

00343

2
2ej



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

ESTAMPADO
FEB 20 1996

EFFECTO DE LA EXPOSICION A OZONO SOBRE
LA ACTIVIDAD CONTRACTIL DEL UTERO
DE RATA

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE:
MAESTRIA EN CIENCIAS
(BIOLOGIA ANIMAL)
P R E S E N T A

PATRICIA CAMPOS BEDOLLA

DIRECTOR DE TESIS: M. EN C. HECTOR PONCE MONTER

CODIRECTORES DE TESIS: DR. MARIO H. VARGAS BECERRA

DRA. NIEVES PEDRON NUEVO

MEXICO, D. F. FALLA DE ORIGEN JULIO DE 1996



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.

A mis padres, Lino y Rosalba.
A Rosy y Andy.
Con amor...

INDICE

AGRADECIMIENTOS	i
LISTA DE ABREVIATURAS	ii
LISTA DE CUADROS Y FIGURAS	iii
RESUMEN	vi
ANTECEDENTES	1
Ozono atmosférico	1
Efectos biológicos del ozono	3
Mecanismos bioquímicos y moleculares del ozono	3
Mecanismos antioxidantes	7
Efectos del ozono en el aparato respiratorio	8
Efectos extrapulmonares del ozono	10
Efectos del ozono en el sistema hematológico	10
Efectos del ozono en el sistema nervioso central	11
Efectos del ozono en el sistema cardiovascular	13
Efectos del ozono en el sistema endocrino	14
Características morfológicas y fisiológicas del músculo liso uterino	16
Regiones mesometrial y antimesometrial del útero	18
Mecanismo de excitación-contracción del músculo liso uterino	20
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	22
OBJETIVOS ESPECIFICOS	23
MATERIAL Y METODOS	24
Animales	24
Diseño Experimental	26
Exposición a ozono	28
Estudios <i>in vitro</i>	28
Sustancias Químicas	28
Análisis de los datos	29

RESULTADOS	31
Curvas a oxitocina	34
Efecto del ozono sobre la actividad de contracción inducida por oxitocina	34
Efecto de la gestación sobre la actividad de contracción inducida por oxitocina	35
Actividad de contracción inducida por oxitocina en las regiones mesometrial y antimesometrial del útero de rata no gestante	43
Curvas a acetilcolina	49
Efecto del ozono sobre la actividad de contracción inducida por acetilcolina	49
Efecto de la gestación sobre la actividad de contracción inducida por acetilcolina	49
Actividad de contracción inducida por acetilcolina en las regiones mesometrial y antimesometrial del útero de rata no gestante	58
DISCUSION	64
Efecto de la gestación sobre la contracción uterina inducida por oxitocina y acetilcolina	64
Contracción inducida por oxitocina y acetilcolina en las regiones mesometrial y antimesometrial del útero de rata no expuesta a ozono	67
Efecto del ozono sobre la contracción uterina inducida por oxitocina y acetilcolina	68
CONCLUSIONES	72
REFERENCIAS	74

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Universidad Nacional Autónoma de México, al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, al Instituto Mexicano del Seguro Social y al Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias por permitirme realizar mis estudios de Maestría y por el apoyo otorgado para la realización de esta tesis.

Deseo expresar mi agradecimiento a los Doctores Héctor Ponce Monter y Mario H. Vargas Becerra por su valiosa dirección y asesoramiento en este trabajo. Así como su paciencia y apoyo constante durante su desarrollo.

De manera especial al Dr. Luis Manuel Montaña por permitirme compartir su espacio de trabajo.

A los Doctores Nieves Pedrón Nuevo, Irma Rosas, Carlos Paz Tres, Miguel Morales Segura y Luis Manuel Montaña Ramírez por sus valiosos comentarios y sugerencias aportadas durante la revisión de la tesis.

Así también agradezco al personal del Bioterio del INER, al Sr. Antonio Lozada [†], al Dr. David García Martínez, a Calixto Vargas Schimpf y al Dr. Sergio Rosas Macedo por el apoyo técnico otorgado.

Gracias también a Alberto Martín Guzmán G. y Blanca Bazán Perkins por compartir su material bibliográfico, apoyo muy importante en el contenido del texto. Es muy importante expresar mi gratitud a Cecilia Vanegas Pérez y Raúl Barrera de quienes constantemente he recibido su ayuda incondicional en todo momento.

También a mis compañeros del Laboratorio de Investigación en Asma (INER) y del laboratorio de la Unidad de Investigación Médica en Farmacología (IMSS) de quienes he recibido su apoyo y ayuda desinteresada.

Quiero agradecer profundamente a Carlos Alvarez Flores quien con tesón estuvo apoyando de manera significativa en las diferentes etapas de este trabajo. Gracias sinceras.

LISTA DE ABREVIATURAS

ACh	Acetilcolina
CE ₅₀	Concentración Efectiva 50%
GSH-Px	Glutación-peroxidasa
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrógeno
IMECA	Indice Metropolitano de Calidad del Aire
mUI/ml	miliunidades Internacionales/mililitros
NOx	Oxidos de nitrógeno
O ₂ ⁻	Anión superóxido
¹ O ₂	Singlete de oxígeno
OH·	Radical hidroxilo
OT	Oxitocina
O ₃	Ozono
ppm	partes por millón
RO·	Radical alcoxilo
ROO·	Radical peroxilo
SOD	Superóxido dismutasa
VOC	Compuestos orgánicos volátiles

LISTA DE CUADROS Y FIGURAS

Página

Cuadro I. Número de ratas no gestantantes y gestantes estudiadas en cada grupo experimental	25
Cuadro II. Número de ratas no gestantantes estudiadas en cada grupo experimental	25
Cuadro III. Valores de la CE_{50} a oxitocina del útero de rata no expuesta y expuesta a ozono	39
Cuadro IV. Valores de la respuesta máxima inducida por oxitocina del útero de rata no expuesta y expuesta a ozono	41
Cuadro V. Valores de la CE_{50} a oxitocina de la región mesometrial y antimesometrial del útero de rata expuesta y no expuesta a ozono	45
Cuadro VI. Valores de la respuesta máxima inducida por oxitocina de la región mesometrial y antimesometrial del útero de rata no expuesta y expuesta a ozono	47
Cuadro VII. Valores de la CE_{50} a acetilcolina del útero de rata expuesta y expuesta a ozono	54
Cuadro VIII. Valores de la respuesta máxima inducida por acetilcolina del útero de rata no expuesta y expuesta a ozono	56
Cuadro IX. Valores de la CE_{50} a acetilcolina de la región mesometrial y antimesometrial del útero de rata expuesta y no expuesta a ozono	60
Cuadro X. Valores de la respuesta máxima inducida por oxitocina de la región mesometrial y antimesometrial del útero de rata no expuesta y expuesta a ozono	62

Fig. A. Generación de radicales libres a partir del radical superóxido	6
Fig. 1. Diagrama de las regiones mesometrial y antimesometrial de la porción media del útero de rata no gestante	27
Fig. 2. Ejemplo típico del registro de la actividad de contracción del músculo liso uterino de rata no gestante con K^+ 60 mM	31
Fig. 3. Ejemplo típico del registro de la actividad de contracción del músculo liso uterino de rata no gestante inducida por oxitocina (OT) a diferentes concentraciones expresadas como $-\log [OT]$ mUI/ml	32
Fig. 4. Ejemplo típico del registro de la actividad de contracción del músculo liso uterino de rata no gestante inducida por acetilcolina (ACh), a diferentes concentraciones expresadas como $-\log [ACh]$ M	33
Fig. 5. Efecto de la exposición a ozono sobre el área bajo la curva inducida por oxitocina en el útero de rata no gestante y gestante (5, 10 y 18 días)	36
Fig. 6. Efecto de la exposición a ozono sobre la amplitud de contracción inducida por oxitocina en el útero de rata no gestante y gestante (5, 10 y 18 días)	37
Fig. 7. Efecto de la exposición a ozono sobre la frecuencia de contracción inducida por oxitocina en el útero de rata no gestante y gestante (5, 10 y 18 días)	38
Fig. 8. Efecto de la exposición a ozono sobre la actividad de contracción inducida por oxitocina en el útero de rata no gestante y gestante (5, 10 y 18 días). Comparación de los valores promedio de la CE_{50}	40
Fig. 9. Efecto de la exposición a ozono sobre la respuesta máxima inducida por oxitocina en el útero de rata no gestante y gestante (5, 10 y 18 días)	42
Fig. 10. Efecto de la exposición a ozono sobre la actividad de contracción inducida por oxitocina en las regiones mesometrial y antimesometrial del útero de rata no gestante	44

Fig. 11. Efecto de la exposición a ozono sobre la actividad de contracción inducida por oxitocina en las regiones mesometrial y antimesometrial del útero de rata no gestante. Comparación de los valores promedio de la CE ₅₀	46
Fig. 12. Efecto de la exposición a ozono sobre la respuesta máxima inducida por oxitocina en las regiones mesometrial y antimesometrial del útero de rata no gestante	48
Fig. 13. Efecto de la exposición a ozono sobre el área bajo la curva inducida por acetilcolina en el útero de rata no gestante y gestante (5, 10 y 18 días)	51
Fig. 14. Efecto de la exposición a ozono sobre la amplitud de contracción inducida por acetilcolina en el útero de rata no gestante y gestante (5, 10 y 18 días)	52
Fig. 15. Efecto de la exposición a ozono sobre la frecuencia de contracción inducida por acetilcolina en el útero de rata no gestante y gestante (5, 10 y 18 días)	53
Fig. 16. Efecto de la exposición a ozono sobre la actividad de contracción inducida por acetilcolina en el útero de rata no gestante y gestante (5, 10 y 18 días). Comparación de los valores promedio de la CE ₅₀	55
Fig. 17. Efecto de la exposición a ozono sobre la respuesta máxima inducida por acetilcolina en el útero de rata no gestante y gestante (5, 10 y 18 días)	57
Fig. 18. Efecto de la exposición a ozono sobre la actividad de contracción inducida por acetilcolina en las regiones mesometrial y antimesometrial del útero de rata no gestante	59
Fig. 19. Efecto de la exposición a ozono sobre la actividad de contracción inducida por acetilcolina en las regiones mesometrial y antimesometrial del útero de rata no gestante. Comparación de los valores promedio de la CE ₅₀	61
Fig. 20. Efecto de la exposición a ozono sobre la respuesta máxima inducida por acetilcolina en las regiones mesometrial y antimesometrial del útero de rata no gestante	63

RESUMEN

En este trabajo se estudió el efecto de la exposición aguda a ozono (O_3 , 3.0 ppm, 1 h) sobre la actividad de contracción inducida por acetilcolina (ACh) y oxitocina (OT) en músculo liso uterino de rata no gestante y de rata gestante (5, 10 y 18 días). Adicionalmente se analizó qué modificaciones provocó la gestación en la contracción uterina inducida por estos agonistas. Para evaluar la actividad de contracción uterina se realizaron curvas concentración-respuesta no acumulativas con OT (10^{-5} a 10^{-1} mUI/ml) y ACh (10^{-7} a 10^{-3} M) a través de los parámetros área bajo la curva, amplitud y frecuencia de la contracción. Se determinó la CE_{50} y la respuesta máxima de los parámetros analizados. Los hallazgos de este trabajo muestran que la exposición a O_3 no modificó la sensibilidad ni la respuesta máxima a la OT y ACh del músculo liso uterino de rata no gestante. Sin embargo, dicha exposición incrementó significativamente ($p < 0.05$) las respuestas máximas a la OT a los 5 días de gestación, evaluadas como área bajo la curva, amplitud y frecuencia de la contracción. Así también, la exposición a O_3 incrementó la respuesta máxima a la ACh, evaluada como área bajo la curva en el útero de rata a los 5 y 10 días de gestación. Estos efectos producidos por el O_3 no se presentan en las etapas finales de la gestación (18 días). Al evaluar la actividad de contracción del músculo liso uterino de ratas no gestantes y gestantes (5, 10 y 18 días) no expuestas a O_3 , se determinó que el útero de rata a los 10 días de gestación presentó un aumento en la sensibilidad y respuesta máxima a la OT comparado con el útero no gestante, mientras que el útero aislado de rata a los 18 días de gestación tuvo un incremento en la sensibilidad y respuesta máxima a la ACh. Del mismo modo, se determinó que en todas las etapas de la gestación estudiadas (5, 10 y 18 días) hay una disminución significativa de la frecuencia de contracción, en comparación con el útero de rata no gestante. Para determinar la variación anatómica de la actividad de contracción uterina se evaluó la contracción inducida por OT y ACh en las regiones mesometrial y antimesometrial del útero de rata no gestante con o sin exposición a O_3 . Se encontró que en la región antimesometrial del útero existió una mayor frecuencia de contracción inducida por OT, en comparación con la región mesometrial. La exposición a O_3 no modificó la sensibilidad ni la respuesta máxima a la OT y ACh en las regiones mesometrial y antimesometrial. No obstante, en la región mesometrial se observó un incremento en la frecuencia de contracción inducida por ACh.

ANTECEDENTES

OZONO ATMOSFÉRICO

El ozono (O_3), una especie alótropa reactiva del oxígeno, es reconocido como uno de los principales oxidantes de origen fotoquímicos de la atmósfera. Se encuentra en concentraciones altas (10 ppm) en la estratósfera (USEPA, 1993). Es ahí donde se sitúa el 90% de O_3 de la atmósfera, que se forma a través de reacciones cíclicas resultado de la fotólisis del oxígeno en oxígeno atómico y la subsecuente reacción del oxígeno atómico con otras moléculas de oxígeno (Jones, 1992).

En la tropósfera el O_3 es formado a través de la disociación de NO_2 por la luz solar que produce un átomo de oxígeno, el cual reacciona con el oxígeno molecular (O_2) y produce una molécula de O_3 . El NO puede rápidamente reaccionar con el O_3 para formar NO_2 y una molécula de O_2 . En ausencia de reacciones competitivas se establece rápidamente un estado estable o concentraciones en equilibrio de O_3 , O_2 , NO_2 y NO (National Research Council, 1977; Jones, 1992). El ingreso de compuestos orgánicos a la atmósfera trastorna el equilibrio y permite la acumulación de O_3 a concentraciones más altas. La longitud del período de inducción antes de la acumulación de O_3 depende de la relación entre los compuestos orgánicos volátiles y óxidos de nitrógeno (VOC/ NO_x) (National Research Council, 1977).

El O_3 de la tropósfera se constituye por el O_3 formado en la estratósfera y por las contribuciones del O_3 producido en el ambiente por diversas reacciones fotoquímicas, que son dependientes de la intensidad y distribución espectral de la luz solar, las condiciones meteorológicas y la concentración y reactividad de los precursores, en especial las relaciones entre los compuestos orgánicos volátiles y óxidos de nitrógeno (VOC/ NO_x) (National Research Council, 1977; USEPA, 1986; Mehlman y Borek, 1987; Jones, 1992). El O_3 , como una parte integral de la atmósfera, puede tener una

concentración de hasta 0.1 ppm. Esta concentración puede ser modificada y alcanzar niveles de un contaminante del ambiente como una consecuencia de la oxidación del nitrógeno atmosférico a óxidos de nitrógeno (NOx) durante combustiones a alta temperatura de compuestos derivados del petróleo y carbón, siendo las principales fuentes de emisión de los precursores los vehículos motores de combustión y los procesos industriales.

Debido a la naturaleza tóxica del O₃, en muchos países los niveles ambientales están sujetos a una regulación gubernamental. En Estados Unidos de América esta regulación la realiza la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (USEPA, 1978), la cual establece que la concentración máxima a la que puede estar expuesto el hombre es de 235 µg/m³ (0.12 ppm), valor promedio por hora que no debe excederse más de una vez por año. En México se ha implantado un criterio de evaluación para los niveles de contaminantes, el cual tiene como objeto establecer un marco de referencia para la protección de la salud de la población y del medio. Este criterio es definido como Índice Metropolitano de Calidad del Aire (IMECA) y se le asigna una escala de 0 a 500, siendo 100 puntos el valor máximo permitido para cada contaminante. En el caso del O₃ el valor de 100 IMECA corresponde a 0.11 ppm ó 216 µg/m³.

EFFECTOS BIOLÓGICOS DEL OZONO

Los efectos biológicos del O₃ han sido estudiados extensamente en diferentes organismos. Sus efectos tóxicos en los seres vivos son atribuidos a su potencial oxidativo (USEPA, 1986), esto es, la capacidad de remover electrones de otras moléculas o iones.

El O₃ produce una gran diversidad de efectos que pueden resultar de su interacción con los diferentes componentes celulares y por el gran número de sistemas biológicos que pueden ser afectados (Menzel, 1984; Mehman y Borek, 1987; Wright y col. 1990). Los niveles a los cuales la toxicidad del O₃ llega a ser evidente están determinados por una gran variedad de parámetros, que incluyen estado de desarrollo, anatomía, edad (Uchiyama y col. 1986; Gunnison y col. 1990, 1992a), sexo, estado alimenticio, estado hormonal y sistemas celulares de protección (Mehlman y Borek, 1987), además la severidad del daño producido por el O₃ depende de la concentración y el tiempo de exposición (Menzel, 1984; Hazucha, 1987). El daño producido por el O₃ ha sido definido como una cascada de efectos, iniciándose en la capa de tejido más accesible, produciendo compuestos secundarios tóxicos que tienen un tiempo de vida mayor que el O₃ y además pueden difundir dentro del tejido y producir daño en otros sistemas. A su vez, estos compuestos secundarios pueden reaccionar y producir compuestos terciarios tóxicos (Pryor, 1993).

MECANISMOS BIOQUÍMICOS Y MOLECULARES DEL OZONO

Se han propuesto diversos mecanismos moleculares y bioquímicos para explicar la toxicidad del O₃. Estos mecanismos son complejos y la mayoría no sólo involucran la acción directa del O₃ sobre las macromoléculas, sino también la formación de productos secundarios tales como los precursores de radicales libres y los mediadores químicos y enzimas asociados con las actividades de células inflamatorias (USEPA, 1993).

En relación al efecto directo del O₃, se ha propuesto que éste actúa a través de la peroxidación de los ácidos grasos poliinsaturados (Chow y Teppel, 1972; Pryor y col. 1983) y la oxidación de péptidos o proteínas de bajo peso molecular que contienen grupos funcionales tioles, aminas, aldehídos y alcoholes (Freeman y Mudd, 1981; Menzel y Wolpert, 1989). Ambas propuestas son consideradas complementarias, ya que las membranas celulares están constituidas tanto de lípidos como de proteínas y la oxidación de estos constituyentes membranales es simultánea (Menzel, 1984; Melhman y Borek, 1987).

La lipoperoxidación comprende una cascada de eventos, donde una entidad química inicia el desplazamiento de un átomo de hidrógeno y produce el rearrreglo molecular de los ácido grasos poliinsaturados, resultando la formación de lipohidroperóxidos y productos secundarios, como el malondialdehído, los cuales podrían inducir un daño biológico en las proteínas de la membrana o pueden interactuar con otros ácidos grasos y propagar la cadena de lipoperoxidación localmente (Gutteridge y Halliwell, 1990; Winkhofer-Roob, 1994) y a zonas más distantes del daño inicial (Hubel y col. 1989) en una gran variedad de sitios extrapulmonares donde se producen modificaciones de su función (Kavlock y col. 1980). Algunas condiciones que pueden estimular la lipoperoxidación incluyen la hiperoxia, la hipoxia, la toxicidad por cobre y hierro y las deficiencias en los antioxidantes (Hubel y col. 1989).

Por otro lado, cuando el O₃ se encuentra frente a diferentes moléculas, éste reacciona inicialmente con las moléculas más reactivas (Mudd y Freeman, 1977; Menzel, 1984; Pryor, 1993). Por ejemplo, el orden de reacción del O₃ con algunos aminoácidos es: cisteína > metionina = triptófano > tirosina > histidina > cistina > fenilalanina (Mudd y Freeman, 1977).

Con respecto a la toxicidad indirecta del O₃, se ha determinado que parte del daño bioquímico celular ocurre a través de la formación de metabolitos secundarios como los radicales libres (Stockinger, 1965; Goldstein y col. 1969; Goldstein y col. 1970; Hueter y Fritzhand, 1971). Los radicales libres de oxígeno son compuestos altamente reactivos

con electrones no apareados, capaces de iniciar la oxidación (Winkhofer-Roob, 1994) y producir daño en el tejido, contracción en el músculo liso, incremento en la permeabilidad vascular, hiperreactividad bronquial y liberación de mediadores químicos (Jarjour y Calhoun, 1994).

El O_3 puede producir radicales libres por tres tipos de mecanismos: i) la reacción directa del O_3 con moléculas lipofílicas, ii) la reacción directa con moléculas en regiones acuosas que pueden atrapar productos de la ozonólisis y iii) la producción indirecta de radicales libres por la acción del O_3 sobre las células fagocíticas (Pryor, 1991). Los sitios de generación de radicales libres y especies reactivas del oxígeno incluyen mitocondrias, lisosomas, peroxisomas, así como las membranas nuclear, citoplásmica y del retículo endoplásmico (Hicks y col. 1991). Las especies moleculares producidas incluyen a los radicales hidroxilo ($OH\cdot$), peroxilo ($ROO\cdot$), alcoxilo ($RO\cdot$), anión superóxido ($O_2\cdot^-$), y moléculas reactivas como peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y singulete de oxígeno (1O_2). La Fig. A se muestra la generación de radicales libres a partir del radical anión superóxido ($O_2\cdot^-$).

La vida media estimada para las especies reactivas del oxígeno son diferentes. Las tasas más altas de las constantes de reacción son para el radical hidroxilo (10^{-9} s) y sus reacciones de difusión son limitadas, por lo que prácticamente sólo participan en el sitio de su generación. En contraste, algunos radicales peroxilo son relativamente estables, con una vida media en segundos (7 s). Tales moléculas pueden difundirse lejos del sitio de generación y además transportar el radical u oxidar a otros sitios blanco (Sies, 1993). Los lipohidroperóxidos pueden propagar la formación de radicales peroxilo e iniciar una nueva cadena de reacciones, a menos que las reacciones sean bloqueadas por algún antioxidante (Winkhofer-Roob, 1994).

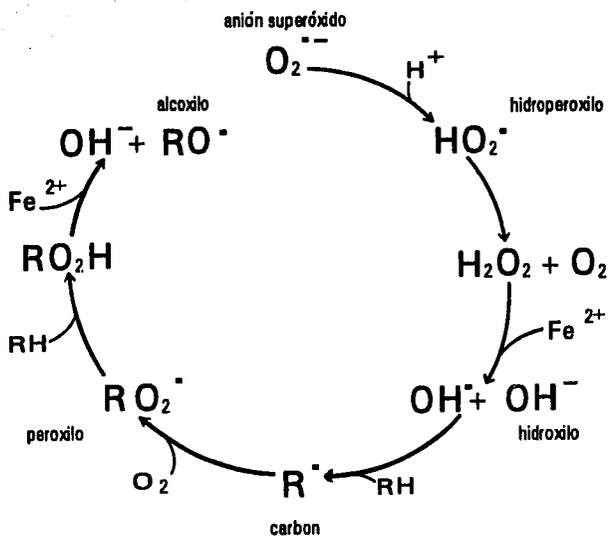


Fig. A. Generación de radicales libres a partir del radical superóxido ($O_2^{\cdot -}$).

MECANISMOS ANTIOXIDANTES

Existen diversas sustancias que son capaces de prevenir los efectos bioquímicos del O₃ o de sus metabolitos secundarios.

Las enzimas antioxidantes, glutatión-peroxidasa (GSH-Px), superóxido-dismutasa (SOD), catalasa (CAT), y otras peroxidases, protegen a la célula contra el daño producido por los radicales de oxígeno, el exceso de producción de oxidantes y otros compuestos tóxicos (Van Aeker y col. 1993; Jarjour y Calhoun, 1994). Dicha actividad enzimática antioxidante es dependiente de la concentración y del tiempo de exposición al O₃ (Plopper y col. 1979). Parte de los datos que apoyan la función protectora de estas enzimas son estudios en los que se describe un incremento en la actividad enzimática producida por repeticiones de estrés oxidativo (Basset y col. 1988a). El estrés oxidativo puede ser definido de manera amplia como un desequilibrio entre los prooxidantes y antioxidantes en el cual domina el primero; una manifestación de este fenómeno es la peroxidación (Hubel y col. 1989).

La enzima glutatión-peroxidasa actúa como un mecanismo de protección, ya que reduce tanto al peróxido de hidrógeno (H₂O₂) (Del Maestro y McDonald, 1987; Winkhofer-Roob, 1994) como a los hidroperóxidos de los ácidos grasos producidos por el O₃ (Chow, 1981). Este puede ser el sistema intracelular de disminución de radicales libres más importante y uno de los índices bioquímicos más sensibles a la exposición a O₃ (Menzel, 1984).

La superóxido-dismutasa reduce el radical anión superóxido (O₂⁻) a peróxido de hidrógeno (H₂O₂). Intracelularmente H₂O₂ es reducido a H₂O por una catalasa y peroxidases (USEPA, 1993).

Diversos estudios han determinado que la vitamina E (α -tocoferol), que es un poderoso antioxidante liposoluble, protege de la toxicidad del O₃ (Goldstein y col. 1970; Roehm y col. 1971; Chow y Tappel, 1972; Chow y col. 1981; Chow, 1983; Mustafa y col. 1983; USEPA, 1986). Se ha encontrado que la vitamina E puede prevenir la

lipoperoxidación evitando la formación de radicales libres, reduciendo el anión superóxido (O_2^-), el radical hidroxilo ($OH\cdot$) y el singulete de oxígeno (1O_2) (Ciuffi y col. 1991; Winkhofer-Roob, 1994). También disminuye el incremento de la actividad enzimática de la glutatión-peroxidasa (GSH-Px), glutatión-reductasa y glutatión-deshidrogenasa glucosa-6-fosfato producida por la exposición a O_3 (Plopper y col. 1979).

Otros antioxidantes no menos importantes son la vitamina C, el ácido úrico y los grupos sulfhidrilo (-SH) de las proteínas plasmáticas (Van Acker y col. 1993). El ácido úrico proviene de la oxidación de la vitamina C y se une a metales de transición, atrapando radicales hidroxilo ($OH\cdot$), singulete de oxígeno (1O_2) y radicales peroxilo, por lo que inhibe la estimulación de la formación de reacciones mediadas por los radicales libres (Winkhofer-Roob, 1994).

En general, los antioxidantes protegen a las proteínas celulares del efecto de la lipoperoxidación e inhiben las reacciones de peroxidación (Wang y col. 1991a; Winkhofer-Roob, 1994). La interacción entre los diferentes antioxidantes puede ser importante para la eficaz inhibición del proceso de la lipoperoxidación producido por los radicales libres (Winkhofer-Roob 1994).

EFFECTOS DEL OZONO EN EL APARATO RESPIRATORIO

La exposición a O_3 produce una gran variedad de modificaciones fisiológicas y morfológicas en el aparato respiratorio que han sido demostradas tanto en animales de laboratorio (Lippmann 1989, 1993; Wright y col. 1990) como en humanos (Hazucha, 1987). Los principales hallazgos muestran que la exposición por inhalación a O_3 induce cambios estructurales y funcionales en el aparato respiratorio (Bhalla y col. 1986; Basset y col. 1988b; Koren y col. 1989). Entre estos cambios se encuentran incremento en la permeabilidad de la mucosa, daño celular epitelial, cambios en la función pulmonar como disminución de los volúmenes y flujos espiratorios (Hazucha 1987; Bhalla y col. 1993), inflamación de las vías aéreas e incremento en la reactividad de las mismas

(Campos y col. 1992; Vargas y col. 1994). Estos cambios probablemente son el resultado de la oxidación de los componentes de los sistemas biológicos.

De manera específica, se ha propuesto recientemente que el O_3 reacciona con los ácidos grasos poliinsaturados de las capas de los fluidos protectores del pulmón, incluyendo moco y surfactante pulmonar (Lai y col. 1990; Pryor y col. 1991; Cross y col. 1992; Cueto y col. 1992). El surfactante pulmonar está constituido de un 15% a un 40% de ácidos grasos poliinsaturados, componente proteico A, colesterol y compuestos de bajo peso molecular (Pryor y col. 1991; USEPA, 1993). Los principales ácidos grasos poliinsaturados son el ácido palmítico (16:1), el ácido oleico (18:1) y el ácido linoleico (18:2). Esto ha permitido especular que las fosfatidilcolinas, como componente principal del surfactante pulmonar (Lai y col. 1990), y el colesterol sean los que reaccionan directamente con el O_3 (Lai y col. 1990; Pryor y col. 1992). El O_3 reacciona con las olefinas, constituyentes de los ácidos grasos poliinsaturados, produciendo 1,2,3-trioxalano, que reacciona rápidamente a un óxido de carbonilo y aldehído. El óxido de carbonilo puede reaccionar con un aldehído obteniéndose un ozonido de Criegee o en presencia de agua un hidroperóxido hidroxilo. El hidroperóxido hidroxilo se hidroliza generando peróxido de hidrógeno y una segunda molécula de aldehído (Pryor y col. 1991; Santrok y col. 1992). De esta forma, Pryor y col. (1991) sugieren que las olefinas de los fluidos protectores del pulmón, y quizá las membranas lipídicas de las células adyacentes al medio, reaccionan con el O_3 inhalado para producir peróxido de hidrógeno y aldehído, siendo éstos los principales mediadores de los efectos pulmonares producidos por el O_3 . El peróxido de hidrógeno es precursor del radical hidroxilo ($OH\cdot$), el cual sería capaz de llegar a la vía sistémica y producir modificaciones químicas en diferentes componentes celulares extrapulmonares.

Pryor (1992) ha hipotetizado que el O_3 no penetra más allá de la capa de fluidos protectores del pulmón, excepto en regiones donde las células epiteliales puedan no estar protegidas por el moco o surfactante pulmonar, por lo que es poco probable que el O_3 penetre en el tejido de las vías aéreas.

EFFECTOS EXTRAPULMONARES PRODUCIDOS POR EL OZONO

A diferencia de los efectos pulmonares, los efectos extrapulmonares producidos por la exposición a O₃ han sido poco estudiados. Se han descrito diversos efectos tóxicos en sistemas no pulmonares después de la inhalación a O₃, tanto en animales de laboratorio como en humanos (Menzel, 1970; Mehlman y Borek, 1987; USEPA 1986, 1993). Estos efectos sistémicos son secundarios a las alteraciones pulmonares o resultado de productos de reacción al O₃ (Pryor, 1993).

Se desconocen los mecanismos precisos por los cuales el O₃ altera a otros sistemas. Sin embargo, es poco probable que el O₃ entre directamente al sistema circulatorio (Pryor, 1992), por lo que se ha planteado son los productos derivados de la reacción del O₃ con los componentes celulares los que cruzan la barrera sanguínea y llegan a otros tejidos, produciendo efectos distantes (Pryor, 1992, 1993).

Los efectos tóxicos del O₃ han sido observados en diferentes sistemas biológicos como son eritrocitos, leucocitos y sistemas nervioso central, cardiovascular, genético, endócrino y reproductivo (Mehlman y Borek, 1987).

EFFECTOS DEL OZONO EN EL SISTEMA HEMATOLÓGICO

Los cambios morfológicos y fisiológicos producidos por concentraciones variables de O₃ a nivel hematológico en animales y humanos abarcan incremento significativo de la fragilidad osmótica de la membrana de eritrocitos (Goldstein, 1973; Buckley y col. 1975), disminución de los niveles de algunas enzimas como la acetilcolinesterasa y la GSH-Px y aumento de los niveles de vitamina E, lipoperóxidos y creatinín-cinasa (Goldstein y col. 1968, 1974; Buckley y col. 1975; Ross y col. 1979; Canada y col. 1987; Takahashi y col. 1990; Veninga y Fidler 1986)

Miller y col. (1987) observaron un decremento de tromboxano B₂ (TXB₂) y prostaglandinas (6-keto-PGF_{1α} y PGE₁) en plasma de cobayos expuestos a 1 ppm de

O₃ durante 1 hora. Así también, se ha determinado una disminución en los niveles de la acetilcolinesterasa de la membrana de eritrocitos de ratones expuestos a O₃ a concentración de 8 ppm durante 4 horas y 40 ppm durante 2 horas (Goldstein y col. 1968; 1974) y en eritrocitos humanos expuestos a O₃ a 0.5 ppm durante 2.45 h (Buckley y col. 1975). Se ha informado también un incremento de lipoperóxidos en los eritrocitos humanos expuestos a O₃ a 0.5 ppm durante 2.45 h (Buckley y col. 1975).

Ross y col. (1979) determinaron que el O₃ (1.0 y 3.0 ppm durante 4 h) no modifica la afinidad de la interacción del sitio de unión hemo-oxígeno y la afinidad de la oxihemoglobina, por lo que no se modifica la capacidad de transporte de oxígeno de los eritrocitos.

Se ha propuesto que las alteraciones de los leucocitos polimorfonucleares seguidas de la exposición a O₃, probablemente sean a través de la liberación de agentes quimiotácticos y metabolitos del oxígeno, seguido por la salida de mediadores químicos de los pulmones en la circulación periférica y su encuentro en compartimiento vascular con leucocitos circulantes (Bhalla y col. 1993).

EFFECTOS DEL OZONO SOBRE EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL

El sistema nervioso central es altamente vulnerable a las condiciones ambientales, probablemente los efectos del O₃ en este sistema sean por los productos de reacción del O₃ que llegan algún lugar a través de la corriente sanguínea afectando al sistema nervioso central (Graham *et al.* 1981; Haro y Paz, 1993).

Una forma de evaluar los efectos producidos por el O₃, a diferentes concentraciones, en el sistema nervioso ha sido la cuantificación de neurotransmisores y enzimas como la serotonina (Skillen y col. 1961), noradrenalina, adrenalina, monoamino-oxidasa, catecol-O-metiltransferasa (Trams y col. 1972) y acetilcolinesterasa (Gordon y col. 1981) en la corteza cerebral de perros y ratas.

Por otro lado, los estudios conductuales realizados en animales de laboratorio muestran que existen modificaciones en los patrones de conducta después de la exposición a diferentes concentraciones de O_3 (0.05 a 16 ppm), como el decremento en la actividad motora de manera proporcional a la concentraciones suministrada (0.12-2.0 ppm) (Tepper y col. 1982; Tepper y Weiss, 1986) y decremento en la conducta operante condicionada (Weiss y col. 1981). Asimismo, Musi y col. (1993) evaluaron algunos patrones conductuales (crianza, acicalado, husmear e interacción social) en ratones expuestos a O_3 de manera continua por 13 días (0.4-1.2 ppm). Estos autores observaron que se produce un incremento en las patrones conductuales evaluados durante la primera hora de exposición (0.8 y 1.2 ppm). En otro trabajo, Umezú y col. (1994) describieron que ratas expuestas una sola vez a 0.4 ppm de O_3 durante 23 h disminuyeron su actividad alimenticia y la ingestión de agua en un 29 y 44% respectivamente.

Hore y Gibson (1968) determinaron que la exposición a O_3 (0.2-0.3 ppm, 70 min) no modifica las pruebas de inteligencia realizadas a un grupo de estudiantes universitarios.

En otros experimentos se han evaluado los patrones de sueño de animales expuestos a O_3 . Yokoyama y col. (1989) observaron una disminución del sueño paradójico de ratas expuestas a 0.5 ppm de O_3 (6 h) y 1 ppm (3 h). Este mismo grupo de trabajo determinó que la exposición a O_3 (0.1 y 0.2 ppm) no modifica la duración del estado de vigilia ni del sueño de ondas lentas y paradójico de ratas (Arito y col. 1990), mientras que a 1 ppm de O_3 durante 3 horas se produce un decremento en el sueño paradójico y un incremento en sueño de ondas lentas (Arito y col. 1992). En relación con estos estudios, Paz y Bazán (1992), determinaron que en gatos expuestos a O_3 durante 24 h se produce un incremento en el tiempo de sueño de ondas lentas (0.8 y 1.2 ppm) y un decremento en el sueño paradójico. Del mismo modo, en ratas recién nacidas de ratas gestantes expuestas a O_3 (1 ppm durante 12 h por sesión) se observó una inversión en el sueño de ondas lentas y estado de vigilia, así como un decremento en

el sueño paradójico (Haro y Paz, 1993). Se ha evaluado también que la exposición a O₃ (0.5 y 1.0 ppm) en ratas produce un decremento en la frecuencia de actividad del electroencefalograma de la corteza parietal (Arito y col. 1992).

EFFECTOS DEL OZONO EN EL SISTEMA CARDIOVASCULAR

Algunos trabajos han definido que la exposición a O₃ produce efectos en el sistema cardiovascular. Los estudios muestran que la exposición aguda a 0.5 ppm (durante 6 h) y 1.0 ppm (durante 3 h) de O₃ en ratas machos adultos produce una marcada disminución en la frecuencia cardiaca y la presión arterial media, así como arritmia cardiaca (Uchiyama y col. 1986; Yokoyama y col. 1989) siendo estos parámetros cardiovasculares dependientes de la edad (Uchiyama y col. 1986). A estas concentraciones de O₃ se observan los mismos efectos en ratas enfisematosas tratadas con elastasa (Uchiyama y Yokoyama, 1989) y en ratas normales se observa un decremento en la frecuencia cardiaca. De la misma manera, este grupo de investigación determinó que disminuye la frecuencia cardiaca y se incrementan los eventos de bradiarritmia en ratas expuestas a 0.1 y 0.2 ppm de O₃ durante 5 días (Arito, 1990). En contraste, Tepper y col. (1990) no observaron alteración en la presión sanguínea de ratas expuestas a O₃ (1.0 ppm durante 135 min) aunque la ventilación fue incrementada por CO₂.

Un estudio reciente realizado por Vesely y col. (1994) muestra que el O₃ (0.5 ppm/8h) incrementa el péptido atrial natriurético en corazón, pulmón y circulación de ratas. Ellos sugieren que el péptido atrial natriurético puede mediar el decremento de la presión sanguínea y el edema pulmonar observado con la exposición a O₃. La causa de los efectos cardiovasculares aún no tiene explicación; sin embargo, se postula que probablemente sea consecuencia de cambios en el sistema nervioso parasimpático (Yokoyama y col. 1989; Arito y col. 1990, 1992).

EFFECTOS DEL OZONO EN EL SISTEMA ENDOCRINO

Estudios sobre los efectos en sistema endocrino han determinado que el O₃ puede afectar el eje adrenal-tiroideo-hipofisario (USEPA, 1986, 1993; Mehlman y Borek, 1987). La mayoría de los estudios se diseñaron para determinar si algunos agentes bloqueadores de las glándulas tiroides, adrenales e hipófisis o la eliminación de éstas, incrementa la frecuencia de sobrevivencia de las ratas y ratones expuestos a O₃ (USEPA, 1986). El trabajo de Fairchild y col. (1959) es una primera observación sobre los efectos de la exposición a O₃ en el sistema endócrino de ratones. Estos autores determinaron que la exposición a O₃ a 5.8 ppm durante 4 h produce un decremento en la actividad de un bloqueador de la tiroides (α -naftiltiourea, ANTU). En otros trabajos posteriores, Clemons y García (1980 a,b) determinaron los efectos en el sistema hipotálamo-hipófisis-tiroides de ratas expuestas a O₃ (1 ppm durante 24 h). Estos investigadores determinaron que el O₃ produce un decremento de la concentración sérica de la hormona estimulante de la tiroides, de las hormonas tiroideas (T3 y T4), un incremento en los niveles de prolactina y alteraciones morfológicas en la tiroides. Algunos mecanismos de protección han sido observados al remover la tiroides, hipófisis y glándulas adrenales, lo que sugiere que ciertas hormonas pueden potenciar la acción tóxica del O₃ (Mehlman y Borek, 1987).

Graham y col. (1981) investigaron los efectos de la inhalación del O₃ en el metabolismo xenobiótico. Este grupo expuso a 1.0-5.0 ppm del O₃ durante 3 h/día a ratones, ratas y hámsters y encontraron un incremento en el sueño inducido por pentobarbital. La duración del tiempo de sueño producido por pentobarbital es un bioensayo del metabolismo xenobiótico hepático del pentobarbital. Aunque es poco probable que el O₃ llegue al hígado a través de la sangre, el O₃ produce peróxidos y otros productos oxigenados con tiempo de vida suficiente para llegar al hígado (Menzel, 1984).

EFFECTOS EN EL SISTEMA REPRODUCTIVO

Los estudios del efecto del O_3 sobre el sistema reproductor son más limitados. Los efectos de la exposición a los oxidantes fotoquímicos en animales gestantes y sus embriones pueden ser considerados como de alto riesgo, ya que el volumen de aire inspirado se incrementa de 15 a 50% durante la gestación (USEPA, 1986). En un primer estudio con ratones gestantes expuestos a O_3 a bajas concentraciones (0.1-0.2 ppm) se determinó que existe una disminución en la frecuencia de sobrevivencia de las crías; sin embargo, en este trabajo no se especifica el tiempo de exposición durante la gestación (Brinkman y col. 1964). En otra investigación, Veninga (1967) encontró un aumento del crecimiento dental en ratones expuestos a 0.2 ppm de O_3 por 7 h/día, 5 días/semana durante el desarrollo embriológico y 3 semanas después del nacimiento.

Parte de la información existente sobre los efectos tóxicos del O_3 en la reproducción se basa en los trabajos de Kavlock y col. (1979, 1980). Este grupo de investigación expuso a ratas gestantes, en una etapa temprana (6-9 días), media (9-12 días) y tardía (17-20 días) de gestación, a concentraciones de 0.44 a 1.97 ppm de O_3 durante 8 h/día, determinando que la exposición a 1.49 ppm durante la mitad de la gestación produce un incremento de reabsorción de fetos, sin encontrar efectos teratogénicos. Del mismo modo, la exposición a 0.44 ppm de O_3 durante la mitad y la última etapa de gestación produjo un decremento en el peso materno y fetal.

Kavlock y col. (1980) observaron que en ratas gestantes expuestas a 1.5 ppm de O_3 durante 4 días no hubo mortalidad neonatal. También, observaron un decremento en el peso de las crías a los 6 días de nacidos con una exposición de 1 ppm de O_3 durante las etapas media y tardía de la gestación. Recientemente, se determinó que en ratas gestantes expuestas a O_3 existe un decremento en el peso corporal de las crías con respecto al control (Haro y Paz, 1993).

CARACTERISTICAS MORFOLOGICAS Y FISIOLÓGICAS DEL MUSCULO LISO UTERINO

El útero tiene funciones importantes en la reproducción, ya que recibe al embrión procedente de la trompa uterina y es el sitio donde se realiza la implantación y donde se establecen las relaciones vasculares para el mantenimiento del embrión a lo largo de su desarrollo.

Desde el punto de vista histológico la pared del útero de los mamíferos esta constituida de tres regiones: endometrio, miometrio y perimetrio (Delmann y Brown, 1976; Banks, 1986; Vaquero, 1982). El endometrio participa en la implantación del embrión y la formación de la placenta (Bloom y Fawcet, 1987), e incluye en su estructura epitelio, glándulas tubulares simples y tejido conjuntivo subyacente (Vaquero, 1982; Banks, 1986). El miometrio está formado de una capa gruesa de músculo liso circular interna en la que los haces están arreglados alrededor del eje longitudinal, una capa externa donde los haces están arreglados de manera paralela al eje longitudinal y tejido conjuntivo situado entre los haces musculares (Delmann y Brown, 1976; Banks, 1986). El perimetrio se compone de tejido conjuntivo laxo, recubierto de mesotelio peritoneal (Delmann y Brown, 1976).

El útero de rata tiene inervación adrenérgica y colinérgica, asociada al músculo liso, los vasos sanguíneos y los elementos glandulares. La capa circular interna del músculo liso uterino está inervada más que la capa longitudinal externa y la intensidad de inervación disminuye gradualmente hacia la región ovárica (Adham y Schenk, 1969). La inervación simpática del útero está determinada por los nervios presacrales (hipogástrico) (Moawad, 1973) y constituida de receptores adrenérgicos tipo α_1 , α_2 , β_1 y β_2 (Korenman y Krall, 1977). Además de la inervación adrenérgica y colinérgica el músculo liso uterino está influido en forma directa por otros neurotransmisores, tales como la serotonina, histamina, oxitocina, angiotensina, endotelina y prostaglandinas, sustancias que llegan al útero a través de la vía sistémica (Ottesen y Fahrenkrug, 1990).

La oxitocina (OT), una hormona peptídica neurohipofisaria, es un potente estimulante específico del miometrio (Fuchs, 1983). Se ha establecido que el útero humano no gestante o en las primeras etapas de gestación es insensible a la OT, aun a grandes concentraciones (Bygdeman y Wíqvist, 1973; Currie, 1980); sin embargo, existe un incremento en la sensibilidad a la OT hacia la semana 36 de la gestación y durante el trabajo de parto (Bygdeman y Wíqvist, 1973; Braaksma y col. 1973).

Kuriyama y Susuki (1976) encontraron que en el útero de rata embarazada, inmediatamente antes del parto, la OT es más efectiva en inducir la contracción del miometrio que a la mitad del embarazo. Asimismo, se ha descrito un incremento de sensibilidad a la OT en la capa longitudinal del músculo liso uterino de rata a los 10 días de la gestación (Crankshaw, 1986). Este súbito cambio en la sensibilidad del útero de rata embarazada a la OT corresponde al aumento de la concentración de receptores miometriales a la OT (Alexandrova y Soloff, 1980; Fuchs y col. 1983). Por lo tanto, en animales la sensibilidad del miometrio a la OT depende del estado gestacional o del ciclo estral, así como del número de receptores a OT, el cual se incrementa hacia la etapa final del embarazo, es máximo durante el trabajo de parto y declina posteriormente (Carsten y Miller, 1987; Fu y col. 1993). La concentración de receptores a OT en el útero de rata parece incrementarse con los estrógenos (Fuchs y col. 1983), siendo también la progesterona un contribuyente a la excitabilidad miometrial producida por la OT (Fu y col. 1993). Estos hallazgos, correlacionados con la función fisiológica, sugieren que el incremento en la sensibilidad uterina a la OT esta causada por un incremento en los receptores miometriales a la OT (Carsten y Miller, 1987).

Los cambios morfológicos y fisiológicos, al igual que la actividad eléctrica y mecánica del útero de los mamíferos están regulados por los estrógenos y la progesterona. Los estrógenos en el útero de rata inducen una serie de cambios complejos que comprenden mayor permeabilidad vascular, aumento del número de eosinófilos y de células cebadas, e incremento del metabolismo de la glucosa y de la síntesis de proteínas, actomiosina, RNA y DNA (Tchernitchin, 1981, 1989; Campell y col.

1980; Wilson, 1963; Gorski y Nelson, 1965).

Durante la gestación los estrógenos y la progesterona de la placenta afectan de forma sinérgica al miometrio, induciendo la hiperplasia e hipertrofia de las células del músculo liso, aumentando la maquinaria contráctil. La concentración de estrógenos se incrementa marcadamente durante los dos últimos días de gestación en las ratas, mientras que los niveles de progesterona disminuyen antes del parto (Parkington y Coleman, 1990), siendo la placenta y el ovario las dos fuentes importantes de progesterona durante la gestación (Lanman, 1977).

REGIONES MESOMETRIAL Y ANTIMESOMETRIAL DEL UTERO

Existen datos experimentales que han demostrado que existe variación regional, anatómica y electromecánica, del músculo liso uterino, por lo que la actividad de la contracción uterina depende de la zona estudiada. En este sentido, Nesheim (1975) describió un incremento de la sensibilidad a los agonistas β -adrenérgicos en la región longitudinal del músculo liso uterino. Daels (1974) encontró un incremento en la contracción a la adrenalina y OT en la región externa uterina. Crankshaw (1986) describió un incremento de la sensibilidad a la OT en la capa longitudinal del útero de rata a los 10 días de gestación, mientras que en la capa circular uterina observó un incremento hasta el día 21 de la gestación.

Otras regiones descritas del músculo liso uterino de rata son la región mesometrial y antimesometrial. La región uterina que conduce el estímulo eléctrico a un índice más rápido que el resto del miometrio se denominó región antimesometrial (línea uterina) y parece como una estría traslúcida que se encuentra a lo largo del cuerno uterino, mientras la región mesometrial se encuentra en el límite opuesto y externo del tejido (Sterin-Speziale y col. 1981). Se ha descrito que en la región mesometrial del útero de rata existe un incremento en la respuesta de relajación inducida por agonistas β adrenérgicos (Sterin-Speziale y col. 1981), y un incremento en la respuesta a OT (Borda

y col. 1978) y serotonina (Campos y col. 1995), en comparación con la región antimesometrial.

Así también, existe una mayor proporción de células cebadas y un mayor suplemento sanguíneo en la región mesometrial del útero y en animales tratados con estrógenos, por lo que es una región importante en el control vascular y en la permeabilidad uterina (Gibbons y Chang, 1972). Se propone que las variaciones morfofisiológicas descritas en las regiones del músculo liso uterino podrían ser explicadas por la diferencia que existe entre la actividad eléctrica y mecánica a los agonistas (Crankshaw, 1986), por la presencia de poblaciones diferentes de receptores (el Aij, y col. 1993), por un incremento en el número de receptores o por un incremento en la afinidad de los receptores a los agonistas (Sterin-Speziale y col. 1981).

MECANISMO DE EXCITACION-CONTRACCION DEL MUSCULO LISO UTERINO

Ha sido definido que la participación del calcio (Ca^{2+}) en el mecanismo de excitación-contracción del músculo liso es indispensable para activar a las proteínas contráctiles de las fibras musculares (Somlyo y Somlyo, 1968; Carsten y Miller, 1990; Wray, 1993).

El ingreso del Ca^{2+} al músculo liso uterino está mediado por cambios en el potencial de la membrana a través de los canales sensibles al voltaje y por la apertura de los canales operados por receptores. En este último mecanismo existen tres componentes: i) el agonista induce la entrada de Ca^{2+} o de otros iones a través de los canales operados por el receptor; ii) la liberación de Ca^{2+} de almacenes intracelulares, por la acción de segundos mensajeros y iii) la modulación de la sensibilidad de las proteínas contráctiles o de sus mecanismos regulatorios (Bolton, 1979; Ruzicky y col. 1987; Wray, 1993).

Los agonistas uterotónicos participan en el mecanismo excitación-contracción a través de la unión con su receptor activando la proteína G. La proteína G se disocia liberando la subunidad catalítica α , que a su vez activa a la fosfolipasa C (PLC). La PLC hidroliza el fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (IP_2) dando como resultado la formación de segundos mensajeros, el 1,2-diacilglicerol (DAG), el cual activa a la proteína-quinasa C (PKC) y el inositol 1,4,5-trifosfato (IP_3), este último capaz de inducir la liberación de Ca^{2+} del retículo sarcoplásmico (Berridge, 1987; Carsten y Miller, 1990; Wray, 1993). Tanto la movilización de Ca^{2+} como la activación de la PKC participan en la iniciación, la intensidad y la duración de la respuesta de contracción del músculo liso uterino. Estudios en músculo liso uterino han mostrado un incremento en el metabolismo de los fosfoinosítidos producidos por la estimulación con ACh, carbacol y OT (Carsten y Miller, 1990).

El aumento de Ca^{2+} intracelular, a través de la vía de la hidrólisis de los fosfoinosítidos, hace que la calmodulina se una a los iones Ca^{2+} , formando el complejo

Ca^{2+} -calmodulina. Al interactuar el complejo Ca^{2+} -calmodulina con la miosín-cinasa de la cadena ligera fosforila las dos cadenas ligeras de miosina. Una vez fosforilada la miosina forma puentes de entrecruzamiento con la actina y se produce el deslizamiento de los filamentos de la actina y de la miosina. Cuando los niveles de Ca^{2+} disminuyen, la calmodulina se disocia de la miosín-cinasa de la cadena ligera y se produce la relajación (Carsten y Miller, 1987; Wray, 1993). En el estado de reposo del músculo liso uterino la concentración de Ca^{2+} intracelular es de 10^{-7} M, mientras que en la contracción máxima existe un incremento en la concentración de Ca^{2+} a 10^{-6} M (Carsten y Miller, 1987, 1990). El restablecimiento de la concentración de Ca^{2+} intracelular de las células del músculo liso uterino se lleva a cabo a través de una ATPasa- Mg^{2+} , Ca^{2+} y por un intercambiador Na^{+} - Ca^{2+} de la membrana plasmática (Carsten y Miller, 1987; 1990). Otro mecanismo que participa en la disminución de Ca^{2+} intracelular es el almacenamiento de Ca^{2+} en el retículo sarcoplásmico (Carsten y Miller, 1987; 1990). En fecha reciente se ha definido que la contracción del músculo liso uterino inducida por ACh y K^{+} parece originarse principalmente por la entrada de Ca^{2+} extracelular, mientras que el incremento de la concentración de Ca^{2+} intracelular inducido por OT es debido a la liberación de Ca^{2+} de los almacenes intracelulares en células aisladas (Tsukamoto y col. 1991).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La mayoría de los estudios relacionados con el efecto de la exposición a O_3 se han realizado sobre el aparato respiratorio, en donde se ha demostrado que induce diversas alteraciones. Se ha determinado que el O_3 , por su gran capacidad oxidante, produce una amplia variedad de efectos en otros órganos lejanos a las vías aéreas (efectos extrapulmonares), a través de la formación de lipoperóxidos y radicales libres. Se ha determinado que la lipoperoxidación produce una pérdida de la fluidez de la membrana, y de la alineación del receptor y potencialmente la lisis celular (Machlin y Bendich 1987) asociado con un incremento de la concentración de Ca^{2+} citosólico (Nicotera y col. 1988), el cual modula el mecanismo de excitación-contracción del músculo liso uterino. Sin embargo, ha sido poco estudiado el efecto de la exposición a O_3 sobre el aparato reproductor y mecanismo excitación-contracción del músculo liso uterino como una forma de explorar los efectos extrapulmonares y como un fenómeno de estrés oxidativo. Por tal motivo, en este estudio se investigó si la exposición aguda a 3.0 ppm de O_3 modifica el mecanismo excitación-contracción a través de la acción farmacológica de la oxitocina (OT) y la acetilcolina (ACh) en el músculo liso uterino aislado de rata no gestante y gestante (5, 10 y 18 días). Debido a que existen diferencias en la contracción del músculo liso uterino estimulada por diferentes agonistas, y que éstas dependen del ciclo estral y del estado gestacional, en este estudio se determinó también la respuesta de contracción inducida por OT y ACh de los tejidos uterinos de ratas no gestantes y gestantes (5, 10 y 18 días).

Por otro lado, existen diversos estudios que señalan que existe variación anatómica de la respuesta de contracción en el músculo liso uterino a diferentes hormonas y/o neurotransmisores (Borda y col. 1981; Campos y col. 1995). Por ello se propuso estudiar la actividad de contracción de las regiones mesometrial y antimesometrial del útero de rata no gestantes y evaluar si la exposición a O_3 modifica dicha actividad.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

- 1. Caracterizar la actividad de contracción inducida por oxitocina (OT) y acetilcolina (ACh) en el útero de rata no gestante y gestante (5, 10 y 18 días).**
- 2. Determinar el efecto de la exposición aguda a 3.0 ppm de O₃ por una hora sobre la actividad de contracción inducida por OT y ACh en el útero de rata no gestante y gestante (5, 10 y 18 días).**
- 3. Caracterizar la actividad de contracción inducida por OT y ACh en las regiones mesometrial y antimesometrial del útero de rata no gestante.**
- 4. Determinar el efecto de la exposición aguda a 3.0 ppm de O₃ por una hora sobre la actividad de contracción inducida por OT y ACh en las regiones mesometrial y antimesometrial del útero de rata no gestante.**

MATERIAL Y METODOS

ANIMALES

Los experimentos se realizaron con tiras de músculo liso uterino aisladas de ratas cepa Wistar de 200-250 g de peso. Los animales estuvieron en condiciones controladas, con agua y alimento *ad libitum* y con un ciclo de luz-oscuridad de 12-12 horas.

Con el objeto de estandarizar el estado hormonal de las ratas no gestantes, a cada una se le administró subcutáneamente una concentración de 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de 3 benzoato 17- β estradiol (3BE₂) en un volumen de 200 μl de aceite de maíz, 24 horas antes del sacrificio. Se consideró como día cero de la gestación la presencia de tapón vaginal y espermatozoides en el frotis vaginal.

DISEÑO EXPERIMENTAL

En los cuadros I y II se muestran los grupos de ratas empleados, así como el número de individuos utilizados en cada uno de ellos. Para investigar el efecto del O₃ sobre la reactividad uterina antes y durante la gestación (cuadro I) se emplearon 16 grupos de animales, 8 de los cuales fueron evaluados con OT y los 8 restantes con ACh. Para cada uno de estos fármacos se utilizaron ratas no gestantes y ratas de 5, 10 y 18 días de gestación con y sin exposición a O₃.

Para evaluar las modificaciones de la reactividad uterina que ocurren en las diferentes etapas de la gestación, se utilizaron los datos de las ratas no expuestas a O₃ de los grupos arriba indicados (cuadro I).

CUADRO I. Número de ratas no gestantes y gestantes estudiadas en cada grupo experimental

Rata	OXITOCINA		ACETILCOLINA	
	No expuesta	Expuesta a O ₃	No expuesta	Expuesta a O ₃
No gestante	8	8	8	8
Gestante:				
5 días	5	5	5	5
10 días	9	5	5	5
18 días	6	7	5	6

CUADRO II. Número de ratas no gestantes estudiadas en cada grupo experimental

Rata	OXITOCINA		ACETILCOLINA	
	No expuesta	Expuesta a O ₃	No expuesta	Expuesta a O ₃
No gestante:				
Mesometrial	16	10	12	8
Antimesometrial	15	10	12	8

Para analizar la variación anatómica en la contracción del útero de rata no gestante con y sin exposición a O_3 se obtuvieron segmentos de las regiones mesometrial y antimesometrial (Fig. 1) y se evaluó su respuesta de contracción a OT y ACh. En el Cuadro II se muestra el diseño experimental utilizado en esta parte del trabajo.

Finalmente, para investigar si existe variabilidad en la respuesta a ACh y OT entre las regiones mesometrial y antimesometrial, se analizaron los datos de las ratas no expuestas a O_3 de los grupos arriba indicados (cuadro II).

EXPOSICION A OZONO

El O_3 se produjo haciendo pasar un flujo constante de aire a través de un generador de O_3 (PURAQUA) y transferido a una cámara de exposición de acrílico sellada herméticamente. La concentración de O_3 dentro de dicha cámara se reguló con el voltaje del generador y se registró cada minuto con un analizador ultravioleta de O_3 (Dasibi Enviromental Corp., modelo 1008 AH). Las ratas fueron expuestas a 3.0 ppm de O_3 durante una hora. El estudio experimental de las ratas expuestas a O_3 se realizó 18 horas después de la exposición. Como grupo control se usaron ratas no expuestas a O_3 .

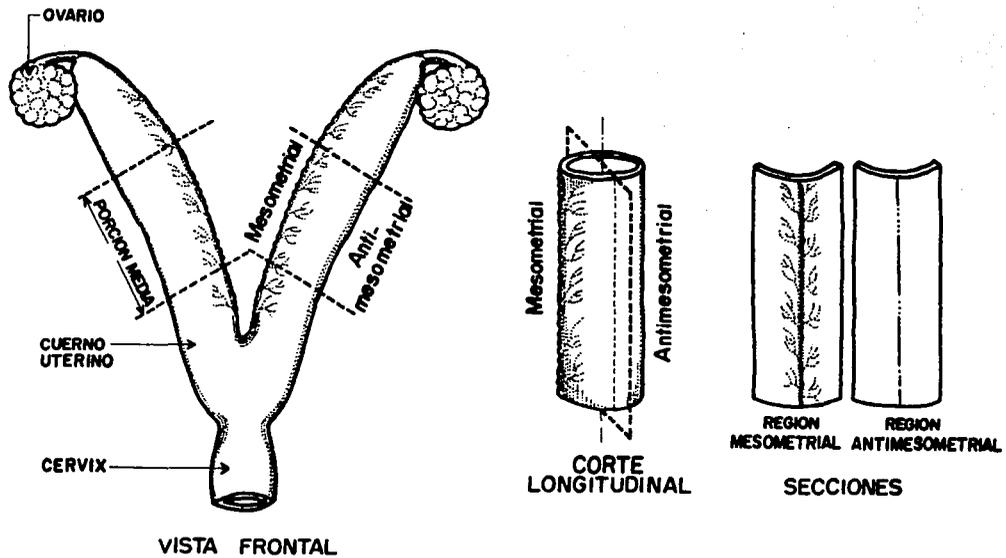


Fig. 1. Diagrama de las regiones mesometrial y antimetometrial de la porción media del útero aislado de rata.

ESTUDIOS *IN VITRO*

Los animales se sacrificaron por desnucamiento y de inmediato se extrajeron cuidadosamente los cuernos uterinos, quitándoles el tejido conjuntivo y grasa. De la parte central de cada cuerno uterino de rata no gestante y gestante se obtuvieron dos segmentos de 1 cm de longitud aproximadamente. Para obtener tejidos de las regiones mesometrial y antimesometrial (Sterin-Speziale y col. 1981) del útero de ratas no gestantes, se realizó un corte longitudinal de cada segmento uterino, con lo que se obtuvieron dos tiras de aproximadamente 10X3X3 mm. Posteriormente los tejidos se colocaron en una cámara de órganos aislados que contenía solución Ringer Krebs-bicarbonato, con la siguiente composición (mM): NaHCO₃ 20; NaCl 120; KCl 4.6; MgSO₄ 1.2; KH₂PO₄ 1.2; CaCl₂ 2.0 y glucosa 11.5. La solución se mantuvo con un burbujeo constante de una mezcla gaseosa de 5% de CO₂ y 95% de O₂, a una temperatura de 37°C y con un pH final de 7.4.

La actividad uterina se registró isométricamente con un transductor de tensión (FTO3 Grass) conectado a un polígrafo Beckman modelo R611. Los segmentos uterinos se ajustaron a 1 g de tensión y se estabilizaron durante 1 hora antes de exponerlos a los fármacos, renovando la solución Ringer Krebs bicarbonato cada 10 minutos. Se realizaron curvas concentración-respuesta no acumulativas a OT y ACh en los tejidos de grupos de animales expuestos y no expuestos a O₃.

SUSTANCIAS QUIMICAS

Las sales utilizadas para preparar la solución Ringer Krebs bicarbonato y despolarizante (K⁺ 60 mM) fueron grado reactivo de los laboratorios J. T. Baker (México).

Se utilizó el estrógeno 3 benzoato 17 β-estradiol (3BE₂) y acetilcolina (ACh) de los laboratorios Sigma, Chemical Co. (St. Louis Mo.). Asimismo, se utilizó oxitocina sintética (OT, Syntocinon^{MR}) de los laboratorios Sandoz (México).

Los agonistas (OT y ACh) se disolvieron en agua destilada y se adicionaron a la cámara de órganos aislados en un volumen que no excedió de los 20 μ l a las concentraciones crecientes, expresadas como $-\log$, para OT (5, 4.5, 4, 3.5, 3, 2.5, 2, 1.5 y 1 mUI/ml) y ACh (7, 6.5, 6, 5.5, 5, 4.5, 4, 3.5, 3 μ M) para cada uno de los grupos experimentales.

ANALISIS DE LOS DATOS

La actividad de contracción del músculo liso uterino inducida por ACh y OT se evaluó cuantitativamente como área bajo la curva, amplitud de la contracción y frecuencia de la contracción.

El área bajo la curva y la amplitud de la contracción se expresaron como % de respuesta. Se consideró como el 100% de respuesta la contracción producida por la administración de 60 mM de KCl en el tejido uterino. La estimulación de 60 mM de KCl se realizó al inicio de cada experimento hasta obtener dos respuestas sucesivas semejantes con el objeto de reconocer la viabilidad y normalizar la respuesta de los diferentes tejidos. El área bajo la curva (cm^2) se midió con un planímetro digital con trazador ajustable Tamaya modelo Polar 2. La amplitud de la contracción indica la tensión máxima producida por el agonista. La frecuencia de contracción se definió como el número de contracciones inducidas por el agonista. Las variables analizadas fueron evaluadas durante un período de 5 minutos.

Los resultados se expresaron como el logaritmo negativo de la concentración efectiva 50 ($-\log \text{CE}_{50}$), es decir, la concentración del agonista a la cual se obtiene el 50% de la respuesta máxima. Para cada curva se calculó la CE_{50} mediante análisis de regresión lineal empleando los valores de respuesta transformados en unidades probabilísticas y que representa la sensibilidad del tejido al agonista utilizado. Se evaluó también la respuesta máxima obtenida de los parámetros analizados en cada grupo experimental. La respuesta máxima indica la reactividad del tejido al agonista. Para la

evaluación estadística se usaron pruebas de comparación múltiple (análisis de varianza de una vía y método de Bonferroni (Wallenstain y col. 1980)). Así también se utilizó prueba t de Student para datos pareados y no pareados. El nivel de significancia se fijó en valores de $p < 0.05$ bimariginal. Los datos y las figuras que aparecen en el texto se expresan como los valores promedio \pm el error estándar.

RESULTADOS

La Figura 2 muestra el estímulo inducido por K^+ (60 mM de KCl) en el músculo liso uterino de rata. En las Figuras 3 y 4 se muestran los trazos del registro típico del protocolo experimental de la contracción uterina inducida por OT y ACh, respectivamente. Se observa inicialmente una contracción sostenida por el estímulo de K^+ 60 mM y posteriormente, los registros estímulo-respuesta no acumulativos para los agonistas OT y ACh. Se obtuvieron curvas concentraciones-respuesta a la OT y ACh para todos los grupos.

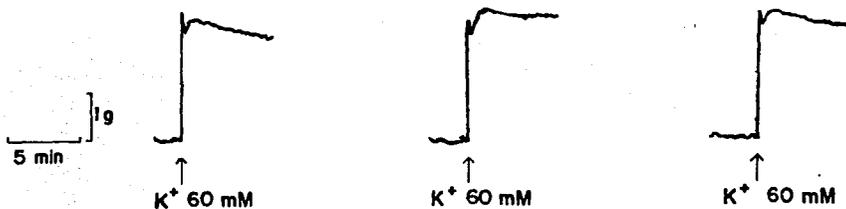


Fig. 2. Ejemplo típico del registro de la actividad de contracción del músculo liso uterino de rata no gestante a la estimulación con K^+ 60 mM.

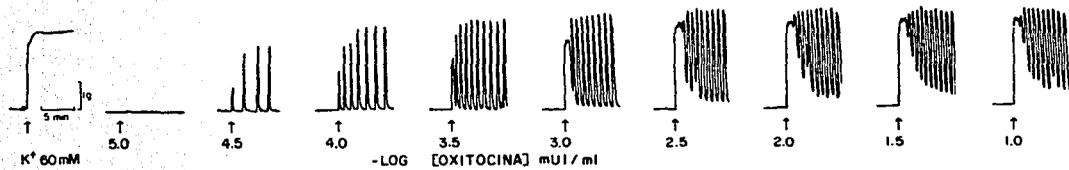


Fig. 3. Ejemplo típico del registro de la actividad de contracción del músculo liso uterino aislado de rata no gestante inducida por oxitocina (OT), a diferentes concentraciones expresadas como $-\text{Log} [\text{OT}]$ mU/ml.

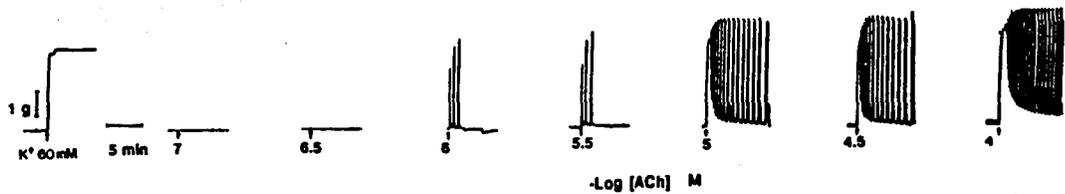


Fig. 4. Ejemplo típico del registro de la actividad de contracción del músculo liso uterino aislado de rata no gestante inducida por acetilcolina (ACh), a diferentes concentraciones expresadas como $-\log [ACh] M$.

CURVAS A OXITOCINA

EFFECTO DEL OZONO SOBRE LA ACTIVIDAD DE CONTRACCION INDUCIDA POR OXITOCINA

Las curvas estímulo-respuesta inducidas por OT, expresadas como área bajo la curva (Fig. 5), amplitud de la contracción (Fig. 6) y frecuencia de la contracción (Fig. 7), en el útero de rata no gestante expuesta a O₃, muestran un desplazamiento hacia la izquierda en comparación con la contracción del útero de rata no gestante no expuesta a O₃. Sin embargo, la exposición a O₃ no modificó la CE₅₀ (Cuadro III, Fig. 8), ni la respuesta máxima (Cuadro IV, Fig. 9) del área bajo la curva, amplitud y frecuencia de la contracción inducida por OT en el útero de rata no gestante con respecto al control.

En el útero de rata gestante (5 días) expuesta a O₃ las curvas estímulo-respuesta a la OT expresadas como área bajo la curva (Fig. 5), amplitud de la contracción (Fig. 6) y frecuencia de la contracción (Fig. 7) se desplazaron a la izquierda en comparación con el útero de rata gestante (5 días) no expuesta a O₃. No obstante, el análisis del área bajo la curva, la amplitud y la frecuencia de la contracción inducida por OT del útero de rata gestante (5 días) muestra que no se modificaron los valores de la CE₅₀ con respecto a los controles (Cuadro III, Fig. 8). En cambio, la exposición a O₃ incrementó la respuesta máxima del área bajo la curva, amplitud y frecuencia de la contracción del útero de rata a los 5 días de gestación ($p < 0.05$, Cuadro IV, Fig. 9).

En ratas a los 10 días de gestación la exposición a O₃ no modificó la CE₅₀ (Cuadro III, Fig. 8), ni la respuesta máxima (Cuadro IV, Fig. 9) del área bajo la curva, amplitud y la frecuencia de la contracción uterina inducida por OT, en comparación con el tejido de ratas gestantes (10 días) no expuestas a O₃. Del mismo modo, la exposición a O₃ no modificó la CE₅₀ (Cuadro III, Fig. 8), ni la respuesta máxima (Cuadro IV, Fig. 9) del área bajo la curva, la amplitud y la frecuencia de la contracción uterina inducidas por OT del útero de rata a los 18 días de gestación con respecto al control.

EFFECTO DE LA GESTACION SOBRE LA ACTIVIDAD DE CONTRACCION INDUCIDA POR OXITOCINA

Se evaluó la contracción inducida por OT del músculo liso uterino de rata no gestante y gestante no expuestas a O_3 a través de la CE_{50} y la respuesta máxima. Al analizar la contracción como área bajo la curva se encontró que a los 10 días de gestación el tejido uterino fue más sensible que el útero de rata no gestante, ya que se observó un incremento significativo de la CE_{50} ($p < 0.05$) (Cuadro III, Fig. 8). El resto de los parámetros estudiados (amplitud y frecuencia) no presentó diferencias significativas de CE_{50} (Cuadro III, Fig. 8).

Analizando la respuesta máxima inducida por OT, observamos que existen diferencias significativas ($p < 0.05$) entre el útero de rata no gestante y el útero de rata a los 10 días de gestación, tanto para el área bajo la curva como para la frecuencia de contracción (Cuadro IV, Fig. 9). No se determinaron diferencias significativas en la respuesta máxima de la amplitud de la contracción inducida por OT (Cuadro IV, Fig. 9).

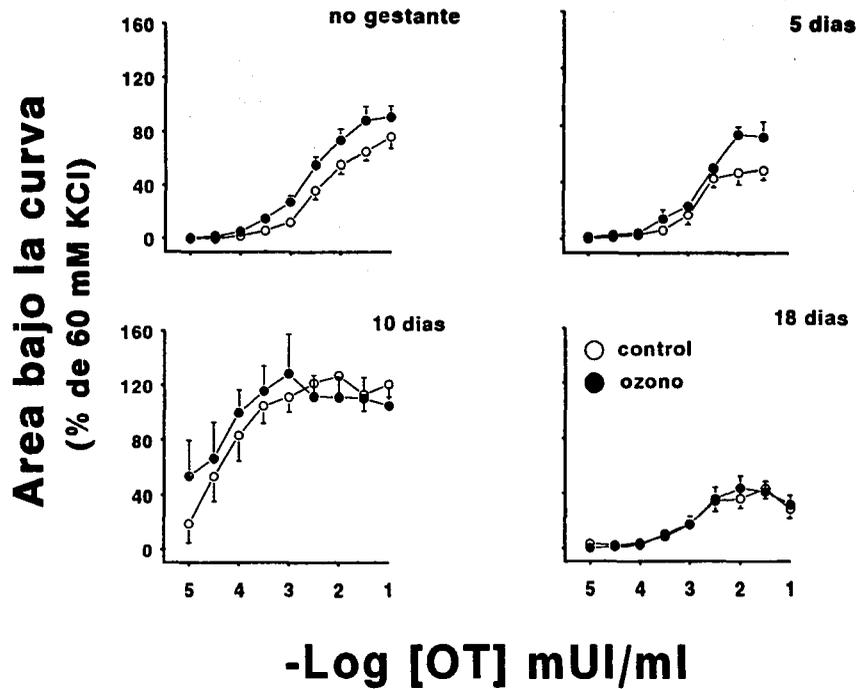


Fig. 5. Efecto de la exposición a ozono sobre el área bajo la curva inducida por oxitocina en el útero de rata no gestante y gestante (5, 10 y 18 días). Los valores representan el promedio \pm error estándar.

**Amplitud de la contracción
(% de 60 mM de KCl)**

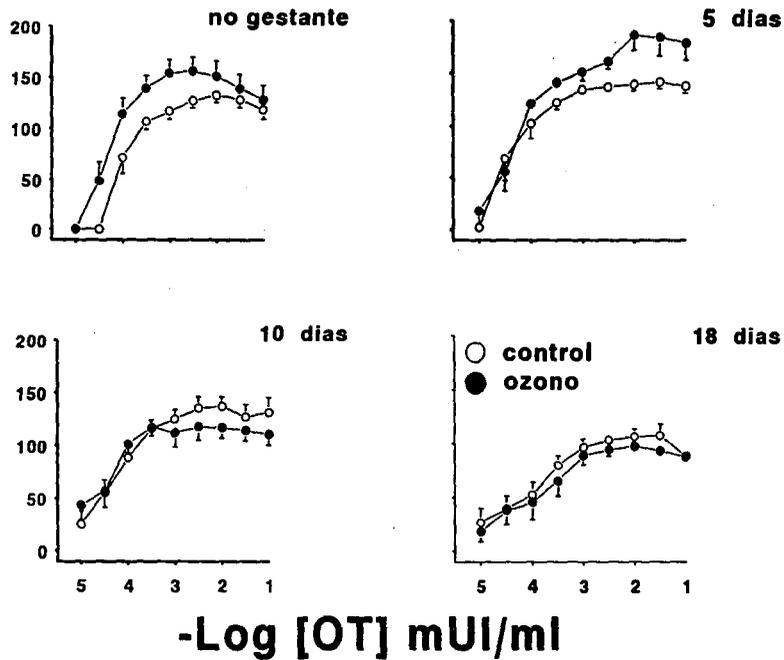


Fig. 6. Efecto de la exposición a ozono sobre la amplitud de la contracción inducida por oxitocina en el útero de rata no gestante y gestante (5, 10 y 18 días). Los valores representan el promedio \pm error estándar.

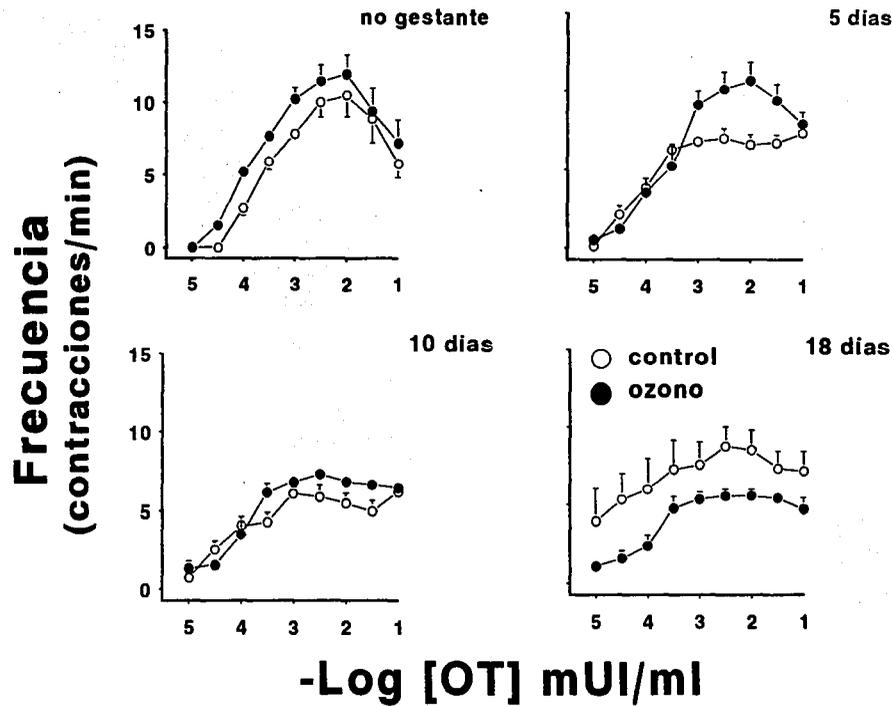


Fig. 7. Efecto de la exposición a ozono sobre la frecuencia de la contracción inducida por oxitocina en el útero de rata no gestante y gestante (5, 10 y 18 días). Los valores representan el promedio \pm error estándar.

CUADRO III. Valores de la CE₅₀ a oxitocina del útero de rata no expuesta y expuesta a ozono.

Días de Gestación	Area bajo la curva (%KCl 60mM)		Amplitud de contracción (%KCl 60mM)		Frecuencia (contrac/min)	
	No expuesta	Expuesta	No expuesta	Expuesta	No expuesta	Expuesta
No gestante	2.39±0.06	2.53±0.06	4.56±0.35	4.46±0.23	3.60±0.10	3.79±0.08
5 días	2.82±0.11	2.57±0.17	4.85±0.44	4.23±0.20	4.32±0.31	3.77±0.08
10 días	4.32±0.13	4.54±0.55	4.39±0.09	4.55±0.56	4.08±0.21	3.96±0.17
18 días	2.85±0.17	2.87±0.14	4.28±0.21	4.22±0.29	4.65±0.72	3.81±0.25

Las cifras corresponden al valor promedio $-\log CE_{50} \pm E.E.$

* $p < 0.05$

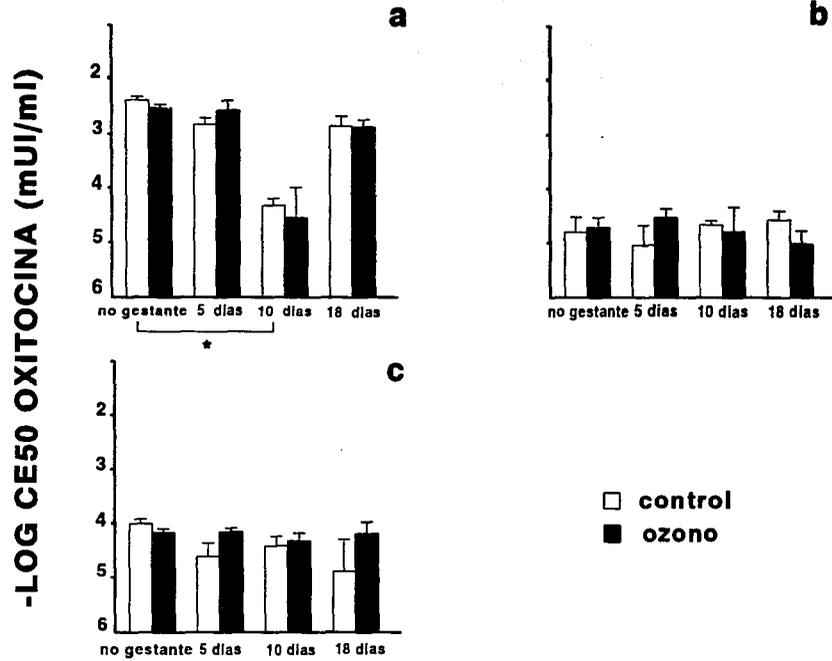


Fig. 8. Efecto de la exposición a ozono sobre la actividad de contracción inducida por oxitocina en el útero de rata no gestante y gestante (5, 10 y 18 días). a=área bajo la curva, b=amplitud de la contracción, c=frecuencia. Comparación de los valores promedio de la $CE_{50} \pm$ error estándar a oxitocina de tejidos aislados de ratas expuestas y no expuesta a ozono. * $p < 0.001$.

CUADRO IV. Valores de la respuesta máxima inducida por oxitocina del útero de rata no expuesta y expuesta a ozono.

Días de Gestación	Area bajo la curva (%KCl 60mM)		Amplitud de contracción (%KCl 60mM)		Frecuencia (contrac/min)	
	No expuesta	Expuesta	No expuesta	Expuesta	No expuesta	Expuesta
No gestante	76.69±8.82	98.34±8.75	136.49±6.27	160.42±12.1	11.06±1.21	12.31±1.21
5 días	51.31±5.93	88.22±10.8	142.15±5.50	188.66±16.07	7.80±0.54	10.87±1.20
10 días	132.92±15.59	131.02±28.78	144.55±9.23	122.39±9.87	6.67±0.44	7.60±0.24
18 días	44.33±6.72	46.90 ±8.67	113.60±8.31	101.39±3.05	8.92±1.26	6.43±0.35

Las cifras corresponden al valor promedio de la respuesta máxima ± E.E.

*p<0.05

Respuesta máxima

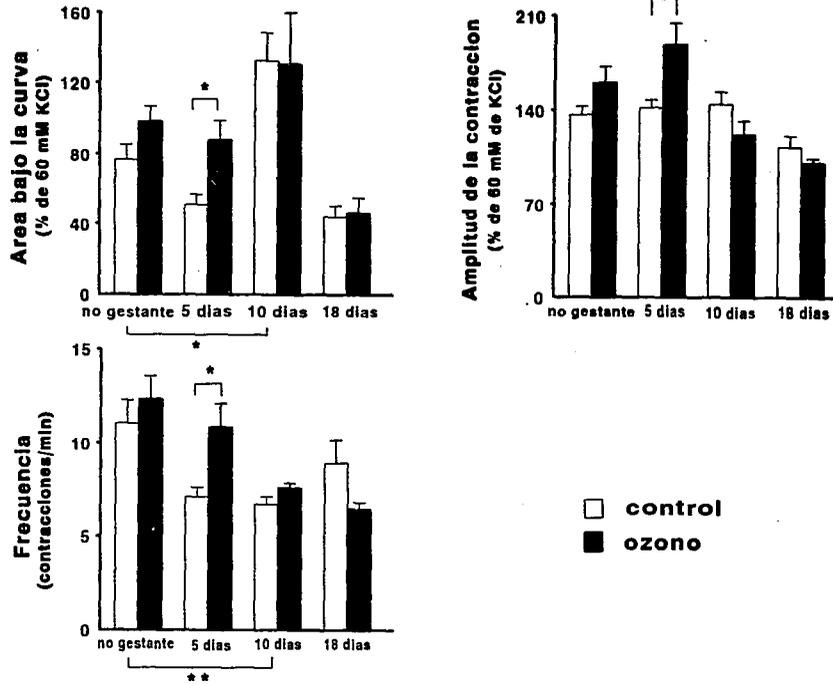


Fig. 9. Efecto de la exposición a ozono sobre la respuesta máxima inducida por oxitocina en el útero de rata no gestante y gestante (5, 10 y 18 días). Los valores representan el promedio de la respuesta máxima \pm error estándar. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

ACTIVIDAD DE CONTRACCIÓN INDUCIDA POR OXITOCINA EN LAS REGIONES MESOMETRIAL Y ANTIMESOMETRIAL DEL ÚTERO DE RATA NO GESTANTE

Al comparar la CE_{50} del área bajo la curva, la amplitud y la frecuencia de la contracción (Cuadro V, Fig. 11) de las regiones mesometrial con la antimesometrial no se observaron diferencias significativas. Sin embargo, se encontró un incremento significativo ($p < 0.01$) en la respuesta máxima de la frecuencia de contracción inducida por OT en la región antimesometrial, en comparación con la región mesometrial (Cuadro VI, Fig. 12).

Al analizar el efecto del O_3 sobre cada una de estas regiones anatómicas (Fig. 10) se encontró que la exposición a O_3 no modificó la CE_{50} (Cuadro V, Fig. 11) ni la respuesta máxima (Cuadro VI, Fig. 12) de la contracción inducida por OT en ninguno de los parámetros evaluados.

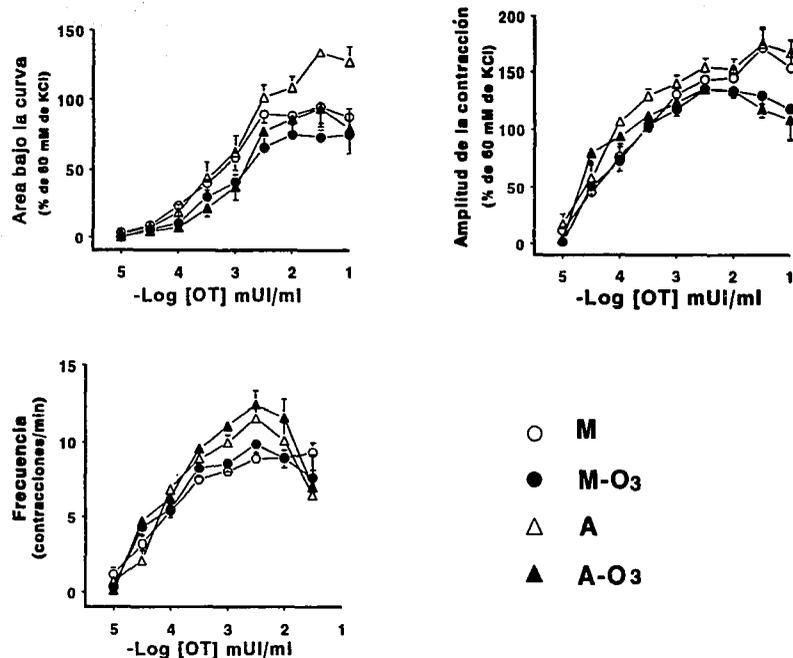


Fig. 10. Efecto de la exposición a ozono sobre la actividad de contracción inducida por oxitocina en las regiones mesometrial y antimesometrial del útero de rata no gestante. M=región mesometrial, M-O₃=región mesometrial de rata expuesta a ozono, A=región antimesometrial, A-O₃=región antimesometrial de rata expuesta a ozono. Los valores representan el promedio \pm error estándar.

CUADRO V. Valores de la CE₅₀ a oxitocina de la región mesometrial y antimesometrial del útero de rata no expuesta y expuesta a ozono.

	Area bajo la curva (%KCl 60mM)		Amplitud de contracción (%KCl 60mM)		Frecuencia (contrac/min)	
	No expuesta	Expuesta	No expuesta	Expuesta	No expuesta	Expuesta
Mesometrial	3.23±0.14	3.04±0.15	4.18±0.14	4.16±0.08	4.29±0.13	4.34±0.19
Antimesometrial	3.07±0.16	3.02±0.08	4.57±0.12	4.76±0.14	4.07±0.09	4.03±0.09

Las cifras corresponden al valor promedio -log CE₅₀ ± E.E.

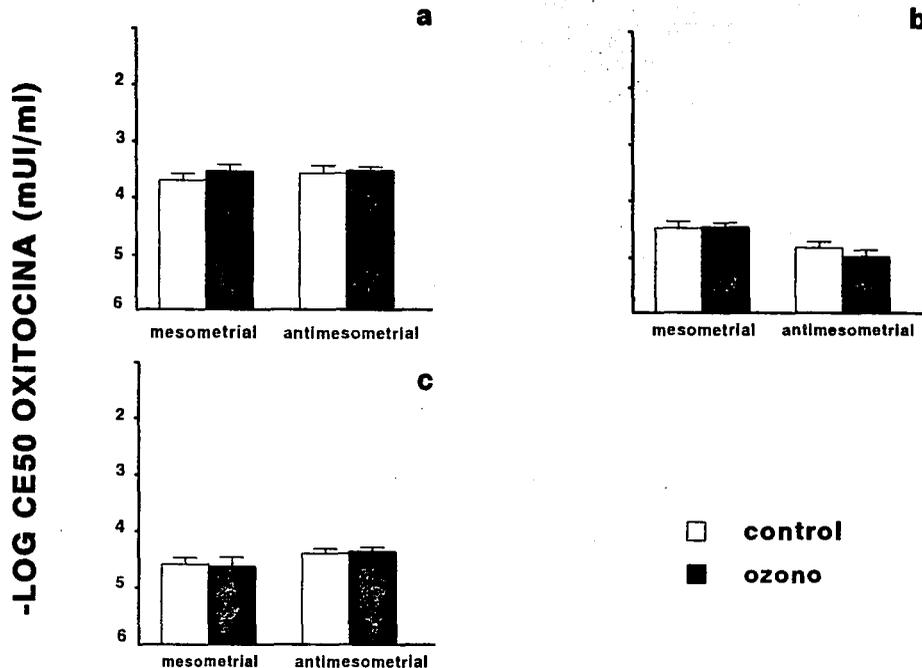


Fig. 11. Efecto de la exposición a ozono sobre la actividad de contracción inducida por oxitocina en las regiones mesometrial y antimesometrial del útero de rata no gestante. a=área bajo la curva, b=amplitud y c=frecuencia. Los valores representan el valor promedio del $-\log CE_{50} \pm$ error estándar a oxitocina de tejidos aislados de animales no expuestos y expuestos a ozono.

CUADRO VI. Valores de la respuesta máxima inducida por oxitocina de la región mesometrial y antimesometrial del útero de rata no expuesta y expuesta a ozono.

	Area bajo la curva (%KCl 60mM)		Amplitud de contracción (%KCl 60mM)		Frecuencia (contrac/min)	
	No expuesta	Expuesta	No expuesta	Expuesta	No expuesta	Expuesta
Mesometrial	97.99±6.55	83.78±7.90	154.91±8.88	143.84±7.61	10.06±0.33	10.05±0.52
Antimesometrial	120.50±8.12	88.94±9.81	159.19±8.27	137.58±5.13	12.57±0.74	13.25±0.70

Las cifras corresponden al valor promedio de la respuesta máxima ±E.E.

**p<0.01

Respuesta máxima

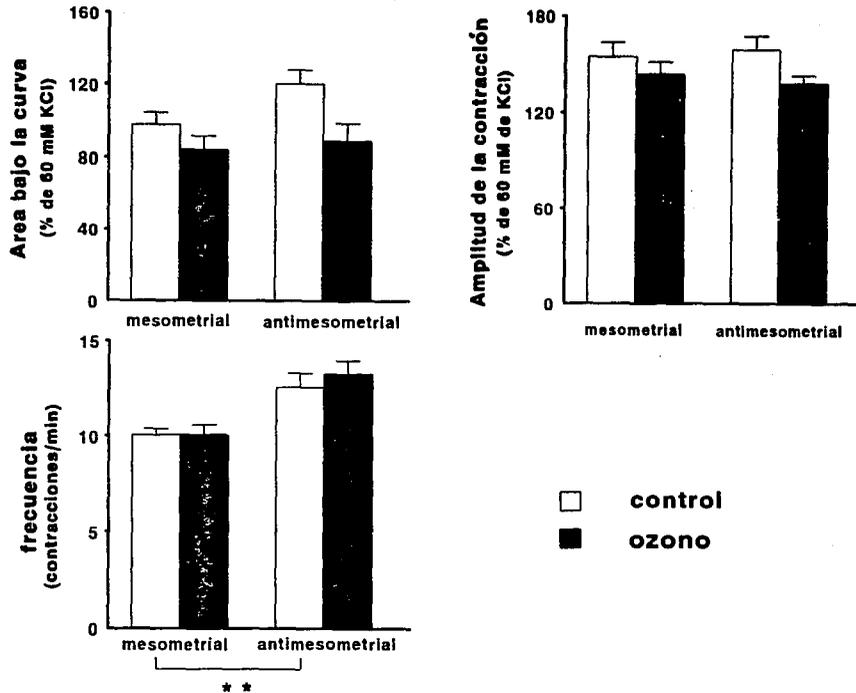


Fig. 12. Efecto de la exposición a ozono sobre la respuesta máxima inducida por oxitocina en las regiones mesometrial y antimesometrial del útero de rata no gestante. Los valores representan el promedio \pm error estándar. ** $p < 0.01$

CURVAS A ACETILCOLINA

EFFECTO DEL OZONO SOBRE LA ACTIVIDAD DE CONTRACCIÓN INDUCIDA POR ACETILCOLINA

Se realizaron curvas estímulo-respuesta inducidas por ACh, expresadas como área bajo la curva (Fig. 13), amplitud de la contracción (Fig. 14) y frecuencia de la contracción (Fig. 15), en el útero de rata no gestante o gestante (5, 10 y 18 días), con o sin exposición a O₃.

Al evaluar la CE₅₀ (Cuadro VII, Fig. 16) de la contracción inducida por ACh en estos tejidos, se encontró que la exposición a O₃ no modificó en forma significativa ninguno de los parámetros evaluados.

Al analizar las respuestas máximas (Cuadro VIII, Fig. 17) se encontró que la exposición a O₃ incrementó ($p < 0.05$) la respuesta máxima del área bajo la curva en el útero de rata a los 5 y 10 días de gestación, no así en el útero de rata no gestante y en el de rata con 18 días de gestación.

Con respecto a las respuestas máximas de la amplitud y de la frecuencia de la contracción (Cuadro VIII, Fig. 17), no se observaron diferencias significativas al evaluar el efecto del O₃ sobre los úteros de ratas no gestantes como gestantes.

EFFECTO DE LA GESTACION SOBRE LA ACTIVIDAD DE CONTRACCIÓN INDUCIDA POR ACETILCOLINA

Se evaluó la CE₅₀ y la respuesta máxima de la contracción inducida por ACh en el útero de ratas no gestantes y gestantes (5, 10 y 18 días) no expuestas a O₃ (Cuadro VII, Fig. 16). Se encontró un incremento significativo de la CE₅₀ del área bajo la curva ($p < 0.05$)

en el útero de las ratas con 18 días de gestación, en comparación con las ratas no gestantes. No se encontraron diferencias significativas entre las ratas gestantes y las no gestantes en relación a la CE_{50} de la amplitud y la frecuencia de la contracción.

Al comparar las respuestas máximas de los úteros de ratas gestantes y de ratas sin gestación (Cuadro VIII, Fig. 17), se encontró que a los 18 días de gestación los tejidos presentaron un aumento de la respuesta máxima en el área bajo la curva, misma que fue más del doble de la observada en las ratas no gestantes ($p < 0.001$).

De igual forma, al analizar las respuestas máximas de la frecuencia de contracción (Cuadro VIII, Fig. 17) se encontró que, en comparación con los úteros de ratas no gestantes, desde los 5 días de gestación los tejidos presentan una disminución significativa de dichas respuestas, fenómeno que persiste durante los 10 y los 18 días de gestación ($p < 0.05$).

Finalmente, las respuestas máximas de la amplitud de contracción no presentaron cambios significativos durante la gestación (Cuadro VIII, Fig. 17).

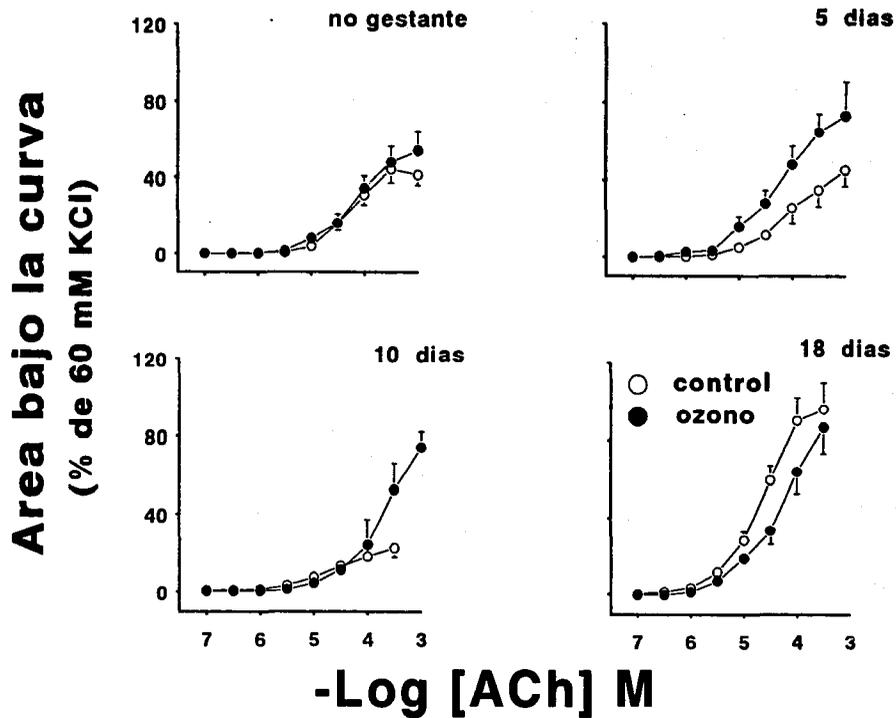


Fig. 13. Efecto de la exposición a ozono sobre el área bajo la curva por acetilcolina en el útero de rata no gestante y gestante (5, 10 y 18 días). Los valores representan el promedio \pm error estándar.

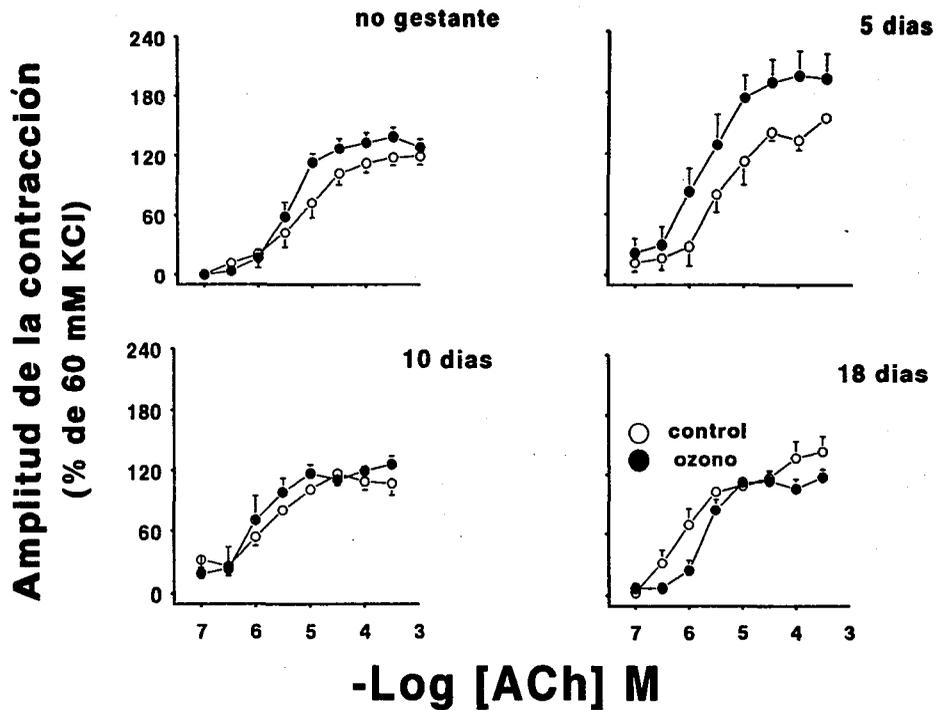


Fig. 14. Efecto de la exposición a ozono sobre la amplitud de la contracción inducida por acetilcolina en el útero de rata no gestante y gestante (5, 10 y 18 días). Los valores representan el promedio \pm error estándar.

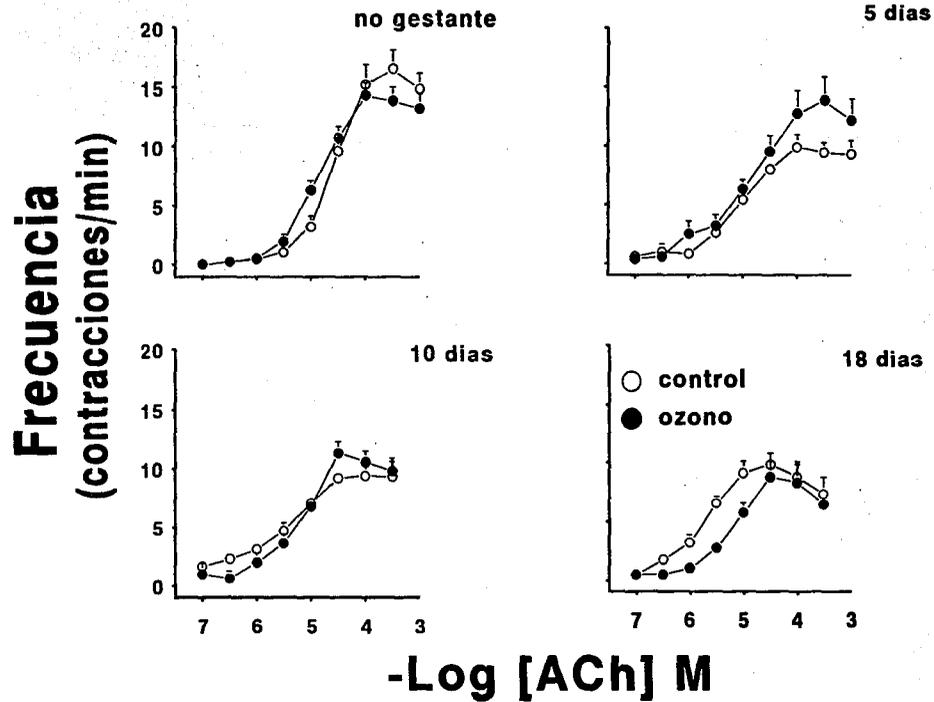


Fig. 15. Efecto de la exposición a ozono sobre la frecuencia de la contracción inducida por acetilcolina en el útero de rata no gestante y gestante (5, 10 y 18 días). Los valores representan el promedio \pm error estándar.

CUADRO VII. Valores de la CE₅₀ a acetilcolina del útero de rata no expuesta y expuesta a ozono.

Días de Gestación	Area bajo la curva (%KCl 60mM)		Amplitud de contracción (%KCl 60mM)		Frecuencia (contrac/min)	
	No expuesta	Expuesta	No expuesta	Expuesta	No expuesta	Expuesta
No gestante	4.24±0.07	4.25±0.08	5.31±0.18	5.53±0.17	4.60±0.06	4.82±0.08
5 días	4.23±0.09	4.12±0.12	5.56±0.24	6.02±0.25	5.15±0.12	4.97±0.13
10 días	4.43±0.16	3.91±0.20	6.05±0.20	6.46±0.55	5.65±0.18	5.34±0.20
18 días	4.69±0.04	3.95±0.35	5.82±0.17	6.23±0.16	5.56±0.10	5.23±0.12

Las cifras corresponden al valor promedio $-\log CE_{50} \pm E.E.$

* $p < 0.05$

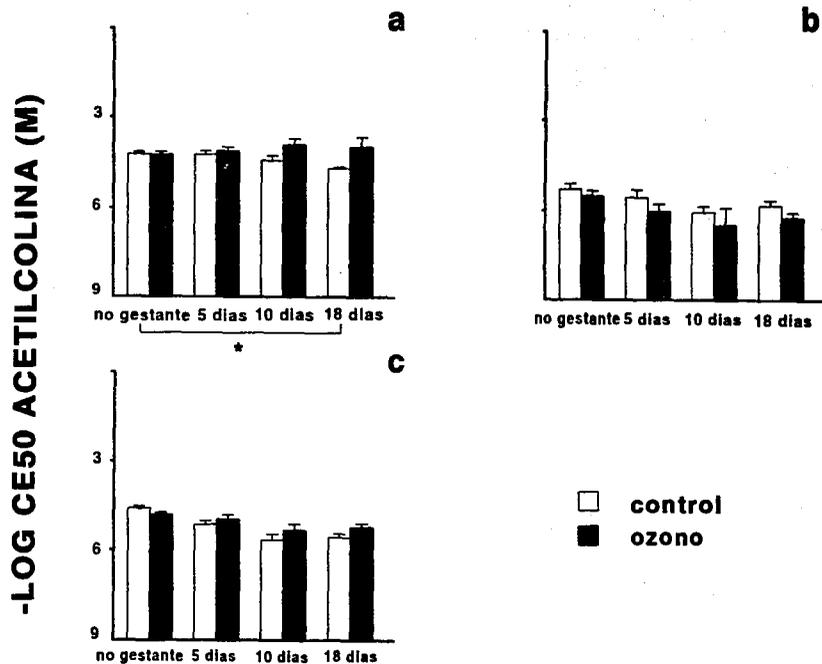


Fig. 16. Efecto de la exposición a ozono sobre la actividad de contracción inducida por acetilcolina en el útero de rata no gestante y gestante (5, 10 y 18 días). a=área bajo la curva, b=amplitud de la contracción, c=frecuencia. Los valores representan el promedio del $-log CE_{50} \pm$ error estándar.

CUADRO VIII. Valores de la respuesta máxima inducida por acetilcolina del útero de rata no expuesta y expuesta a ozono.

Días de Gestación	Area bajo la curva (%KCl 60mM)		Amplitud de contracción (%KCl 60mM)		Frecuencia (contrac/min)	
	No expuesta	Expuesta	No expuesta	Expuesta	No expuesta	Expuesta
No gestante	45.56±6.48	55.63±9.21	120.60±7.87	144.51±8.09	16.92±1.51	15.00±1.19
5 días	38.17±9.05	72.91±12.08	155.10±5.82	204.87±28.2	10.10±0.86	13.8 ±1.93
10 días	23.12±3.77	74.86±5.65	121.11±10.23	135.26±4.79	10.40±1.18	11.63±1.07
18 días	99.81±11.43	95.22 ±6.54	143.25±16.07	123.03±8.38	10.23±0.76	9.23±1.39

Las cifras corresponden al valor promedio de la respuesta máxima ± E.E.

*p<0.05; **p<0.01

Respuesta máxima

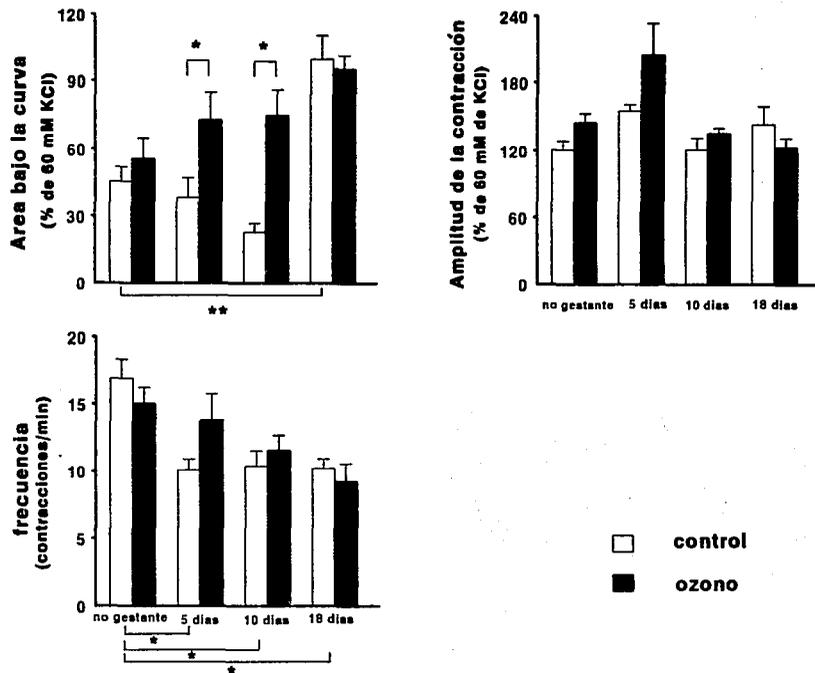


Fig. 17. Efecto de la exposición a ozono sobre la respuesta máxima inducida por acetilcolina en el útero de rata no gestante y gestante (5, 10 y 18 días). Los valores representan el promedio \pm error estándar. * $p<0.05$, ** $p<0.01$.

ACTIVIDAD DE CONTRACCIÓN INDUCIDA POR ACETILCOLINA EN LAS REGIONES MESOMETRIAL Y ANTIMESOMETRIAL DEL UTERO DE RATA NO GESTANTE

Al comparar las regiones mesometrial y antimetrial en las ratas sin exposición a O_3 no se hallaron diferencias significativas en la CE_{50} (Cuadro IX, Fig. 19) y la respuesta máxima (Cuadro X, Fig. 20) de la contracción inducida por ACh en ninguno de los parámetros evaluados (area bajo la curva, amplitud y frecuencia).

Por otra parte, la exposición a O_3 no modificó las respuestas a la ACh en la región mesometrial o la antimetrial. Esta carencia de efecto pudo observarse tanto para la CE_{50} (Cuadro IX, Fig. 19) como para la respuesta máxima (Cuadro X, Fig. 20) de la contracción, en cualquiera de sus parámetros estudiados (area bajo la curva, amplitud y frecuencia).

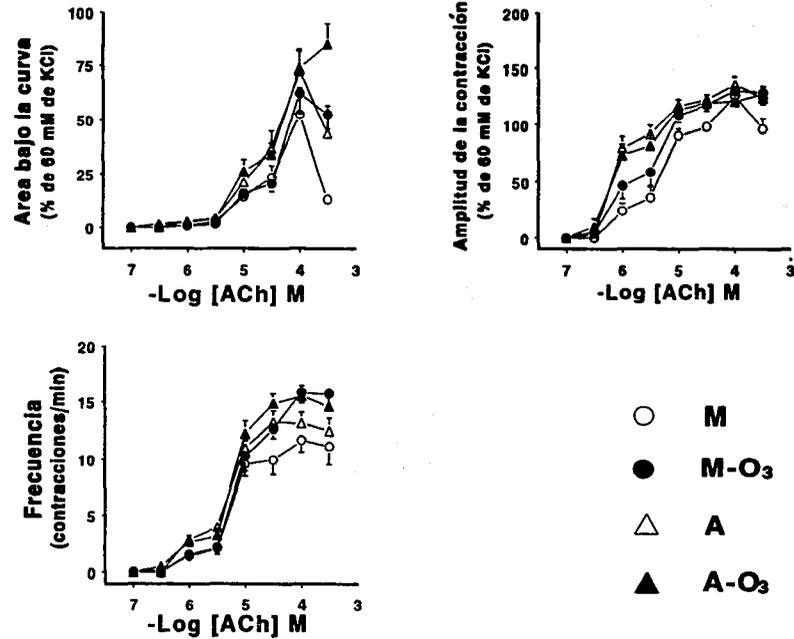


Fig. 18. Efecto de la exposición a ozono sobre la actividad de contracción inducida por acetilcolina en las regiones mesometrial y antimesometrial del útero de rata no gestante. M=región mesometrial, M-O₃=región mesometrial de rata expuesta a ozono, A=región antimesometrial, A-O₃=región antimesometrial de rata expuesta a ozono. Los valores representan el promedio \pm error estándar.

CUADRO IX. Valores de la CE₅₀ a acetilcolina de la región mesometrial y antimesometrial del útero de rata no expuesta y expuesta a ozono.

	Area bajo la curva (%KCl 60mM)		Amplitud de contracción (%KCl 60mM)		Frecuencia (contrac/min)	
	No expuesta	Expuesta	No expuesta	Expuesta	No expuesta	Expuesta
Mesometrial	4.39±0.13	4.34±0.13	5.47±0.12	6.24±0.71	5.19±0.05	5.04±0.017
Antimesometrial	4.57±0.08	4.52±0.06	6.35±0.21	6.13±0.15	5.81±0.11	5.32±0.08

Las cifras corresponden al valor promedio $-\log CE_{50} \pm E.E.$

* $p < 0.05$

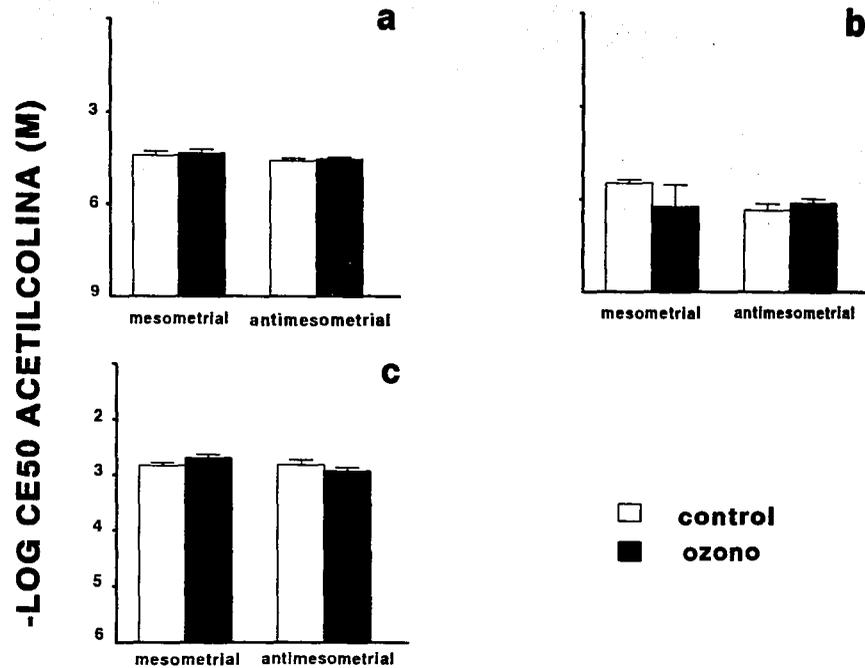


Fig. 19. Efecto de la exposición a ozono sobre la actividad de contracción inducida por acetilcolina en las regiones mesometrial y antimesometrial del útero de rata no gestante. a=área bajo la curva, b=amplitud de la contracción, c=frecuencia. Los valores representan el promedio del $-\log CE_{50} \pm$ error estándar.

CUADRO X. Valores de la respuesta máxima inducida por acetilcolina de la región mesometrial y antimesometrial del útero de rata no expuesta y expuesta a ozono.

	Area bajo la curva (%KCl 60mM)		Amplitud de contracción (%KCl 60mM)		Frecuencia (contrac/min)	
	No expuesta	Expuesta	No expuesta	Expuesta	No expuesta	Expuesta
Mesometrial	52.64±12.29	63.23±9.22	127.01±6.74	132.88±7.65	13.00±1.13	16.38±0.84
Antimesometrial	75.34±10.28	83.71±9.06	138.78±6.28	126.53±6.54	14.54±0.85	15.56±0.93

Las cifras corresponden al valor promedio de la respuesta máxima ±E.E.

*p=0.05

Respuesta máxima

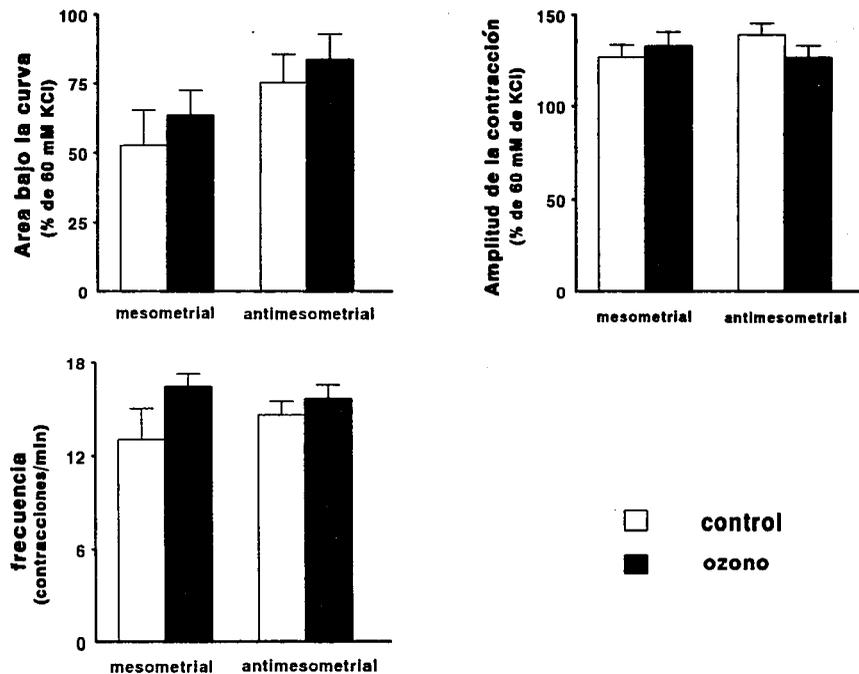


Fig. 20. Efecto de la exposición a ozono sobre la respuesta máxima inducida por acetilcolina en las regiones mesometrial y antimesometrial del útero de rata no gestante. Los valores representan el promedio \pm error estándar.

DISCUSION

Desde hace más de 35 años se ha estudiado el efecto del O₃ sobre organismos vivientes (Fairchild y col., 1959). En los animales y los seres humanos gran parte de esta investigación se ha enfocado a los posibles efectos dañinos de este gas oxidante sobre el aparato respiratorio, lo que seguramente ha sido motivado porque, además de la piel y las mucosas externas, este órgano es el que más posibilidades tiene de recibir la agresión del O₃ ambiental. Lo anterior contrasta con la relativa escasez de estudios sobre el efecto del O₃ en otros aparatos diferentes del respiratorio. Específicamente, los pocos estudios que se han realizado al respecto en el aparato reproductor se han enfocado a la acción del O₃ sobre el embrión, ya sea en relación a efectos teratogénicos o alteraciones del desarrollo del embrión (Kavlock, 1979, 1980).

En el presente trabajo se investigaron los efectos del O₃ sobre la actividad de contracción del útero de rata no gestante, así como sus posibles cambios durante la gestación. Adicionalmente, en ratas sanas no gestantes se intentó dilucidar qué región anatómica, mesometrial o antimesometrial, era más afectada por el O₃. Finalmente, se evaluaron los cambios en la sensibilidad uterina a la OT y ACh durante la gestación.

EFFECTO DE LA GESTACION SOBRE LA CONTRACCIÓN UTERINA INDUCIDA POR OXITOCINA Y ACETILCOLINA

Estos resultados muestran que la actividad de contracción inducida por OT y ACh en el útero de rata se modifica dependiendo del estado gestacional. Con respecto a las respuestas a OT, el estudio permitió determinar que el útero de rata a los 10 días de gestación presenta mayor sensibilidad y respuesta máxima a este agonista en comparación con el útero no gestante, hecho que se manifestó al evaluar las respuesta como área bajo la curva. En el ser humano se ha establecido claramente que el

embarazo causa una modificación de la sensibilidad del útero a la OT, asociada a un incremento en la concentración de receptores a esta hormona. Así, se ha descrito que hacia la etapa final del embarazo existe una mayor densidad de receptores a OT, siendo máxima durante el trabajo de parto, y disminuyendo después (Carsten y Miller, 1987; Fu y col. 1993). En contraste con lo anterior, los estudios realizados en ratas han encontrado resultados muy variables. Alexandrova y Soloff (1980) y Fuchs y col. (1983) demostraron una mayor sensibilidad a la OT del útero de rata durante el embarazo, mientras que Kuriyama y Susuki (1976) describieron un aumento de la concentración de sus receptores miométriales inmediatamente antes del parto. Contrariamente a las observaciones anteriores, Madeiros y Calixto (1989) establecieron que en el músculo liso uterino de la rata con 10 días de gestación existe una disminución de la sensibilidad a la OT, en comparación con el útero de rata no gestante.

Una posible explicación para estas diferencias podría ser la región uterina seleccionada en cada estudio. Se ha descrito que en la capa longitudinal del útero de rata a los 10 días de gestación existe un incremento de sensibilidad a la respuesta de OT, mientras que en la capa circular uterina existe un incremento hasta el día 21 de la gestación para este mismo agonista (Crankshaw, 1986). Es posible que este diferente comportamiento sea debido a la presencia de dos poblaciones de receptores a la OT en el miometrio de rata, un tipo de receptor predominante en la capa longitudinal y otro tipo de receptor regulado por progesterona que se encuentra en la capa circular del músculo liso (el Alj y col. 1993). Además, se han descrito, al menos para el útero humano, variaciones regionales en la concentración de receptores a OT, siendo mayor en el segmento superior, menor en la parte inferior, y la más baja a nivel del cuello uterino (Fuchs, 1983). Lo mencionado anteriormente permite suponer que la región uterina utilizada en este estudio determinó probablemente el incremento en la sensibilidad y la respuesta máxima a la OT en el útero a los 10 días de gestación.

Contrastando con la mayor respuesta a OT a los 10 días de gestación, se encontró que para la ACh había un incremento de la respuesta como área bajo la curva

hasta los 18 días de gestación. Existen diversos estudios que han establecido que la ACh produce contracciones en el músculo liso uterino (Hodgson y Daniel, 1973; Wray, 1993). Contrario a esto, Madeiros y Calixto (1989) determinaron que en el útero de rata gestante (10 días) la ACh no produce ningún efecto en la contracción uterina. Los resultados de este estudio indican que el útero de rata no gestante y gestante (5, 10 y 18 días) fue capaz de responder a la ACh, siendo el útero de rata a los 18 días de gestación más reactivo a la ACh, expresado como área bajo la curva, en relación con el útero no gestante.

El hecho de que la OT y la ACh provoquen una mayor respuesta uterina en diferentes periodos de la gestación sugiere que los mecanismos subyacentes que potencian las respuestas a cada uno de estos agonistas pudieran ser diferentes.

En el presente estudio se determinó que el útero de rata a los 10 días de gestación presenta un decremento en la frecuencia de contracción inducida por OT comparado con el útero de rata no gestante. Con la ACh también se observó un decremento de la frecuencia de contracción durante todas las etapas gestacionales estudiadas (5, 10 y 18 días). La frecuencia de contracción uterina es un parámetro que no ha sido evaluado regularmente en estudios previos. Es muy probable que esta actividad fásica sea un fenómeno diferente de la contracción tónica inducida por el agonista. Según Wray (1993), la frecuencia de las contracciones puede ser incrementada por cambios iónicos que 1) aumenten la actividad de las células marcapaso y 2) acorten los potenciales de acción. Esta autora define que el incremento de la amplitud o duración de la contracción podría resultar de 1) un incremento del Ca^{2+} intracelular o 2) un incremento en la sensibilidad del sistema contráctil al Ca^{2+} . El incremento del Ca^{2+} intracelular puede ser debido a 1) un incremento en la entrada a través de los canales operados por el receptor o canales operados por el voltaje, 2) incremento en la liberación de los almacenes intracelulares y/o el reciclado de los almacenes intracelulares, 3) decremento o intercambio de Na^+ - Ca^{2+} o 4) disminución de la expulsión de Ca^{2+} a través de la bomba Ca^{2+} -ATPasa membranal. Por lo anterior, en estudios de

la contracción uterina parece justificado evaluar la frecuencia de las contracciones fásicas como un parámetro adicional a la amplitud y al área bajo la curva. Con base en lo anterior, la disminución de la frecuencia de contracción observada con OT y ACh durante la gestación podrían explicarse a través de cambios iónicos que modificarían la actividad de las células marcapaso o de los potenciales de acción de las células del músculo liso uterino (Wray, 1993). En este sentido, una sustancia que podría motivar estos cambios en las células marcapaso es la progesterona, hormona que está presente durante todo el embarazo y que es capaz de reducir la excitabilidad del útero, posiblemente al afectar su potencial de membrana (Carsten y Miller, 1990).

CONTRACCION INDUCIDA POR OXITOCINA Y ACETILCOLINA EN LAS REGIONES MESOMETRIAL Y ANTIMESOMETRIAL DEL UTERO DE RATA NO EXPUESTA A OZONO

Los resultados de este estudio indican que entre las regiones mesometrial y antimesometrial del útero de rata no existen diferencias en la sensibilidad y respuesta máxima a la ACh. Con respecto a la OT, solamente se observó un aumento en la máxima frecuencia de contracción de la región antimesometrial, en comparación con la mesometrial, sin que existieran diferencias significativas entre los demás parámetros estudiados.

Como se ha mencionado anteriormente, existen estudios que muestran que las respuestas a los diferentes agonistas pueden ser variables dependiendo de la región anatómica estudiada. Aunque son escasas las investigaciones relacionadas con la respuestas de contracción o relajación entre las regiones mesometrial y antimesometrial del músculo liso uterino de rata (Gibbons y Chang, 1972, Borda y col. 1978; Sterin-Speziale y col. 1981; Campos y col. 1995), dichos trabajos señalan que estas diferencias podrían estar moduladas por una regionalización del número o afinidad de los receptores a los agonistas. Por otro lado, como ha descrito Wray (1993), la frecuencia de las

contracciones del músculo liso uterino es modificada por los cambios iónicos que determinan la actividad de las células marcapaso y la aparición de los potenciales de acción. Por lo tanto, de acuerdo a los resultados del presente estudio se podría especular que en la región antimesometrial las células marcapaso, posiblemente influidas por una diferencia regional de receptores, presentan una mayor actividad que las de la región mesometrial.

EFFECTO DEL OZONO SOBRE LA CONTRACCIÓN UTERINA INDUCIDA POR OXITOCINA Y ACETILCOLINA

El interés por la identificación de los mecanismos bioquímicos y moleculares involucrados en la causa y reparación del daño producido por el O_3 , ha contribuido también a incrementar los resultados experimentales que apoyan fuertemente que existen efectos extrapulmonares asociados con la exposición a O_3 .

Hasta la fecha, este estudio es el primero en relacionar el efecto de la exposición a O_3 sobre el mecanismo excitación-contracción del útero de rata, como una forma de explorar los efectos del O_3 sobre el aparato reproductor.

Los resultados del presente estudio muestran que en ausencia de gestación la exposición a O_3 (3 ppm, 1 h) no modificó la sensibilidad ni la respuesta máxima a la OT y ACh del útero de rata, expresada como área bajo la curva, amplitud y frecuencia de la contracción. De forma interesante, se encontró que durante las etapas iniciales de la gestación (5 días) el O_3 fue capaz de incrementar las respuestas tanto a OT como a ACh. En el caso de la ACh este aumento de las respuestas también se observó en etapas intermedias (10 días). Sin embargo, durante la última parte de la gestación (18 días) el O_3 no produjo más este efecto potenciador sobre las respuestas uterinas.

Hasta el momento se desconocen los posibles mecanismos involucrados en los efectos extrapulmonares del O_3 a nivel del sistema reproductor. Sin embargo, de manera

O₃ son generados a través de los productos de reacción del O₃, siendo estos últimos los que probablemente crucen la barrera sanguínea, y tengan tiempo de vida suficiente para llegar a otros sistemas (Goldstein, 1973; Menzel, 1984; Steingberg, 1990; Pryor, 1992, 1993; Sies, 1993). Este fenómeno se describe como una cascada de productos de reacciones donde el O₃ interactúa con las células blanco, generando productos secundarios más estables que el mismo O₃, como el radical peroxilo, que con una vida media de 7 segundos es capaz de difundir a otro tejidos. A su vez, estos productos secundarios podrían reaccionar con otras células blanco y generar productos terciarios (Pryor, 1992).

En este contexto, Machlin y Bendich (1987) y Nicotera y col. (1988) han determinado que la lipoperoxidación produce una pérdida en la fluidez de la membrana, y de la alineación del receptor y la lisis celular, asociado con un incremento en la concentración de Ca²⁺ intracelular. Así también Kimura y col. (1992) han determinado que la lipoperoxidación participa de manera importante en el incremento de Ca²⁺ intracelular, después de un tratamiento con peróxido de hidrógeno en las células endoteliales cardíacas. Por lo anterior, si se asume que la exposición aguda a 3.0 ppm de O₃ (1 h) genera la lipoperoxidación de las membranas celulares y por ende la producción de radicales libres que se difunden lejos del sitio de generación inicial y actúan en otras células blanco y migren a otros sistemas, en este caso al sistema reproductor, sería posible que se modificara la concentración de Ca²⁺ intracelular, el cual está íntimamente involucrado en la modulación del mecanismo excitación-contracción del músculo liso uterino y, por lo tanto, que se modifique la contracción inducida por OT y ACh del útero de rata a los 5 y 10 días de gestación, resultados obtenidos en este trabajo.

Existen algunos estudios que apoyan esta posibilidad. Se ha demostrado que las moléculas altamente oxidantes como el peróxido de hidrógeno son capaces de provocar contracción del músculo liso de las vías aéreas del cobayo (Barnes y Rhoden, 1987), y que la administración de superóxido dismutasa previene parcialmente el desarrollo de hiperreactividad de las vías aéreas inducida por O₃ (2 ppm, 2 h) y por reto antigénico

(Takahashi y col. 1993; Ikuta y col. 1992).

Un aspecto interesante que se observó en el presente estudio fue que este efecto potenciador del O_3 en la contracción uterina a OT y ACh desapareció en la etapa tardía de la gestación (18 días). Una explicación probable es que en las etapas finales del embarazo exista un mecanismo antioxidante que proteja al útero de los efectos indirectos del O_3 . Debido a la ausencia de trabajos efectuados en la rata sobre este aspecto, es necesario considerar estudios previos en el humano. Walsh (1994) y Uotila y col. (1991) determinaron que los niveles de lipoperóxidos circulantes producidos en la placenta humana se incrementan conforme avanza el estado gestacional (Hubel y col. 1989; Uotila y col. 1991; Walsh, 1994). Este incremento de lipoperóxidos placentarios se produce por un aumento de radicales de oxígeno generados durante la producción de tromboxanos y la producción intrínseca de radicales libres de la placenta (Wang y col. 1991b). Walsh (1994) describió que en el embarazo normal humano este aumento de lipoperóxidos se ve acompañado de un incremento del nivel de antioxidantes tales como la vitamina E, lo que podría ayudar a contrarrestar sus acciones tóxicas. De este modo, durante la gestación existe un aumento progresivo de la relación vitamina E/lipoperóxidos en la sangre materna, debido fundamentalmente a una elevación de los niveles de vitamina E (Hubel y col. 1989; Wang y col. 1991a; Uotila y col. 1991). Otros estudios en mujeres han demostrado que también la actividad enzimática de la glutatión-peroxidasa (GSH-Px) sérica, otro importante factor antioxidante, se incrementa conforme avanza el estado gestacional (Uotila y col. 1991). Con respecto al presente estudio, si estos mecanismos antioxidantes existen y se incrementan progresivamente durante la gestación en la rata, entonces la generación de radicales libres producidos por la exposición a O_3 podría estar disminuida en las etapas finales de la gestación (18 días). Esto explicaría la falta de efecto del O_3 en esta etapa tardía de la gestación, a diferencia de la etapas inicial (5 días) e intermedia (10 días) donde la falta de este mecanismo antioxidante permitiría la expresión de un efecto potenciador del O_3 sobre las respuestas a OT y ACh.

Otro factor que se incrementa progresivamente durante la gestación son los estrógenos (Oakey, 1983; Parkington y Coleman, 1990). Kuhl (1993) propuso que los estrógenos, debido a la presencia de su anillo fenólico, participan como atrapadores de radicales libres que contrarrestan el efecto de la lipoperoxidación durante la gestación. Por lo tanto, este incremento en el nivel de estrógenos podría constituir otro probable mecanismo antioxidante que permite explicar la ausencia de diferencias en la sensibilidad y respuesta máxima del útero de rata con gestación tardía (18 días). Además, debido a que para homogeneizar el ciclo estral en el grupo de ratas no gestantes se les administró una dosis alta (10 µg/kg) de 3 benzoato 17 β-estradiol, la presencia de esta hormona podría explicar también la ausencia de efecto del O₃ en este grupo. Esta misma propuesta podría explicar la falta de efecto del O₃ en las regiones mesometrial y antimesometrial de la rata no gestante.

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos permiten, para las condiciones experimentales empleadas, establecer las siguientes conclusiones:

1. La exposición previa a O_3 (3 ppm por 1 h, 18 h antes del estudio) tuvo los siguientes efectos:

1a. No modificó las respuestas a OT y ACh del útero de rata no gestante.

1b. Incrementó las respuestas máximas a la OT en el útero de rata con 5 días de gestación, evaluadas como área bajo la curva, amplitud y frecuencia de la contracción.

1c. Incrementó la respuesta máxima a la ACh, evaluada como área bajo la curva, en el útero de rata con 5 y 10 días de gestación.

1d. No modificó la CE_{50} de la OT y ACh en ninguna de las etapas de la gestación (5, 10 y 18 días).

2. En comparación con el útero de rata no gestante, durante la gestación se observó lo siguiente:

2a. Un decremento de la máxima frecuencia de contracción inducida por ACh en el útero de rata a los 5, 10 y 18 días de gestación.

2b. A los 10 días de gestación existió una mayor sensibilidad del útero a la OT, evaluada como la CE_{50} del área bajo la curva, y un aumento en las respuestas máximas del área y la frecuencia de contracción a este agonista.

2c. A los 18 días de gestación hubo un incremento de la CE_{50} y de la respuesta máxima a la ACh, evaluadas como área bajo la curva.

3. Al comparar las regiones mesometrial y antimesometrial del útero de la rata se encontró:

3a. La región antimesometrial tuvo una mayor frecuencia máxima de contracción inducida por OT.

3b. En ambas regiones, la exposición previa a O_3 no modificó las respuestas a O_2 y ACh.

4. Probablemente cada uno de los parámetros estudiados (área bajo la curva, amplitud y frecuencia de la contracción), brinda información diferente sobre aspectos de la respuesta uterina, por lo que su uso en estudios experimentales debería generalizarse.

REFERENCIAS

- Adham N. y Schenk E. 1969. Autonomic innervation of the rat vagina, cervix and uterus and its cyclic variation. *Am. J. Obstet Gynec.* 104:508-516
- Alexandrova M. y Soloff M. 1980. Oxytocin receptors and parturition. I. Control of oxytocin receptor concentration in the rat myometrium at term. 106:730-738.
- Arito H. Uchiyama, I. Arakawa H. y Yokoyama E. 1990. Ozone-induced bradycardia and arrhythmia and their relation to sleep-wakefulness in rats. *Toxicol. Lett.* 52:169-178.
- Arito H., Uchiyama I. y Yokoyama E. 1992. Acute effects of ozone on EEG activity, sleep-wakefulness and heart rate in rats. *Industrial Health.* 30:23-34.
- Banks W. J. 1986. *Histología veterinaria aplicada. Manual Moderno. México.* 730 pp.
- Barnes P. J. y Rhoden K. J. 1987. The effect of oxygen-derived free radicals on airway smooth muscle responses. *Br. J. Pharmacol.* 90:142P.
- Basset D. J., Bowen-Kelly E., Elbon C. L. y Reichenbaug S. S. 1988a. Rat lung recovery from 3 days of continuous to 0.75 ppm ozone. *J. Toxicol. Environ. Health.* 25:329-347.
- Basset D. J., Bowen-Kelly E., Brewster E. L., Elbon C. L., Reichenbaug S. S., Buntun T. and Kerr J. S. 1988b. A reversible model of acute lung injury based on ozone exposure. *Lung.* 166:355-369.
- Berridge M. J. 1987. Inositoltrisphosphate and diacylglycerol: two interacting second messengers. *Ann. Rev. Biochem.* 56:159-193. 1987.
- Bhalla D. K., Mannix R. C., Kleinman M. T. y Crocker T. T. 1986. Relative permeability of nasal, tracheal and bronchoalveolar mucosa to macromolecules in rats exposed to ozone. *J. Toxicol. Environ. Health.* 17:269-283.

Bhalla D. K., Rasmussen R. E. y Daniels D. S. 1993. Adhesion and motility of polymorphonuclear leukocytes isolated from blood of rats exposed to ozone: Potential biomarkers of toxicity. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 123 (2):177-186.

Bloom W. D. y Fawcett D. W. 1987. A textbook of histology. W.B. Saunders Co. London. 1033 pp.

Bolton T. B. 1979. Mechanisms of the action transmitters and the other substances on smooth muscle. *Physiol. Rev.* 59 (3):606-718.

Borda E. Sterin-Borda L. Sterin-Speziale N., Gimeno M. y Gimeno A. L. 1978. Functional pharmacological and morphological characteristics of two regions of rat uterine horns. *Acta Physiol. Latinoam.* 28:223-233.

Braaksma J. T., Veth A. F., Eskes T. K. y Stolte L. A. 1973. Digital evaluation of uterine contraction records. *Uterine contraction. Side effects of steroidal contraceptives.* (Josimovich J. B. ed.). 171-178 pp. John Wiley y Sons. New York.

Buckley R. D., Hackney J. D., Clarck K. y Posin C. 1975. Ozone and human blood. *Arch. Environ. Health* 30: 40-43.

Bygdeman M. y Wiqvist N. 1973. The relation between prostaglandin and oxytocin action on the pregnant myometrium. In: *Uterine contraction. Side effects of steroidal contraceptives.* (Josimovich J. B. ed.). 171-178 pp. John Wiley y Sons. New York.

Campbell P. S., Newman G. A., Loveless G. C., Wilson H. J. y Eley M. H. 1980. Differential uterine responsivity to diethylstilbestrol: apparent bases for contrasting estrogenic potency. *Biology of Reproduction.* 23:78-87. 1980.

Campos M. G., Segura P., Vargas M. H., Vanda B., Ponce-Monter H., Selman M. y Montañó L. M. 1992. O₃-induced airway hyperresponsiveness to noncholinergic system and other stimuli. *J. Appl. Physiol.* 73 (1):1-8.

Campos M. G., Oropeza M. V. Perusquía M., Quiroz S. C., Ponce Monter H. 1995. Different sensitivity to serotonin of mesometrial and antimesometrial regions of isolated rat uterus. *Medical Science Research*. (en prensa).

Canada A. T. , Chow C. K. Airriess G. R., Calabrese E. J. 1987. Lack Of ozone effect on plasma concentrations of retinol, ascorbic acid and tocopherol. *Nutr. Res.* 7:797-800.

Carsten M. E. y Miller J. D. 1987. A new look at uterine muscle contraction. *Am. J. Obstet Gynecol.* 157:1303-1315.

Carsten M. E. y Miller J. D. 1990. Calcium control mechanisms in the myometrial cell and the role of the phosphoinositide cycle. Carsten y Miller (ed.). In: *Uterine function. Molecular and cellular aspects.* Plenum Press. . 121-167 pp

Chow C. K. 1983. Influence of dietary vitamin E on susceptibility to ozone exposure. In: *Biomedical effects of ozone and photochemical oxidants.* Lee S., Mustafa M. and Melhman M. (eds.). Princeton Scientific. Princeton, N. J. 75-93 pp.

Chow C. K. y Teppel A. L. 1972. An enzymatic protective mechanism against lipid peroxidation damage to lungs of ozone-exposed rats. *Lipids.* 7:518-524.

Chow C. K. , Plopper C. G. Chiu M., y Dungworth D. L. 1981. Dietary vitamin E and pulmonary biochemical and morphological alterations of rats exposed to 0.1 ppm ozone. *Environ. Res.* 24:315-324.

Ciuffi M., Gentilini G., Franchi-Micheli S., y Zilletti L. 1991. Lipid peroxidation induced "in vivo" by iron-carbohydrate complex in the rat brain cortex. *Neurochem. Res.* 16 (1):43-49.

Clemons G. K. y García J. F. 1980 a. Endocrine aspects of ozone exposure in rats. *Arch. Toxicol. Suppl.* 4:301-304.

- Clemons G. K. y García J. F. 1980 b. Changes in thyroid function after short-term ozone exposure in rats. *J. Environ. Pathol. Toxicol.* 4:359-369.
- Crankshaw D. J. 1986. The sensitivity of the longitudinal and circular layers of the rat's myometrium to oxytocin in vitro during pregnancy. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 65:773-777.
- Cross C. E., Motchnik P. A., Bruener B. A., Jones D. A. Kaur H., Ames B. N. y Halliwell B. 1992. Oxidative damage to plasma constituents by ozone. *FEBS.* 298 (2,3):269-272.
- Cueto R., Squadrito G. L., Bermudez E. y Pryor W. A. 1992. Identification of heptanal and nonanal in bronchoalveolar lavage from rats exposed to low levels of ozone. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 188 (1): 129-134.
- Currie W. B. Fisiología del útero. 1980 In: *Obstetrics and Gynecology.* Fuchs A. y Fuchs F (eds.). 1973. Possible mechanisms of the inhibition of labor by ethanol.
- Daels J. 1974. Uterine contractility patterns of outer and inner zone of the myometrium. *J. Obstet Gynecol.* 44 (3):315-326.
- Del Maestro R. y McDonald W. 1987. Distribution of superoxide dismutase, glutathione peroxidase and catalase in developing rat brain. *Mechanisms of ageing and developmental.* 41:28-38.
- Delmann H. D. y Brown E. M. 1976. *Histología Veterinaria.* Ed. Acribia. España. 529 pp.
- el Alj A., Winer N., Lallaoui H., Delensorne R., Ferre F. y Germain G. 1993. Progesterone and mifepristone modify principally the responses of circular myometrium to oxytocin in preparturient rats: comparison with responses to acetylcholine and to calcium. *J. Pharmacol. Exp. Therapeutics.* 265 (3): 1205-1212.
- Fairchild E. J. Murphy S. D., Stockinger H, E. 1959. Protection by sulfur compounds against the air pollutants ozone and nitrogen dioxide. *Science.* 130:861-862.

- Folinsbee L. J., Bedi J. y Horvath S. 1980. Respiratory responses in humans repeatedly exposed to low concentrations of ozone. *Am. Rev. Respir. Dis.* 121:431-439.
- Freeman B. A. y Mudd J. B. 1981. Reaction of ozone with sulfhydryls of human erythrocytes. *Arch. Biochem. Biophys.* 208:212-220.
- Fu X., Rezapour M., Löfgren M., Ulmsten U. y Bäckström T. 1993. Antitachyphylactic effects of progesterone and oxytocin on tern human myometrial contractile activity in vitro. *Obstet. Gynecol.* 82:532-538.
- Fuchs A. R. 1983. The role of oxytocin in parturition. In: Current topics in Experimental Endocrinology. The endocrinology of pregnancy and parturition. Martin L. y James V. H. (eds). Academic Press. 231-265 pp.
- Fuchs A., Periyasamy S., Alexandrova M. y Soloff M. 1983. Correlation between oxytocin receptor concentration and responsiveness to oxytocin in pregnant rat myometrium: effects of ovarian steroids. *Endocrinology.* 113:742-748.
- Gibbons A. F. y Chang M. C. 1972. Number of mast cells in the rat uterus with special reference to its relation to hormonal treatment and decidual response. *Biol. Reprod.* 6:193-203.
- Goldstein B. J. 1973. Hydrogen peroxide in erythrocytes. *Arch. Environ. Health* . 26:279-280.
- Goldstein B. D., Pearson B. Lodi C. Buckley R. D., Balchum O. J. 1968. The effect of ozone on mouse blood in vivo. *Arch. Environ. Health.* 16:648-650.
- Goldstein B. D., Lodi C- Collkindon C. y Balchum O. J. 1969. Ozone and Lipid peroxidation. *Arch. Environ. Health.* 18: 631-635.
- Goldstein B. D., Buckley R. D., Cardenas R. y Balchum O. J. 1970. Ozone and vitamin E. *Science.* 169:605.

Goldstein B. D., Lai L. Y., Cuzzi-Spada R. 1974. Potentiation of complement-dependent membrane damage by ozone. *Arch. Environ. Health*. 28:40-42

Gordon T., Taylor B. F. y Amdur M. O. 1981. Ozone inhibition of tissue cholinesterase in guinea pigs. *Arch. Environ. Health*. 36:284-288.

Gorski J. y Nelson N. J. 1965. Ribonucleic acid synthesis in the rat uterus y its early response to estrogen. *Arch. Biochem. Biophys*. 110:284.

Graham J. A., Menzel D. A., Miller F. J., Illing J. W. y Gardner D. E. 1981. Influence of ozone on pentobarbital-induced sleeping time in mice, rats, y hamsters. *Toxicol. Appl. Pharmacol*. 61:64-73.

Gunnison A. F., Finkelstein I., Weideman P. A. Wei-Yi Su, Sobo M., Schlesinger, R. B. 1990. Age-dependent effect of ozone on pulmonary eicosanoid metabolism in rabbits y rats. *Fundam. Appl. Toxicol*. 15:779-790.

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

Gutteridge J. M. y Halliwell. 1990. The measurement and mechanism of lipid peroxidation in biological systems. *TIBS*. 15: 129-135.

Haro R. y Paz C. 1993. Effects of ozone exposure during pregnancy on ontogeny of sleep in rats. *Neurosci. Lett*. 164:67-70

Hazucha, M. J. 1987. Relationship between ozone exposure and pulmonary function changes. *J. Appl. Physiol*. 62:1671-1680.

Hicks J. J., Guzmán-Grenfell M. A. y Medina-Santillán R. 1991. Los radicales libre en el daño tisular. I. En la inflamación. *Rev. Mex. Reumat*. 6:225-229.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

- Hore T. y Gibson D. E. 1968. Ozone exposure and intelligence tests. *Arch. Environ. Health*. 17:77-79.
- Hubel C. A., Roberts J. M., Taylor R. N., Musci T. J., Rogers G. M. y McLaughlin M. K. 1989. Lipid peroxidation in pregnancy: new perspectives on preeclamsia. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 161:1025-1034.
- Hueter F. G. y Fritzhand M. 1971. Oxidants and lung biochemistry. *Arch. Intern. Med.* 128:48-53.
- Ikuta N., Sugiyama S., Takagi K., Satake T. y Ozawa T. 1992. Implication of oxygen radicals on airway hyperresponsiveness after ovalbumina challenge in guinea pigs. *Am. Rev. Respir. Dis.* 145: 561-565.
- Jarjour N. N. y Calhoun W. J. 1994. Enhanced production of oxygen radicals in asthma. *J. Lab. Clin. Med.* 123 (1): 131-136.
- Jones R. R. 1992. Ozone depletion and outs effects on human populations. *British J. Dermatology*. 127 (Suppl. 41):2-6.
- Kavlock R. Daston G. y Grabowski C. T. 1979. Studies on the developmental toxicity of ozone. I. Prenatal effects. *Toxicol. App. Pharmacol.* 48:19-28
- Kavlock R. J., Meyer y Grabowski C. T. 1980. Studies on the developmental toxicity ozone: Postnatal effects. *Toxicol. Lett.* 5:3-9.
- Kimura M., Maeda K. y Hayashi S. 1992. Cytosolic calcium increase in coronary endothelial cells after H₂O₂ exposure and the inhibitory effect of U7851F. *Br. J. Pharmacol.* 107:488-493.
- Koren H. S. Devlin R. B., Graham D. E. Mann R., McGee M. P. Horstman D. H., Kozumbo W. J., Becker S. House D. E., McDonnell W. F. y Bromberg P. A. 1989. Ozone-induced inflammation in the lower airways of human subjets. *Am. Rev. Respir. Dis.* 139:

407-415.

Korenman S. G. y Krall J. F. 1977. The role of cyclic AMP in the regulation of Smooth Muscle cell contraction in the uterus. *Biol. Reprod.* 16:1-17.

Kuhl H. 1993. Beyond hormonal action: are oestrogens effective free radical scavengers? *Maturitas.* 18:5-8.

Kuriyama H. y Susuki H. 1976. Effects of prostaglandin E2 and oxytocin on the electrical activity of hormone-treated pregnant rat myometria. *J. Physiol.* 260:335-349.

Lai C. C., Finlayson-Pitts y Willis W. V. 1990. Formation of secondary ozonides from the reaction of an unsaturated phosphatidylcholine with ozone. *Chem Res. Toxicol.* 3 (6):517-523.

Lanman J. T. 1977. Parturition on nonhuman primates. *Biology of Reproduction.* 16:28-38.

Lippmann M. 1989. Health effects of ozone: a critical review. *JAPCA* 39:671-695.

Lippmann M. 1993. Health effects of tropospheric ozone: review of recent research findings and their implications to ambient air quality standars. *J. Exposure Anal. Environ. Epidemiol.* 3:103-129.

Machlin L. J. y Bendich A. 1987. Free radical tissue damage: protective role of antioxidants nutrients. *FASEB J.*1:441-445.

Madeiras Y. S. y Calixto J. B. 1989. Effect of induced thyroid dysfunction upon uterine responsiveness in strip from pregnant and nonpregnant rats. *Pharmacology.* 38:235-242.

Mehlman M. A. y Borek C. 1987. Toxicity and biochemical mechanisms of ozone. *Environ. Res.* 41:36-53.

Menzel D. B. 1970. Toxicity of ozone, oxygen and radiation. *Ann. Rev. Pharmacol.* 10:379-394.

Menzel D. B. 1984. Ozone: an overview of its toxicity in man and animals. *J. Toxicol Environ. Health.* 13: 183-203. In: *Fundamentals of extrapolation modeling of inhaled toxicants: ozone and nitrogen dioxide* (F. J. Miller y D. B. Menzel, Eds). pp. 183-204. Hemisphere, New York.

Menzel D. B. y Wolpert R. L. 1989. Is there a threshold for human health risk from ozone? In: *Atmospheric ozone research and its policy implications.* (T. Schneider y col. eds.) Elsevier Science Pub. Amsterdam. 331-342 pp.

Miller P. D., Ainsworth D., Lam H. F., y Amdur M. O. 1987. Effect of ozone exposure on lung functions and plasma prostaglandin and tromboxane concentration in guinea pigs. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 88:132-140.

Moawad A. H. 1973. The sympathetic nervous system and the uterus. In: *Uterine Contraction. Side effects of steroidal contraceptives.* J. B. Josimovich (ed.) John Wiley & Sons. New York. 65-82 pp.

Montaño L. M., Jones G. L., O'Byrne P. M. and E. E. Daniel. 1993. Effect of ozone exposure on response of bronchial rings *in vitro*: role of intracellular Ca^{2+} . *J. Appl. Physiol.*

Mudd J. B. y Freeman B. A. 1977, Reaction of ozone with biological membranes. In: Lee S. D. (ed.) *Biochemical effects of environmental pollutants.* Ann Arbor Science Pub. Inc. pp 97-133.

Mustafa M. G., Elsayed N. M., Graham J. A. Gardner D. E. 1983. Effects of ozone exposure conditions. In: Lee S. D. Mustafa M. G., Melhman M. (eds.) *International symposium on the biomedical effects of ozone and related photochemical oxidants.* Princeton Scientific Pub. Inc. pp 57-73.

National Research Council 1977. Toxicology. In: *Ozone and other photochemical*

oxidants. Washington, D. C. National Academy Sciences, Committee on Medical and Biologic Effects of Environmental Pollutans. p 323-387.

Nesheim B. I. 1975. Action of beta-adrenoceptor antagonists on the response to isoprenaline in the oestrogen dominated rabbit uterus. *Br. J. Pharmacol.* 53:393-401.

Nicotera P., McConkey D. J. Svensson S. A., Bellomo G. and Orrenius S. 1988. Correlation between cytosolic Ca^{2+} concentration and cytotoxicity in hepatocytes exposed to oxidative stress. *Toxicology.* 52: 55-63.

Oakey R. E. 1983. Estrogen and progesterone production in human pregnancy. In: Currents topics in experimental endocrinology. Endocrinology of pregnancy and parturition. Martin L. y James V. H. (eds). 194-229 pp.

Ottesen B. y J. Fahrenkrug. 1990. Regulatory peptides and uterine function. In: Uterine function. Molecular and cellular aspects. Carsten M. y Miller J. (eds.). 393-422 pp.

Parkington H. C. y Coleman H. C. 1990. The role of membrane potential in the control of uterine motility. In: Uterine function. Molecular and cellular aspects. Carsten M. y Miller J. (eds.). 195-248 pp.

Paz C. y Bazán-Perkins B. 1992. Sleep-wake disorganization in cats exposed to ozone. *Neurosci. Lett.* 140:270-272.

Plopper C. G., Dungworth D., Tyler W. y Chow C. 1979. Pulmonary alterations in rats exposed to 0.2 and 0.1 ppm ozone: a correlated morphological y biochemical study. *Arch. Environ. Health.* 34:390-395.

Pryor W. A. 1991. Can vitamin E protect humans against the pathological effects of ozone in smog? *Am. J. Clin. Nutr.* 53:702-722.

Pryor W. A. 1992. How far does ozone penetrate into the pulmonary air/tissue boundary

before it reacts? *Free Radical Biol. & Med.* 12:83-88.

Pryor W. A. 1993. Ozone in all its reactive splendor. *J. Lab. Clin Med.* 122:483-486.

Pryor W. A., Dooley M. M. y Church D. F. 1983. Mechanisms for the reaction of ozone with biological molecules, the source of the toxic effects of ozone. In: Lee S. D., Mustafa M. G., Mehلمان M. D. (eds.). International symposium of the biomedical effects of ozone and photochemical oxidants. Princeton Scientific Pub. Inc. pp 7-19.

Pryor W. A., Das B. y Church D. F. 1991. The ozonation of unsaturated fatty acids: aldehydes and hydrogen peroxide as products and possible mediators of ozone toxicity. *Chem. Res. Toxicol.* 4:341-348.

Pryor W. A., Wang K. y Bermúdez E. 1992. Cholesterol ozonation as biomarkers for ozone exposure in rats. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 188 (2): 618-623.

Roehm J., Hadley J. G. y Menzel D. B. 1971. Antioxidants vs lung disease. *Arch. Intern. Med.* 129:88-93.

Ross B. K., Hlastala M. P. y Frank R. 1979. Lack of ozone effects on oxygen hemoglobin affinity. *Arch. Environ. Health.* May/June 161-162.

Ruzycky A. L., Crankshaw D. J. y Triggle D. J. 1987. Ca²⁺ channel ligand activities in uterine smooth muscle: influence of hormonal status. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 65:2085-2092.

Santrock J., Gorski R. A., O'Gara J. F. 1992. Products and mechanism of the reaction of ozone with phospholipids in unilamellar phospholipid vesicles. *Chem. Res. Toxicol.* 5: 134-141.

Sies H. 1993. Strategies of antioxidant defense. *Eur. J. Biochem.* 215:213-219.

Skillen R. G., Thienes C. H., Cangelosi J. y L- Strain. 1981. Brain 5-Hydroxytryptamine in ozone exposed rats. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 108:121-122.

Somlyo A. V. y Somlyo A. P. 1968. Electromechanical and pharmacomechanical coupling in vascular smooth muscle. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 159:129-145.

Steingberg J.J., Gleeson J. L. y Gil D. 1990. The pathobiology of ozone-induced damage. *Arch. Environ. Health.* 45:80-87.

Sterin-Speziale N. Gimeno M., Borda E., Chaud M. y Gimeno A. 1981. A different contractile response to catecholamine of two regions (mesometrial y antimesometrial) of isolated rat uterine horns. *Pharmacol. Res. Comm.* 13:401-410.

Stockinger H. E. 1965. Ozone toxicology: a review of research and industrial experiences:1954-1964. *Arch Environ. Health.* 10:719-731.

Takahashi Y., Miura T., Kimura S. 1990. A decrease in serum retinol by in vivo exposures of rats to ozone. *Int. J. Vitam. Nutr. Res.* 60:294-295.

Takahashi Y., Miura T., Katsumata M., Ichinose K., Kimura K., Inoue H., Takishama T. y Shirato K. 1993. Involvement of superoxide in ozone-induced airway hyperresponsiveness in anesthetized cat. *Am. Rev. Respir. Dis.* 148: 103-106.

Tchernitchin A. N. y Galand P. 1981. Some uterine estrogenic responses depend on systematic, no local, estrogen levels. *Biol. Reprod.* 24 Suppl., 148 A.

Tchernitchin A. N., Mena M. A., Soto J. y Unda C. 1989. The role of eosinophils in the action of estrogens and other hormones. *Med. Sci. Res.* 5-10

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

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

Tepper J. S., Wiester M. J., Weber M. F., Fitzgerald S., Costa D. L. 1990. Measurements of cardiopulmonary response in awake rats during acute exposure to near-ambient

concentrations of ozone. *Fundam. Appl. Toxicol.* 10:7-15.

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

Uchiyama I. Simomura Y. y Yokoyama E. 1986. Effects of acute exposure to ozone on heart rate and blood pressure of the conscious rat. *Environ. Res.* 41:529-537.

Uchiyama I. y Yokoyama E. 1989. Effects of short- and long-term exposure to ozone on heart rate y blood pressure to emphysematous rats. *Environ. Res.* 48:76-86.

Umezu T., Miura T. y Tsubone H. 1994. Development of tolerance against ozone effects on drinking and eating behaviors in rats by intermittent exposures. *Inhalation Toxicol.*:6:289-302.

Uotila J., Tuimala R., Aarnio T., Pyykk K. y Ahotupa M. 1991. Lipid peroxidation products, selenium-dependent glutathione peroxidase and vitamin E in normal pregnancy. *Eur. J. Obstet. Ginecol Reprod. Biol.* 42:95-100.

U. S. Environmental Protection Agency. 1978. Air quality criteria for ozone and other photochemical oxidants. Research Triangle Park, NC. Office of Health and Environmental Assessment, Environmental Criteria y Assessment Office.

U. S. Environmental Protection Agency. 1986. Air quality criteria for ozone and other photochemical oxidants. Research Triangle Park, NC. Office of Health and Environmental Assessment, Environmental Criteria y Assessment Office.

U. S. Environmental Protection Agency. 1993. Air quality criteria for ozone and related photochemical oxidants. Research Triangle Park, NC. Office of Health y Environmental Assessment, Environmental Criteria and Assessment Office.

Van Aeker S. A., Koymans L. M. y Bast A. 1993. Molecular pharmacology of vitamin E: structural aspects of oxidant activity. *Free Radic. Biol. Med.* 15:311-328.

Vaquero C. J. 1982. Fundamentos de Histología. Interamericana. México. 431 pp.

Veninga T. S. 1967. Toxicity of ozone in comparison with ionizing radiation. *Strahlentherapie*. 134:469-477.

Veninga T. S. y Fidler V. 1986. Ozone-induced elevation of creatine kinase activity in blood plasma of rats. *Environ. Res.* 41:168-173.

Vesely D. L. Giordano A. T., Raska-Emery P. y Montgomery M. R. 1994. Ozone increases amino- and carboxyl-terminal atrial natriuretic factor prohormone peptides in lung, heart, and circulation. *J. Biochem. Toxicol.* 9 (2):107-112.

Wallenstein S., Zucker C. L. y Fleiss J. L. 1980. Some statistical methods useful in circulation research. *Cir. Res.* 47: 1-9.

Walsh S. W. 1994. Lipid peroxidation in pregnancy. *Hypertension in Pregnancy* 13 (1): 1-32.

Wang Y., Walsh S. W., Guo J. y Zhang J. 1991a. Maternal levels of prostacyclin, thromboxane, vitamin E, and lipid peroxides through normal pregnancy. *Am. J. Obstet Gynecol.* 165:1690-1694.

Wang Y., Walsh S. W., Guo J. y Zhang J. 1991b. The imbalance between thromboxane and prostacyclin in preeclampsia is associated with imbalance between lipid peroxides and vitamin E in maternal blood. *Am. J. Obstet Gynecol.* 165:1695-1700.

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

Wilson J. D. 1963. The nature of the RNA response to estradiol administration by the uterus of the rat. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 50:93.

Winkhofer-Roob B. M. 1994. Oxygen free radicals and antioxidants in cystic fibrosis: the concept of oxidant-antioxidant imbalance. *Acta Paediatr. Suppl.* 395:49-57.

Wray S. 1993. Uterine contraction and physiological mechanisms of modulation. *Am J. Physiol.* 264 (*Cell Physiol.* 33): C1-C18.

Wright E. S., Dziedic D. y Wheeler C. S. 1990. Cellular, biochemical and functional effects of ozone: New research and perspectives on ozone healths effects. *Toxicol. Lett.* 51: 125-145.

Yokoyama E., Uchiyama I. y Arito H. 1989. Extrapulmonary effects of low level ozone exposure. In: *Atmospheric Ozone Research and its policy implications*. T. Schneider y col. (Eds). Elsevier Science Pub. Amsterdam. 301-309 pp.