con gran detalle la ocurrencia de diferentes procesos biológicos tales como la inducción de la placa neural, la generación neuronal, la proliferación localizada de células, la migración, la diferenciación neuronal, el crecimiento neuronal, la formación de conexiones con otras neuronas y la mielinización; por otra parte, también se conoce el momento en que se origina la síntesis y la liberación de neurotransmisores y la muerte celular selectiva (Cowan, 1979).

Estos eventos ocurren durante largos períodos de tiempo y diferirán dependiendo de la especie de que se trate. Aunque no se conocen con precisión los mecanismos que ponen en marcha, ni aquellos que detienen dichos eventos, se sabe que la mayoría de ellos están determinados genéticamente y que los instantes relativos a cada evento están rigidamente determinados (Rodier, 1980).

En la actualidad, es posible conocer mediante técnicas de marcaje, los días precisos de nacimiento de las células de diversas partes del cerebro, así como las fechas en que inician los otros procesos del desarrollo del SNC. Gracias a esto, ha sido posible el establecimiento de algunas generalizaciones con respecto a la formación del cerebro. En primer lugar se sabe que las neuronas de mayor tamaño se generan primero que las pequeñas. Por otro lado, se sabe también que la secuencia de la proliferación celular es específica para cada especie y para cada región del cerebro. Asimismo, se sabe que en la mayoría de las áreas del cerebro, las primeras células gliales se forman al mismo tiempo que las neuronas (Cowan, 1979).

Se ha sugerido que la secuencia y el momento en que acontecen estos

procesos del desarrollo cerebral varían de una especie a otra, así como también, entre las diversas estructuras cerebrales. Dobbing y su grupo desde 1970 postularon el concepto de "período vulnerable", el cual plantea que durante el desarrollo del SNC existe un lapso de crecimiento cerebral rápido. Según este grupo, el desarrollo cerebral rápido es el lapso en el cual ocurre la máxima susceptibilidad cerebral a ciertos factores nocivos, ya que los procesos que ocurren durante este tiempo son sumamente lábiles (Dobbing y Sands, 1979).

En todas las especies, el periodo de crecimiento cerebral rápido se inicia cuando se ha generado el número total de neuronas. De manera que en el ser humano, este período ocurre entre el último trimestre de la gestación y el periodo posnatal temprano (primeros dos años de edad). En cambio, en la rata este período comprende el primer mes de vida. Durante el período de crecimiento cerebral rápido en la rata, ocurre principalmente la diferenciación celular de las poblaciones celulares generadas prenatalmente, así como también la generación y diferenciación de la oligodendroglía y de la mielinización. En términos de desarrollo, al momento del nacimiento, en los roedores se inicia su periodo de crecimiento cerebral rápido (Dobbing, 1970).

Por otro lado, también se ha descrito que durante el desarrollo normal del cerebro, las neuronas están sujetas a diversas influencias mecánicas que puedan modificar su estructura. El SNC es muy sensible a la interferencia con la proliferación celular. Tal interferencia puede dar como resultado efectos teratológicos, aunque también pueden presentarse otros efectos como son las alteraciones en la conducta, las cuales se presentarán de acuerdo a las estructuras nerviosas que sean dañadas y serán dependientes del momento del desarrollo en que ocurra la exposición a agentes neurotóxicos. Se han descrito

alteraciones en la conducta que se presentan como consecuencia de los cambios ambientales ocurridos durante la gestación. Existen reportes de infecciones virales (Kilham y Margolis, 1964), radiaciones (Fowler y cols., 1962), desnutrición, (Salas y cols., 1980) y una serie de drogas y sustancias químicas que alteran el comportamiento posnatal de los animales afectados durante la gestación (Eccles y Annau, 1982). En la mayoría de los casos se desconocen los mecanismos por los que un agente neurotóxico altera el comportamiento, sin embargo, existen evidencias de que la interferencia con los procesos de proliferación es determinante (Cowan, 1979).

Tomando en cuenta los estudios en donde se establecieron los conceptos de período vulnerable y de crecimiento cerebral rápido, gran parte del conocimiento que se tiene acerca del desarrollo del cerebro, es producto de los estudios en que se ha interferido con dicho proceso (Lorenzana-Jiménez y Salas, 1980; Ballatori y Clarkson 1982; Eccles y Annau 1982; Cintra y cols., 1988).

Se ha señalado la existencia de varios períodos vulnerables, en los que los procesos del desarrollo tienen un lapso de expresión mayor en un momento dado en la formación de cada una de las áreas cerebrales. Entonces, no sólo existe un período crítico durante el desarrollo cerebral, existen varios que pueden ocurrir antes o después del nacimiento. Asimismo, se ha mencionado que quizás los que ocurren prenatalmente son de mayor importancia, debido a que en ellos suceden los períodos de neurogénesis máxima que difieren en cada una de las estructuras cerebrales (Smart, 1990, 1991).

Recientemente han adquirido gran interés los estudios en los que se determinan los rangos de neurogénesis prenatal en las estructuras cerebrales, ya que en los estudios en los que se aplican ciertos agentes nocivos durante la

etapa prenatal, se produce la pérdida de células nerviosas ó errores en la migración neuronal, provocando con ello la disminución en el número de sinapsis y la alteración en la circuitería neuronal (Bayer y Altman, 1987).

Con el surgimiento de diferentes técnicas, se ha establecido el origen de las estructuras que integran los sistemas de transmisión neuronal. Así por ejemplo, en el caso de la rata, el origen del sistema de neurotransmisión monoaminérgica ocurre entre los 10 y 13 días de la gestación en la rata (Lauder y Bloom, 1974), del sistema colinérgico entre los 12 y 16 días gestacionales (Semba y Fibiger, 1988); además, los sitios de enlace muscarínicos en el SNC aparecen antes del día 14 de gestación (Schlumpf y cols., 1991) y el sistema serotoninérgico entre los 11 y 15 días de la gestación (Wallace y cols., 1982). A partir del día 12 de gestación, ocurre el mayor período de proliferación celular, y es en este período en donde se presentan los efectos teratológicos más severos ocasionados por cambios ambientales (Bayer y Altman, 1987).

Por otro lado, los estudios electrofisiológicos empleando la técnica del registro de la actividad multiunitaria ó de actividad unitaria efectuados en ciertas especies de mamíferos en desarrollo, han contribuido a determinar el inicio de la función en diversos grupos neuronales. Algunas de las estructuras involucradas en el fenómeno del sueño que han sido investigadas son: las células del núcleo del rafe dorsal de la rata, quienes entre los 3 y los 6 días posnatales ya presentan un patrón de descarga neuronal similar al de los sujetos en etapas maduras (Gallager, 1982, Lamfumey y Jacobs, 1982); en las células del núcleo locus coeruleus de la rata neonata de 1 a 3 días de edad, la actividad neuronal está gobernada por los estímulos sensoriales (Kimura y Nakamura, 1985); en la formación reticular pontina el patrón de actividad neuronal durante la vigilia

activa y el sueño activo aparece al inicio de la segunda semana posnatal de la rata (Corner y Bour, 1984) y en el núcleo supraquiasmático el ritmo circadiano de la actividad neuronal se establece entre los 11 y 14 días posnatales (Shibata y cols., 1983). A partir del día 12 de gestación ocurre el mayor período de proliferación celular y es en este período donde se presentan los efectos teratológicos más severos ocasionados por cambios ambientales. Se sabe que la mayoría de las células de la parte medial de la formación reticular se forman entre los días 10 y 13 de gestación; el tálamo, el hipotálamo y el hipocampo, entre los días 10 y 16; y el cerebelo se forma en el intervalo comprendido entre los días 11 y 18 de la gestación (Rodier, 1980).

OZONO.

El ozono es conocido como uno de los contaminantes ambientales urbanos más comunes, en consecuencia, se han estudiado ampliamente sus efectos en plantas, animales y humanos (Scheel y cols., 1959; Barry y cols., 1988; USEPA, 1988). Sus acciones toxicológicas afectan no sólo el aparato respiratorio, sino también, se han descrito efectos cardiovasculares, conductuales y neurológicos (Weiss y cols., 1981; Morgan y cols., 1985; Tepper y Wood, 1985; Arito y cols., 1992).

Los efectos tóxicos del ozono en los seres vivos, se atribuyen a su alta capacidad oxidante. Se ha postulado que el ozono al entrar al organismo, forma radicales libres como productos de reacción, los cuales afectan directa ó indirectamente la configuración molecular de las proteínas. Lo anterior, también provoca la peroxidación de lípidos, ocasionando cambios en la respuesta celular como consecuencia de las alteraciones que se dan en la permeabilidad de la membrana (Trams y cols., 1972; Ryer-Powder y cols., 1988).

Las reacciones que el ozono produce en el organismo, se manifiestan principalmente en el aparato respiratorio. La mayoría de los estudios acerca de la toxicidad del ozono, han explorado sus efectos sobre dicho aparato, en particular, a los daños que produce en el epitelio nasal, en los alvéolos y en el endotelio pulmonar (Brinkman y cols., 1964; Boatman y cols, 1974; Reiser y cols., 1987). Como se mencionó anteriormente, se ha sugerido que sus efectos se deben principalmente a la producción de moléculas citotóxicas como son los radicales libres. En 1988 Bhalla y cols., sometieron a ratas a la inhalación de 0.25 a 1.5 ppm de ozono y reportaron alteraciones en la organización de las

inclusiones citoplasmáticas, necrosis, devastación ciliar e incremento en las funciones mucociliares del tejido apical del tracto respiratorio. Bascom y cols., en 1990 reportaron además infiltración de albúmina, eosinófilos, neutrófilos y leucocitos polimorfonucleares, así como proliferación de macrófagos y depósitos irreversibles de colágena en los alvéolos pulmonares.

También se ha reportado que la inhalación de 1.8 ppm de ozono produce edema con infiltración de linfocitos, células epiteliales y antioxidantes como son el glutatión y la superóxido dismutasa en las vías respiratorias (Goldstein y cols., 1970). La cantidad de vacuolas aumenta considerablemente en los pneumocitos tipo II, como resultado de la acumulación masiva de lactato deshidrogenasa y proteínas infiltradas, que aunado a la producción de fosfatidilcolina, produce devastación del factor surfactante alveolar (Hiroshima y cols., 1987). La regeneración del tejido pulmonar se presenta entre 24 y 96 horas después de iniciada la exposición, aunque los efectos más severos de la inhalación de ozono se dan a las 48 horas de exposición y éstos se determinan dependiendo de la concentración de ozono a la que se someta a los organismos (Farrell y cols., 1979; Horvat y cols., 1981).

Los estudios realizados en humanos, indican que la oxigenación arterial no se ve afectada por la exposición a ozono, no obstante, la presión sanguínea, la capacidad de difusión y la presión parcial del bióxido de carbono se ven disminuidas, dando como consecuencia la presencia de arritmias cardíacas (Linn y cols., 1979, 1988). La inhalación de 0.12 a 0.5 ppm de ozono disminuye el volumen de expiración forzada en un segundo, la capacidad vital forzada, la tasa de flujo respiratorio forzado, la capacidad inspiratoria, la resistencia pulmonar y la frecuencia respiratoria. De la misma manera, la magnitud de estos

cambios depende de la concentración de ozono utilizada. Estos efectos se dan en humanos independientemente de la edad ó del sexo de los individuos que han sido estudiados. Los efectos mencionados empeoran en presencia de actividad física extenuante. Conductualmente, los efectos mencionados, se reflejan en disminución del tiempo de reacción, fallas en la ejecución y cefalea (Menzel, 1984; Tepper y cols., 1982, 1985, 1990).

Algunos experimentos con ratones y ratas han mostrado efectos teratológicos del ozono; la exposición perinatal de ratones a 0.2 partes por millón (ppm) redujo la sobrevivencia de los animales e incrementó la incidencia del crecimiento ilimitado de los incisivos. La exposición de ratas a 1.49 ppm de ozono durante la gestación media, produjo un retardo en el desarrollo embrionario, mientras que la exposición a 1 ppm durante la gestación tardía retardó los índices de crecimiento neonatal y el desarrollo de algunos reflejos como la conducta de crianza y de aicalamiento (Kavlock y cols., 1979). Existen también datos de efectos dependientes de la edad en ratas neonatas bajo exposición aguda a 1 ppm de ozono, siendo más susceptibles a daño pulmonar, los animales de menor edad (Guninson y cols., 1992).

También se han descrito efectos extrapulmonares como la disminución en la actividad de la acetilcolinesterasa y en los niveles de glutamato reductasas en los eritrocitos de ratones expuestos a ozono (Goldstein y cols., 1968; Gordon y cols., 1981); mientras que el tamaño y el peso del hígado de ratones expuestos a 1.2 ppm de ozono se ven disminuidos (Zidenberg-Cherr y cols., 1991). Estas alteraciones se han explicado por los productos tóxicos que se derivan de la reacción del ozono con los lípidos insaturados que forman parte del factor surfactante y moco de las células epiteliales del pulmón (Shelley y cols., 1989;

Balis y cols., 1991; Kennedy y cols., 1992). Entre estas sustancias se encuentran el peróxido de hidrógeno (H₂O₂) y los aldehídos (Goldstein y Balchum, 1967; Goldstein y cols., 1970; Pryor y cols., 1991). El H₂O₂ además de ser un inactivador de enzimas membranales, reacciona con gran facilidad ante cierto tipo de metales como el hierro para formar radicales libres hidroxilo, los cuales son altamente citotóxicos, y probablemente sean los responsables del daño extrapulmonar ocasionado por el ozono (Kanofsky y Sima, 1991).

Debido a lo anterior, recientemente ha crecido el interés por estudiar los efectos del ozono sobre el sistema nervioso central. La manera en que hasta ahora se ha abordado el problema, es mediante el estudio del efecto que la inhalación de ozono produce sobre algunas de las funciones reguladas por dicho sistema. La exposición a 6 ppm de ozono durante 4 horas en ratas disminuye la cantidad de serotonina cerebral (Skillen y cols., 1966). En el mismo año, Xintaras reportó que la exposición de 0.5 a 1 ppm de ozono durante 1 hora, retarda la aparición de la respuesta inducida por estimulación fótica en el colículo superior y en la corteza occipital de la rata. La exposición a 1 ppm de ozono durante 7 a 24 horas por 18 meses produce disminución en las concentraciones de noradrenalina, adrenalina y catecol-o-metiltransferasa en la corteza cerebral de perros y el metabolismo de la monoamino-oxidasa cerebral se incrementa (P'an y Jergier, 1970; Trams y cols., 1972). Además se han observado alteraciones en la amplitud y latencia de los potenciales provocados en conejos expuestos a 0.02 ppm de ozono (Bokina, 1976).

Por otro lado, se han reportado trastornos del sueño causados por la inhalación de ozono en animales adultos. Gatos expuestos durante 24 horas a 0.8 y 1.2 ppm de ozono y ratas expuestas a 0.5 durante 6 horas ó a 1 ppm de

ozono durante 3 horas, presentan una disminución significativa en el tiempo total de sueño paradójico y un aumento en la cantidad total del sueño de ondas lentas (Arito y cols., 1992). Asimismo, se ha reportado que la exposición a 0.4 ppm de ozono en gatos y de 0.1 ó 0.2 ppm de ozono en ratas, no produce alteraciones significativas en la duración de las fases de sueño (Paz y Bazán-Perkins, 1992).

RADICALES LIBRES DE OXIGENO.

Se ha descrito que los radicales de oxígeno son sustancias implicadas en reacciones metabólicas propias de diferentes tipos celulares en las que la lesión tisular se produce como consecuencia de un amplio espectro de condiciones y enfermedades. Se sabe que participan en la patogénesis de prácticamente todas las enfermedades conocidas y en el proceso de envejecimiento. Se ha postulado también la probabilidad de que la presencia de radicales libres represente un epifenómeno dentro de algo más complejo; participan en forma activa en diversos procesos patológicos, y por otro lado, que el control de su producción y de su eliminación significan un área terapéutica activa que quizá permita el control de ciertos procesos, fundamentalmente de naturaleza inflamatoria (Dreosty, 1991).

En organismos aeróbicos, el oxígeno molecular juega un papel de aceptor de electrones e interviene en un gran número de reacciones intracelulares, particularmente aquellas que generan radicales libres dentro de la célula. El oxígeno presenta una configuración única en la que dos de sus electrones se encuentran en las órbitas más alejadas de su núcleo. Ambos electrones poseen el mismo número cuántico. Cuando el oxígeno reacciona con átomos ó moléculas cuyos electrones se encuentran dispuestos en la configuración más frecuente, se observa una notable tendencia a aceptar un solo electrón en cada ocasión. Esto significa que el oxígeno tiende a reducirse en forma univalente en cada reacción. Una vez que el oxígeno ha aceptado un electrón y se ha reducido, se produce el radical superóxido, el cual es capaz de participar

en reacciones subsecuentes y dar lugar a la producción de otros tipos de radicales como son el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), los radicales hidroxilo (OH), y de menor importancia, el oxígeno univalente (Aust y cols., 1985).

El origen de los radicales libres puede ser endógeno ó exógeno. Endógenamente pueden originarse a partir de células con actividad fagocítica como los neutrófilos, monocitos, macrófagos, eosinófilos y células endoteliales. Los procesos metabólicos intracelulares que dan origen a estas sustancias incluyen las cadenas de transportes mitocondriales, microsomales y cloroplásticos, así como la participación de enzimas como la xantinoxidasa, indolamino dioxigenasa, triptofano dioxigenasa, galactosa oxidasa, ciclooxigenasa, lipoxigenasa y monoaminooxidasa. Algunas reacciones de auto reducción entre las que se encuentran la oxidación del hierro y epinefrina son fuente importante de radicales libres de oxígeno. El sistema de generación de radicales libres se encuentra inactivo en células en reposo y por el contrario, en pleno desarrollo cuando la actividad celular, especialmente fagocitosis, es intensa. Durante esta actividad, el neutrófilo consume una gran cantidad de oxígeno, dando lugar a la formación directa de las diversas especies reactivas de oxígeno que finalmente son las responsables del daño a las membranas celulares. Los dos sistemas que generan especies reactivas de oxígeno son: el sistema oxidativo de NADP/NAPDH ó piridina dinucleótido y el sistema de mieloperoxidasa. El primero se encuentra acoplado a la membrana celular, mientras que el segundo se localiza en los gránulos azurófilos del neutrófilo (Del Maestro, 1991).

El sistema oxidativo de NADPH es el responsable de la generación de radicales superóxido. Estos dan lugar a la formación de peróxido de hidrógeno a

en reacciones subsecuentes y dar lugar a la producción de otros tipos de radicales como son el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), los radicales hidroxilo (OH), y de menor importancia, el oxígeno univalente (Aust y cols., 1985).

El origen de los radicales libres puede ser endógeno ó exógeno. Endógenamente pueden originarse a partir de células con actividad fagocítica como los neutrófilos, monocitos, macrófagos, eosinófilos y células endoteliales. Los procesos metabólicos intracelulares que dan origen a estas sustancias incluyen las cadenas de transportes mitocondriales, microsomales y cloroplásticos, así como la participación de enzimas como la xantina oxidasa, indolamino dioxigenasa, triptofano dioxigenasa, galactosa oxidasa, ciclooxigenasa, lipoxigenasa y monoaminooxidasa. Algunas reacciones de auto reducción entre las que se encuentran la oxidación del fierro y epinefrina son fuente importante de radicales libres de oxígeno. El sistema de generación de radicales libres se encuentra inactivo en células en reposo y por el contrario, en pleno desarrollo cuando la actividad celular, especialmente fagocitosis, es intensa. Durante esta actividad, el neutrófilo consume una gran cantidad de oxígeno, dando lugar a la formación directa de las diversas especies reactivas de oxígeno que finalmente son las responsables del daño a las membranas celulares. Los dos sistemas que generan especies reactivas de oxígeno son: el sistema oxidativo de NADP/NADPH ó piridina dinucleótido y el sistema de mieloperoxidasa. El primero se encuentra acoplado a la membrana celular, mientras que el segundo se localiza en los gránulos azurófilos del neutrófilo (Del Maestro, 1991).

El sistema oxidativo de NADPH es el responsable de la generación de radicales superóxido. Estos dan lugar a la formación de peróxido de hidrógeno a

través de una reacción intracelular de dismutación que se lleva a cabo en forma más eficiente, a través de la acción de una dismutasa con actividad eliminadora de radicales libres de oxígeno, que es una oxidasa dependiente de NADPH y que da lugar a la reducción de oxígeno molecular (O_2), a ion superóxido (O_2^-). Por otro lado, el radical superóxido también es capaz de reducir todos los complejos que tienen hierro, al estado ferroso. Los iones de hierro y el peróxido de hidrógeno reaccionan entre sí y generan el radical hidroxilo a través de la reacción de Fenton. El radical hidroxilo tiene tal capacidad de reaccionar, que cuando es producido in vivo produce cambios en moléculas que se encuentran a muy pocos nanómetros de distancia (Halliwell y Gutteridge, 1984).

El hierro participa de tres maneras diferentes dentro del proceso oxidativo:

- 1) Facilita la descomposición de peróxidos lipídicos y da lugar a la producción de sustancias entre las que se encuentran los aldehídos citotóxicos y gases hidrocarbonados.
- 2) Promueve la generación de radicales hidroxilos a través de la vía del peróxido de hidrógeno y ;
- 3) Participa en los procesos de generación del radical superóxido y peróxido de hidrógeno al acelerar la oxidación no enzimática de moléculas como la epinefrina y el glutatión (Biemond y cols., 1988).

El origen exógeno de los radicales libres es diverso y quizás mucho mayor de lo que hasta ahora se conoce. Algunas sustancias como el paraquat, aloxano y doxorubicina poseen propiedades óxido-reductoras, mientras que el paracetamol es capaz de inducir reacciones de oxidación. El cigarro, las radiaciones ionizantes, la exposición a los rayos solares y sustancias oxidantes como el glutatión pueden dar lugar a la formación de radicales libres de oxígeno, los cuales son capaces de alterar reversible e irreversiblemente compuestos

bioquímicos de todo tipo como: ácidos nucleicos, proteínas, aminoácidos libres, lípidos, lipoproteínas, carbohidratos y moléculas generadas ó presentes en el tejido conectivo. Asimismo, influyen en actividades celulares tanto a nivel de membranas como de vías metabólicas y expresión génica (Cerutti, 1985).

Aunque se desconoce la naturaleza exacta de las moléculas reactivas que median el daño a biomembranas, se ha demostrado que tanto eritrocitos y neutrófilos como células endoteliales son susceptibles a este tipo de alteraciones. Los resultados de la mayor parte de estudios in vitro realizados hasta ahora señalan que los radicales aniónicos de superóxido y peróxido de hidrógeno juegan un papel importante en el daño a las membranas celulares, por ejemplo, los radicales hidroxilo y el oxígeno univalente, son capaces de lesionar las membranas de las células mencionadas (Cino y Del Maestro, 1989).

Uno de los mecanismos a través de los cuales se rompe la integridad de las membranas celulares es la peroxidación de lípidos. Los radicales hidroxilo son capaces de extraer átomos de hidrógeno de las posiciones alélicas que ocupan en lípidos no saturados. Los radicales de hidroxiperóxido pueden formarse como resultado de la acción directa de oxígeno univalente sobre ácidos grasos poli-insaturados a sistemas simples de generación de superóxidos. Los ácidos grasos ya oxidados también tienen una participación importante. Los derivados del ácido araquidónico poseen una intensa actividad quimiotáctica. De esta manera se considera que los hidroxiperóxidos derivados del ácido araquidónico pueden ser fuente de radicales libres de oxígeno, y éstos, a su vez, pueden provenir de reacciones mediadas a través de ellos mismos. La exposición de ácido araquidónico a sistemas de radicales libres da como

resultado la producción de hidroxiperóxidos con actividad quimiotáctica sobre el neutrófilo. La generación de dichos ácidos grasos puede ser inhibida por la acción de enzimas eliminadoras de radicales libres y oxígeno univalente. La conclusión obtenida hasta ahora es que los productos derivados del metabolismo del ácido araquidónico pueden ser generados a través de un sistema enzimático en que el sustrato es el propio ácido araquidónico (síntesis de prostaglandinas) y un sistema no enzimático a través de la peroxidación de lípidos. Ambos sistemas parecen interactuar y retroalimentarse (Gutteridge y cols., 1982).

ACCIONES SOBRE EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL.

Como se ha mencionado, los radicales libres de oxígeno se producen en los sistemas biológicos por la reducción de un electrón de oxígeno. El oxígeno activo y otros radicales libres se presentan naturalmente como intermediarios en el metabolismo oxidativo. El cerebro es altamente susceptible a los efectos tóxicos de estas sustancias parcialmente reducidas de oxígeno e incluyen al anión superóxido, peróxido de hidrógeno y radical hidroxilo. Esta susceptibilidad del tejido nervioso, puede ser consecuencia del alto contenido de lípidos y de ácidos grasos poli-insaturados comparado con otros tejidos. El radical superóxido es el promotor principal del daño neural. Puede ser liberado en el líquido extracerebral, donde ocurre una dismutación que produce peróxido de hidrógeno y en presencia de sales de hierro, radicales hidroxilo, los cuales resultan dañinos debido a su alta reactividad, mientras que los radicales

superóxido también pueden ser nocivos debido a que difunden fuera del sitio de formación. La peroxidación de lípidos es característica peculiar del daño tisular y puede ser iniciada por la acción de radicales superóxido e hidroxilo. Se cree que la peroxidación de lípidos contribuye significativamente a las alteraciones funcionales que se dan a nivel de la membrana celular (Lupo y cols., 1967; Liu y Mori, 1993; Rojas y Ríos, 1993).

Existen muchas enzimas y sustancias protectoras de la acción de los radicales libres; éstas se encuentran en el tejido cerebral normal y su función es mantener a los radicales libres en niveles no tóxicos. Las enzimas superóxido dismutasas representan el mejor sistema de defensa en las células aeróbicas para combatir los efectos tóxicos de los radicales libres de oxígeno. Las enzimas remueven rápidamente el anión superóxido, previniendo de esta manera los efectos tóxicos directos, así como su interacción con iones de metal para aumentar los productos del radical hidroxilo, que representa uno de los radicales de oxígeno más reactivos. Existen dos enzimas superóxido dismutasas en el cerebro de los mamíferos, una mitocondrial que contiene manganeso y una citosólica que contiene cobre y zinc; esta última es la más activa (Pelmar, 1986 y Mori y cols., 1991). La vitamina E es otra sustancia antioxidante que protege al organismo del daño ocasionado por los radicales libres, y se dice que sus efectos preventivos se deben a su acción eliminadora de radicales libres ó bien, a la acción de inhibir la peroxidación de lípidos en la sangre, al donar un hidrógeno fenólico; concomitantemente se produce un aumento en la actividad de las enzimas superóxido dismutasas (Goldstein y Balchum, 1967; Goldstein y cols., 1979; Liu y Mori, 1993; Mori y cols., 1993).

En algunos estados patológicos del sistema nervioso, los radicales libres

en el tejido cerebral pueden aumentar y llegar a niveles anormales. Uno de estos estados es la isquemia y la reperfusión subsecuente. Los radicales libres producidos por esta alteración son muy susceptibles de reaccionar con los ácidos grasos poli-insaturados e iniciar la peroxidación de lípidos, afectando la integridad de las membranas celulares. Aunque existe controversia al respecto, se ha propuesto que la lesión mitocondrial y la liberación de enzimas hidrolíticas a consecuencia de isquemia cerebral, produce radicales libres de oxígeno y fosfolípidos susceptibles de peroxidación. Una vez que se lleva a cabo la reperfusión ó reingreso de oxígeno al tejido isquémico, se produce una cantidad significativa y explosiva de radicales que sobrepasa a los sistemas eliminadores naturales. Se ha sugerido que el aumento en los radicales libres en el tejido cerebral son capaces de producir daños severos en la actividad neuronal; ejemplos de lo anterior son la reducción en la eficacia de la transmisión sináptica y el retardo en el potencial de acción (Halliwell y Gutteridge, 1985; Kontos y Enoch, 1986; Kitagawa y cols., 1990; Thordstein y cols, 1993). Es probable que el efecto de los radicales libres de oxígeno repercute en otras condiciones clínicas que afectan al sistema nervioso central, como es el caso del edema cerebral y la epilepsia. Reportes relacionados con lo anterior, han señalado que las sales de hierro agregadas a los lípidos poli-insaturados da como resultado la formación de radicales libres de oxígeno, como son los radicales libres hidroxilo y los peróxidos, los que a su vez causan peroxidación lipídica neural con el posterior desarrollo de un foco epiléptico (Will more y cols., 1983).

Otra de las explicaciones que apoya la ocurrencia de estas acciones sobre el sistema nervioso central se encuentra en el reporte que habla de

cambios en el sueño de gatos expuestos a ozono; los autores proponen que los efectos observados sobre la organización del sueño se deben principalmente a la formación y acción de los radicales libres de oxígeno (Paz y Bazán-Perkins, 1992).

HIPÓTESIS.

Si la exposición a ozono produce cambios en la organización del sueño en animales adultos, y si los organismos son más susceptibles durante su desarrollo a los cambios ambientales, entonces la exposición a ozono durante los periodos prenatal y neonatal producirá cambios más severos en la organización del sueño que el observado en ratas adultas.

OBJETIVOS.

En el presente estudio se investigaron las consecuencias que tiene sobre el patrón de sueño, la inhalación de 1 ppm de ozono en ratas cuyas madres fueron expuestas por 12 horas diarias a lo largo de toda la gestación, durante la gestación temprana, media y tardía, durante el ciclo de oscuridad; asimismo, se estudiaron los efectos de la inhalación de 3 concentraciones diferentes de ozono (0.35, 0.75 y 1.5 ppm) durante 24 horas en ratas de 30 días de edad y en ratas adultas. Por lo que los objetivos fueron los siguientes:

Analizar las alteraciones en los estados de vigilancia en ratas de 30, 60 y 90 días de edad cuyas madres fueron expuestas por 12 horas diarias durante la gestación a la inhalación de 1 ppm de ozono.

Analizar los estados de vigilancia en ratas de 30, 60 y 90 días de edad de ratas cuyas madres fueron expuestas por 12 horas diarias únicamente durante la gestación temprana, media ó tardía a la inhalación de 1 ppm de ozono.

Analizar las alteraciones en los estados de sueño en ratas de 30 días de edad y en ratas adultas que fueron expuestas durante las 24 horas del registro a la inhalación de 0.35, 0.75 y 1.5 ppm de ozono.

MÉTODO.

En el presente estudio se investigaron los efectos de la inhalación de ozono sobre el patrón de sueño en ratas expuestas durante la gestación y en diferentes momentos de la misma por 12 horas diarias; así como en ratas jóvenes y adultas expuestas únicamente durante 24 horas a 3 concentraciones diferentes de ozono.

El estudio incluyó 8 grupos de 10 ratas jóvenes y 4 grupos de ratas adultas.

GRUPO CONTROL.

El grupo 1 fue el control y estuvo formado por animales que no recibieron ninguna manipulación experimental; se les realizó registro de sueño a los 30, 60 y 90 días de edad.

RATAS JÓVENES EXPUESTAS A LA INHALACIÓN DE OZONO DURANTE LA GESTACIÓN.

El grupo 2 estuvo formado por ratas expuestas a 1 ppm de ozono durante 12 horas diarias a lo largo de la gestación y también se les realizó registro de sueño a los 30, 60 y 90 días de edad.

El tercer grupo estuvo constituido por ratas cuyas madres fueron expuestas a la inhalación de 1 ppm de ozono durante la gestación temprana, la cual comprende los 7 primeros días de gestación y que fueron registradas a los 30, 60 y 90 días de edad.

El cuarto grupo lo formaron 10 ratas expuestas a la inhalación de 1 ppm de ozono durante la gestación media, comprendida entre los días 7 y 14 de la gestación, y también fueron registradas a los 30, 60 y 90 días de edad.

El quinto grupo lo formaron 10 ratas expuestas a la inhalación de 1 ppm de ozono durante la gestación tardía (día 14 al 21). A este grupo se le realizaron registros de sueño de la misma manera que a los anteriores, es decir, a los 30, 60 y 90 días de edad.

RATAS JÓVENES EXPUESTAS A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE OZONO DURANTE 24 HORAS.

Se incluyeron también 3 grupos de ratas jóvenes que no fueron expuestas a ozono durante la gestación, pero que fueron expuestas a 3 concentraciones diferentes de ozono durante las 24 horas de duración de los registros de sueño. De esta manera, el grupo 6 estuvo formado por ratas de 30 días de edad que fueron expuestas durante 24 horas a la inhalación de 0.35 ppm de ozono. El grupo 7 lo formaron ratas de 30 días de edad expuestas durante 24 horas a la inhalación de 0.75 ppm de ozono; mientras que el grupo 8 estuvo constituido por ratas de 30 días de edad que fueron expuestas durante las 24 horas del registro polisomnográfico, a la inhalación de 1.5 ppm de ozono. Para estos grupos, el

destete, la cirugía y los registros de sueño se realizaron bajo las mismas condiciones que las ratas incluidas en el apartado anterior.

RATAS ADULTAS.

El grupo 9 estuvo formado por 10 ratas adultas control, es decir, ratas que en ningún momento fueron sometidas a la inhalación de ozono y que sólo se les realizó estudio de sueño de 24 horas. El grupo 10 estuvo constituido por ratas expuestas a 0.35 ppm de ozono durante las 24 horas de registro polisomnográfico. El grupo 11 por ratas expuestas durante 24 horas a la inhalación de 0.75 ppm de ozono. Finalmente, el grupo 12 estuvo formado por ratas expuestas durante 24 horas a la inhalación de 1.5 ppm de ozono. Para estos grupos de ratas adultas, se siguió el mismo procedimiento que con las ratas jóvenes, sólo que fueron implantadas y registradas después de los tres meses de edad.

GESTACIÓN.

Se aparearon hembras y adultos sexualmente aptos y en el caso de los grupos expuestos a ozono durante la gestación, o bien, durante los diferentes tercios que la componen; su inicio se determinó por medio de la presencia de esperma en exudados vaginales. A partir de este momento se consideró el día 0 de gestación (Kavlock y cols., 1979).

EXPOSICIÓN A OZONO.

Los animales del grupo 2 fueron sometidos durante la gestación a la inhalación de 1 ppm de ozono durante el período de oscuridad (de 19:00 p.m. a 7:00 a.m.), de acuerdo al ciclo circadiano de luz-oscuridad de la rata (Borbély y cols., 1975; Borbély y Tobler, 1989; Betteray y cols., 1991), mientras que las ratas de los grupos 3, 4 y 5 fueron expuestas durante la gestación temprana, media y tardía respectivamente, a la inhalación de 1 ppm, también durante el período de oscuridad. Ninguno de estos grupos fue expuesto a ozono después del nacimiento y la valoración polisomnográfica se realizó libre de contaminantes. Los grupos 6, 7 y 8 de ratas jóvenes, así como los grupos 10, 11 y 12 de ratas adultas, inhalaron diferentes concentraciones de ozono (0.35, 0.75 y 1.5 ppm respectivamente), únicamente durante las 24 horas de duración de los registros de sueño.

El ozono fue administrado mediante el equipo generador TRIOZON P15, el cual genera el gas por descarga de energía eléctrica entre dos electrodos. Las concentraciones de ozono en partes por millón se calcularon antes y después de las sesiones de exposición de acuerdo al método de Byers y Saltzman, quienes en 1958 diseñaron la técnica que emplea las medidas de absorción de una serie de soluciones de yodo de concentraciones conocidas. Las concentraciones de ozono en partes por millón de la cámara de exposición fueron medidas con el método de iodometría. Este método fue desarrollado por Littman y Benoliel en 1953 y modificado por Tokiwa en 1972 (en USEPA, 1986) y consiste en el burbujeo de aire a una solución al 10% de KI con una resolución

de 0.01 ppm de ozono. Las concentraciones de ozono fueron comparadas con estándares ultravioleta de acuerdo al método de Pitts y cols., desarrollado en 1976. El flujo de aire con el que cuentan las cámaras de registro se ajustó para mantener de manera permanente las concentraciones deseadas de ozono y en los casos en que éste se administró simultáneamente a la realización de los registros polisomnográficos, los cuales iniciaron una vez establecidas las concentraciones de ozono requeridas.

IMPLANTACIÓN DE ELECTRODOS.

Los animales jóvenes fueron destetados a los 21 días de edad, e implantados con electrodos convencionales para el registro electroencefalográfico de sueño en la corteza sensitivo-motora, y en el músculo dorsal de la nuca para el registro electromiográfico. Las ratas fueron anestesiadas bajo la administración intraperitoneal de pentobarbital sódico (40 mg/Kg.) y fijadas al aparato estereotáxico por medio de dos barras introducidas en los conductos auditivos externos y de barras de fijación facial. Posterior a la asepsia de la cabeza, se realizó una incisión de aproximadamente 2 cm. en dirección antero-posterior a través de la región parietal, retirando los músculos fascia epicraneal y el periostio. En seguida se realizaron trepanaciones en el cráneo para introducir electrodos en la corteza frontal sensoriomotriz para el registro del electrocorticograma (ECG). Los electrodos bipolares estuvieron formados por 2 cables aislados de acero inoxidable de 0.005 pulgadas de diámetro, barnizados a los extremos y separados por una distancia de 0.5 mm.

Para el registro del electromiograma, se colocaron en los músculos dorsales de la nuca 2 electrodos de alambre de acero inoxidable, barnizados, excepto en los extremos. Se implantó un tornillo en el cráneo, el cual sirvió como una fuente de referencia indiferente en el registro del ECG. Todos los electrodos se soldaron a miniconectores y se fijaron al cráneo de los animales con cemento acrílico. En el caso de las ratas adultas, se siguió el mismo procedimiento quirúrgico.

REGISTROS DE SUEÑO.

Después de siete días de recuperación postquirúrgica, todos los animales fueron habituados a las condiciones de registro durante 48 horas. Posteriormente se realizaron registros de sueño de 24 horas. Los registros se realizaron en cámaras sonoamortiguadas de 30x22x22 cm. ventiladas con aire fresco distribuido a un flujo de 4 litros/min. Se utilizaron cables flexibles para comunicar los electrodos con el polígrafo modelo Grass 78 D y permitir libre movimiento a los animales, los cuales tuvieron acceso ilimitado a agua y alimento. Los animales del grupo control y aquellos cuyas madres fueron expuestas a la inhalación de 1 ppm de ozono durante toda la gestación, fueron registrados polisomnográficamente durante 24 horas a los 30, 60 y 90 días de edad sin ser expuestos a ozono durante el registro. Las ratas que estuvieron expuestas durante la gestación temprana, media y tardía se registraron libres del contaminante a los 30, 60 y 90 días de edad. Los grupos de ratas jóvenes y adultas que no fueron expuestas durante la gestación a la inhalación de ozono,

fueron registradas durante 24 horas bajo la administración de tres diferentes concentraciones de este gas (0.35, 0.75 y 1.5 ppm).

EVALUACIÓN DE RESULTADOS.

Los registros de sueño de las ratas se analizaron visualmente y se identificaron los estados de vigilia, sueño de ondas lentas, y sueño paradójico. Los criterios electrofisiológicos para definir dichos estados fueron los siguientes (Timo-laria y cols., 1970):

La vigilia estuvo determinada por oscilaciones electrográficas desincronizadas en la corteza y la presencia de tono muscular en el cuello.

El SOL se caracterizó por la presencia de husos de sueño acompañados de ondas lentas de alto voltaje en la corteza y mantenimiento ó disminución del tono muscular con relación al de la vigilia.

El SP se caracterizó por la presencia de desincronización en el ECG y por la ausencia de tono muscular.

El criterio mínimo para definir un cambio de estado, fue que el animal permaneciera en alguno de los tres estados electrofisiológicos por un período mayor de 10 segundos.

Se cuantificaron los porcentajes totales, el número y duración de los diferentes estados de vigilancia, así como la latencia de aparición del primer episodio de SP, el número de episodios de los tres estados y el promedio de duración. Los registros también se dividieron para su análisis en períodos de 12 horas, de acuerdo al ciclo luz-oscuridad de la rata. Con los datos obtenidos, se

realizó el análisis estadístico mediante la prueba de ANOVA para conocer la posible significancia de las diferentes condiciones, cuando se encontraron diferencias significativas mediante esta prueba, se aplicó la prueba de Tukey para conocer entre qué condiciones ocurrieron los cambios.

RESULTADOS.

EXPOSICIÓN PRENATAL.

El análisis de los registros de 24 horas en las ratas de 30, 60 y 90 días de edad, mostró que el grupo expuesto a ozono durante la gestación, presenta una disminución significativa en el tiempo total de sueño paradójico a expensas de un aumento en el tiempo de vigilia. Bajo esta condición, los valores del SOL no sufrieron modificaciones significativas (Figura 1). Durante el período de luz, los cambios en los valores del SP y la vigilia, fueron consistentes, sin embargo, también se observó una disminución significativa en el SOL de los animales de 30 y 60 días de edad. Los cambios en el tiempo total de SP y de vigilia, también ocurrieron a los 90 días, sin embargo, el tiempo total de SOL no cambia (Figura 2). En el período de oscuridad nuevamente disminuyeron los valores del SP, no obstante, ocurrió un cambio inverso con relación a los valores de los 2 estados conductuales restantes, es decir, la vigilia disminuyó y el SOL aumentó significativamente en los animales de 30, 60 y 90 días de edad expuestos a ozono a lo largo de la gestación (Figura 3).

Por otro lado, los animales del grupo experimental presentaron menor peso y talla corporal que los animales control tanto al momento del nacimiento como a lo largo de los 30 días de edad, que fue el momento en que iniciaron los estudios de sueño (Figura 4). No hubo diferencia en el número de crías entre ambos grupos; 2 de los animales del grupo experimental sometidos a la inhalación de 1 ppm de ozono presentaron crecimiento anormal de los incisivos.

ESTADOS DE SUEÑO 24 HORAS

Gestación

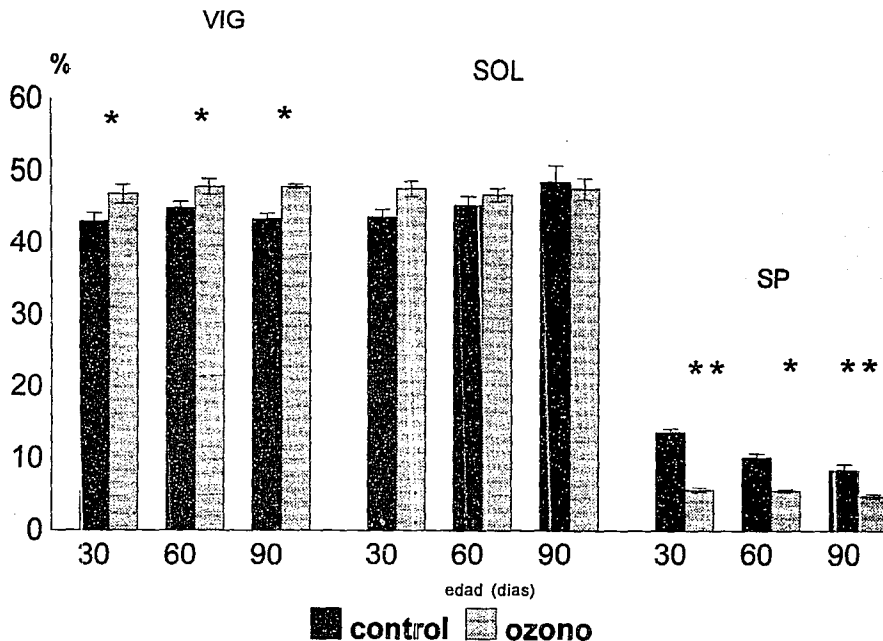


Figura 1. Duración de los estados de vigilancia en ratas control y en ratas expuestas durante la gestación a la inhalación de ozono. Los porcentajes promedio se analizaron con la prueba ANOVA simple: n=10; * p < 0.01, ** p < 0.001

ESTADOS DE SUEÑO PERIODO DE LUZ

Gestación

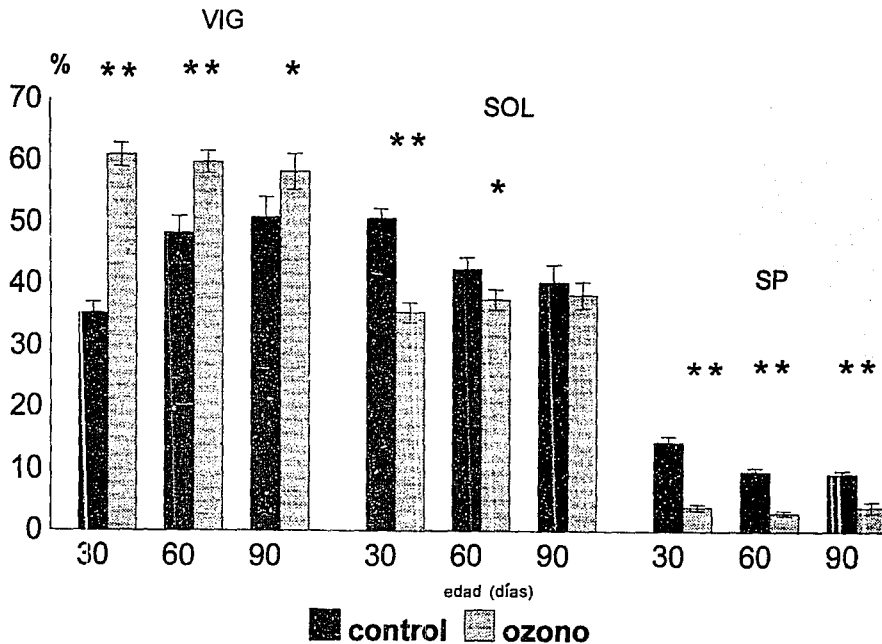


Figura 2. Duración de los estados de vigilancia en el período de luz en ratas control y en ratas expuestas durante la gestación a la inhalación de ozono. Los valores promedio (+ E.E) se analizaron con la prueba ANOVA simple: n=10, * p< 0.01, ** p< 0.001.

ESTADOS DE SUEÑO PERIODO DE OSCURIDAD

Gestación

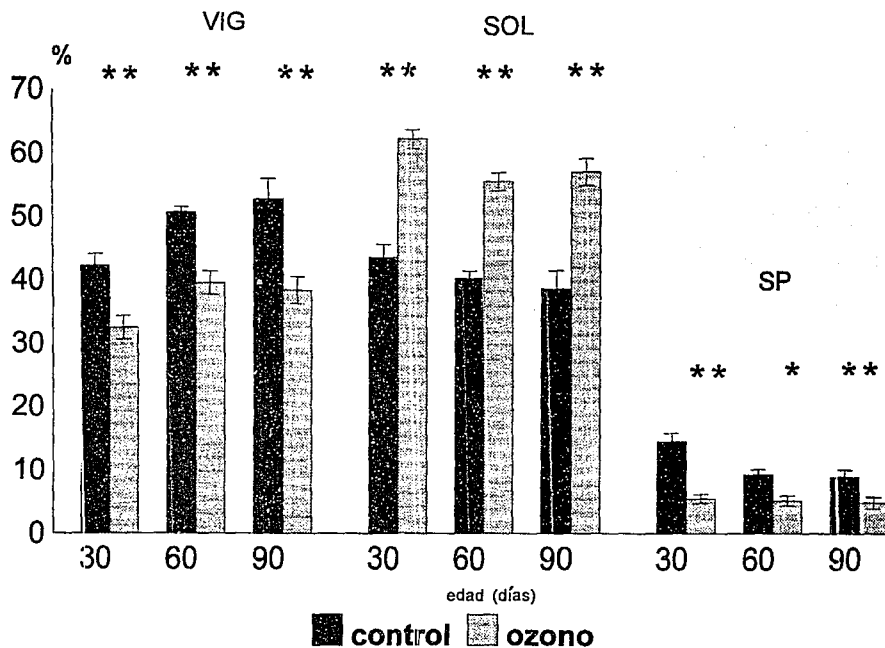


Figura 3. Duración de los estados de vigilancia en el período de oscuridad en ratas control y en ratas expuestas durante la gestación a la inhalación de ozono. Los porcentajes promedio se analizaron con la prueba ANOVA simple: n=10; * p < 0.01, ** p < 0.001.

PESO CORPORAL

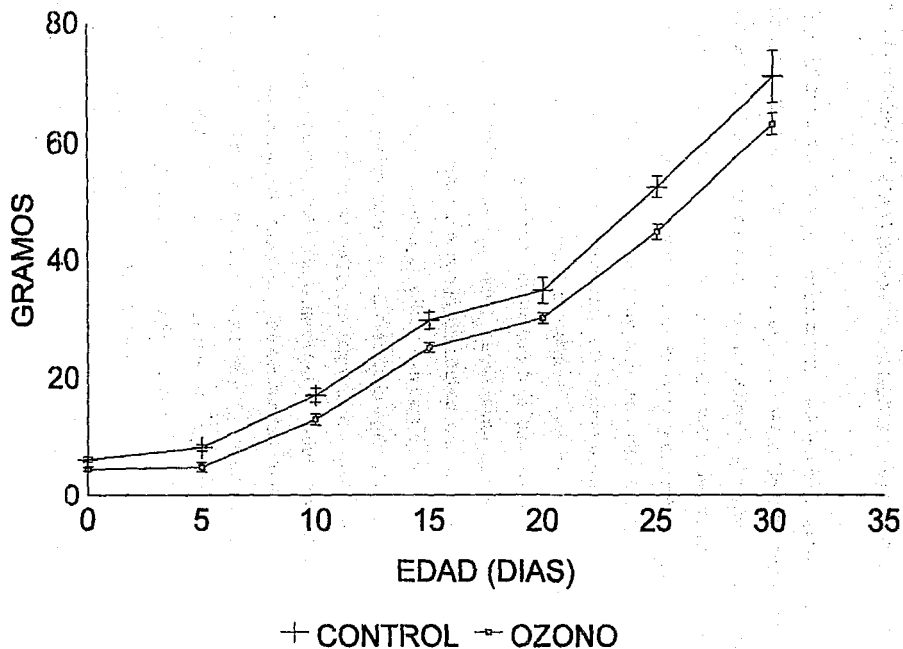


Figura 4. Peso corporal desde el nacimiento hasta los 30 días de edad en ratas control y en ratas cuyas madres fueron expuestas a 1 ppm de ozono a lo largo de la gestación durante el ciclo de oscuridad. Las diferencias fueron significativas de acuerdo a la prueba T de student ($p < 0.001$), $n=18$.

EXPOSICIÓN A OZONO DURANTE LA GESTACIÓN TEMPRANA.

En el grupo 3, formado por ratas cuyas madres fueron expuestas por 12 horas diarias durante los primeros siete días de gestación a la inhalación de 1 ppm de ozono, el análisis de los registros de sueño de 24 horas a los 30 días de edad, muestra una disminución significativa de sueño paradójico en el grupo experimental con respecto al grupo control; la vigilia y el sueño de ondas lentas se encuentran aumentados, aunque dicho aumento sólo fue significativo en el caso del SOL (Figura 5). Por lo que respecta al ciclo de luz, se observó que el sueño paradójico disminuye significativamente en el grupo experimental; mientras que la vigilia y el SOL aumentan bajo esta condición experimental (Figura 6). En el período de oscuridad, nuevamente ocurre una disminución significativa en la duración del sueño paradójico en el grupo experimental, aunque el SOL también disminuye; estos cambios ocurren a expensas de un aumento también significativo en los valores de la vigilia (Figura 7).

En este mismo grupo se realizaron registros de sueño de 24 horas a los 60 días de edad, observándose que la cantidad de sueño paradójico disminuye en el grupo experimental, sin embargo, las cantidades de la vigilia y el SOL, no presentan cambios importantes. El análisis del ciclo de luz nos permite observar cambios significativos en los tres estados de vigilancia para el grupo experimental: el sueño paradójico y la vigilia disminuyen, mientras que el SOL aumenta. En el período de oscuridad bajo esta condición experimental, ocurren los siguientes cambios significativos: el sueño paradójico disminuye y la vigilia aumenta, mientras que la cantidad total del SOL no sufre cambios importantes.

Los registros de sueño a los 90 días de edad permiten observar durante las 24 horas de registro que la cantidad total del sueño paradójico disminuye en el grupo sometido a la inhalación de 1 ppm de ozono durante los días 0 a 7 de la gestación; mientras que el tiempo total de la vigilia y del SOL no se ven modificados bajo esta condición. Durante la fase luminosa, vuelve a presentarse una disminución significativa en las cantidades de SP y de la vigilia; mientras que el SOL presenta un aumento significativo. En el período de oscuridad, el SP disminuye, la vigilia aumenta y el SOL no sufre modificaciones significativas (Figuras 5, 6 y 7).

EXPOSICIÓN A OZONO DURANTE LA GESTACIÓN MEDIA.

El grupo 4, que a continuación se describe, estuvo formado por las crías de ratas expuestas durante la gestación media (7 a 14 días) por 12 horas diarias, a la inhalación de 1 ppm de ozono. El análisis de los registros de sueño de 24 horas para los animales de este grupo, muestra a los 30 días una disminución significativa en la cantidad total del sueño paradójico, así como un aumento en el tiempo de la vigilia. En el período de luz, los cambios el SP persisten, es decir, ocurrió una disminución en esta fase de sueño, mientras que el sueño de ondas lentas aumentó de manera significativa bajo esta condición. El análisis del período de oscuridad resultó también en una disminución significativa en la duración del SP, mientras que la vigilia aumentó de manera también significativa.

De la misma manera, se realizaron estudios de 24 horas para este grupo a

ESTADOS DE SUEÑO 24 HORAS

Gestación temprana, media y tardía

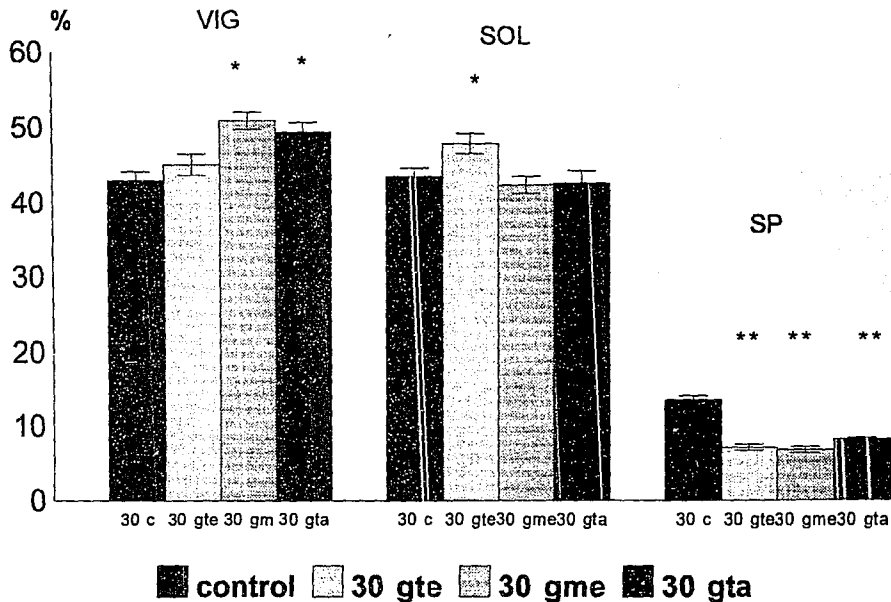


Figura 5. Duración de los estados de sueño en ratas control y en ratas de 30 días de edad expuestas durante diferentes momentos de la gestación a la inhalación de 1 ppm de ozono. Los valores promedio $n=10$ (+E.E.) fueron analizados mediante la prueba ANOVA simple: * $p < 0.01$, ** $p < 0.001$.

ESTADOS DE SUEÑO PERIODO DE LUZ

Gestación temprana, media y tardía

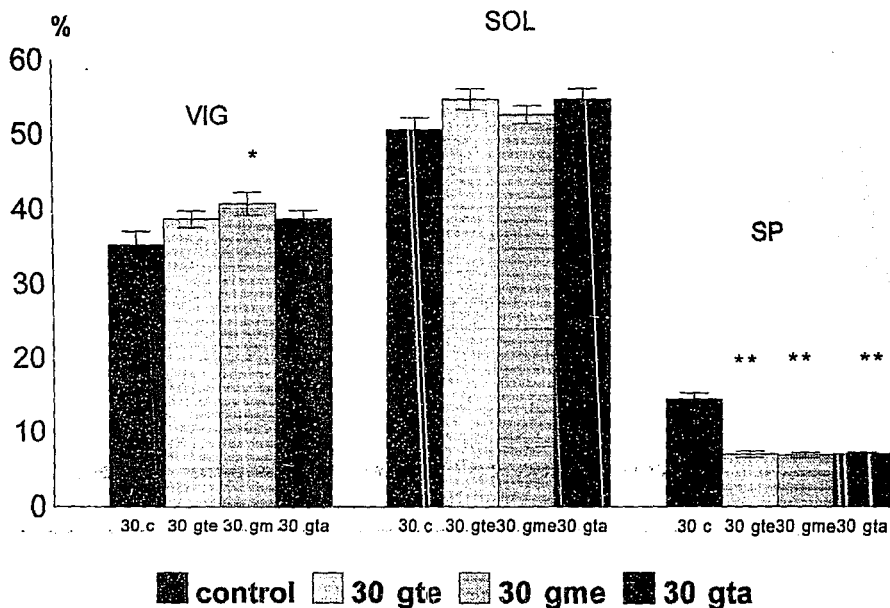


Figura 6. Duración de los estados de sueño en el período de luz en ratas control y en ratas de 30 días de edad expuestas durante diferentes momentos de la gestación a la inhalación de 1 ppm de ozono. Los valores promedio $n = 10$ (+E.E.) se analizaron con la prueba ANOVA simple: * $p < 0.01$, ** $p < 0.001$.

ESTADOS DE SUEÑO PERIODO DE OSCURIDAD

Gestación temprana, media y tardía

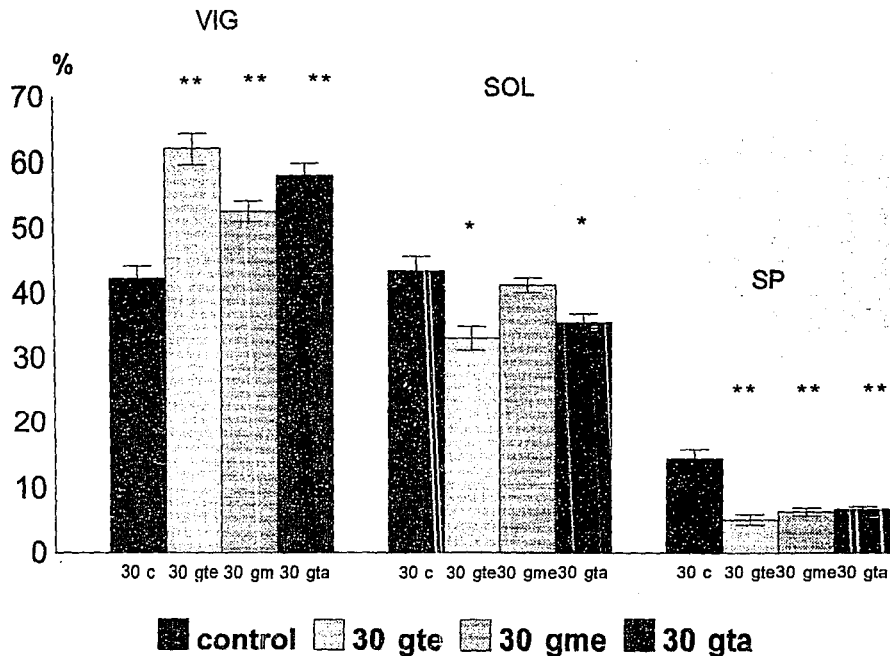


Figura 7. Estados de vigilancia durante el período de oscuridad en ratas control y en ratas de 30 días de edad expuestas en diferentes momentos de la gestación a la inhalación de 1 ppm de ozono. Los promedios $n=10$ (+E.E) se analizaron mediante la prueba de ANOVA simple: * $p < 0.01$, ** $p < 0.001$

los 60 días de edad, los cuales resultaron en una disminución en el tiempo de sueño paradójico, mientras que la vigilia se vio aumentada significativamente. En el período de luz, ocurrió también una disminución en la cantidad total de SP y de la vigilia, mientras que el SOL aumentó de manera significativa. El análisis de los estados de sueño en el período de oscuridad también refleja disminución en el tiempo total de SP, así como un aumento en el de la vigilia.

Los registros de sueño de 24 horas a los 90 días de edad para este grupo muestran también disminución significativa del SP, en tanto que la vigilia presenta aumento significativo. Durante la fase luminosa el SP y la vigilia disminuyen, mientras que el SOL aumenta significativamente. En el período de oscuridad, sólo ocurre una disminución significativa en la cantidad total del SP.

EXPOSICIÓN A OZONO DURANTE LA GESTACIÓN TARDÍA.

El grupo 5 estuvo formado por las crías de ratas expuestas durante el último tercio de la gestación. Los registros de sueño de 24 horas en las ratas de 30 días de edad permiten observar cambios significativos en la cantidad total del SP y la vigilia; el primero disminuye, mientras que la vigilia aumenta. En el período de luz, el SP disminuye, mientras que el SOL aumenta significativamente. El análisis de los registros de sueño durante la fase oscura presenta decrementos significativos para el SP y el SOL, mientras que la vigilia se ve aumentada también de manera significativa.

A los 60 días de edad, se presentan nuevamente cambios en los estados de vigilancia al analizar los registros de sueño de 24 horas; el sueño paradójico

disminuye significativamente. En el período de luz, el SP y la vigilia disminuyen, en tanto que el SOL presenta aumento significativo. La fase oscura refleja también disminución en el tiempo total del SP.

Se realizó el análisis de los registros de sueño de 24 horas para este grupo a los 90 días de edad y se encontró que el SP disminuye. Durante el período de luz ocurren disminuciones significativas para el SP y la vigilia, mientras que el SOL se ve incrementado. El análisis de los estados de vigilancia en la fase oscura, muestra disminución significativa en la duración del SP (Figuras 5, 6 y 7).

EXPOSICIÓN A OZONO A LOS 30 DÍAS DE EDAD.

Los grupos 6, 7 y 8 estuvieron formados por ratas de 30 días de edad que inhalaban 0.35, 0.75 y 1.5 ppm de ozono respectivamente durante las 24 horas del registro y que nunca antes habían sido expuestas al ozono. Al comparar las fases de sueño de estos grupos, con ratas control de 30 días de edad, se observa que el SP disminuye y que la vigilia aumenta significativamente en todas las condiciones. El análisis de los estados de sueño durante el período de luz muestra los mismos efectos, es decir, el SP disminuye y la vigilia aumenta significativamente; sin embargo, el SOL aumenta también de manera significativa en los animales expuestos a 0.75 y a 1.5 ppm de ozono. En el período de oscuridad, se presentan nuevamente la disminución significativa en la cantidad total del SP y el aumento en la vigilia. Finalmente, en el período de oscuridad se observan los mismos cambios para estos grupos que en el análisis

ESTADOS DE SUEÑO 24 HORAS 30 días

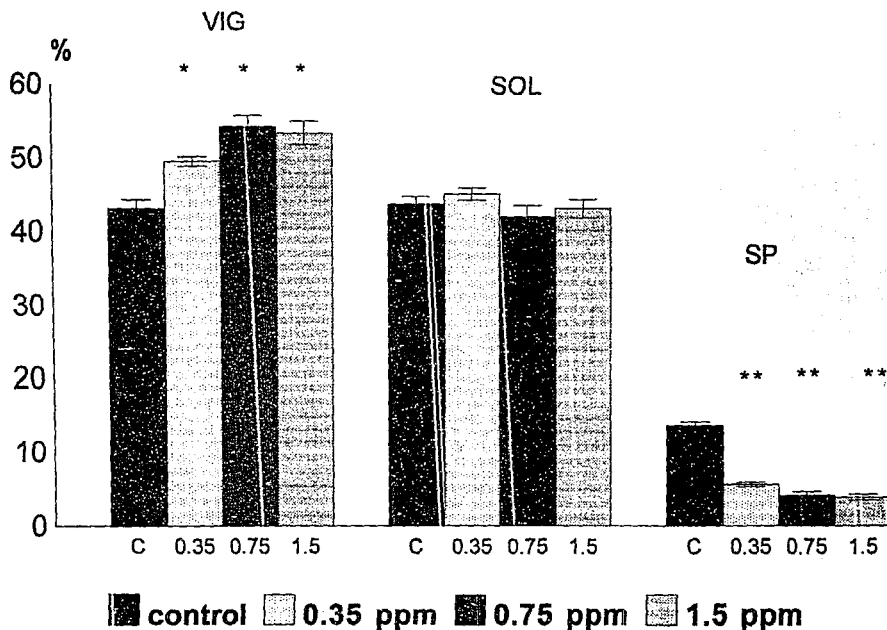


Figura 8. Estados de vigilancia en ratas control y en ratas de 30 días de edad expuestas durante 24 horas continuas a la inhalación de ozono. Los valores promedio $n=10(+E.E.)$ expresados en porcentaje, se analizaron con la prueba ANOVA simple: * $p < 0.01$, ** $p < 0.001$.

ESTADOS DE SUEÑO PERIODO DE LUZ

30 días

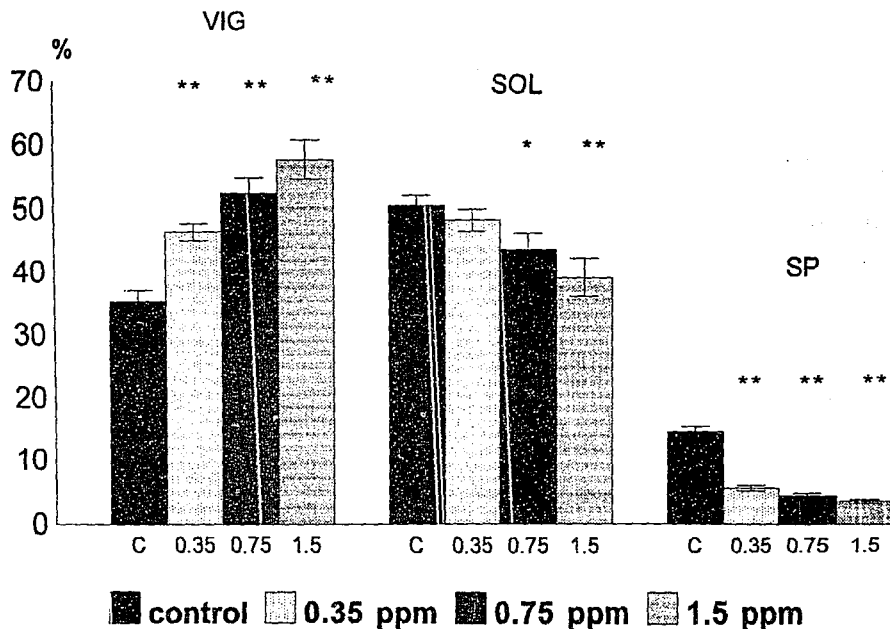


Figura 9. Estados de vigilancia en el período de luz de ratas control y de ratas de 30 días de edad expuestas durante 24 horas continuas a la inhalación de ozono. Los valores promedio (+E.E.) se analizaron con la prueba de ANOVA simple: n=10; * p < 0.01, ** p < 0.001.

ESTADOS DE SUEÑO PERIODO DE OSCURIDAD

30 días

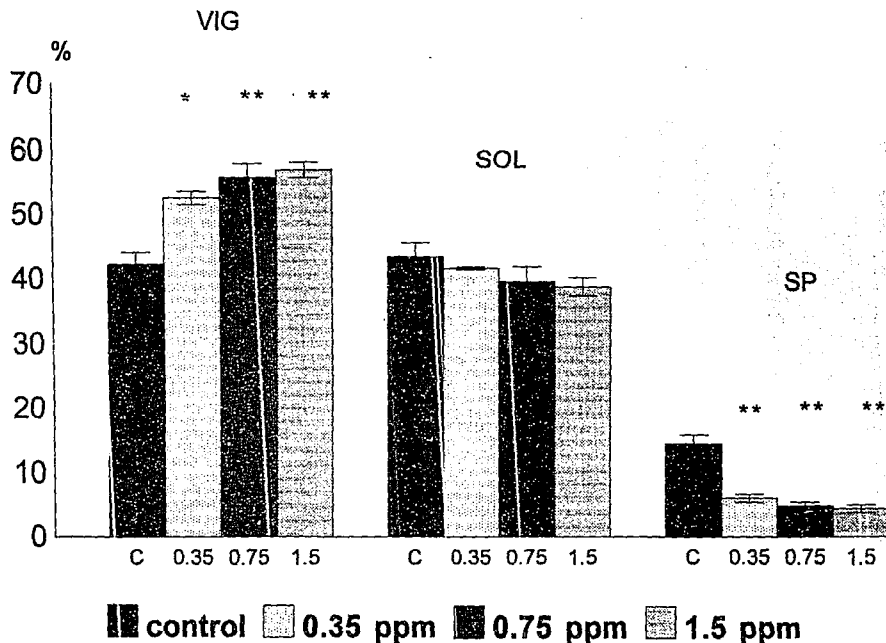


Figura 10. Estados de vigilancia en el período de oscuridad de ratas control y de ratas de 30 días de edad expuestas durante 24 horas continuas a la inhalación de ozono. Se utilizó la prueba de ANOVA simple para analizar las diferencias entre los grupos: n=10; * p < 0.01, ** p < 0.001.

de 24 horas, es decir, el sueño paradójico disminuye y la vigilia aumenta significativamente en las tres condiciones experimentales (Figuras 8, 9 y 10).

EXPOSICIÓN A OZONO EN RATAS ADULTAS.

Se estudiaron los efectos de 3 concentraciones de ozono sobre el patrón de sueño de ratas adultas y se compararon con el patrón de sueño normal de un grupo de ratas control (grupo 9), con el fin de conocer las posibles diferencias entre efectos observados en ratas jóvenes y adultas, así como los efectos entre diferentes concentraciones de ozono.

El análisis de los registros de sueño para los grupos 10, 11 y 12, formados por ratas adultas expuestas a la inhalación de 0.35, 0.75 y 1.5 ppm de ozono respectivamente durante las 24 horas del registro, muestra los siguientes cambios: la vigilia y el SP se encuentran disminuidos, mientras que el SOL aumenta significativamente. En el período de luz, la cantidad total del SP disminuye, en tanto que la vigilia aumenta significativamente. En cuanto a los cambios ocurridos en el período de oscuridad, se presentaron disminuciones significativas en el tiempo total del SP y la vigilia; bajo esta condición, la cantidad total del SOL se vio incrementada también significativamente (Figuras 11, 12 y 13).

ESTADOS DE SUEÑO 24 HORAS

Adultas

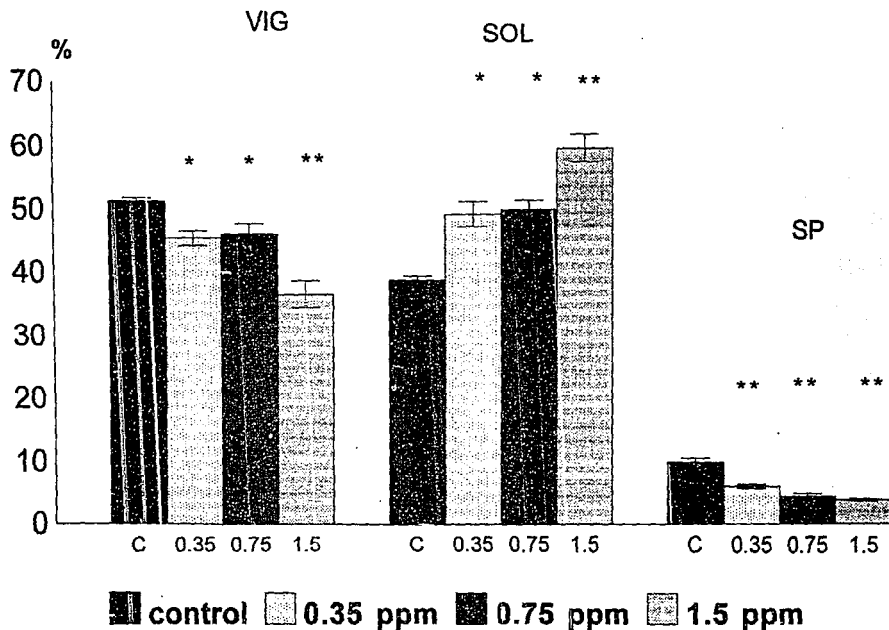


Figura 11. Duración de los estados de vigilancia en ratas control y en ratas adultas expuestas durante 24 horas continuas a la inhalación de ozono. Los valores promedio (+E.E) se analizaron mediante la prueba ANOVA simple: n=10; * p < 0.01, ** p < 0.001.

ESTADOS DE SUEÑO PERIODO DE LUZ

Adultas

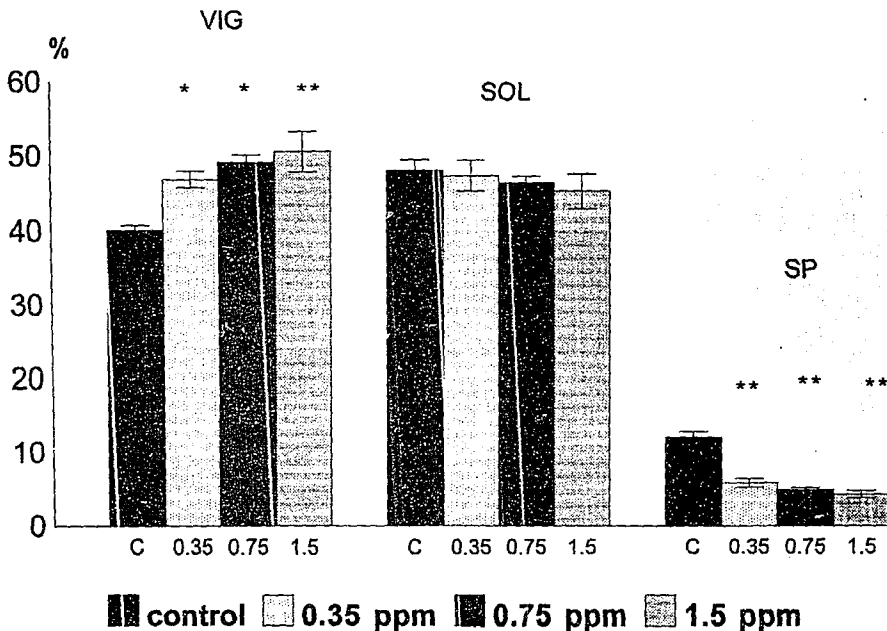


Figura 12. Estados de vigilancia en el período de luz de ratas control y de ratas adultas expuestas durante 24 horas continuas a la inhalación de ozono. Los valores promedio (+E.E.) se analizaron mediante la prueba ANOVA simple: n= 10; * p< 0.01, ** p< 0.001.

ESTADOS DE SUEÑO PERIODO DE OSCURIDAD

Adultas

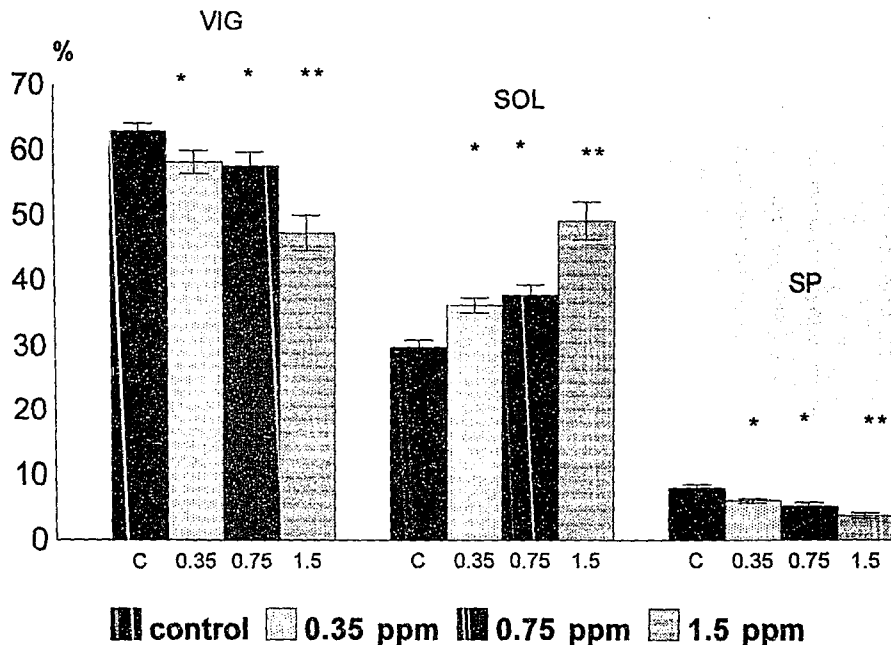


Figura 13. Estados de vigilancia en el período de oscuridad de ratas control y de ratas adultas expuestas durante 24 horas continuas a la inhalación de ozono. Los valores promedio (+E.E.) expresados en porcentaje, se analizaron con la prueba ANOVA simple: n=10; * p < 0.01, ** p < 0.001.

CAMBIOS EN EL SUEÑO PARADOJICO.

Se encontraron disminuciones significativas en el tiempo total de sueño paradójico en todos los grupos experimentales con respecto a los grupos control. Estos cambios se dieron tanto en el análisis de 24 horas como durante los ciclos de luz y oscuridad (Figuras 14 y15).

SUEÑO PARADOJICO

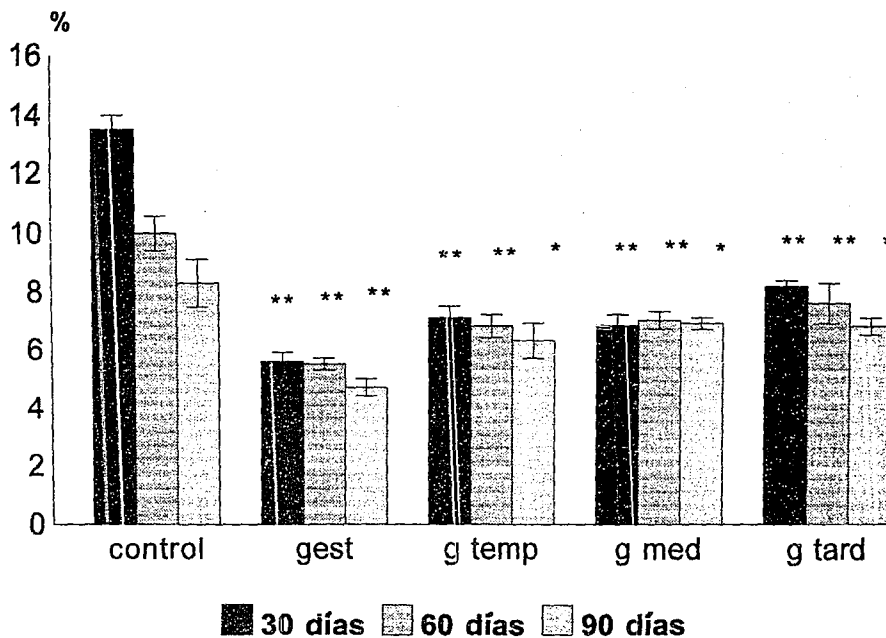


Figura 14. Cambios en la duración del sueño paradójico en ratas control y en ratas expuestas durante la gestación, la gestación temprana, gestación media y gestación tardía a 1 ppm de ozono. Los promedios (+E.E) se analizaron con ANOVA simple * p<0.01; ** p<0.001.

SUEÑO PARADOJICO

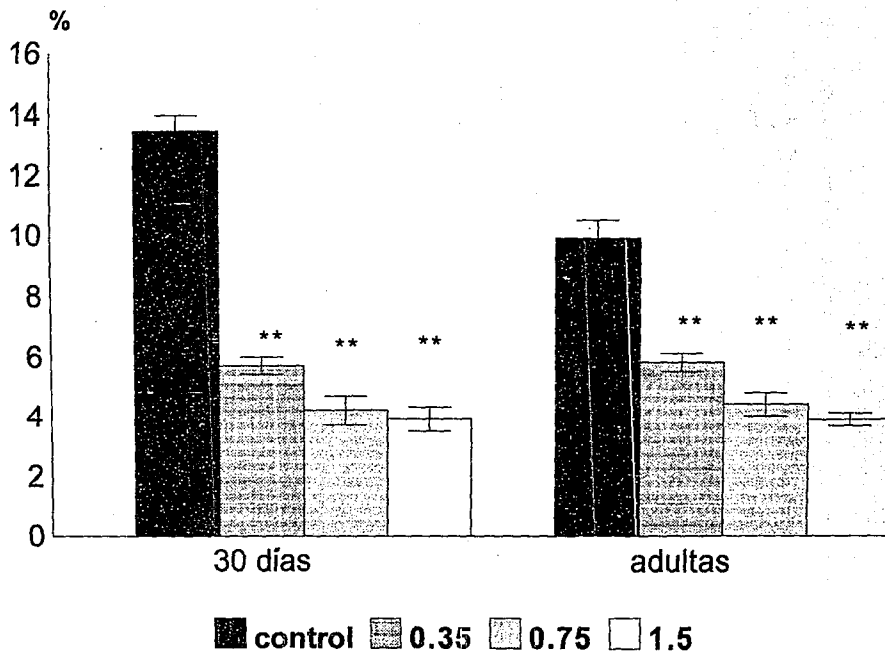


Figura 15. Cambios en la duración del SP en ratas jóvenes y adultas control, así como en ratas jóvenes y adultas expuestas a la inhalación de 0.35, 0.75 y 1.5 ppm de ozono durante 24 horas continuas. Los promedios (+E.E) se analizaron con ANOVA simple * $p < 0.01$; ** $p < 0.001$.

DISCUSIÓN.

En el presente estudio se sometió a la inhalación de ozono a ratas gestantes y a sus productos se les realizó registro polisomnográfico en diferentes momentos de su desarrollo. Asimismo, se estudiaron las consecuencias de la exposición a diferentes concentraciones de ozono durante 24 horas en ratas jóvenes de 30 días de edad y en ratas adultas. Se encontraron diferencias en la organización del sueño en todas las condiciones experimentales, particularmente, se dieron reducciones significativas en la duración del sueño paradójico. Los efectos fueron más severos en aquellos animales que fueron expuestos durante el periodo prenatal. En el resto de las condiciones experimentales, los animales jóvenes fueron más afectados que los adultos y las consecuencias de la inhalación de ozono fueron más severas en animales expuestos durante 24 horas a concentraciones altas.

Es conocido el hecho de que a los 30 días de edad, la rata presenta mayor cantidad de sueño paradójico que en la edad adulta, y que la disminución en la duración de esta fase de sueño produce un aumento en la vigilia. Lo anterior se corrobora en la duración de los estados de vigilancia de las ratas de nuestro estudio. Sin embargo, en las ratas juveniles cuyas madres estuvieron expuestas a la inhalación de ozono durante la gestación, las cantidades de sueño paradójico se encuentran disminuidas de manera permanente y la vigilia se encuentra aumentada; mientras que en las adultas, además de la disminución en el sueño paradójico, disminuye también la vigilia y en el sueño de ondas lentas se registra un aumento. Todos los cambios anteriores ocurren a

manera dosis-respuesta, es decir, los efectos son más severos mientras mayor sea la concentración de ozono empleada. Las diferencias en los efectos de la exposición a ozono sobre los estados de vigilancia en ratas jóvenes y adultas pueden ocurrir como consecuencia de que las primeras presentan mayor actividad motriz durante los dos primeros meses de edad; entonces, la disminución en el sueño paradójico se refleja en un aumento en la vigilia y probablemente en la conducta de estos animales. Por otro lado, la exposición a ozono se realizó en el caso de las ratas jóvenes en el momento en que aún su SNC es más vulnerable que el de los animales adultos (Dobbing y Sands, 1970).

Se sabe que las estructuras nerviosas que regulan el sueño y la vigilia maduran en diferentes momentos del desarrollo. El sueño paradójico depende principalmente de la actividad de las células reticulares pontinas. Estas células alcanzan su madurez en el período intrauterino. Por otro lado, el sueño de ondas lentas aparece en el momento en que ocurren interconexiones entre el tálamo y la corteza cerebral; hecho que ocurre entre los 10 y 16 días de edad en la rata (Jouvet-Mounier, 1969). Otro hecho que apoya las diferencias en la severidad de los efectos en animales jóvenes y adultos expuestos a la inhalación de ozono es que las neuronas noradrenérgicas y serotoninérgicas deben establecer contacto en el tallo cerebral y remotamente en la corteza cerebral. Una de las funciones de ambos tipos de células es la inhibición y la disminución en la duración del SP durante las primeras semanas posnatales. Lo anterior ocurre debido a un incremento en el control inhibitorio aminérgico; además, durante el mismo período las neuronas se vuelven menos sensibles a la acetilcolina, que es el neurotransmisor que interviene primordialmente en la aparición del SP

(Hobson, 1972).

El sistema nervioso central es muy vulnerable a los cambios ambientales, especialmente si estos ocurren durante el desarrollo del mismo. La severidad del daño depende del momento en que se presentan las variaciones y generalmente se ha reportado que estos daños son irreversibles (Kavlock y cols., 1979; Cintra y cols., 1988; Gunninson y cols., 1992). A este respecto, un área de especial interés lo constituye el estudio del ciclo sueño-vigilia. Los resultados del presente estudio, muestran claros efectos sobre la organización del sueño en todas las ratas expuestas al ozono. De esta manera, es probable que estas condiciones afecten el desarrollo de las estructuras involucradas en la regulación del ciclo sueño-vigilia y que en organismos que presentan ya desarrollado su sistema nervioso, la exposición al ozono afecta también de manera selectiva, los mecanismos generadores del sueño paradójico.

La vulnerabilidad del SNC durante el desarrollo, se manifiesta principalmente en las células que sufren mitosis, en las que migran y en las que se encuentran en fase de mielinización, siendo todas ellas más sensibles a los agentes neurotóxicos. El daño a estas células puede resultar de la inhalación de varios agentes químicos, ó por la ingestión de alguno de ellos, por ejemplo, algunos medicamentos como la talidomida y los corticosteroides; algunos citotóxicos como la 5-azacitidina; aditivos de alimentos como son el benzantraceno y el benzopireno; la acción de ciertas hormonas como es el caso de la tiroxina; drogas de abuso como el alcohol, los disolventes industriales y los opiáceos; los metales pesados cloruro de metil-mercurio y plomo; los pesticidas organoclorados y fosforados; y otros (Eccles y Annau, 1982; Lorenzana-Jiménez y Salas, 1980, 1983, 1985; Kira y cols., 1988; Kishi y cols., 1992). Con los datos

de nuestro estudio, a pesar de que sólo se realizó análisis electrofisiológico, podemos suponer que en los modelos empleados bajo exposición a ozono, se está produciendo a nivel celular, un daño similar a aquel producido en los experimentos con sustancias neurotóxicas.

La diferenciación del SNC no sólo ocurre en el período intrauterino, sino que se extiende al período posnatal, de esta manera, se han descrito diferentes períodos en los que los organismos son especialmente vulnerables a la acción de agentes exógenos; en el caso de la rata, este período se extiende al primer mes de vida (Dobbing y Sands, 1979). De esta manera, el daño producido prenatalmente como consecuencia de la exposición a ozono, podría extenderse hasta los primeros días posnatales; asimismo, los animales jóvenes expuestos sólo durante 24 horas a la inhalación de ozono, aún se encontraban en el período de mayor vulnerabilidad del SNC; razón por la cual, se vieron más afectados que los adultos.

No se conoce una relación dosis-efecto directa. Los agentes tóxicos administrados prenatalmente no solo destruyen neuronas, sino que alteran la función de grandes redes neuronales, lo que complica en última instancia la expresión de la toxicidad conductual. Los estudios experimentales muestran que el SNC en desarrollo, es más susceptible a los agentes neurotóxicos que el de los adultos (Thornburg y Moore, 1976). Es sabido que los sistemas antioxidantes tales como la vitamina E y las enzimas Cu-Zn super oxidodismutasa y glutatión peroxidasa se encuentran disminuidas en el tejido fetal (Gunther y cols., 1993). El SNC es muy susceptible al estrés oxidativo provocado por la presencia de radicales libres; esta susceptibilidad se ha atribuido a que el sistema nervioso posee un alto contenido de sustancias

antioxidantes amortiguadoras, así como a la misma producción endógena de radicales libres que se generan durante el metabolismo celular. Dicha susceptibilidad es mayor cuando el sistema nervioso se encuentra en desarrollo. Por lo anterior, el impacto del ozono y sus productos de reacción es mayor mientras el organismo sea más joven, ó bien cuando se empleen altas dosis de este contaminante.

Se ha concluido que el periodo del día 13 al 18 de la gestación en la rata, es crítico para el desarrollo de la conducta, ya que el daño producido durante este periodo puede afectarla severamente (Dobbing y Sands, 1979). En nuestro estudio se incluyó un grupo de ratas cuyas madres fueron expuestas a ozono durante la gestación tardía, que comprende el intervalo entre los 14 y 21 días de gestación. En este grupo de ratas se realizaron estudios de sueño en un ambiente libre de contaminantes a los 30, 60 y 90 días de edad y se encontraron claros efectos sobre la organización del sueño. La inhalación crónica de 1 ppm de ozono durante la gestación y en diferentes intervalos de ésta, disminuye significativamente las cantidades de SP tanto en el análisis por periodos de luz y oscuridad como a lo largo de todo el registro. Los efectos persistentes en la cantidad del sueño paradójico a lo largo del ciclo sueño-vigilia apoyan la hipótesis de que el ozono está actuando de manera selectiva sobre los mecanismos generadores de esta fase de sueño en particular y que los efectos sobre los demás parámetros podrían ser consecuencia de un efecto compensatorio (Paz y Bazán-Perkins, 1992). Lo anterior está apoyado también por el hecho de que tanto ratas jóvenes como adultas presentan variaciones similares al ser expuestas durante 24 horas a la inhalación de diferentes concentraciones de ozono.

Los estudios de sueño en ratas normales señalan que son animales nocturnos, es decir, son más activos durante el ciclo de oscuridad y que además, como otros mamíferos ya estudiados, presentan predominantemente SP al momento del nacimiento, estos valores disminuyen en la medida en que el SNC de estos animales se va desarrollando y los valores del SOL y de la vigilia aumentan de manera concomitante (Jouvet-Mounier y cols., 1969; Gramsbergen, 1976; Hobson, 1989). Lo anterior es evidente en los valores de los grupos control en el presente estudio, sin embargo, al analizar los estados de vigilancia tomando en cuenta el ciclo luz-oscuridad, ocurre una inversión de este ciclo en el grupo expuesto durante toda la gestación, ya que las ratas pasaron más tiempo en vigilia en el período de luz y a su vez, se mostraron más activas, mientras que en el ciclo de oscuridad pasaron más tiempo en sueño de ondas lentas. Esto sugiere que la inhalación de O₃ durante la gestación puede estar afectando también de manera selectiva, las estructuras nerviosas involucradas en la regulación de los ritmos circadianos. Cabe mencionar, que los animales expuestos a ozono durante los diferentes tercios de la gestación y aquellos que fueron expuestos después de nacidos no presentaron la inversión del ciclo.

De acuerdo a la hipótesis de que el SP favorece el desarrollo del SNC en los mamíferos (Jouvet-Mounier y cols., 1969; Coons, 1987; Alford y cols., 1990) y que durante la gestación existe mayor vulnerabilidad ante los cambios ambientales sobre los organismos (Sobotka y cols., 1974; Annau y cols., 1986), es probable que los efectos de la contaminación del aire estén incidiendo sobre la presencia de trastornos del sueño ó del desarrollo de éstos, secundarios a problemas ambientales; tomando en cuenta que la última clasificación diagnóstica de los trastornos del sueño, incluye un apartado especial que hace

referencia a este tipo de alteraciones (American Sleep Disorders Association - ASDA, 1990). La disminución en la duración del sueño paradójico que ocurre a expensas de un aumento en la duración del sueño de ondas lentas durante las primeras semanas de edad en la rata, se consideran signos de madurez del SNC, en los animales expuestos a ozono durante la gestación y en los diferentes momentos de ésta, no se observa esta caída en la duración del SP. Este hecho, apoya la hipótesis de que se está afectando el desarrollo del SNC en ratas expuestas a ozono durante la gestación.

La administración de sustancias neurotóxicas durante la gestación, altera el desarrollo fetal, aunque algunas pueden producir efectos que no se atribuyen a la exposición prenatal (Hutchings, 1978). La exposición prenatal a estas sustancias, produce alteraciones en la función neuronal, la cual ha sido mostrada ampliamente en modelos animales expuestos a bajas concentraciones de un tóxico, sin embargo, no existen hasta el momento evidencias suficientes de daño cerebral en el hombre, ni tampoco se conoce con exactitud si el feto humano es más sensible que los de otras especies a la exposición prenatal de agentes neurotóxicos (Kabat y cols., 1985; Annau y Eccles, 1986). En el presente trabajo se estudiaron los efectos de un contaminante ambiental al que estamos expuestos los habitantes de las grandes ciudades. Los estudios previos han abordado el problema a partir de sustancias neurotóxicas que afectan sólo a determinados sectores de la población, por lo tanto, el estudio de los efectos que el ozono produce en organismos en desarrollo, como en aquellos que han alcanzado la madurez, aporta nueva información para conocer los daños que este agente pudiera producir en el organismo humano.

Hasta el momento no existen reportes que indiquen con precisión los

efectos que el ozono produce sobre el SNC en desarrollo. El presente modelo resulta un buen indicador, ya que el sueño es una de las funciones importantes del organismo, que es regulada por el SNC. Es muy probable que los productos de reacción del ozono estén afectando a las células nerviosas en sus procesos de división, migración y proliferación. Lo anterior interfiere con el desarrollo de los sistemas de defensa antioxidantes que ocurren bajo condiciones normales de crecimiento (Gunther y cols., 1993; Miyazawa y cols., 1993; Subramanian y cols., 1993); y en consecuencia, algunas de las funciones reguladas por el SNC se ven afectadas por esta condición, entre ellas, la organización de los estados de sueño.

Cuando un organismo en desarrollo es expuesto a algún tóxico, se produce un daño a nivel del sistema nervioso en el que no necesariamente se ven afectadas estructuras específicas como las dendritas, las espinas dendríticas u otros organelos neuronales. Puede ocurrir también una disminución en el número de las espinas, alteración de la maduración sináptica del cerebelo con retardo en la diferenciación neuronal de la corteza cerebral. Estas alteraciones se verán necesariamente relacionadas con disfunciones neurológicas (Volk, 1984). Es probable que en los animales experimentales que participaron en nuestro estudio, los daños sobre el SNC se reflejen en las alteraciones del sueño detectadas.

El fenómeno de plasticidad neuronal, sin embargo, puede permitir algún tipo de recuperación funcional (Escobar y Salas, 1987). Los resultados obtenidos en el presente estudio, muestran que el daño en las ratas que fueron expuestas a la inhalación de ozono durante la gestación y en diferentes momentos de ésta, es irreversible, ya que los efectos fueron permanentes al

realizar estudios polisomnográficos a los 30, 60 y 90 días de edad.

Los efectos del ozono han sido descritos con mayor detalle en el aparato respiratorio (Bassett y cols., 1988; Van y cols., 1988), no obstante, también se han descrito efectos extrapulmonares, a pesar de que hasta el momento no existe evidencia de que el ozono penetre más allá del pulmón (Tepper y Weiss, 1986; Tepper y cols., 1989; Arito y cols., 1992; Huitrón-Reséndiz y cols., 1994). Sin embargo, una de las hipótesis más aceptadas hasta el momento en cuanto a los efectos del ozono sobre los organismos, es la formación de radicales libres, los cuales podrían ser transportados vía sanguínea hacia las estructuras nerviosas que intervienen en la regulación del ciclo sueño-vigilia (Paz y Bazán-Perkins, 1992). El SNC es muy susceptible a la acción de los radicales libres, particularmente sobre algunas patologías degenerativas (Haugaard, 1968; Halliwell y Gutteridge, 1985; Thordstein y cols., 1993). Los efectos dañinos de los radicales libres, también han sido demostrados en modelos experimentales de daño cerebral (Kontos y Jacobs, 1986; Kitagawa y cols., 1990). Los efectos sobre el patrón de sueño en ratas de 30 días y en ratas adultas expuestas a diferentes concentraciones, podrían darse a consecuencia de los productos de reacción del ozono. En el caso de las ratas que fueron expuestas durante la gestación y en los diferentes intervalos de ésta, es probable que los radicales libres pudieran atravesar la barrera placentaria y afectar los mecanismos de formación y desarrollo del SNC, produciendo una susceptibilidad acrecentada durante la diferenciación celular y afectando entre otras funciones, la organización del ciclo sueño-vigilia.

Los efectos del daño cerebral producido por los agentes neurotóxicos sobre el feto, no se presentan en la madre. Algunas razones deben existir para

explicar la sensibilidad del SNC en desarrollo, el cual se acompaña de una disminución en la protección de la barrera hematoencefalica, probablemente debida al daño celular producido por la formación de radicales libres (Thornburg y Moore, 1976). Las sustancias que cruzan la barrera placentaria alcanzan el cerebro fetal con gran facilidad. Los sistemas que metabolizan drogas se desarrollan después del nacimiento, por lo que la capacidad del feto para metabolizar es muy baja. Estos factores combinados con la rápida proliferación de células durante la gestación, favorecen el daño producido por los agentes neurotóxicos (Spyker y Smithberg, 1972; Ballatori y Clarkson, 1982). En nuestro estudio, el patrón de sueño de las madres que estuvieron expuestas a 1 ppm de ozono durante la gestación también debió verse afectado, ya que a pesar de no haber realizado registros polisomnográficos en las madres, las ratas jóvenes y adultas que fueron expuestas a concentraciones menores de 1 ppm de ozono durante 24 horas, presentaron alteraciones de sueño.

Los efectos de la desnutrición pre y posnatal sobre el sueño en ratas ocurren principalmente sobre el sueño paradójico, esta fase de sueño aumenta significativamente en el período de luz en ratas desnutridas después del nacimiento (Forbes y cols., 1977; Cintra y cols., 1988). Si se restringe de alimento a las ratas madres durante la gestación y a sus crías durante la lactancia, el sueño paradójico de estas últimas disminuye durante el período de luz y aumenta en el período de oscuridad, como consecuencia de este fenómeno compensatorio, no existen diferencias al analizar las 24 horas de registro (Salas y cols, 1983). La exposición prenatal al ozono produce disminución significativa en el peso de las ratas; esto no representa un modelo de desnutrición, sin embargo, los efectos sobre el sueño paradójico son más severos que en los

modelos anteriores, dando como resultado cambios a largo plazo en la distribución de las fases de sueño, lo cual podría causar una interferencia con los procesos de desarrollo de las estructuras nerviosas involucradas en la regulación del ciclo sueño-vigilia y la ritmicidad circadiana.

Se ha reportado un incremento en la tasa de liberación de acetilcolina en la corteza cerebral que acompaña a la desincronización electrográfica observada durante el SP (Jouvet, 1969, 1972). Tomando en cuenta que la acción de las monoaminas es importante en la presentación de las diferentes fases de sueño, y que la exposición a ozono produce cambios importantes en las concentraciones de estas sustancias, particularmente de la serotonina (Skillen y cols., 1966). Recientemente se han reportado cambios en las concentraciones de monoaminas en ratas adultas expuestas durante 24 horas a la inhalación de 1 ppm de ozono. Por otro lado, algunas alteraciones del sueño han sido relacionadas con un aumento de serotonina a nivel pontino, así como un aumento de este neurotransmisor y su metabolito el ácido 5-hidroxiindolacético tanto en el puente como en el mesencéfalo, mientras que ambas sustancias disminuyen en el hipotálamo (Huitrón-Reséndiz y cols., 1994). Es probable que estos efectos estén presentes en animales expuestos durante la gestación, así como en animales jóvenes. Se sabe que la acetilcolina y la serotonina intervienen de manera importante en la regulación del sueño y la vigilia (Morgane y Stern, 1972); entonces, si la exposición a ozono afecta las concentraciones de estos neurotransmisores en animales adultos, es muy factible que este fenómeno se esté presentando en animales en desarrollo y en animales jóvenes expuestos al contaminante.

Otros aminoácidos excitadores ó inhibidores como el glutamato y el GABA

se liberan en la corteza cerebral en relación a la activación electrográfica de los diferentes estados de sueño (Steriade y McCarley, 1990; Steriade, 1992). Algunos cambios en los contenidos de las catecolaminas y otros neurotransmisores se han correlacionado con las alteraciones conductuales provocadas por la administración de agentes tóxicos (Sobotka, 1974). También se ha observado una reducción significativa en el contenido de la serotonina y norepinefrina a nivel del mesencéfalo (Hughes y Annau, 1976).

Hilaire y cols., reportaron en 1993 que los cambios en el metabolismo de la serotonina pueden facilitar la ocurrencia de la apnea obstructiva de sueño, trastorno respiratorio que se presenta únicamente durante el sueño, y que no necesariamente refleja la existencia de alguna patología respiratoria durante la vigilia (Megiriany cols., 1980; Ballard y cols., 1990). Los autores mencionados reportan la presencia de apneas obstructivas en ratas neonatas, como resultado de cambios metabólicos en la serotonina. Por otro lado, se sabe que la hipoxia es una de las consecuencias de la exposición a grandes concentraciones de ozono; la hipoxia a su vez, es el resultado de los trastornos respiratorios inducidos por el sueño como son las apneas de tipo central y obstructivas (Laszy y Sarkadi, 1990). Lo anterior debe considerarse al analizar los resultados de nuestro estudio. Es probable que estén ocurriendo cambios en el metabolismo de los neurotransmisores que tienen mayor participación en la regulación del ciclo sueño-vigilia y que además, los cambios en la organización de los estados de sueño observados en nuestros animales experimentales, se deban en parte a la presencia de trastornos respiratorios que se den secundarios a la inhalación de ozono.

CONCLUSIONES.

La inhalación de ozono produce los siguientes efectos sobre la organización del sueño:

Alteraciones en las fases de sueño, destacando una disminución en la duración del sueño paradójico; la severidad del daño depende tanto de la edad de los animales, como de la concentración utilizada. En cuanto a la edad, aquellos animales expuestos durante su desarrollo se ven más afectados que los ya desarrollados. Por lo que respecta a las concentraciones de ozono empleadas, se observó que mientras más altas sean éstas, mayor será el impacto sobre la organización del sueño.

Cuando las ratas fueron expuestas a ozono durante la gestación, se produjo además una inversión del ciclo sueño-vigilia y los efectos permanecen de manera irreversible hasta la edad adulta.

BIBLIOGRAFÍA.

Alfoldi, P., Tobler, I. y Borbély A.A. Sleep regulation in rats during early development. *Am. J. Physiol.* 258:(Regulatory Integrative Comp. Physiol. 27) R634-R644, 1990.

American Sleep Disorders Society. The International Classification of Sleep Disorders, Diagnostic and Coding Manual. Allen Press. Inc., Kansas, pp. 77-80, 1990.

Annau, Z. y Eccles, Ch. Prenatal exposure. En: Annau, Z. Neurobehavioral Toxicology. The Johns Hopkins University Press. Baltimore, USA. Cap. 7, pp. 153-169, 1986.

Arito, H., Uchiyama, I., Arakawa, H. y Yokoyama, E. Ozone-induced bradycardia and arrhythmia and their relation to sleep-wakefulness in rats. *Toxicol. Lett.*, 52:169-178, 1990.

Arito, H., Uchiyama, I. y Yokoyama E. Acute effects of ozone on EEG activity, sleep-wakefulness and heart rate in rats. *Industrial Health*, 30:23-34, 1992.

Aust, S., Morehouse, L. y Thomas, C. Role of metals in oxygen radical reactions. *J. Free Rad. Biol. Med.* 1:3-25, 1985.

Balis, J.U., Faterson, J.F., Lundh, J.M., Haller, E.M., Shelley, S.A. y Montgomery, M.Z. Ozone stress initiates acute perturbations of secreted surfactant membranes. *American Journal of Pathology*, 138:847-857, 1991.

Ballard, R.D., Irvin, C.G., Martin, R.J., Pak, J., Pandey, R. y White, D.P. Influence of sleep on lung volume in asthmatic patients and normal subjects. *J. Appl. Physiol.* 68 (5):2034-2041, 1990.

Ballatori, N. y Clarkson, T.W. Developmental changes in the biliary excretion of methylmercury and glutathione. *Science*, 216:61-63, 1982.

Barry, E.B., Mercer, R.R., Miller, F.J. y Crapo, J.D. Effects of inhalation of 0.25 ppm ozone on the terminal bronchioles of juvenile and adult rats. *Exp. Lung*

Res., 14:225-245, 1988.

Bascom R., Nacleiro, R.M., Fitzgerald T.K., Kagey-Sobotka A. y Proud, D. Effect of ozone inhalation of the response to nasal challenge with antigen of allergic subjects. *Am. Rev. Resp. Dis.*, 142:594-601, 1990.

Bassett, D.J.P., Bowen-Kelly, E., Brewster. E.L., Elbon, C.L., Reichenbaugh, S.S., Burnton, T. y Kerr, J.S. A reversible model of acute lung injury based on ozone exposure. *Lung*, 166:355-369, 1988.

Battini, C., Moruzzi, G., Palestini, M., Rossi, G.F., y Zanchetti, A. Persistent patterns of wakefulness in the pretrigeminal midpontine preparation. *Science*, 128:30-32, 1958.

Bayer, S.A. y Altman J. Directions in neurogenetic gradients and patterns of anatomical connections in the telencephalon. *Prog. Neurobiol.*, 29:57-106, 1987.

Betteray, J.N., Vossen, J.M. y Coenen, L.M. Behavioral characteristics of sleep under different light/dark conditions. *Physiol. Behav.*, 50 (1) 79-82, 1991.

Bhalla, D.K., Lavan S.M. y Crocker T.T. Airway permeability in rats exposed to ozone or treated with cytoskeleton-destabilizing drugs. *Exp. Lung. Res.*, 14:501-525, 1988.

Biamond, P., Swaak, A., Van Ejjik, H. y Koster, J. Superoxide dependent iron release from ferritin in inflammatory diseases. *Free Rad. Biol. Med.* 4:185-198, 1988.

Boatman, S.E., Sato, S. y Frank, R. Acute effects of ozone on cat lungs. *Am. Rev. Resp. Dis.*, 110:157-168, 1974.

Bokina, A.I., Eksler, N.D., Semenenko, A.D. y Merkur'yeva, R.V. Investigation on the mechanism of action of atmospheric pollutants on the central nervous system and comparative evaluation of methods of study. *Environ. Health Persp.*, 13:37-42, 1976.

Borbély, A.A., Huston, J.P. y Waser, P.G. Control of sleep states in the rat by short light-dark cycles. *Brain Res.*, 95:89-101, 1975.

Borbély, A.A. y Tobler I. Endogenous sleep-promoting substances and sleep regulation. *Physiol. Rev.*, 6:605-670, 1989.

Bravo, H., Perrin, F., Sosa, R. y Torres, R. Importancia de la contaminación por ozono en la zona metropolitana de la Ciudad de México. *Ciencia, UNAM* 12:36-39, 1988.

Brinkman, R., Lamberts, H.B. y Veringa, T.S. Radiomimetic toxicity of ozonized air. *Lancet*, 7325:133-136, 1964.

Byers, D. y Saltzman, B.E. Determination of ozone in air by neutral and alkaline iodine procedures. *Am. Ind. Hyg. Assoc. J.*, 19:251-257, 1958.

Cerutti, P.A. Prooxidant status and tumor promotion. *Science*, 227:375-381, 1985.

Cino, M. y Del Maestro, R. Generation of hydrogen peroxide by brain mitochondria: The effects of reoxygenation following postdecapitative ischemia. *Arch. Biochem. Biophys.*, 269:623-628, 1989.

Cintra L., Diaz-Cintra S., Galvan, G. y Morgane, P.J. Circadian rhythm of sleep in normal and undernourished rats. *Bol. Est. Med. Biol.*, 36:3-17, 1988.

Colombo, P. The critical period concept: Research, methodology and theoretical issues. *Psychol. Bull.* 91:269-275, 1982.

Coons S. Development of sleep and wakefulness during the first 6 months of life. En: *Sleep and Its Disorders in Children*. Raven Press, New York, 17-27, 1987.

Corner, M.A. y Bour, H.L. Postnatal development of spontaneous neuronal discharges in the pontine reticular formation of free-moving rats during sleep and wakefulness. *Exp. Brain Res.*, 54:66-72, 1984.

Cowan, W.M. The development of the brain. *Sci. Am.*, 241:112-133, 1979.

Crnic, L.S. Effects of nutrition and environment on brain biochemistry and behavior. *Dev. Psychobiol.*, 16:129-145, 1983.

Curró, D.R., Paré D., Steriade, M. Short-lasting nicotinic and long-lasting

muscarinic depolarizing responses of thalamocortical neurons to stimulation of mesopontine cholinergic nuclei. *J. Neurophysiol.*, 65:393-406, 1991.

Del Maestro, R. Free radicals as mediators of tissue injury. En: *Trace Elements, Micronutrients, and Free Radicals*. E.I. Dreosty (ed.) Chap. 2, New Jersey, Humana Press, pp. 25-51, 1991.

Dement, W.C. The effect of dream deprivation. *Science*, 131:1705- 1707, 1960.

Dobbing, J. Undernutrition and the developing brain. The relevance of animal models to the human problem. *Amer. J. Dis. Child.*, 120:411-415, 1970.

Dobbing, J. y Sands, S. Comparative aspects of the brain growth spurt. *Early Hum. Dev.*, 3(1):79-83, 1979.

Dreosty E.I. Free radicals in biological systems. En: *Trace Elements, Micronutrients, and Free Radicals*. E.I. Dreosty (ed.) Chap. 1, New Jersey, Humana Press, pp. 1-24, 1991.

Drucker-Colín, R. y Prospero-García, O. Neurophysiology of sleep. En: Thorpy M.J. ed. *Handbook of Sleep Disorders*. New York: Merce! Decker, Inc, pp. 33-35, 1990.

Eccles, C.U. y Annau, Z. Prenatal methylmercury exposure: I. Alterations in neuronal activity. *Neurobehav. Toxicol. Teratol.*, 4:371-376, 1982.

Environmental Protection Agency (USA). Air quality criteria for ozone and other photochemical oxidants. V. IV, 1986.

Erinoff, L., Macphail, R.C., Heller, A. y Seiden, L.S. Age dependent effects of 6-hydroxydopamine on locomotor activity in the rat. *Brain Res.*, 64:195-205, 1979.

Escobar, C. y Salas, M. Ameliorating effects of early sensory stimulation of the behavior of adult rats underfed during the lactating period. *Bol. Estud. Méd. Biol. Méx.*, 35:195-202, 1987.

Farrell, B.P., Kerr, H.D., Kulla, T.J., Sauder, L.R. y Young, J.L. Adaptation in human subjects to the effects of inhaled ozone after repeated exposure. *Am. Rev. Resp. Dis.*, 119:725-730, 1979.

- Forbes, W.B., Tracy, C.A., Resnick, O. y Morgane, P.J. Effect of protein malnutrition during development of sleep behavior of rats. *Exp. Neurol.*, 57:440-450, 1977.
- Fowler, H., Hicks, S., D'amato, C., Beach, F. Effects of fetal irradiation on behavior in the albino rat. *J. Comp. Physiol. Psychol.*, 55, 309-314, 1962.
- Gallager, D.W. Spontaneous unit activity of neurons within the dorsal raphe nucleus of the neuronal rat. *Life Sci.*, 30:2109- 2113, 1982.
- Glenn, L., Steriade, M. Discharge rate excitability of cortically projecting intralaminar neurons during waking and sleep states. *J. Neurosci.*, 2:1387-1404, 1982.
- Gaillard, J. Biochemical pharmacology of paradoxical sleep. *Br. J. Clin. Pharmacol.*, 16:57-67, 1985.
- Galván-Rosas, A. Efectos de la privación total de sueño en ratas con desnutrición proteinica crónica. Tesis de Maestría. UACPyP, CCH, UNAM, 1993.
- Goldstein, B.D. y Balchum, O.J. Effect of ozone on lipid peroxidation in the red blood cell. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 126:356-358, 1967.
- Goldstein, B.D., Buckley, R.D., Cardenas, R., y Balchum, O.J. Ozone and vitamin E. *Science* 169:605-606, 1970.
- Goldstein, B.D., Lodi, C., Collinson, C. y Balchum, O.J. Ozone and lipid peroxidation. *Arch. Environ. Health*, 18:631-634, 1979.
- Goldstein, B.D., Pearson, B., Lodi, Ch., Buckley, R.D. y Balchum, O.J. The effect of ozone on mouse blood in vivo. *Arch. Environ. Health*, 16:648-650, 1968.
- Gordon, T., Taylor, B.F. y Amdur, M.O. Ozone inhibition of tissue cholinesterase in guinea pigs. *Arch. Environ. Health*, 36:284- 288, 1981.
- Graham, J.A., Menzel, D.B., Miller, F.J., Illing, J.W. y Gardner, D.E. Effect of ozone on drug-induced sleeping time in mice pretreated with mixed-function oxidase inducers and inhibitors. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 62:489-497, 1982.
- Graham, J.A., Menzel, D.B., Miller, F.J., Illing, J.W. y Gardner, D.E. Influence of

ozone pentobarbital-induced sleeping time in mice, rats, and hamsters. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 61:64-73, 1981.

Gramsbergen, A. EEG development in normal and undernourished rats. *Brain Res.*, 105:287-308, 1976.

Gramsbergen, A. The development of the EEG in the rat. *Dev. Psychobiology*, 9(6):501-515, 1976.

Gunnison, A.F., Weideman, M.S., Sobo, M., Koenig, K.L. y Chi, L.C. Age dependence of responses to acute ozone exposure in rats. *Fund. Appl. Toxicol.*, 18, 360-369, 1992.

Gunther, T., Hollriegl, V. y Vormann, J. Perinatal development of iron and antioxidant defense systems. *Journal of Trace Elements and Electrolytes in Health and Disease*, 7 (1) 472-476, 1993.

Gutteridge, C., Rowley, A. y Halliwell, B. Superoxide-dependent formation of the hydroxyl-radicals and lipid peroxidation in the presence of iron salts. *Biochem. J.* 206:605-609, 1982.

Hackney, J.D., Linn, W.S., Buckley, R.D., Pedersen, E.E., Karuza, S.K., Law, D.C. y Fisher, D.A. Experimental studies on human health effects of air pollutants. I. Design and considerations. *Arch. Environ. Health*, 30:373-378, 1975.

Halliwell, B. y Gutteridge, C. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals, and disease. *Biochem. J.*, 219:1-14, 1984.

Halliwell, B. y Gutteridge, C. The importance of free radicals and catalytic metal ions in human diseases. *Mol. Aspects Med.*, 8:89-93, 1985.

Haugaard, N. Cellular mechanisms of oxygen toxicity. *Physiol. Rev.*, 48:311-373, 1968.

Hayaishi, O., Matumura, H., Onoe, H., Koyama, Y. y Watanabe, Y. Sleep-wake regulation by PGD2 and E2. *Adv. Prostaglandin Thromboxane Leukotriene Res.*, 21B:723-726, 1991.

Herschkowitz, H. y Rossi, E. Critical periods in brain development. En: *Lipids, Malnutrition and the Developing Brain*. CIBA Foundation Symposium (Eds.),

Elsevier, Amsterdam. pp. 107-119, 1972.

Hicks, S.P., Damato, C.J. y Lowe, M.J. The development of the mammalian nervous system. *J. Compl. Neurol.*, 113:435-469, 1959.

Hilaire, G., Morin, D., Lajard, AM. y Monteau, R. Changes in serotonin metabolism may elicit obstructive apnea in the newborn rat. *Journal of Physiology*, 466:367-382, 1993.

Hiroshima, K., Kohno, T., Owada, H. y Hayashi, Y. A morphological study of the effects of ozone on rat lung. I. Short term exposure. *Exp. Mol. Pathology*, 47:327-345, 1987.

Hobson, J.A. *Sleep*. Scientific American Library, New York pp. 116-141, 1989.

Hobson, J.A. y McCarley, R.W. Spontaneous discharge rates of cat cerebellar Purkinje cells in sleep and waking. *Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol.*, 33:457-469, 1972.

Hobson, J.A., McCarley, R.W. y Wyzinski P.W. Sleep cycle oscillation: reciprocal discharge by two brain stem neuronal groups. *Science*, 189:55-58, 1975.

Horvat S.M., Gliner, J.A. y Folinsbee L.J. Adaptation to ozone: Duration of effect. *Am. Rev. Resp. Dis.*, 123:496-499, 1981.

Hughes, J.A. y Annau, Z. Postnatal behavioral effects in mice after prenatal exposure to methylmercury. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 4:385-391, 1976.

Huítón-Reséndiz, S., Custodio-Ramírez, V., Escalante-Membrillo, C., González-Piña, R. y Paz, C. Sleep alterations and brain regional changes of serotonin and its metabolite in rats exposed to ozone. *Neurosc. Let.* 177:119-122, 1994.

Hutchings, D.E. Behavioral teratology: Embryopathic and behavioral effects of drugs during pregnancy. En: *Studies on the Development of Behavior and the Nervous System*. Academic Press London, England, pp. 7-34, 1978.

Jones, G.L., Lane, C.G., Manning, P.J. y O'Byrne, P.M. Role of the parasympathetic nervous system in airway hyperresponsiveness after ozone inhalation. *J. Appl. Physiol.*, 63(3):1238-1243, 1988.

Jouvet, M. Paradoxical sleep- a study of its nature and mechanisms. Sleep mechanism. *Progress in Brain Res.*, 18:20-62, 1965.

Jouvet, M. Biogenic amines and the states of sleep. *Science*, 163:32-41, 1969.

Jouvet, M. Neurophysiology of the states of sleep. *Physiol. Rev.*, 47:89-98, 1967.

Jouvet, M. The role of monoamines and acetylcholine-containing neurons in the regulation of the sleep-waking cycle. *Ergeb. Physiol.*, 64:166-307, 1972.

Jouvet-Mounier, D., Astic, L. y Lacote, D. Ontogenesis of the states of sleep in rat, cat, and guinea pig during the first postnatal month. *Dev. Psychobiology*, 2(4):216-239, 1969.

Kabat, K., Buterbaugh, G.B. y Eccles, C.U. Methylazoxymethanol as a developmental model of neurotoxicity. *Neurobehav. Toxicol. Teratol.*, 7:519-525, 1985.

Kanofsky, J.R. y Sima, P. Singlet oxygen production from the reactions of ozone with biological molecules. *J. Biol. Chem.*, 296(14):9039-9042, 1991.

Katsuda, Y., Walsh, S., Ware, J., Cowen, J. y Sharpley, L. Meta-Chlorophenylpiperazina decrease slow-wave sleep in humans. *Biological Psychiatry*, 33:49-51, 1993.

Kavlock, R., Datson, G. y Grabowski, C.T. Studies on the developmental toxicity of ozone. I. Prenatal effects. *Toxicol. Appl. Pharmacology*, 48:19-28, 1979.

Kennedy, C.H., Hatch, G.E., Slade, R. y Mason R.P. Application of the EPR spin-trapping technique to the detection of radicals produced in vivo during inhalation exposure of rats to ozone. *Toxicol. Appl. Pharmacology*, 114:41-46, 1992.

Kilham, L., Margolis, G. Cerebellar ataxia in hamsters inoculated with rat virus. *Science*, 143: 1047-1048.

Kimura, F. y Nakamura, S. Locus coeruleus neurons in the neonatal rat: electrical activity and responses to sensory stimulation. *Dev. Brain Res.*, 23:301-305, 1985.

Kira, S., Ogata, M., Ebara, Y., Horii, S. y Otsuki, S. A case of thinner sniffing: relationship between neuropsychological symptoms and urinary findings after inhalation of toluene and methanol. *Ind. Health*, 26:81-85, 1988.

Kishi, R., Katahura, Y., Ikeda, T., Chen, BQ. y Miyake, H. Neurochemical effects in rats following gestational exposure to styrene. *Toxicology Letters* 63(2):141-146, 1992.

Kitagawa, K., Matsumoto, M., Oda, T., Niinobe, M., Hata, R., Handa, N., Fukunaga, R., Isaka, Y., Kimura, K., Maeda, H., Mikoshiba, K. y Kamada, T. Free radical generation during brief period of cerebral ischemia may trigger delayed neuronal death. *Neuroscience*, 35:551-558, 1990.

Kontos, H. y Enoch, P.W. Superoxide production in experimental brain injury. *J. Neurosurg.*, 64:803-807, 1986.

Lamfumey, L. y Jacobs, B.L. Developmental analysis of raphe dorsalis unit activity in the rat. *Brain Res.* 242:317-320, 1982.

Laszy, J. y Sarkadi, A. Hypoxia-induced sleep disturbances in rats. *Sleep*, 13:205-217, 1990.

Lauder, J.M. y Bloom, F.E. Ontogeny of monoamine neurons in the locus coeruleus, raphe nuclei and substantia nigra of the rat. I. Cell differentiation. *J. Comp. Neurol.*, 155:469-482, 1974.

Lerma, J. y Garcia-Austt, E. Hippocampal theta rhythm during paradoxical sleep. Effects of afferent stimuli and phase relationship with phasic events. *Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol.*, 60:46-54, 1985.

Lidbrink, P. The effect of lesions of ascending noradrenalin pathways on sleep and waking in the rat. *Brain Res.*, 74:19-40, 1973.

Lin, J.S., Sakai, K., Jouvet, M. Evidence for histaminergic arousal mechanisms in the hypothalamus of cats. *Neuropharmacology*, 27:111-122, 1988.

Linn, W.S., Avol, E.L., Shamoo, D.A., Peng, R., Valencia, L.M., Little, D.E. y Hackney, J.D. Repeated laboratory ozone exposure of volunteer. Los Angeles residents: An apparent seasonal variation in response. *Toxicol. Ind. Health*, 4:505-520, 1988.

Linn, W.S., Jones, M.P., Rachmayer, E.A., Clark, K.W., Karusa, S.K. y Hackney, J.D. Effect of low-level exposure to ozone on arterial oxygenation in humans. *Am. Rev. Resp. Dis.*, 119:731- 740, 1979.

Liu, J. y Mori, A. Antioxidant and pro-oxidant activities of p- hydroxybenzyl alcohol and vanillin: effects on free radicals, brain peroxidation and degradation of benzoate, deoxirribose, aminoacids and DNA. *Neuropharmacology*, 32(7):659-669, 1993.

Lorenzana-Jiménez, M. y Salas, M. Behavioral effects of chronic toluene exposure in the developing rat. *Neurobehav. Toxicol. Teratol.*, 12:353-357, 1990.

Lorenzana-Jiménez, M. y Salas, M. Effects of neonatal exposure to paint thinner on the development of swimming in rats. *Neurobehav. Toxicol. Teratol.*, 2:1-5, 1980.

Lorenzana-Jiménez, M. y Salas, M. Effects of neonatal toluene exposure on the development of evoked and spontaneous cortical activity in the rat. *Neurobehav. Toxicol. Teratol.*, 7:215-220, 1985.

Lorenzana-Jiménez, M. y Salas, M. Neonatal effects of toluene on the locomotor behavioral development of the rat. *Neurobehav. Toxicol. Teratol.*, 5:295-299, 1983.

Lupo, G., Anfuso, C.D. y Alberghina, M. Aging does not affect the susceptibility to lipid peroxidation and lysosomal enzyme release of rat visual system structures and sciatic nerve. *Neurochem. Int.*, 23(2):157-162, 1993.

Llinás, R.R. y Paré, D. Of dreaming and wakefulness. *Neuroscience* 44:521-535, 1991.

McCormick, D.A. Cellular mechanisms underlying cholinergic and noradrenergic modulation of neuronal firing mode in the cat and guinea pig dorsal lateral geniculate nucleus. *J. Neurosci.*, 12:278-289, 1992.

Megirian, D., Ryan, T.N. y Sherrey, H.J. An electrophysiological analysis of sleep and respiration of rats breathing gas mixtures: diaphragmatic muscle function. *Electroencephal. Clin. Neurophysiol.*, 50:303-313, 1980.

Menzel, D.B. Ozone: an overview of its toxicity in man and animals. *J. Toxicol.*

Environ. Health, 23:149-153, 1984.

Miale, I. y Sidman, R.L. An autoradiographic analysis of histogenesis in the mouse cerebellum. *Exp. Neurol.*, 4:277-296, 1961.

Mirmiran, M. The importance of fetal/neonatal REM sleep. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.*, 21:283-291, 1986.

Miyazawa, T., Suzuki, T. y Fujimoto, K. Age-dependent accumulation of phosphatidylcholine hydroperoxidase in the brain and liver of the rat. *Lipids* 28(9):789-793, 1993.

Morgan, D.L., Dorsey, A.F. y Menzel, D.B. Erythrocytes from ozone-exposed mice exhibit decreased deformability. *Fundam. Appl. Toxicol.*, 5:137-143, 1985.

Morgane, P.J. y Stern, W.C. Relationship of sleep to neuroanatomical circuits, biochemistry and behavior. *Ann. NY. Acad. Sci.*, 193:95-111, 1972.

Mori, N., Wada, J.A., Watanabe, M. y Kumashiro, H. Increased activity of superoxide dismutase in kindled brain and suppression of kindled seizure following intra-amygdaloid injection of superoxide dismutase in rats. *Brain Research*, (557):313-315, 1991.

Mori, N. y Yokoyama, H. Role of superoxide dismutase in a kindling model of epilepsy. *Comp. Biochem. Physiol.*, 104C(3):373-376, 1993.

P'an, A.Y.S. y Jergier, Z. The effect of sulfure dioxide and ozone on acetylcholinesterase. *Arch. Environ. Health*, 21:498-501, 1970.

Paz, C., y Bazán-Perkins, B. Sleep-wake disorganization in cats exposed to ozone. *Neurosc. Lett.*, 140(2):270-272, 1992.

Pellmar, T. Electrophysiological correlates of peroxide damage in guinea pig hippocampus in vitro. *Brain Research*, 364:377-381, 1986.

Pitts, J.N., McAfee, J.N., Long, W.D. y Winer, A.M. Long path infrared spectroscopic investigation at ambient concentration of the 2% neutral buffered potassium iodide method for determination of ozone. *Environ. Sci. Technol.*, 10:787-793, 1976.

Pompeiano, O. The neurophysiological mechanisms of the postural and motor events during desynchronized sleep. *Res. Publ. Assoc. Nerv. Ment. Dis.* 45:351-423, 1967.

Prospero O., Jiménez, A., y Drucker-Colín, R. Factores inductores de sueño. En: Buela-Casal, G. y Navarro, J (comps.). *Avances en la Investigación del Sueño y sus Trastornos*. Ed. Siglo XXI de España, pp. 105-126, 1990.

Pryor, W.A., Miki, M., Das, B. y Church, D.F. The reaction of ozone with unsaturated fatty acids: aldehydes and hydrogen peroxide as mediators of ozone toxicity. En: K.J.A. Davies (Ed.), *Oxidative Damage and Repair: Chemical, Biological and Medical Aspects*. Pergamon Press, New York, pp. 142-212, 1991.

Reiser, K.M., Tyler, W.S., Hennessy, S.M., Domínguez, J.J. y Last, J.A. Long-term consequences of exposure to ozone. II Structural alterations in lung collagen of monkeys. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 89:314-322, 1987.

Rodier, P.M. Critical periods for behavioral anomalies in mice. *Environ. Health Perspec.*, 18:79-83, 1976.

Rodier, P.M. Chronology of neuron development: Animal studies and their clinical implications. *Dev. Med. Child Neurol.*, 22:525-545, 1980.

Rodier, P.M. y Reynolds, S.S. Morphological correlates of behavioral abnormalities in experimental congenital brain damage. *Exp. Neurol.*, 57:81-93, 1977.

Rojas, P. y Ríos, C. Increased striatal lipid peroxidation after intracerebroventricular MPP+ administration to mice. *Pharmacology & Toxicology*, (72):364-368, 1993.

Ryer-Powder, J.E., Amoruso, M.A., Czerinecki, B., Witz, G. y Goldstein, B.D. Inhalation of ozone produces a decrease in superoxide anion radical production in mouse alveolar macrophages. *Am. Rev. Resp. Dis.*, 138:1129-1133, 1988.

Sakai, K. y Jouvet, M. Brain stem PGO-on cells projecting directly to the cat dorsal lateral geniculate nucleus. *Brain Res.*, 194:500-505, 1980.

Salas, M., Ruiz, C., Torero, C. y Pulido, S. Neonatal food restriction: its effects on the sleep cycles and vigil behavior of adult rats. *Bol. Estud.*

Med. Biol. Méx., 32:209-215, 1983.

Sallanon, M., Denoyer, M., Kitahama, K., Aubert, C., Gay, N. y Jouvet, M. Long-lasting insomnia induced by preoptic neuron lesions and its transient reversal by muscimol injection into the posterior hypothalamus in the cat. *Neuroscience*, 32:669-683, 1989.

Scheel, L.D., Dobrogorski, O.J., Mountain, J.T., Svrbely, J.L., y Stokinger H.E. Physiology, biochemical, immunologic, and pathologic changes following ozone exposure. *J. Appl. Physiol.*, 14:67-80, 1959.

Schlumpf, M., Palacios, J.M., Cortéz, R. y Linchtensteiger, W. Regional development of muscarinic cholinergic binding sites in the prenatal rat brain. *Neuroscience*, 45(2):347-357, 1991.

Scott, J.P. Critical periods in organizational processes. En: *Human Growth: Neurobiology and Nutrition*. F. Falkner y J. Tanner (Eds.), Plenum Press, New York, pp. 223-241, 1979.

Semba, K. y Fibiger, H.C. Time of origin of cholinergic neurons in the rat basal forebrain. *J. Comp. Neurol.* 269:87-95, 1988.

Shelley, S.A., Paciga, J.E., Patterson, J.F. y Balis, J.U. Ozone-induced alterations of lamellar body lipid and protein during alveolar injury and repair. *Lipids* 24:769-774, 1989.

Shibata, S., Liou, S.Y. y Ueki, S. Development of the circadian rhythm of neuronal activity in suprachiasmatic nucleus of rat hypothalamic slices. *Neurosci. Lett.*, 43:231-234, 1983.

Skillen, R., Thienes, C., Cangelos, J. y Strain, L. Brain 5- hydroxytryptamine in ozone exposed rats. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 108:121-122, 1966.

Smart, J.L. Critical periods in brain development. En: *The Childhood Environment and Adult Disease*. CIBA Found. Symp. (Eds.), Wiley, Chichester, pp. 109-128, 1991.

Smart, J.L. Vulnerability of developing brain to undernutrition. *Uppsala J. Med. Sci. Suppl.* 48:21-41, 1990.

Sobotka, T.J., Cook, M.P. y Brodie, R.E. Effects of perinatal exposure to methylmercury on functional brain development and neurochemistry. *Biol. Psych.*, 8:307-320, 1974.

Sobotka, T.J., Cook, M.P. y Brodie, R.E. Neonatal malnutrition; neurochemical, hormonal and behavioral manifestations. *Brain Res.*, 65:443-457, 1974.

Spyker, J.M. y Smithberg, M. Effects of methylmercury on prenatal development in mice. *Teratology*, 5:181-190, 1972.

Steriade, M. Basic mechanisms of sleep generation. *Neurology* 42 (suppl. 6):9-17, 1992.

Steriade, M. y Glenn LL. Neocortical and caudate projections of intralaminar thalamic neurons and their synaptic excitation from the midbrain reticular core. *J. Neurophysiol.*, 48:352-371, 1982.

Steriade, M. y McCarley, R.W. Neuronal control of the sleep-wake states. En: Steriade M., y McCarley, R.W. (Eds.) *Brainstem Control of Wakefulness and Sleep*. Plenum Press, New York. pp. 326- 353, 1990.

Stockinger, H.E. Ozone toxicology. *Arch. Environ. Health*, 10:719-731, 1965.

Subramanian, M., Pusphendran, C.K., Tarachand, U. y Devasagayam, T.P. Gestation confers temporary resistance to peroxidation in the maternal rat brain. *Neurosc. Lett.* 155(2):151-154, 1993.

Tepper, J.S., Costa, D.L., Lehman J.R., Weber, M.F. y Hatch, G.E. Unattenuated structural and biochemical alterations in the rat lung during functional adaptation to ozone. *Am. Rev. Resp. Dis.*, 140:493-501, 1989.

Tepper, J.S. y Weiss, B. Determinants of behavioral response with ozone exposure. *J. Appl. Physiol.*, 60:868-875, 1986.

Tepper, J.S., Weiss, B. y Cox, C. Microanalysis of ozone depression of motor activity. *Tox. Appl. Pharmacol.*, 64:317-326, 1982.

Tepper, J.S., Weiss, B. y Wood, W.R. Alterations in behavior produced by inhaled ozone or ammonia. *Fund. Appl. Physiol.*, 5:1110-1118, 1985.

Tepper, J.S., Wiester, M.J., Weber, M.F. y Menache, M.G. Measure of cardiopulmonary response in awake rats during acute exposure to near-ambient concentrations of ozone. *J. Appl. Physiol.*, 10:7-15, 1990.

Tepper, J.S. y Wood, R.W. Behavioral evaluation of the irritating properties of ozone. *Tox. Appl. Pharmacol.* 78:404-411, 1985.

Thordstein, M., Bagenholm, R., Thiringer, K. y Kjellmer, I. Scavengers of free oxygen radicals in combination with magnesium ameliorate perinatal hypoxic-ischemic brain damage in the rat. *Pediatric Research*, 34(1):23-26, 1993.

Thornburg, J.E. y Moore, K.E. Pharmacologically induced modification of behavioral and neurochemical development. En: *Perinatal Pharmacology and Therapeutics*. B.L. Mirkin (Ed.). Academic Pres. New York, USA. pp. 270-345, 1976.

Timo-laria, C., Negrao, N., Schmiddek, W.R., Hoshino, K., De Menezes, C.E. y da Rocha, T.L. Phases and states of sleep in the rat. *Physiol. Behav.* 5(9):1057-1062, 1970.

Tobler, I. y Borbély A.A. The effect of 3-h and 6-h sleep deprivation on sleep and EEG spectra of the rat. *Behav. Brain Res.*, 36:73-78, 1990.

Trams, E.G., Lauter, C.J., Branderburger, B.E.A. y Bethesda, O.Y. Cerebral cortical metabolism after chronic exposure to ozone. *Arch. Environ. Health* 24:153-159, 1972.

USEPA. Air quality criteria for ozone and other photochemical oxidants. *Cent. Environ. Res.*, Cincinnati, USA. 11:1-80, 1986.

USEPA. Summary of selected new information of effects of ozone on health and vegetation. *Cent. Environ. Res. Triangle Park NC 27711:1-83*, 1988.

Van, B.L., Haagsman, H.K., Van, G.L. y Rombout, P.J. Phosphatidylcholine synthesis in isolated type II pneumocytes from ozone- exposed rats. *Arc. Toxicol.*, 61:224-228, 1988.

Velasco, F., Velasco, M. y Cepeda C. Wakefulness-sleep modulation of cortical and subcortical somatic evoked potentials in man. *Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol.*, 48:64-72, 1980.

Volk, B. Neurohistological and neurobiological aspects of fetal alcohol syndrome in the rat. En: Yanai, J. (Ed.). Neurobehavioral Teratology. Elsevier, 1984.

Wallace, J.A., Petrusz, P. y Lauder, J.M. Serotonin immunocytochemistry in the adult and developing rat brain: methodological and pharmacological considerations. Brain Res. Bull., 9:117-129, 1982.

Weiss, B., Ferin, J., Merigan, W., Stem, S. y Cox, C. Modification of rat operant behavior by ozone exposure. Tox. Appl. Pharmacol., 58:244-251, 1981.

Willmore, L.J., Hiramatsu, H., Kochi, H., Mori, A. Formation of superoxide radicals after FeCl₃ injection into rat isocortex. Brain Research (277) 393-396, 1983.

Xintaras, C., Johnson, B.L., Ulrich, C.E., Terrill, R.E. y Sobocki, M.F. Application of the evoked response technique in air pollution toxicology. Tox. Appl. Pharmacol. 8:77-87, 1966.

Zhang, P., Damier, P., Hirsch, EC., Agid, Y., Ceballospicot, I., Sinet, PM., Nicole, A., Laurent, M. y Javoyagid, F. Preferential expression of superoxide dismutase messenger RNA in melanized neurons in human mesencephalon. Neuroscience 55(1):167-175, 1993.

Zidenberg-Cherr, S., Han, B. y Dubick, M.A. Influence of dietary-induced changes in lung and liver antioxidant systems. Toxicology Letters, 57:81-90, 1991.