

01965

4
zey



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE PSICOLOGIA
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

Efecto de la exposición al ozono sobre las
concentraciones de monoaminas cerebrales
en el puente, mesencéfalo y cuerpo
estriado de la rata adulta.

T E S I S

Que para obtener el Grado de
MAESTRO EN PSICOBIOLOGIA

P r e s e n t a

Biol. Rigoberto González Piña

Jurado:

- Dr. Carlos Paz Tres
- Mtro. Alfonso Salgado Benítez
- Dr. David Velázquez Martínez
- Mtra. Consuelo Arce Ortiz
- Dr. Salvador Huitrón Reséndiz

Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía.
Unidad de Investigaciones Cerebrales
Departamento de Neurofisiología

México, D. F.

1995.

FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

AGRADECIMIENTOS

A la Facultad de Psicología de la Universidad Nacional Autónoma de México por darme la oportunidad de cursar el posgrado en sus aulas.

Agradezco al Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía "Manuel Velasco Suárez", en particular a la Subdirección de Investigación, por la infraestructura facilitada y sin la cual no podría haberse desarrollado este trabajo.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por su apoyo económico durante mis estudios de Maestría.

A mis sinodales:

Dr. Carlos Paz Tres

Mtro. Alfonso Salgado Benítez

Dr. David Velázquez Martínez

Mtra. Consuelo Arce Ortiz

Dr. Salvador Huitrón Reséndiz

Por el tiempo y aportaciones que dedicaron en la revisión de este trabajo.

A Reyes y a Mago, quienes me impulsaron y dieron ánimo para seguir adelante con mis proyectos desde los primeros años de mi vida.

A mis hermanos Gonzalo, Miguel, Claudia, Oscar y, por supuesto, a José Antonio

Dedico también este trabajo como un sencillo homenaje a Mary, por hacer feliz mi infancia; al señor Bulmaro, por mostrarme el camino de la ciencia y a aquel amigo que hace poco se fué, por brindarme su compañía durante toda su vida.

A mis compañeros de trabajo y amigos del Departamento de Neurofisiología y de la Facultad de Psicología: Alfonso e Ilián, Paco, Carlos y Susy, Chava, Eric, Reyes y Susana, Adrián, Don Alfonso, al Profesor Salgado y a Miguel Angel y Marisela.

**A mi compañera Carmen, por acompañarme en las buenas y en las malas,
pero sobre todo por su amor incondicional.**

INDICE

I. RESUMEN	1
II. INTRODUCCION	3
EFFECTOS DEL OZONO SOBRE EL ORGANISMO	3
CARACTERISTICAS FISICOQUIMICAS DEL OZONO.	6
MECANISMOS DE ACCION DE LA TOXICIDAD DEL OZONO	8
MONOAMINAS	10
1. DOPAMINA	10
a. Síntesis	10
b. Sistemas dopaminérgicos	11
c. Importancia psicofisiológica	12
2. NORADRENALINA	13
a. Síntesis	13
b. Sistemas noradrenérgicos	16
c. Importancia psicofisiológica	17

3. SEROTONINA	17
a. Síntesis	17
b. Sistemas serotoninérgicos	20
c. Importancia psicofisiológica	23
NEUROTOXICOLOGIA GENERAL DE LAS MONOAMINAS	25
SUSCEPTIBILIDAD DEL CEREBRO A LA PEROXIDACION	27
III. HIPOTESIS	29
IV. OBJETIVOS	30
V. MATERIALES Y METODO	31
VI. RESULTADOS	34
VII. DISCUSION	40
a. Implicaciones bioquímicas	40
b. Posibles implicaciones psicofisiológicas	43
VIII. CONCLUSIONES	50
IX. REFERENCIAS	51

I. RESUMEN.

Se sabe que el ozono es el contaminante más distribuido en las zonas urbanas con alta polución ambiental y se conoce muy poco acerca de los efectos que la exposición a éste provoca sobre la población humana. La inhalación de ozono provoca alteraciones en los estados de sueño en gatos y ratas expuestos a concentraciones entre 0.5 y 1.2 ppm. Además se ha reportado que los animales expuestos a 0.35, 1.5 y 6.0 ppm por lo menos 24 horas presentan alteraciones en el contenido cerebral de los neurotransmisores que se han relacionado con el control del sueño, el objetivo de este trabajo fue estudiar los cambios en los niveles cerebrales de dopamina, noradrenalina, serotonina y de sus metabolitos DOPAC, HVA y 5-HIAA, después de la exposición durante diferentes periodos de tiempo a 1 ppm de ozono. Para esto se utilizó un diseño de bloques completamente aleatorizados de un factor, que consistió de cuatro grupos sin repetición: grupo control, compuesto de animales expuestos a aire libre de contaminantes; grupos 1 y 3, consistente de animales expuestos durante 1 y 3 hs, respectivamente a 1 ppm de Ozono y grupos 3+1 y 3+3, constituido por animales expuestos durante 3 horas al ozono más 1 y 3 horas de exposición al aire libre de contaminantes, respectivamente. Inmediatamente después de la exposición, los animales fueron decapitados y se les extrajo el encéfalo, para obtener el puente, el mesencéfalo y el cuerpo estriado. El análisis de las muestras se hizo mediante Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución con Detección Electroquímica. Los resultados obtenidos se analizaron mediante un Análisis de Varianza Simple y cuando se encontraron significativos, se aplicó la prueba de Tukey utilizando los niveles de significancia menores a 0.05. Se encontró que después de la exposición al O_3 , los niveles de DA, NA, 5-HT, y 5-HIAA aumentaron en las tres regiones estudiadas y este aumento fué en proporción al tiempo de exposición, pero no hubo efectos sobre el HVA. No se observó la recuperación de los efectos 1 hora después de cesada la inhalación de O_3 , pero sí después de 3 horas. Estos resultados sugieren que el O_3 afecta desde las

I. RESUMEN.

primeras horas al contenido de monoaminas en el mesencéfalo, cuerpo estriado y en el puente. Esta última estructura esta relacionada con la generación del SP, lo que sugiere que las alteraciones del sueño provocadas por este gas ocurren de forma selectiva sobre este estado de sueño, mientras que las alteraciones del SOL ocurrirían de manera compensatoria. Los resultados también implican que a pesar de que el pico máximo de altos niveles de contaminación ambiental solamente ocurre durante unas horas, los cambios bioquímicos en el encéfalo persisten todavía un tiempo después de la supresión del O₃.

II. INTRODUCCION.**EFFECTOS DEL OZONO SOBRE EL ORGANISMO.**

La investigación acerca de los efectos del Ozono (O₃) sobre el organismo se ha centrado en la evaluación del daño celular y fisiológico del aparato respiratorio. Se ha reportado que la inhalación de O₃ a concentraciones como las medidas en las ciudades con altos niveles de contaminación ambiental provocan displasia y metaplasia en el epitelio cuboidal de la mucosa nasal, así como la inducción de taquipnea, broncoconstricción, tos y dolor de pecho durante la inspiración en sujetos humanos expuestos durante períodos relativamente cortos de tiempo. Estos síntomas han sido atribuidos a la estimulación vagal en las terminales nerviosas de las vías respiratorias (Schelegle y cols., 1993) Experimentalmente, la exposición a 0.8 partes por millón (ppm) durante 3 y 7 días, provoca hiperplasia epitelial y metaplasia en el epitelio cuboidal no ciliado de la mucosa nasal (Hotchkiss y cols., 1991; Hotchkiss y Harkema, 1992) y ante la exposición a 3 ppm durante 2-8 hs se desencadena el desarrollo del edema alveolar progresivo en el pulmón de la rata como consecuencia de las secreciones alteradas de las células productoras del factor surfactante (Balis y cols., 1991).

A diferencia de las vías aéreas, otros sistemas del organismo han sido poco estudiados en relación al posible efecto que el O₃ puede producir en ellos. En el sistema inmunológico, se ha reportado una supresión en la producción de la inmunoglobulina E después de la exposición a 0.8 ppm (Masashi Ozawa y cols., 1985); y cambios en la reacción de hipersensibilidad retardada de ratones expuestos a 0.8 ppm (Fujimaki y cols., 1986). En un estudio en niños alemanes expuestos a la polución ambiental, se encontraron alteraciones en los nódulos linfáticos mandibulares y en los niveles sanguíneos de las células supresoras T8, así como poca síntesis de ARN en los linfocitos e incremento de la quimioluminiscencia de los granulocitos (Beck y Schmidt, 1993).

II. INTRODUCCION.

También se ha reportado que sujetos humanos previamente expuestos al O_3 presentan fatiga, letargia y dolor de cabeza (Hackney y cols., 1975). En el Sistema Nervioso Central de animales expuestos a diferentes concentraciones de O_3 se han encontrado alteraciones en los potenciales evocados cerebrales (Xintaras y cols., 1966), depresión del condicionamiento operante (Weiss y cols., 1981), prolongación del tiempo de sueño en animales anestesiados con pentobarbital (Graham y cols., 1981), así como disminución tanto en la locomoción espontánea (Tepper y cols., 1982) como en la conducta de ingesta de agua (Umezú y cols., 1987).

Se ha propuesto que el O_3 puede provocar un efecto sedante (Binz, 1963). Paz y Bazán-Perkins (1992) estudiaron el efecto de la exposición al O_3 sobre los estados del sueño en gatos expuestos a 0.4, 0.8 y 1.2 ppm y reportaron que el tiempo total del Sueño de Ondas Lentas (SOL) a 0.8 y 1.2 ppm aumentó significativamente, mientras que a 1.2 ppm de O_3 en el Sueño Paradójico (SP) disminuyó tanto el tiempo total como el número de períodos durante las 24 horas que duró el estudio. Por otro lado, el tiempo total y el número de períodos de la Vigilia (V) y del SOL no se vieron modificados significativamente por ninguna de las concentraciones de O_3 administradas. Un análisis más profundo reveló que el SP disminuyó después de 8 horas de exposición a 0.4 y 1.2 ppm, mientras que el SOL aumentó después de 16 horas de exposición en los animales expuestos a 1.2 ppm. De manera simultánea, Arito y cols. (1992) hicieron un estudio en ratas a las que expusieron a 0.5 ppm de O_3 durante 6 horas, 1.0 ppm durante 3 horas y a aire limpio durante 6 horas como un grupo control. Los resultados obtenidos mostraron que la exposición a 1.0 ppm de O_3 provocó la disminución significativa de la potencia de las bandas de alta frecuencia del espectro EEG (8-24 Hz) comparadas con sus respectivos valores controles y se observó un rebote a las 3 horas después de retirar a los animales del ambiente con O_3 . En las ratas expuestas a 0.5 ppm la potencia disminuyó de manera no significativa y ésta tendió a recuperarse durante las últimas horas de exposición al O_3 . De

II. INTRODUCCION.

la misma manera, las cantidades totales de V y de SOL se vieron aumentadas significativamente a 1.0 ppm de O₃, mientras que las del SP disminuyeron. Después de retirar a los animales del ambiente con O₃, se observó un rebote donde las fases retornaron a sus valores normales después de 3 horas de mantener a los animales en aire limpio. El ritmo cardíaco disminuyó en función al tiempo de exposición y aunque hubo una tendencia a la recuperación, éste no regresó a sus niveles normales. Los autores concluyeron que la disminución en la cantidad total de SP pudo deberse a las alteraciones inducidas por el O₃ sobre la actividad de las neuronas noradrenérgicas centrales, considerando que la exposición a 1 ppm de O₃ provoca alteraciones en el metabolismo de las catecolaminas en el perro (Trams y cols., 1972).

En un trabajo reciente, Haro y Paz (1993) estudiaron ratas cuyas madres habían sido expuestas a la concentración de 1 ppm de O₃ durante la gestación. Los animales fueron implantados con electrodos en la corteza sensoriomotora y en los músculos del cuello para el registro polisomnográfico a los 21 días después del nacimiento y registrados a los 30, 60 y 90 días de edad. Los animales del grupo control eran crías de madres que fueron mantenidas con suministro de aire fresco durante la gestación. Estos autores encontraron una disminución significativa del tiempo total del SP con respecto al control y un aumento en el tiempo total de la vigilia, en todas las edades estudiadas. Al estudiar por separado los tiempos totales de las diferentes fases del sueño durante el periodo de luz y de oscuridad, se encontró un aumento de la vigilia durante el primer periodo y una disminución de ésta durante el segundo. Estos resultados sugirieron que la exposición al O₃ durante la gestación puede afectar a los mecanismos generadores del SP y a la regulación del ritmo circadiano en las ratas.

Por otro lado, se ha reportado una disminución significativa en los niveles de serotonina o 5-hidroxitriptamina (5-HT) en todo el cerebro de ratas expuestas a 6 ppm de O₃ durante 4 horas (Skillen y cols., 1961). Un trabajo importante debido a que se estudió

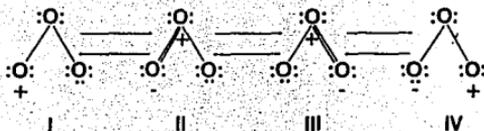
II. INTRODUCCION.

la actividad neurofisiológica y se correlacionó con la neuroquímica cerebral fué el realizado por Huitrón-Reséndiz y cols. (1994) en el cual se utilizaron ratas expuestas a 1.5 ppm de O_3 . En este estudio se confirmó que las cantidades totales de SP y de la vigilia disminuyen, mientras que el del SOL aumenta. En forma conjunta los autores realizaron un análisis bioquímico en distintas regiones del encéfalo, encontraron aumentados los niveles de 5-HT a nivel pontino, mientras que a nivel hipotalámico los encontraron disminuidos. De este trabajo se concluyó que la disminución en la cantidad de SP de las ratas expuestas al O_3 es consecuencia del aumento de la 5-HT a nivel pontino, el cual provoca la inhibición de los núcleos colinérgicos tegmentales pedunculopontinos y tegmentales laterodorsales, responsables de la generación del SP (Steriade, 1992). Por otro lado la disminución de 5-HT en el hipotálamo fué explicada con base en un efecto inhibitorio en los autorreceptores del rafe dorsal provocada por el incremento de este neurotransmisor a nivel pontino, provocando la disminución de 5-HT en el hipotálamo. Lo anterior ya ha sido reportado por otros autores (Marsden and Martin, 1986).

Los datos electroencefalográficos se analizaron hora por hora, encontrándose que la disminución del SP comienza desde la segunda hora de exposición al O_3 en todas las concentraciones empleadas (Huitrón-Reséndiz y cols., 1995). Sin embargo, no se conoce si los niveles de 5-HT o de otras monoaminas también pueden verse afectados desde la primera hora de exposición a este contaminante.

CARACTERISTICAS FISICOQUIMICAS DEL OZONO.

Se ha propuesto que el O_3 o sus productos de reacción provocan la disfunción celular debido a sus características fuertemente oxidantes que son el resultado de su estructura molecular poco estable formada por tres átomos de oxígeno arreglados en cuatro estructuras de resonancia:



La primera y la cuarta, que son las que predominan, están caracterizadas por la presencia de un átomo terminal de oxígeno que posee solamente seis electrones, lo que da como resultado que las reacciones del O_3 sean electrofílicas; esto es, remueve o comparte electrones con otras moléculas o iones. Por definición, entonces, el O_3 es un oxidante, ya que éste término caracteriza a un ión, un átomo o una molécula que es capaz de remover uno ó más electrones de otro ión, átomo o molécula; proceso que se denomina *oxidación*. Un *agente reductor* agrega uno ó más electrones a otro ión, átomo o molécula; proceso que se denomina *reducción*. Las reacciones de oxidación y de reducción ocurren en pares y las reacciones acopladas se conocen como *reacciones redox*. En las reacciones redox, el agente oxidante es reducido y el agente reductor es oxidado. Los dos componentes de tales reacciones redox se conocen como *pares redox*. La capacidad de una especie química para oxidar o reducir se llama *potencial redox* (que puede ser positivo o negativo) y se expresa en voltios. El O_3 es, en consecuencia, un fuerte oxidante que tiene un potencial redox estándar de +2.01 V en sistemas acuosos (Weast, 1977). Entre las características fisicoquímicas del O_3 están: es un gas incoloro e irritante, en estado líquido es de color azul violáceo, de peso molecular de 48.0, con un punto de congelación de -192.7°C , un punto de ebullición de -111.9°C y solubilidad a 0°C de 0.494 ml/100 ml de agua (United States Environmental Protection Agency, 1986).

MECANISMOS DE ACCION DE LA TOXICIDAD DEL OZONO.

En solución acuosa, el O_3 se descompone en peróxido de hidrógeno, óxidos y radicales hidroxilo. Se cree que algunos de los radicales libres inducidos por el O_3 en los sistemas biológicos son derivados de la reacción de dicho gas con los ácidos grasos insaturados que forman parte del factor surfactante y moco de las células epiteliales del pulmón (Kennedy y cols., 1992). Estos radicales producen la oxidación de los grupos sulfhidrilos y de los aminoácidos de enzimas, proteínas y péptidos, haciendo a las membranas celulares blancas sensitivas (Victorin, 1992). En las reacciones del O_3 con los ácidos grasos también se forman epóxidos y dialdehídos como el malonaldehído. Es posible que estos productos de reacción secundaria sean la causa del daño o disfunción celular (Mustafa, 1990; Steinberg, 1990). El radical superóxido es el principal radical libre involucrado en el daño cerebral. Este puede ser liberado al fluido cerebral extracelular, como resultado de la dismutación para producir peróxido de hidrógeno y en la presencia de iones de hierro, radicales hidroxilo. Los radicales hidroxilo pueden ser dañinos debido a su alta reactividad, mientras que los radicales superóxido pueden también ser dañinos debido a que pueden difundirse desde el sitio de su formación hacia otros lugares (Halliwell y Gutteridge, 1984). El peróxido de hidrógeno puede ser producido en el tejido vivo por medio de la superóxido dismutasa, aunque existen algunas otras enzimas que lo producen tales como la L-aminoácido oxidasa y la monoaminoxidasa. Cohen (1988) ha sugerido incluso que, como consecuencia del incremento en la recaptura de DA en la enfermedad de Parkinson se incrementa la desaminación oxidativa de este neurotransmisor por medio de la monoaminoxidasa, provocando la formación de peróxido de hidrógeno y el estrés oxidativo en las terminales nerviosas dopaminérgicas provocando su destrucción. El peróxido de hidrógeno es removido del organismo por medio de dos enzimas: la catalasa y la glutatión peroxidasa dependiente de selenio.

II. INTRODUCCION.

Se ha demostrado que la exposición *in vitro* de sinaptosomas y de rebanadas cerebrales a sistemas generadores de radicales libres disminuyen la recaptura del GABA, incrementan la recaptura del Ca^{++} (Braugher, 1985) e inhiben la actividad de la ATPasa $\text{Na}^+\text{-K}^+$ (Chan y cols., 1983). Estos efectos están asociados a la formación de peróxidos lipídicos. Sin embargo, el daño provocado por los radicales libres no necesariamente involucra a la peroxidación lipídica. Se sabe que también hay una caída en el contenido de ATP y que se activan las proteasas calcio-dependientes que provocan un fenómeno de "formación de burbujas" dentro de la membrana plasmática de las células (Halliwell, 1987; McConkey y cols., 1988; Cochrane y cols., 1988). El aumento de Ca^{++} libre intracelular es particularmente nocivo para las neuronas ya que se sabe que algunas neurotoxinas actúan de este modo (Komulainen y Bondy, 1988).

MONOAMINAS.

Recientemente se han relacionado los cambios en los niveles de 5-HT provocados por la inhalación de 1.5 ppm de O_3 durante 24 horas con las alteraciones provocadas sobre el sueño (Huitrón-Reséndiz y cols., 1993). Sin embargo, no sabemos a partir de qué tiempo de exposición al O_3 se pueden observar las alteraciones bioquímicas ni si estos cambios bioquímicos son reversibles. Siendo así, se revisarán a continuación algunos conceptos generales sobre las monoaminas cerebrales con el objeto de elaborar en la discusión de este trabajo una hipótesis capaz de explicar los probables mecanismos de acción del O_3 sobre estos neurotransmisores.

Las monoaminas contienen un grupo amino simple (NH_2) y están divididas en dos grandes grupos: las catecolaminas, que se sintetizan a partir de la tirosina y que contienen un grupo catecol en su estructura química y las indolaminas, que contienen un grupo indol en lugar de uno catecol y que se sintetizan a partir del triptófano. La Dopamina (DA), la Noradrenalina (NA) y la Adrenalina son catecolaminas mientras que la serotonina o 5-hidroxitriptamina (5-HT) y la Melatonina son indolaminas (Weiner y Molinoff, 1989). Se particularizará en los sistemas monoaminérgicos referentes a la DA, NA y 5-HT.

1. DOPAMINA.

a. **Síntesis.** En general, las catecolaminas son producidas en el encéfalo, en las células cromafines, en los nervios simpáticos y en los ganglios simpáticos a partir de su ya mencionado precursor: la L-tirosina. Para la síntesis de la DA, este aminoácido es hidroxilado mediante una enzima conocida como Tirosina-hidroxilasa, la cual usa oxígeno molecular y tirosina como sus sustratos y bipterina como su cofactor (Shiman y cols., 1971). para producir 3,4-dihidroxi-fenilalanina (DOPA). Esta enzima puede también hidroxilar a la l.-fenilalanina, aunque en menor grado, para originar L-tirosina, la cual se encuentra en el citosol de los procesos neuronales que contienen catecolaminas, en la médula suprarrenal y en general en todos los tejidos inervados por el sistema simpático.

En el siguiente paso, la DOPA descarboxilasa (DDC) se encarga de descarboxilar a la L-DOPA que es convertida en DA casi en su totalidad, siendo éste el paso final de la ruta. Esta enzima también descarboxila al 5-hidroxitriptófano, el precursor de la 5-HT, también como a otros aminoácidos aromáticos. A esta enzima se le ha llamado también aminoácido aromático descarboxilasa y se encuentra en neuronas que contienen catecolaminas y 5-HT, además de tejidos no neurales como el riñón (Weiner y Molinoff, 1989).

b. Sistemas dopaminérgicos. Las neuronas dopaminérgicas del mesencéfalo han sido designadas como los grupos celulares A8, A9 y A10 (Dahlstrom y Fuxe, 1964). No existe ninguna diferencia anatómica entre estos grupos y además las células que los integran aparecen al mismo tiempo durante el desarrollo (Olson y Seiger, 1972). Los hechos anteriores, añadidos a la sobreposición entre las proyecciones de estas tres regiones (Lindvall y Björklund, 1983; Lindvall y Björklund, 1984) han dirigido a la sugerencia de que las neuronas que integran los grupos A8, A9 y A10 están designadas colectivamente al sistema dopaminérgico mesotelencefálico (Moore y Bloom, 1978).

Las neuronas dopaminérgicas A10 se localizan en el *Area Ventral Tegmental* (AVT), mientras que las células dopaminérgicas más laterales de la *sustancia negra* han sido designadas como el grupo de células dopaminérgicas A9. Las neuronas A8 ocupan la posición más caudal en el *campo retrorubral* del mesencéfalo. Las neuronas A9 ascienden para proveer la mayoría de la inervación del *cuerno estriado*, mientras que las neuronas A10 del AVT inervan áreas mesolímbicas (ej. el *núcleo acumbens*, los *tubérculos olfatorios* y la *amígdala*) y sitios mesocorticales tales como la *corteza frontal* (Lindvall y Björklund, 1983; Lindvall y Björklund, 1984). Las neuronas A8 contribuyen a la inervación dopaminérgica del *cuerno estriado* y de sitios mesolímbicos, pero no neocorticales (Deutch y cols., 1986). El patrón de inervación de las neuronas mesencefálicas dopaminérgicas dentro del telencéfalo forma una amplia topografía (Fallon y Moore., 1978; Moore y Bloom, 1978), aunque hay sobreposición entre las proyecciones

II. INTRODUCCION.

aferentes de estas neuronas de tal manera que ciertas áreas telencefálicas reciben entradas convergentes. Además, ciertas subpoblaciones de las neuronas dopaminérgicas mesencefálicas tienen colaterales para inervar dos o más regiones terminales. Tal sobreposición anatómica en el patrón de inervación de las neuronas dopaminérgicas dentro de los campos terminales, sugiere que puede existir un alto grado de heterogeneidad dentro de un campo terminal dado. Estas heterogeneidades son aparentes en el *cuerpo estriado*, en el cual hay dos distintos sistemas dopaminérgicos de terminales nerviosas, nombrados los sistemas *difuso e islándico*. (Olson y cols., 1972). Esos dos tipos de inervaciones dopaminérgicas se originan de diferentes poblaciones de neuronas dentro de los grupos celulares del mesencéfalo (Arluison y cols., 1982; Fuxe y cols., 1983; Jiménez-Castellanos y Reinoso-Suarez, 1985) y exhiben diferentes respuestas a los agonistas y antagonistas de la DA (Arluison y cols., 1982).

Otras proyecciones dopaminérgicas relativamente menores inervan estructuras pontinas y diencefálicas. Estos sistemas incluyen a los aferentes dopaminérgicos hacia el *locus ceruleus* (Deutch y cols., 1986), *región medial parabrachial* (Swanson, 1982), *hipocampo* (Verney, 1985) y *banda diagonal de Broca* (Kalivas y cols., 1985). En la **Figura # 1** se ilustran las principales vías dopaminérgicas en el cerebro de la rata.

c. Importancia psicofisiológica. Los sistemas dopaminérgicos se han involucrado en la conducta de la siguiente manera: el sistema nigro estriatal forma parte del sistema motor extrapiramidal. Participa en la iniciación y ejecución de los movimiento voluntarios, en los movimientos de acompañamiento mímicos e instintivos y en el control del tono muscular. Su alteración se correlaciona con enfermedades extrapiramidales, especialmente con la enfermedad de Parkinson. El sistema mesocortical se correlaciona funcionalmente con el sistema nigro estriatal, mediando la actividad motora. Su actividad más importante es la participación en la vida emocional. También se ha relacionado con la conducta de

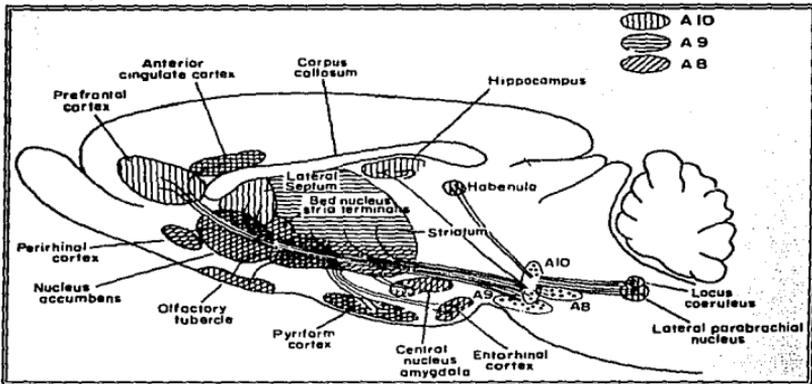


Figura # 1. Representación esquemática de las proyecciones eferentes de los grupos celulares dopaminérgicos A8, A9 y A10 en el cerebro de la rata (Tomado de Roth y cols., 1987)

autoestimulación cerebral y actividades estereotipadas. Su alteración se supone relacionada con la esquizofrenia y otras enfermedades mentales. También se ha involucrado a la DA como un neurotransmisor propio del sistema retiniano en la capa nuclear interna de la retina. Estas son interneuronas correlacionadas con los fenómenos de contraste. Se le ha caracterizado también como uno de los neurotransmisores involucrados en los sistemas cerebrales de recompensa, donde se ha estudiado la modulación que los sistemas dopaminérgicos ejercen sobre los efectos activadores que producen las vivencias cognitivas que tienen un significado emocional para la vida del individuo (Willner y Scheel-Kringer, 1990).

2. NORADRENALINA.

a. *Síntesis.* Algunas células que metabolizan a la DA, contienen a la Dopamina-*B*-hidroxilasa (DABH), que es una enzima de función mixta que usa oxígeno molecular para formar el grupo hidroxilo que se añade al carbono *B* en la cadena lateral de la DA (Craine

II. INTRODUCCION.

y cols., 1973). El ascorbato, reducido a dihidroascorbato durante la reacción, provee una fuente de electrones, lo cual también contribuye a la formación del grupo hidroxilo. La DABH contiene Cu^{2+} , el cual está involucrado en la transferencia de electrones en la reacción, así que los quelatos de cobre, tales como el dietilditiocarbamato, son potentes inhibidores de la DABH. Esta enzima está concentrada dentro de las vesículas que almacenan catecolaminas y grandes cantidades están en la membrana vesicular interna, aunque alguna está libre dentro de las vesículas. La DABH se libera junto con las catecolaminas desde los nervios y desde las glándulas suprarrenales y se encuentra en el plasma.

Como complemento, en las células que producen adrenalina, el paso final es catalizado por la enzima feniletanolamina N-metiltransferasa (PNMT). Estas células se localizan en un pequeño grupo de neuronas del tallo cerebral que utilizan adrenalina como su neurotransmisor, así como en las células medulares adrenales en las cuales la adrenalina es su principal neurohormona. La feniletanolamina N-metiltransferasa (PNMT) transfiere un grupo metilo desde la S-adenosilmetionina al nitrógeno de la NA, formando una amina secundaria (Connett y Kirshner, 1970). La actividad de la PNMT está regulada por corticoesteroides. Los procesos del metabolismo de las catecolaminas se ilustran en la **Figura # 2.**

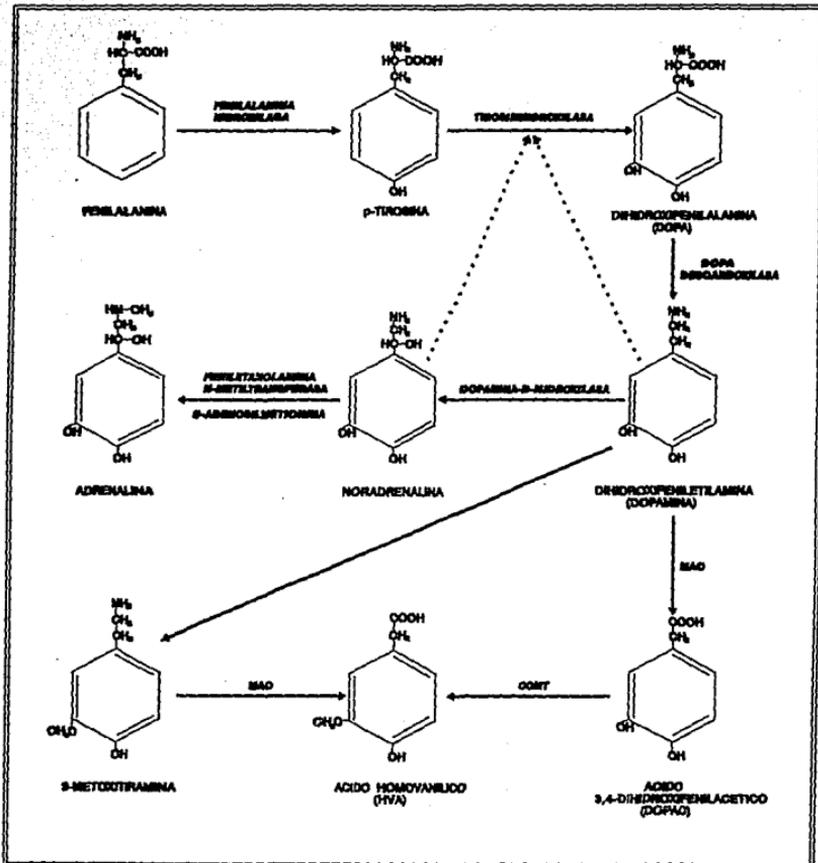


Figura # 2. Biosíntesis y metabolismo de la DA y de la NA. Se usan las siguientes abreviaturas: MAO, monoaminooxidasa; COMT, catecol-orto-metiltransferasa. Las líneas punteadas indican inhibición de la tirosinhidroxilasa por la NA y la DA. La tetrahidrobiopterina es un cofactor para la acción de la fenilalanina hidroxilasa y la tirosinhidroxilasa.

c. Importancia psicofisiológica. En los sistemas cerebrales de recompensa también se implicó a la NA, pero tras la demostración de que la destrucción completa del locus ceruleus tenía un efecto muy pequeño sobre la cantidad de autoestimulación, el estatus de este neurotransmisor en este sentido se volvió incierto (Palomo, 1990). Sin embargo, se sabe que la NA actúa en el sistema nervioso periférico en las reacciones de alarma, originando dilatación pupilar, elevación de la presión arterial, dilatación bronquial, reducción del flujo sanguíneo de la piel, etc. Participa en la regulación por el hipotálamo de la temperatura y de la liberación de hormonas tróficas, y en la adenohipófisis induce la liberación de diversas hormonas y en la hipófisis inhibe la liberación de oxitocina y vasopresina. Las neuronas noradrenérgicas están implicadas en diversas funciones neuropsicológicas tales como: el ciclo vigilia-sueño, conductas emotivo-afectivas, estados de ánimo, agresividad, motivaciones primarias (como la alimentación), actividad psicomotora y por último, en procesos mentales superiores como pueden ser el aprendizaje y la memoria (Ramos y Fernández, 1990).

3. SEROTONINA.

a. Síntesis. Solamente de 1 al 2% de la 5-HT corporal se encuentra en el encéfalo. Sin embargo, ya que la 5-HT no puede cruzar la barrera hematoencefálica, las células deben sintetizarla. Para las células cerebrales, el primer paso es la captación del triptófano, que es el sustrato primario para la síntesis. El triptófano del plasma procede principalmente de la dieta, y los niveles bajos de éste en los alimentos puede disminuir las concentraciones de 5-HT. Además, se sabe que un proceso activo de captación facilita la entrada de triptófano en las células, y este proceso de entrada está abierto competitivamente por otros aminoácidos, como la fenilalanina. Debido a que el triptófano plasmático tiene una variación rítmica diaria en su concentración, es probable que dicha concentración variable pueda influir profundamente la tasa de síntesis de la 5-HT cerebral.

II. INTRODUCCION.

El siguiente paso de la vía sintética es la hidroxilación del triptófano en la posición 5 para formar 5-hidroxitriptófano (5-HTP). La enzima responsable de esta reacción, la triptófano hidroxilasa, se encuentra en bajas concentraciones en la mayor parte de los tejidos. incluyendo el cerebro y a medida que se aísla, la enzima necesita forzosamente oxígeno molecular, pteridina reducida como cofactor y una sustancia estabilizadora de sulfhidrilo como el mercaptoetanol para mantener su actividad *in vitro*. Con este sistema de ensayo fortificado, hay suficiente cantidad en el cerebro para sintetizar un microgramo de 5-HTP por gramo de tallo cerebral en una hora. El pH óptimo es aproximadamente de 7.2 y la K_m para el triptófano de 3×10^{-5} M. Otras investigaciones sobre la naturaleza del cofactor endógeno tetrahidrobiopterina, dieron una K_m para el triptófano de 5×10^{-5} M, que se mantiene por arriba de las concentraciones normales de triptófano. Así, el contenido normal de triptófano en el plasma y la captación resultante por el cerebro dejan a la enzima normalmente no saturada con substrato disponible. Al parecer la triptófano-hidroxilasa es una enzima citoplásmica soluble, pero los procedimientos usados para extraerla de los tejidos pueden alterar en forma notable la capacidad natural de fijación a partículas. Los investigadores que han examinado la distribución relativa de la triptófano-hidroxilasa tanto en partículas como soluble, han publicado que la enzima en partículas puede asociarse con sinápsis que contienen 5-HT, en tanto que la fase soluble de esta enzima es posible que esté asociada con el citoplasma perinuclear. La forma en partículas de la enzima muestra la K_m más baja y presenta la necesidad absoluta de tetrahidrobiopterina. Este paso en la síntesis puede ser específicamente bloqueado por la p-clorofenilalanina, que compete directamente con el triptófano y también se une irreversiblemente a la enzima. Por lo tanto, la recuperación de la inhibición de la triptófano-hidroxilasa con p-clorofenilalanina parece requerir de la síntesis de nuevas moléculas de enzima. En las ratas, una inyección intraperitoneal única de 300 mg/Kg de este inhibidor, baja la concentración cerebral de 5-HT a menos de 20 % en tres días, y la

II. INTRODUCCION.

recuperación completa sólo se manifiesta después de dos semanas. Una vez sintetizado el 5-HTP es casi inmediatamente descarboxilado para obtener 5-HT. Se cree que la enzima responsable es idéntica a la enzima que descarboxila la dihidroxifenilalanina (DOPA). Cuando se examina el paso de la descarboxilación en homogeneizados de cerebro, la actividad para la DOPA es muy diferente a la del 5-HTP con respecto al pH, temperatura y sustrato óptimo; aún dentro de los homogeneizados de cerebro las dos actividades se enriquecen en subfracciones diferentes: la 5-HTP descarboxilasa se asocia principalmente con la fracción sinaptosómica y la DOPA-descarboxilasa con la fracción soluble o microsómica. Finalmente, el caso de que fueran dos enzimas diferentes se apoya en la observación de que el tratamiento de animales con 6-hidroxidopamina intracisternal reduce la actividad de la DOPA-descarboxilasa pero no la actividad de la 5-HTP descarboxilasa. Por otra parte, los antisucros formados contra la descarboxilasa purificada del riñón, reaccionan en forma cruzada con ambas descarboxilasas del cerebro, quizá indicando que comparten muchos determinantes antigénicos comunes. Como esta reacción de descarboxilación ocurre rápidamente y ya que su K_m (5×10^{-6} M) requiere menos sustrato que los pasos precedentes, la triptófano hidroxilasa podría ser el paso limitante de la tasa en la síntesis de 5-HT, siempre y cuando el triptófano agregado esté disponible en el estado controlado.

La única ruta eficaz de un metabolismo continuo de la 5-HT es la desaminación por la monoaminoxidasa (MAO). El 5-hidroxiindolacetaldehído que es el producto de esta reacción es oxidado aún más a ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA) o bien reducido a 5-hidroxitriptófol dependiendo de la relación oxidoreductiva de $NAD^+/NADH$ en el tejido. Se han descrito enzimas en el hígado y cerebro por las cuales la 5-HT puede ser catabolizada sin una desaminación a través de la formación de un 5-tioéster. Este éster podría ser transportado fuera del cerebro, por un sistema de excreción ácida que maneja 5-HIAA.

El cerebro contiene una enzima que cataboliza la N-metilación de la 5-HT al usar S-adenosilcitionina como donador de metilo. Una enzima N-metilante que utilizaría únicamente el 5-metil-tetrahidrofolato (5-MTHF) como donador de metilo. Se ha averiguado que esta reacción es un artefacto del sistema de análisis *in vitro* en la cual el 5-MTHF es desmetilado y libera formaldehído que entonces se condensa con el amino-N y el C₂ del anillo indólico para formar el compuesto ciclico triptolina.

Los procesos de síntesis, descarboxilación y catabolismo de la 5-HT se ilustran en la Figura # 4.

b. Sistemas serotoninérgicos. Las células serotoninérgicas son filogenéticamente muy antiguas, habiéndose estudiado en casi todos los sistemas nerviosos desde los celenterados hasta el humano (Azmitia y Gannon, 1986). Ontogenéticamente, se presentan niveles detectables de 5-HT y actividad de triptófano hidroxilasa en el huevo fertilizado (Azmitia, 1987) y casi cualquier célula tiene 5-HT cuando el estado de gástrula ha sido completado. Sin embargo, la distribución de esta monoamina está restringida a una pequeña proporción de células en el Sistema Nervioso Central, Sistema Nervioso Periférico y algunos tejidos no neurales, como el pulmón y la glándula pineal. Las células serotoninérgicas se forman en la parte lateral de la línea media en el embrión y migran hacia el rafe después del día 18 de gestación en la rata (Azmitia, 1987). Estas comienzan a formar colaterales homotípicas entre ellas mismas antes de que establezcan proyecciones a blancos alejados (Wallace y Lauder, 1983). Estas proyecciones juegan un papel en la sincronización del ritmo de disparo de las células serotoninérgicas. La 5-HT puede actuar como un agente neurotrópico en el desarrollo inicial de las conexiones de las células serotoninérgicas. La aplicación de 5-HT en el cono de crecimiento de un axón de *Helisoma* puede cambiar su ruta de migración (Haydon y cols., 1984). Finalmente se desarrollan en fascículos dirigiéndose anteriormente hacia la corteza, y se extienden caudalmente hacia la médula espinal.

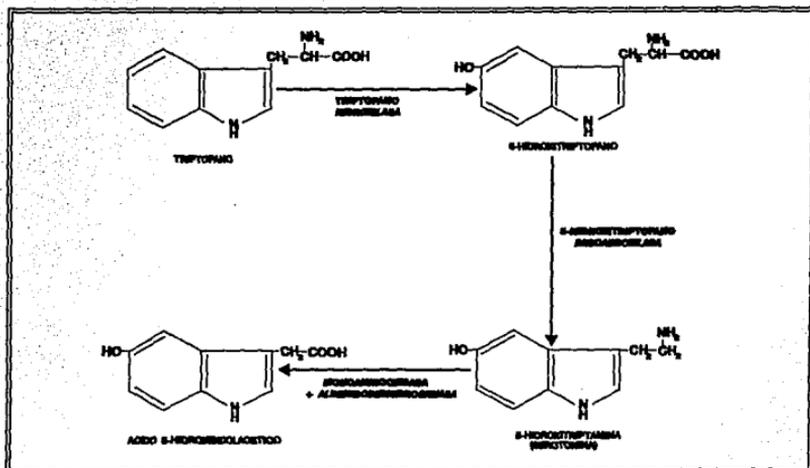


Figura # 4. Biosíntesis y metabolismo de la 5-HT. La enzima que cataliza la descarboxilación de la 5-HT es muy similar, pero probablemente no es idéntica a la que cataliza la acción de la dopa. La tetrahidropterina es un cofactor para la acción de la triptófano hidroxilasa.

Las neuronas inmunorreactivas serotoninérgicas están asociadas a vías sensoriales y motoras. Las células del *núcleo central superior*, *núcleo del rafe dorsal* y *núcleo del rafe oscuro* están localizadas cerca o dentro del *fascículo longitudinal medial*, el cual interconecta al núcleo oculomotor, las neuronas espinales motoras y el núcleo vestibular. Las neuronas del *núcleo prosupralemnico* y el *núcleo del rafe magno* (NRM) localizadas en el *lemnisco medio* transmiten la información propioceptiva desde la médula espinal. Las células del NRM están asociadas con el cuerpo trapezoide el cual trasmite señales auditivas al mesencéfalo. Las células del *núcleo del rafe pálido* están alrededor y adentro del tracto piramidal. Finalmente, las células laterales de la población de neuronas inmunorreactivas serotoninérgicas en el *núcleo reticular lateral* y del *núcleo paragigantocelular lateral* están asociadas con el *tracto espinal olivar* y el *tracto espinal*

talámico, que transmiten estímulos sensoriales de entrada desde la médula espinal hasta el tallo cerebral.

Las células serotoninérgicas están asociadas también con núcleos del tallo cerebral involucrados en la integración de centros superiores e inferiores. El *núcleo central superior* rodea al *núcleo interpeduncular*, que recibe información descendente desde la *habénula*. Células de este núcleo serotoninérgico también se extienden lateralmente dentro de la formación reticular del tallo cerebral (Azmitia, 1987).

También se encuentran aferencias desde los núcleos del rafe hacia la corteza, que forman un patrón laminar en algunas capas de la corteza, con la más alta densidad en las capas I y IV. Estudios hechos en la formación hipocámpal han demostrado también aferencias serotoninérgicas que innervan a las células granulares del giro dentado. El patrón visto en el giro dentado del mono es similar al de la rata. En las zonas subcorticales de los primates, la inervación es mayor en las zonas talámicas asociadas con las funciones límbicas (ej. *núcleo reunien* y *núcleo anterior dorsal*) y con la transmisión sensorial (ej. *núcleo dorsal del cuerpo geniculado lateral*; **Figura # 5**).

Por otro lado, se ha identificado otro grupo adicional de neuronas serotoninérgicas distinto al formado por los núcleos del rafe, localizado en el núcleo dorsomedial del hipotálamo. Hay algunos criterios para establecer la presencia de un neurotransmisor putativo en un grupo celular dado. Estos son: que las neuronas poseen la habilidad para sintetizar, almacenar, liberar, inactivar e imitar el efecto postsináptico del neurotransmisor putativo. Tres de estos criterios se han hallado en este grupo celular: las células son capaces de sintetizar 5-HT, pueden almacenarlo y poseen los mecanismos de inactivación, recaptura y la principal enzima de degradación de 5-HT, la monoaminooxidasa A. Estas células no han sido encontradas en el hipotálamo del gato ni del mono (Azmitia, 1987).

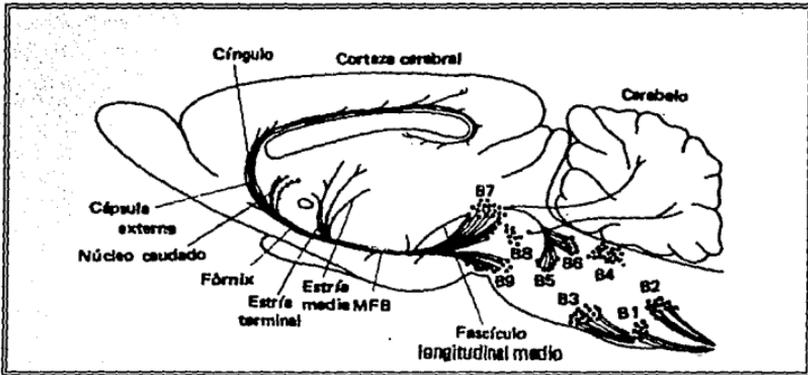


Figura # 5. Diagrama esquemático que ilustra la distribución de las principales vías que contienen 5-HT en el sistema nervioso central de la rata (Tomado de Cooper y cols., 1982).

c. Importancia psicofisiológica. Se ha puesto mucha atención a la regulación global del paso de Triptófano a 5-hidroxitriptófano en la síntesis de 5-HT, especialmente en animales y seres humanos tratados con medicamentos psicoactivos que se supone afectan a los sistemas de 5-HT como modo primario de acción. Estos estudios ofrecen un punto de vista general muy importante que se aplica, de hecho, a las respuestas cerebrales frente a los medicamentos en muchos otros sistemas celulares, así como a la 5-HT. Este punto se debe a que la síntesis, almacenaje, liberación y respuestas del trasmisor, son procesos dinámicos; los desequilibrios agudos producidos inicialmente por los tratamientos con medicamentos, pronto son balanceados por la naturaleza interna de retroacción que tiene la regulación de la síntesis. De modo que si un medicamento o un tóxico reduce la actividad de la triptófano hidroxilasa, las células nerviosas pueden responder incrementando la síntesis de la enzima y transportando cantidades mayores a las terminaciones nerviosas.

II. INTRODUCCION.

Se han aportado pruebas de que un tratamiento a corto plazo con litio incrementa desde un principio la captación de triptófano, lo que aumenta las cantidades que son convertidas a 5-HT. Sin embargo, después de 14-21 días de tratamiento crónico la repetición de las mediciones muestra que la captación de triptófano aún está incrementada, mientras que la actividad de la enzima está disminuida, de manera que se forman cantidades normales de 5-HT. En este nuevo estado de equilibrio, las acciones neuroquímicas de los medicamentos como la anfetamina y la cocaína sobre la síntesis de 5-HT se ven sumamente mermadas, así como sus acciones sobre el comportamiento. En esta forma, el sistema de 5-HT al desviar su relación entre la captación y la síntesis durante la exposición al litio, se puede considerar como más estable. Este factor puede apreciarse más completamente cuando se considera que en el tratamiento de las psicosis maniaco-depresivas suelen requerirse un mínimo de 7 a 10 días antes de que comience la acción terapéutica del litio, período durante el cual se reestablecería el nuevo equilibrio del proceso sintético de 5-HT. Esto puede explicar también los resultados hallados por Huitrón y cols. (1994), donde los animales expuestos al O_3 presentaron alteraciones en los niveles de 5-HIAA, pero no en los de 5-HT de origen pontino, quizás por un proceso de balance en la degradación del neurotransmisor.

Al igual que otros derivados de los productos metabólicos de la 5-HT, la posibilidad de que una de tales moléculas pueda ser psicogénica ha contribuido, aunque sin éxito, al esfuerzo para encontrar estos metabolitos anormales en psicóticos humanos.

La 5-HT está involucrada en la regulación de la temperatura central, en el control de la conducta agresiva, en la génesis de los trastornos afectivos y en la regulación del eje hipotálamo-hipofisiario y, por lo tanto, en la liberación de las hormonas hipofisarias.

Por último, la 5-HT está implicada en la regulación del ciclo sueño-vigilia por lo que las alteraciones en los niveles de este neurotransmisor pueden estar relacionadas con los trastornos que la exposición al O_3 provoca sobre los estados del sueño.

II. INTRODUCCION.

Hay que enfatizar que los estudios realizados sobre diversos tipos de comportamientos muestran cómo estos pueden estar relacionados con la funcionalidad de determinados neurotransmisores. Pero aún no ha sido aclarado si un determinado neurotransmisor se puede considerar como el más característico de un comportamiento. A la vista de las investigaciones más recientes, se observa que cada neurotransmisor tiene interrelaciones con otros neurotransmisores, con diversos neuropéptidos, con otras sustancias o con los entornos neurales en los que se encuentra. Posiblemente todo ello, así como las interrelaciones entre regiones cerebrales, pueden influir en la manifestación de un comportamiento. Las actuaciones de los neurotransmisores se integran en circuitos neuronales y los comportamientos son la manifestación de funcionalidades cerebrales concretas. La recepción de señales por parte del cerebro da lugar al procesamiento cerebral de la información recibida, lo que origina una respuesta mental que se expresa mediante la manifestación de un comportamiento. En cualquiera de estos puntos y/o en todos ellos pueden existir diferencias genéticas, culturales, de aprendizaje o de otros tipos que variarán entre individuos y darán lugar al amplio rango de formas en que puede manifestarse un determinado comportamiento, lo que a su vez se corresponderá con una variación en la funcionalidad de los neurotransmisores con ellos relacionados (Ramos y Fernández, 1990).

NEUROTOXICOLOGIA GENERAL DE LAS MONOAMINAS.

Por medio de la utilización de métodos químicos, la meta de la neuroquímica es entender los mecanismos y las vías involucradas en el funcionamiento nervioso normal y también en sus alteraciones. En el caso de la farmacología, el desarrollo de nuevas drogas terapéuticas está creciendo rápidamente debido al incremento en el conocimiento de nuevos posibles blancos celulares, tales como subtipos de receptores o pasos específicos en las vías de segundos mensajeros. En el caso particular de la neurotoxicología, la

II. INTRODUCCION.

neuroquímica juega un papel vital en la comprensión de los mecanismos moleculares y bioquímicos que producen las respuestas del tejido nervioso al insulto tóxico. La obtención de información acerca de los sustratos bioquímicos involucrados en los cambios conductuales y su correlación con las lesiones neuropatológicas es relevante para la evaluación del impacto de la exposición de los sujetos humanos a agentes neurotóxicos y en particular el desarrollo de antidotos apropiados. El conocimiento de los blancos moleculares de los neurotóxicos puede ser usado también en la predicción de las posibles interacciones con otras sustancias químicas exógenas (por ejemplo: drogas y constituyentes de los alimentos) y de interacciones con alteraciones preexistentes debidas, por ejemplo, a enfermedades o predisposición genética (Costa, 1992). En relación al presente trabajo, el estrés oxidativo puede representar un mecanismo de toxicidad de un cantidad de neurotóxicos ambientales (Pinsky y Bose, 1988). Así por ejemplo, se tiene el caso de algunos metales tales como el plomo y el talio que incrementan la peroxidación lipídica en el cerebro (Ali y Bondy, 1989) También se ha demostrado que el metilo de mercurio incrementa la formación de especies reactivas de oxígeno *in vitro*, particularmente en el cerebelo, una región cerebral que representa un blanco sensitivo a la toxicidad por mercurio (LeBel y cols., 1990). Existen otros mecanismos de toxicidad por estrés oxidativo. Por ejemplo, el manganeso, cuyos efectos neurotóxicos semejan parcialmente a la enfermedad de Parkinson, reduce a la glutatión (GSH) reductasa y a la GSH peroxidasa (Liccione y Maines, 1988) e incrementa los productos de oxidación de las catecolaminas (Garner y Nachtman, 1989; Graham, 1984), particularmente en el cuerpo estriado, un área rica en DA (Liccione y Maines, 1988). Los mecanismos de defensa que presentan las células nerviosas también han sido estudiados. La GSH reductasa o la GSH peroxidasa son dos de las moléculas más importantes en la protección del estrés oxidativo. La GSH reductasa inactiva a las sustancias electrofílicas mediante reacciones de conjugación con la GSH transferasa, reduce la formación de peróxidos por medio de la

GSH peroxidasa y también reduce o se conjuga con las aminoquinonas formadas por la oxidación de las aminas biogénicas (Spina y Cohen, 1989).

¿Cómo podría afectar la exposición al O_3 a la actividad bioquímica de las monoaminas cerebrales? Los efectos sobre la actividad bioquímica general del organismo han mostrado que después de la exposición a concentraciones menores a 1 ppm, la actividad de muchas enzimas mitocondriales, y en el sistema respiratorio, se ve afectada y el resultado es que el metabolismo antioxidante del pulmón se incrementa. Actualmente se debate si ésta es un respuesta protectora o tóxica. Se ha reportado que la actividad de la succinato oxidasa-citocromo C reductasa se incrementa proporcionalmente a la concentración de O_3 (Mustafa y cols., 1977). Muchas de las enzimas en la mitocondria tienen grupos funcionales sulfhidrilos, los cuales se sabe que son afectados por el O_3 (Mustafa y cols., 1973). El efecto sobre las monoaminas cerebrales ha sido estudiado *in vitro* por Meiners y cols. (1977), quienes encontraron que el O_3 reacciona con el triptófano, el 5-hidroxitriptófano, el 5-HIAA y la 5-HT. Además se observó que la oxidación del triptófano por O_3 también genera peróxido de hidrógeno la cual es una sustancia tóxica *per se* y se sabe que inicia la peroxidación de lípidos, pero se debe de aclarar que este efecto no puede ser visto *in vivo* ya que se propone que el O_3 no es capaz de atravesar la barrera alveolocapilar. En cuanto a la actividad de las enzimas que intervienen en la degradación, se ha encontrado que la MAO se decremента en homogeneizados del pulmón de ratas expuestas a 2 ppm de O_3 durante 8 horas (Mustafa y cols., 1977).

SUSCEPTIBILIDAD DEL CEREBRO A LA PEROXIDACION.

En este contexto, se hará mención de que el cerebro es un órgano particularmente sensible al ataque de los radicales libres inducidos por el O_3 . Uno de los aspectos más importantes del daño de estas especies reactivas en la membrana celular es la

disponibilidad de iones metálicos que catalizan la formación de los radicales libres (Halliwell y Gutteridge, 1984, 1985). El ión metálico endógeno más importante para la formación de estos radicales es el hierro (Bucher y cols., 1983), pues se ha inducido la peroxidación de las membranas sinaptosómicas mediante la administración de varias concentraciones de iones férricos y ferrosos en el cerebro de la rata (Braugher y cols., 1986). Ya se ha establecido que la peroxidación lipídica juega un papel importante en el daño causado por la isquemia y en algunas otras condiciones degenerativas, como la enfermedad de Parkinson (Halliwell, 1987), pero es poca la información disponible acerca de la peroxidación en regiones cerebrales específicas. Uno de estos trabajos es el realizado por Subbarao y Richardson (1990), quienes estudiaron la formación de productos reactivos al ácido tiobarbiturico (TBAR's), como índice de peroxidación, en el cerebelo, la amígdala, la corteza, el neocórtex, el hipotálamo, el mesencéfalo y el tallo cerebral de la rata. Estas estructuras fueron diseccionadas y posteriormente centrifugadas, utilizándose el sobrenadante para llevar a cabo las reacciones con cloruro de hierro. Se encontró que la formación de TBAR's fué mayor en el cerebelo y decreció en el siguiente orden: la amígdala, el hipocampo, la corteza, el neocórtex, el hipotálamo, el mesencéfalo y el tallo cerebral. En otras palabras, la peroxidación fué heterogénea y dependiente de la cantidad de hierro disponible en cada estructura de las estudiadas lo que lleva a la suposición de que quizás los efectos del O₂ pueden ser heterogéneos en distintas regiones cerebrales ya que unas son más susceptibles que otras a los efectos de los radicales libres.

III. HIPOTESIS.

a) Si la cantidad de sueño paradójico disminuye 2 horas después de la exposición al O_3 y si la 5-HT participa en la génesis de dicha fase de sueño, entonces se espera encontrar: Alteraciones en el contenido de serotonina desde la primera hora de exposición al O_3 .

b) Si la exposición al O_3 incrementa la actividad enzimática de la Monoaminoxidasa, entonces se espera encontrar: Alteraciones en los niveles totales de otras aminas y de sus metabolitos después de la exposición al O_3 y cambios en el metabolismo de estas sustancias.

c) Si el O^3 genera radicales libres que actúan dependiendo de la concentración de hierro endógeno en las diferentes estructuras cerebrales entonces se espera encontrar que: Las alteraciones en las monoaminas cerebrales variarán en cada una de las estructuras estudiadas.

IV. OBJETIVOS.

- a) Estudiar el efecto de la exposición a 1 ppm de O₃ sobre las concentraciones totales de dopamina, NA, 5-HT y de los metabolitos ácido 3,4 dihidroxifenilacético, ácido homovanílico y ácido 5-hidroxiindolacético en el puente, el mesencéfalo y en el cuerpo estriado del encéfalo de la rata adulta en función al tiempo de exposición.
- b) Estudiar el efecto de la supresión del ozono mediante la medición de las concentraciones de monoaminas 1 y 3 horas después de la exposición al O₃.
- c) Cuantificar el recambio de la dopamina y de la 5-HT expresado como la razón contenido de metabolito entre el contenido del neurotransmisor con el fin de estudiar el efecto del O₃ sobre el metabolismo de las monoaminas.
- d) Discutir los posibles cambios en el contenido de monoaminas por los efectos del O₃ en relación con los cambios conductuales referidos en la literatura.

V. MATERIALES Y METODO.

Se usaron 50 ratas macho de la cepa wistar de 250-275 g las cuales fueron mantenidas en cajas individuales, en una atmósfera libre de contaminantes y con comida y agua *ad libitum*. las ratas fueron asignadas azarosamente a cinco grupos de 10 sujetos cada uno de acuerdo al siguiente protocolo: grupo **Control**, integrado por animales que se mantuvieron expuestos al aire libre de contaminantes; grupos **1 y 3**, en los cuales los sujetos fueron expuestos a 1 ppm de O₃ durante 1 hora y durante 3 horas respectivamente y grupos **3+1 y 3+3**, ambos integrados por ratas expuestas al O₃ durante tres horas seguidas de exposición a aire limpio durante 1 hora y durante 3 horas respectivamente. Los tiempos de exposición se decidieron en concordancia con un modelo exponencial. Se tomaron en cuenta las siguientes variables:

VARIABLE INDEPENDIENTE

Tiempo de exposición a 1 ppm de O₃ y exposición posterior al aire libre de contaminantes.

VARIABLES DEPENDIENTES

Niveles de dopamina, 5-HT y noradrenalina en el puente, mesencéfalo y cuerpo estriado.

Niveles de DOPAC, ácido homovanílico y ácido 5-hidroxiindolacético.

Todos los animales fueron habituados a la cámara de registro antes de comenzar con el experimento. Las ratas de los grupos experimentales fueron expuestas al O₃ administrado mediante un generador TRIOZON (mod. P-15) y cuantificado con un medidor fotométrico de UV (DASIBI mod. 1008-PC). Durante la exposición, las ratas se colocaron en cámaras sonoamortiguadas de acrílico (30 x 40 x 35 cm), provistas de entradas para el aire limpio y para el O₃ y una salida para la cuantificación de los gases.

Después de la exposición correspondiente al O_3 , las ratas fueron inmediatamente sacrificadas por decapitación y el encéfalo fue extirpado y diseccionado según el método de Glowinski e Iversen (1966) para la extracción del puente, del mesencéfalo y del cuerpo estriado, mismos que fueron colocados en tubos para centrifuga (10 ml) previamente etiquetados y pesados en una balanza analítica. Los tubos se volvieron a pesar con su contenido y el peso del tejido se obtuvo mediante la diferencia. Posteriormente se agregaron 0.5 ml de solución 1:N de ácido perclórico para los fragmentos del puente y del cuerpo estriado, mientras que para el mesencéfalo se agregó 1 ml de esta solución en consideración a su volumen. Posteriormente estas estructuras fueron homogeneizadas y centrifugadas a 15 000 rpm durante 10 minutos. Los sobrenadantes se analizaron mediante la técnica de Diggory y Buckett (1984) inyectándose a un Cromatógrafo de Líquidos de Alta Resolución (HPLC; Perkin Elmer mod. LC-1020) a través de una válvula de inyección (Rheodyne) de 20 μ l. La separación de las sustancias se hizo mediante una columna para catecolaminas (ALLTECH, adsorsphere, catecholamine 100 x 4.5 mm y 3 μ m de tamaño de partícula) y una fase móvil conteniendo 0.16 g de EDTA, 0.5 g de octil sulfato de sodio y 4 g de potasio dihidrogenofosfato disueltos en un litro de una solución de metanol:agua 28:100 y se ocupó un flujo de trabajo de 1.2 ml/min. La detección de las monoaminas se logró con un detector electroquímico (BAS LC-4C), acoplado a un amperímetro con electrodo de referencia de Ag/AgCl aplicando un voltaje de 650 mV.

Los resultados obtenidos se analizaron mediante un Análisis de Varianza (ANDEVA) simple y, cuando se hallaron significativos, se aplicó la prueba de Tukey. Todas las comparaciones estadísticas se hicieron con respecto al grupo control respectivo y se trabajó con un nivel de significancia menor o igual a 0.05. En un análisis adicional, se calculó el recambio mediante la razón [metabolito]/[neurotransmisor] y en el caso de la DA se tomó como referencia al DOPAC, por ser éste el producto inmediato de la vía de degradación preferencial de este neurotransmisor. Se construyeron gráficos de barras donde se representan: en el eje de las ordenadas la cantidad de neurotransmisor obtenida

V. MATERIALES Y METODO.

en ng/gr de tejido fresco y en las absisas los diferentes grupos en cada una de las regiones estudiadas.

VI. RESULTADOS.

Durante la exposición al O_3 , todos los animales presentaron disminución de la actividad motora y se observó taquipnea sin presentarse signos visibles de cianosis. Estos datos no fueron cuantificados.

Los contenidos totales de DA se incrementaron significativamente en el puente ($F_{(4,45)}=5.18$; $p(F)=0.002$) y en el mesencéfalo ($F_{(4,45)}=8.65$; $p(F)<0.001$) en función al tiempo de exposición al O_3 permaneciendo en estas dos estructuras aumentados los niveles de este neurotransmisor hasta 1 hora después de cesada la administración del O_3 , mientras que en el cuerpo estriado se observó un incremento abrupto en el contenido de DA desde la primera hora de exposición, continuando elevados los niveles de este neurotransmisor hasta una hora después de eliminado el O_3 en la caja de registro ($F_{(4,45)}=22.67$; $p(F)<0.001$; **Figura # 6**). Del mismo modo, se observó un aumento significativo en el contenido de DOPAC en el puente ($F_{(4,45)}=3.54$; $p(F)=0.013$) desde la primera hora de exposición al O_3 mientras que en el mesencéfalo no se encontró ningún cambio significativo, salvo la disminución de este metabolito después de 3 horas de cesada la administración del O_3 ($F_{(4,45)}=4.10$; $p(F)=0.007$). En el cuerpo estriado se incrementaron los niveles de DOPAC desde la primera hora hasta 1 hora después de finalizada la exposición al O_3 ($F_{(4,45)}=8.36$; $p(F)<0.001$; **Figura # 7**). El recambio de la DA se incrementó en el puente solamente después de una hora ($F_{(4,45)}=7.94$; $p(F)<0.001$), mientras que en el mesencéfalo ($F_{(4,45)}=9.1$; $p(F)<0.001$) y en el cuerpo estriado ($F_{(4,45)}=5.34$; $p(F)=0.002$) el metabolismo fue significativamente menor debido al incremento de DA provocado por la inhalación de O_3 (**Figura # 8**). Los contenidos totales de HVA, a diferencia de la DOPAC, no se modificaron significativamente en ninguno de los grupos experimentales ni se observaron tendencias claras en ninguna estructura (Puente: $F_{(4,45)}=1.08$; $p(F)=0.376$; Mesencéfalo $F_{(4,45)}=1.42$; $p(F)=0.243$; Cuerpo estriado $F_{(4,45)}=1.06$; $p(F)=0.274$; **Figura # 9**).

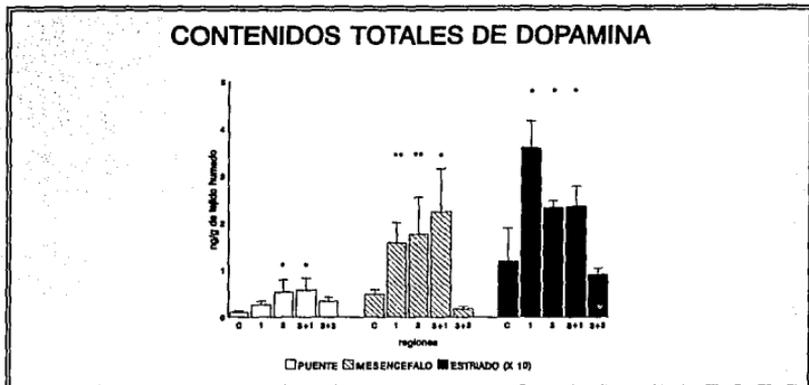


Figura # 6. Contenidos de DA (ng/g de tejido) después de la exposición durante 1 hora (1) y durante 3 horas (3) a 1 ppm de O_3 , durante 3 horas seguidas de exposición durante 1 hora a aire limpio (3+1) y durante 3 horas a O_3 seguidas de 3 horas de exposición al aire limpio (3+3) en el puente, mesencéfalo y en el cuerpo estriado. (C) Grupo control. Los datos se representan como $x \pm$ intervalo de Tukey (* $\alpha < 0.01$ y ** $\alpha < 0.05$).

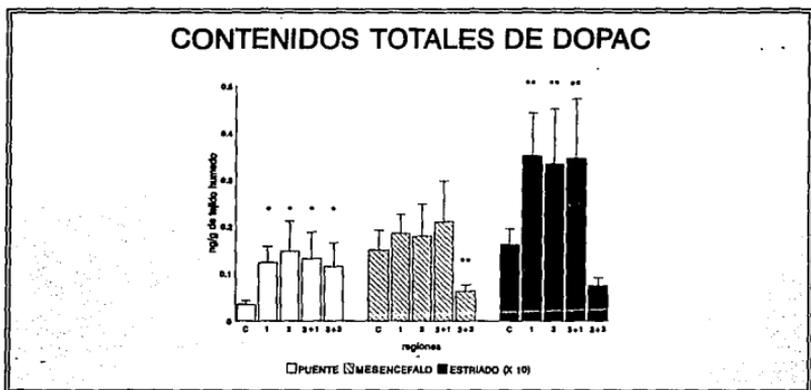


Figura # 7. Contenidos de DOPAC (ng/g de tejido) después de la exposición durante 1 hora (1) y durante 3 horas (3) a 1 ppm de O_3 , durante 3 horas seguidas de exposición durante 1 hora a aire limpio (3+1) y durante 3 horas a O_3 seguidas de 3 horas al aire limpio (3+3) en el puente, mesencéfalo y en el cuerpo estriado. (C) Grupo control. Los datos se representan como $x \pm$ intervalo de Tukey (* $\alpha < 0.01$ y ** $\alpha < 0.05$).

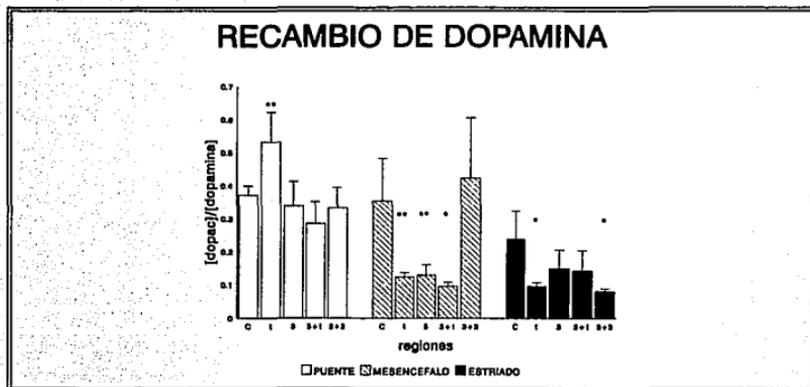


Figura # 8. La gráfica muestra el recambio de DA ([DOPAC]/[DA]) en condiciones control (C) y después de la exposición al O₂ durante 1 hora (1), 3 horas (3), durante 3 horas seguidas de 1 hora de exposición a aire limpio (3+1) y durante 3 horas seguidas de 3 horas de exposición a aire limpio (3+3) en el puente, mesencéfalo y en el cuerpo estriado. Los datos se representan como $\bar{x} \pm$ intervalo de Tukey (* $\alpha < 0.01$ y ** $\alpha < 0.05$).

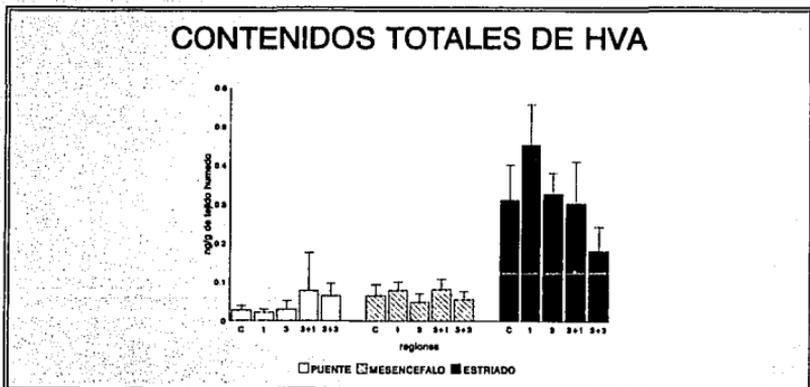


Figura # 9. Contenidos de HVA (ng/g de tejido) después de la exposición durante 1 hora (1) y durante 3 horas (3) a 1 ppm de O₂, durante 3 horas seguidas de exposición durante 1 hora a aire limpio (3+1) y durante 3 horas al O₂ seguidas de 3 horas a aire limpio (3+3) en el puente, mesencéfalo y en el cuerpo estriado. (C) Grupo control. Los datos se representan como $\bar{x} \pm$ intervalo de Tukey.

Por otro lado, las concentraciones totales de NA presentaron un aumento claro en función al tiempo de exposición al O_3 en las tres estructuras estudiadas y este aumento persistió en el puente hasta tres horas después de finalizada la exposición ($F_{(4,45)}=4.61$; $p(F)=0.004$), mientras que en el mesencéfalo ($F_{(4,45)}=15.77$; $p(F)<0.001$) y en el cuerpo estriado ($F_{(4,45)}=4.83$; $p(F)=0.003$) hubo una disminución con respecto a la condición control de NA tres horas después de cesada la administración del O_3 (**Figura # 10**).

Con referencia a la 5-HT, se obtuvo que no hay cambios de ésta en ninguna de las estructuras estudiadas, si bien en el puente se observó que los niveles aumentaron progresivamente en función al tiempo de exposición al O_3 , haciéndose significativos estos cambios hasta 1 hora después de finalizada la exposición ($F_{(4,45)}=6.13$; $p(F)<0.001$). En el mesencéfalo la mayor concentración de 5-HT se observó durante la primera hora de exposición al O_3 , aunque sin valores significativos ($F_{(4,45)}=0.66$; $p(F)=0.627$), mientras que después de 1 hora de exposición así como después de tres horas de administración de aire limpio se mantuvieron sin cambios. En el cuerpo estriado tampoco se observaron cambios significativos en ninguna de las condiciones experimentales ($F_{(4,45)}=1.44$; $p(F)=0.236$), si bien hubo una disminución de los niveles después de la primera hora de exposición, manteniéndose así hasta el final del experimento (**Figura # 11**).

Sin embargo, los niveles del metabolito de la 5-HT, el 5-HIAA, se incrementaron en las tres estructuras estudiadas y en función del tiempo de exposición al O_3 (Puente: $F_{(4,45)}=2.82$; $p(F)=0.035$; Mesencéfalo: $F_{(4,45)}=7.76$; $p(F)<0.001$; Cuerpo estriado: $F_{(4,45)}=9.09$; $p(F)<0.001$) hasta después de tres horas de exposición (**Figura # 12**). Comparando esto con los niveles de 5-HT, se pudo observar que existen cambios en el metabolismo de esta amina, con tendencia al aumento de 5-HIAA, lo cual significa que la amina almacenada es reemplazada del tejido provocando un incremento en el recambio, que no siempre fue significativo (Puente: $F_{(4,45)}=4.38$; $p(F)<0.005$; Mesencéfalo: $F_{(4,45)}=8.64$; $p(F)<0.001$; Cuerpo estriado: $F_{(4,45)}=1.60$; $p(F)<0.191$; **Figura # 13**).

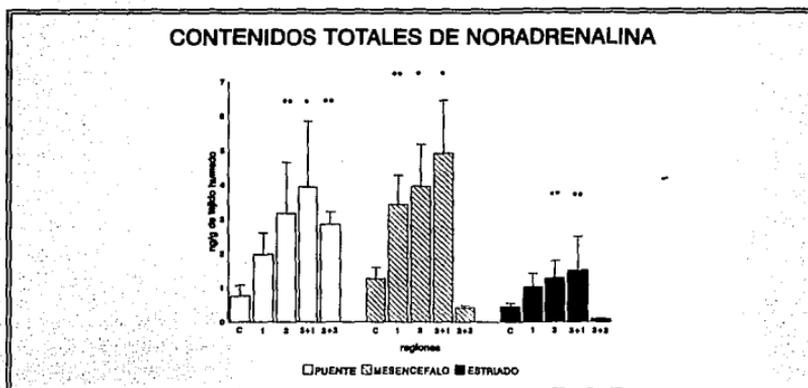


Figura # 10. Contenidos de NA (ng/g de tejido) después de la exposición durante 1 hora (1) y durante 3 horas (3) a 1 ppm de O_3 , durante 3 horas seguidas de exposición durante 1 hora a aire limpio (3+1) y durante 3 horas al O_3 seguidas de 3 horas a aire limpio (3+3) en el puente, mesencéfalo y en el cuerpo estriado. (C) Grupo control. Los datos se representan como $\bar{x} \pm$ intervalo de Tukey. (* $\alpha < 0.01$).

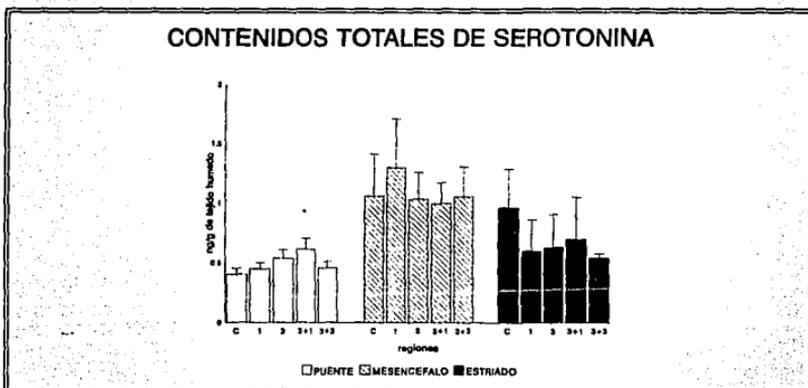


Figura # 11. Contenidos de 5-HT (ng/g de tejido) después de la exposición durante 1 hora (1) y durante 3 horas (3) a 1 ppm de O_3 , durante 3 horas seguidas de exposición durante 1 hora a aire limpio (3+1) y durante 3 horas al O_3 seguidas de 3 horas a aire limpio (3+3) en el puente, mesencéfalo y en el cuerpo estriado. (C) Grupo control. Los datos se representan como $\bar{x} \pm$ intervalo de Tukey (* $\alpha < 0.01$).

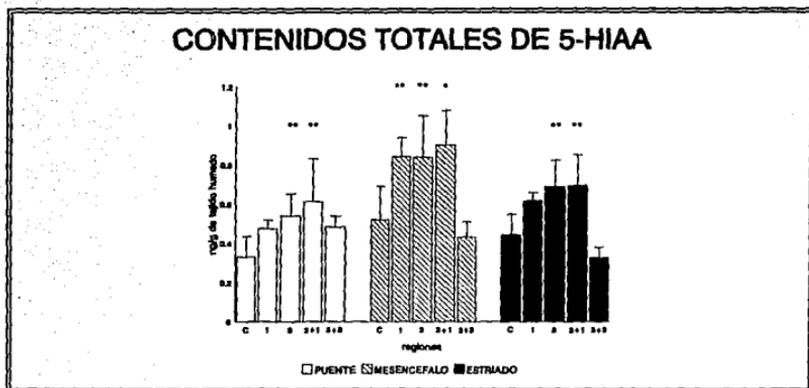


Figura # 12. Contenidos de 5-HIAA (ng/g de tejido) después de la exposición durante 1 hora (1) y durante 3 horas (3) a 1 ppm de O_2 , durante 3 horas seguidas de exposición durante 1 hora a aire limpio (3+1) y durante 3 horas al O_2 , seguidas de 3 horas a aire limpio (3+3) en el puente, mesencefalo y en el cuerpo estriado. (C) Grupo control. Los datos se representan como $\bar{x} \pm$ intervalo de Tukey (* $\alpha < 0.01$ y ** $\alpha < 0.05$).

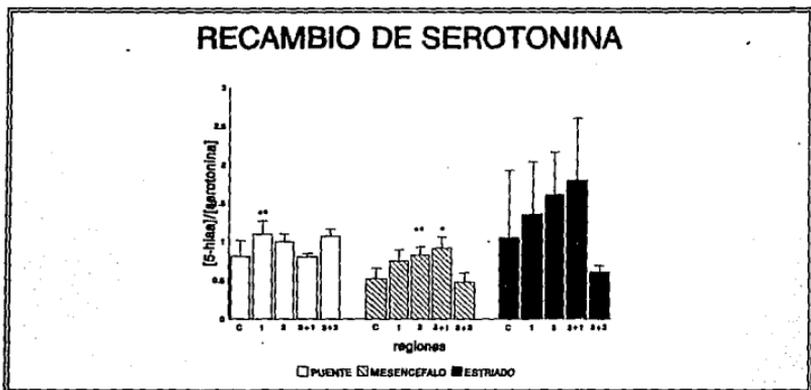


Figura # 13. La gráfica muestra el recambio de 5-HT ($[5-HIAA]/[5-HT]$) en condiciones control (C) y después de la exposición al O_2 durante 1 hora (1), 3 horas (3), durante 3 horas seguidas de 1 hora de exposición a aire limpio (3+1) y durante 3 horas seguidas de 3 horas de exposición a aire limpio (3+3) en el puente, mesencefalo y en el cuerpo estriado. Los datos se representan como $\bar{x} \pm$ intervalo de Tukey (* $\alpha < 0.01$ y ** $\alpha < 0.05$).

VII. DISCUSION.

a. Implicaciones bioquímicas.

La exposición a 1 ppm de O_3 durante 1 hora produjo una elevación significativa del 5-HIAA en el mesencéfalo y del DOPAC en el puente y en el cuerpo estriado, mientras que la exposición durante 3 horas elevó el contenido de 5-HIAA en el puente y en el cuerpo estriado. Es en el puente donde se encuentra el mayor número de células serotoninérgicas, en el mesencéfalo donde se encuentra el mayor número de células dopaminérgicas y ambos grupos neuronales proyectan al cuerpo estriado. Se sabe que el 5-HIAA y el DOPAC son los productos de la oxidación de la 5-HT y de la DA respectivamente, debido al efecto enzimático de la MAO. La actividad de esta enzima se ha reportado elevada en la corteza cerebral del perro después de 18 meses de inhalación de 1 ppm de O_3 durante 8 y 16 horas diarias (Trams y cols., 1972) razón por la cual se puede considerar que el incremento de 5-HIAA y DOPAC podría ocurrir por un aumento en la actividad enzimática de la MAO, sin descartar la posibilidad de que el incremento en la DOPAC podría estar ocurriendo por una disminución de la actividad de la COMT, ya que en los resultados no se encontraron modificados los niveles de HVA en ninguna de las estructuras estudiadas.

No conocemos el mecanismo por medio del cual ocurre el aumento que se observa sobre las concentraciones totales de las monoaminas a medida que aumenta el tiempo de exposición al O_3 . Una propuesta es que los radicales libres producidos por el O_3 provocan la peroxidación lipídica de las membranas celulares, lo que puede estar alterando la actividad de los autorreceptores. Se sabe que la activación mediada por DA de los autorreceptores somatodendríticos provoca la depresión del impulso en las neuronas dopaminérgicas, ocasionando un decremento en la liberación de DA dependiente del impulso eléctrico (Roth y cols., 1987). De esta forma, al afectarse estos autorreceptores, no hay control sobre la liberación del neurotransmisor, lo que tiene como consecuencia

su acumulación en las vesículas presinápticas. Otros autorreceptores regulan la síntesis en la terminal sináptica, por lo que la alteración de éstos también podría dirigir a una disfunción de ésta. La interacción de estos dos factores podría estar provocando la acumulación del neurotransmisor en la terminal sináptica. Esta acumulación podría ser consecuencia de otra alteración membranal que afectaría directamente a la propiedad de endocitosis; en este caso, la recaptura también se vería alterada. En el caso particular de la 5-HT, parece ser que actúan algunos mecanismos de compensación para mantener normales sus niveles una vez que se han alterado después de la exposición al O₃ y que probablemente involucra un aumento de la actividad de la Triptófano hidroxilasa y de la MAO tipo A, pues los cambios en la concentración de 5-HIAA así lo indican. La 5-HT una vez que se libera al espacio intersináptico es inmediatamente recapturada y metabolizada dentro de la neurona. Se sabe también que es desaminada dentro de la célula preferentemente por la MAO A para producir 5-HIAA. Sin embargo, si el neurotransmisor no está siendo liberado de manera óptima y se acumula dentro de la célula, en este caso la MAO tendería a incrementar su acción sobre el sustrato, pero no hay que olvidar que también la actividad de la triptófano hidroxilasa puede estar incrementada debido a la disfunción ya propuesta de los autorreceptores que controlan la síntesis. El aumento del recambio después de la exposición es una evidencia de esto, pues es mayor a 1, lo que indica una mayor disponibilidad de metabolito que de neurotransmisor. En el caso de la DA lo más evidente es el incremento en las concentraciones totales de DOPAC en contraste con los efectos nulos sobre el HVA. Tomando en cuenta que la ruta preferencial para la degradación de la DA hasta DOPAC se lleva a cabo, en el caso de los roedores, mediante la MAO A (Heninger y Dennis, 1987), y que la degradación de la DOPAC hasta el HVA es preferencialmente mediante la COMT, entonces esto parece una evidencia de que la enzima más afectada es la MAO. Sin embargo, si se remite a la figura # 3 se observa que la degradación desde la DA hasta el HVA de todas maneras requiere de la

participación de la MAO. Caben, entonces, las siguientes posibilidades: si después de la exposición al O_3 aumenta la concentración de DA, entonces pueden estar alteradas las actividades de las enzimas fenilalanina hidroxilasa y/o la tirosin-hidroxilasa. Si la concentración de DOPAC también aumenta, entonces es consecuencia del aumento de DA y de la actividad de la MAO. Finalmente este aumento de DOPAC traería como consecuencia un aumento de HVA; sin embargo este resultado no se observó pues los niveles de HVA se mantuvieron constantes, lo que podría indicar una disminución de la actividad de la COMT o bien, ningún efecto sobre esta enzima. De cualquier manera, la constancia de los niveles de HVA pueden estar contribuyendo también al incremento de los niveles de DOPAC.

Otra observación es que los efectos no fueron similares en ninguna de las tres regiones cerebrales afectadas, a excepción de los efectos sobre la NA. Esto podría explicarse en función a la formación de radicales libres mediante reacciones químicas mediadas por hierro, como la reacción de Fenton o la de Haber-Weiss (Halliwell, 1989). Para que cualquiera de estas reacciones se lleven a cabo se requiere de hierro ferroso y hierro férrico (Braugher y cols., 1986). Tomando en cuenta estos elementos se puede suponer que los contenidos regionales de hierro en el tejido nervioso pudieran estar contribuyendo en los efectos observados, ya que se sabe que la peroxidación dependiente de hierro varía entre las distintas regiones cerebrales (Subbarao y Richardson, 1990). Otra contribución importante es la de la producción de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) por medio de la MAO, a partir del cual se pueden producir radicales hidroxilo (OH). En efecto, la desaminación oxidativa de la DA y de la 5-HT por medio de la MAO es la principal vía catabólica en las terminales nerviosas de estas monoaminas, e incluso se ha sugerido que la recaptura acelerada de DA en la enfermedad de Parkinson provoca el incremento de la producción de H_2O_2 y el estrés oxidante que resulta de esto acelera la destrucción de las terminales dopaminérgicas sobrevivientes (Cohen, 1988). Sin embargo,

el hecho de que en este trabajo se encontró afectado de diferente manera el metabolismo de la DA sugiere un efecto relativamente específico de los productos resultantes de la inhalación de O₃ sobre el encéfalo. Por otro lado, no se sabe si la exposición al O₃ es capaz de acelerar el desarrollo de la enfermedad de Parkinson en personas propensas, pero sí se ha encontrado que la exposición a 1 ppm durante 1 hora facilita el desarrollo de las crisis epilépticas en el modelo del kindling amigdalino en la rata (Escalante-Membrillo, 1995).

b. Posibles implicaciones psicofisiológicas.

Con referencia a los resultados de este trabajo y a los reportados por otros autores, se puede especular acerca de las probables implicaciones que los efectos del O₃ tienen sobre la conducta. En los antecedentes se mencionaron algunos trabajos en los que se reporta que animales expuestos a diferentes concentraciones de O₃ presentan alteraciones de la conducta tales como la disminución de la actividad motora espontánea (Tepper y cols., 1982) y de la conducta de ingesta de agua (Umezu y cols., 1987). Sin embargo, el modelo hasta ahora más empleado para el estudio de los efectos del O₃ sobre el sistema nervioso central es el de la evaluación de los estados de vigilancia tanto en gatos (Paz y Bazán-Perkins, 1992), como en ratas neonatas (Haro y Paz, 1993) y adultas (Arito y cols., 1992; Huitrón-Reséndiz y cols., 1994). Se ha encontrado una disminución significativa del SP en ratas expuestas durante 24 horas a diferentes concentraciones de O₃ y a las cuales también se les encontró un aumento significativo en los niveles de 5-HT en el puente después de 24 horas de exposición (Huitrón-Reséndiz y cols., 1994). Un análisis cuantitativo del registro polisomnográfico demostró que los efectos sobre el SP se observaron a partir de una hora después de la exposición (Huitrón-Reséndiz y cols., 1995), pero en este análisis no se consideró la colecta de datos bioquímicos tomados hora por hora. En el presente reporte se observó el aumento significativo de la 5-HT en el puente

hasta tres horas después de la exposición, lo que sugiere que el efecto sobre el SP no está mediado exclusivamente por el efecto que el O_3 tiene sobre los niveles de 5-HT en el puente. En este punto hay que hacer énfasis en que el reporte de Huitrón-Reséndiz y cols. (1994) y el presente trabajo se realizaron utilizando las mismas condiciones de administración de O_3 y de disección del encéfalo de las ratas, aunque no son los mismos sujetos experimentales, por lo que los resultados obtenidos en ambos trabajos pueden ser sólo parcialmente correlacionados entre sí. Se ha propuesto la existencia de una influencia inhibitoria de los núcleos del rafe serotoninérgicos sobre los núcleos colinérgicos relacionados con la generación del SP (Steriade, 1992; Steriade y McCarley, 1990), por lo que los productos de reacción del O_3 pudieran afectar también a estos núcleos colinérgicos antes de comenzar a afectar a los núcleos serotoninérgicos. Se ha propuesto también que el sistema noradrenérgico funciona de una manera similar para la generación del SP. Adrien y Dugovic (1985) han sugerido que este sistema está involucrado en la síntesis y/o la liberación de factores inductores del SP. Cabe entonces suponer que la generación de SP se debe a una interacción de la acción de varios neurotransmisores y, aunque la NA se incrementa y posiblemente genera factores hipnógenicos desde la primera hora de exposición al O_3 , no es posible ver los efectos de tales factores en ausencia de la acción de la 5-HT. Si la generación de SP dependiera exclusivamente de la NA, entonces se hubiera encontrado que la exposición al O_3 generaría un incremento del SP. De cualquier manera, la disminución del SP durante la exposición al O_3 implica algunos trastornos en la conducta. Los efectos conductuales de la privación de SP en el humano han sido estudiados desde la década de los 60's. En algunos experimentos, como el de Dement y Fisher (1963) o el de Sampson (1966) se ha encontrado un aumento en la irritabilidad, la ansiedad y la dificultad de concentración. En otras ocasiones se han encontrado cambios psicológicos como temores masoquistas e incluso paranoides, modificaciones en el sentido de la realidad, euforia (Sampson, 1966), aumento en la

cantidad de deseos y sentimientos, y disminución en la propiedad de la forma, medido a través de la prueba de las manchas de tinta de Holtzman (Clemes y Dement, 1967), disminución de la eficiencia de las relaciones interpersonales, confusión, suspicacia e inseguridad (Agnew y cols., 1967). El problema que tienen estos estudios es que los cambios mencionados se basan principalmente en apreciaciones subjetivas y bien pudieron deberse a las expectativas de los investigadores. Se puede entonces decir que los efectos psicológicos y conductuales de la privación de SP no han sido consistentemente demostrados y que los efectos reportados pueden deberse a artefactos del procedimiento experimental o a lo inadecuado de las pruebas empleadas. Se han documentado mejor los efectos sobre modelos animales tales como la disminución de la actividad motora, también reportada como un efecto de la exposición al O₃. Es el caso de los gatos que se volvieron incapaces de saltar a una silla para conseguir su comida permaneciendo todo el tiempo en un estado de relajación profunda (Jouvet y cols., 1964). También una buena parte de los estudios están de acuerdo en que la privación de SP produce un aumento en la motivación y emoción del animal, esto presenta las siguientes características: un aumento en la ingestión de comida (Jouvet y cols., 1964), exageración de la conducta sexual (Dement, 1965) y aumento de la agresividad (Morden y cols., 1968), entre otras manifestaciones.

Por otra parte, se sabe también que la privación del sueño produce un incremento en el SOL que se correlaciona con el aumento del recambio de 5-HT en los núcleos del rafe (Sallanon y cols., 1983). Aquí se encontró un aumento del recambio en el puente y en el mesencéfalo desde la primera hora de exposición al O₃, por lo que cabría esperar que la cantidad de SOL se incremente desde esta primera hora de exposición. Huitrón-Reséndiz y cols. (1995) encontraron que las cantidades de SOL se incrementan hasta pasadas diez horas de exposición, por lo que se puede suponer que existen algunos mecanismos de compensación que permiten mantener al organismo sin alteraciones conductuales, en este caso en el SOL. Tal mecanismo de compensación debería ser capaz

de ser puesto en marcha rápidamente aunque pasado cierto tiempo de exposición también este mecanismo o se ve alterado o la disfunción provocada por el O_3 es tan grande que ya no es suficiente para compensar los déficits, por lo que el SOL se ve alterado. Otra posibilidad es que el aumento del SOL puede ser consecuencia de la disminución del SP y que se presente de manera compensatoria, correlacionándose con una disminución de la vigilia. Para lograr correlacionar con más exactitud estos estados de vigilancia con la neuroquímica cerebral y el efecto del O_3 sobre un área específica del encéfalo, están en proceso estudios electrofisiológicos simultáneamente con la toma de muestras del encéfalo mediante microdiálisis equivalentes a segmentos poligráficos de 60 minutos.

Por otro lado, se ha reportado que la sección del fascículo noradrenérgico dorsal a nivel del istmo produce en los gatos una disminución de la vigilia, acompañada de una disminución de NA en el mesencéfalo y un aumento de 5-HIAA (Petitjean y Jouvet, 1970). Si se supone que la NA juega un papel importante en el mantenimiento de la vigilia, entonces cabe suponer que un aumento de este neurotransmisor provocaría un aumento del tiempo total de la vigilia. Al tomar en cuenta también el papel de la DA sobre la vigilia, se refiere en la literatura que la disminución de DA cerebral se relaciona con un estado akinético parecido al coma acompañado de activación cortical, es decir, ocurre una disociación entre los componentes eléctricos y conductuales de la vigilia (Jouvet, 1972). Entonces: si el mecanismo dopaminérgico nigro-estriado es el responsable de la activación conductual y el mecanismo noradrenérgico originado en el locus ceruleus es responsable de la activación electroencefalográfica tónica y el O_3 incrementa estas monoaminas en las regiones anteriormente señaladas ¿Porqué el O_3 no incrementa el tiempo total de vigilia en los animales expuestos, sino que más bien la disminuye?. Para tratar de explicar esto, se argumentará de nuevo que la generación de radicales libres puede ser nuevamente la responsable de esta discrepancia, pues al peroxidar a la membrana los receptores postsinápticos podrían desensibilizarse y la transmisión se

alteraría. Este mismo modelo podría ser aplicado también para explicar la disminución de la actividad motora durante la exposición al O₃ reportada por otros autores (Tepper y cols., 1982), aunque no hay evidencia suficiente para pensar que todos los receptores de membrana tengan la misma susceptibilidad al ataque de los radicales libres. Tampoco hay que descartar de esta especulación a otros sistemas neuroquímicos que podrían estar relacionados con los diferentes estados de vigilancia y que interactúan en la modulación de los sistemas monoaminérgicos aquí estudiados, pues la interacción de todos estos sistemas es la que se refleja en el comportamiento, el cual no puede ser atribuido solamente a un neurotransmisor determinado.

El aumento progresivo de NA a nivel pontino puede discutirse también desde el punto de vista de la atención y de respuestas psicofisiológicas típicas. Es sabido que la elevación de NA incrementa la distracción en el gato y que la estimulación eléctrica del locus ceruleus incrementa la presión sanguínea, el ritmo cardíaco y dilata las pupilas (Yamamoto, 1985). Es bien probable que estas respuestas autonómicas, que no fueron evaluadas, se hayan encontrado en los animales expuestos al O₃. Estas respuestas son muy parecidas a las producidas por el estrés. No sabemos todavía si la exposición crónica al O₃ puede producir daño cardiovascular o incluso producir infartos cardíacos o cerebrales en personas propensas, pero este estado de estrés puede ser indirectamente responsable de la disminución del SP. Sin entrar en la exposición y debate teórico que conlleva la definición del estrés, solamente se mencionará que los agentes estresores pueden ser acontecimientos físicos o ambientales de carácter agradable o desagradable en el humano (Selye, 1980) y también que este agente estresor debe reunir varias características, entre éstas la falta de habilidades por parte del sujeto para hacer frente y manejar la situación que se presenta (Labrador y cols., 1990). Frankenhaeuser (1986) ha encontrado un aumento en los niveles de catecolaminas en la orina y la sangre de sujetos humanos sometidos a estrés. Pero el aumento de monoaminas que se encontró en este trabajo puede

ser atribuido al O_3 , ya que la exposición a este gas disminuye la cantidad de SP y la de V, mientras que se ha reportado que el estrés provoca la privación total del sueño, es decir, incrementa la V (Labrador y cols., 1990). Es importante hacer notar también que algunas de estas respuestas autonómicas pueden también estar mediadas por DA, neurotransmisor que también se encontró aumentado después de la exposición al O_3 , si bien no se estudiaron sus niveles en el sistema periférico. En relación a este neurotransmisor, se sabe que a nivel central participa en el control del movimiento

Los animales expuestos al O_3 presentaron taquipnea, otra respuesta autonómica. En adición, datos piloto tomados de animales con un termistor implantado para el registro poligráfico mostraron un aumento de la frecuencia respiratoria después de una hora de exposición (estudio en proceso). Se puede entonces objetar que la hiperventilación pueda ser la responsable de los cambios que se observaron en este estudio, ya que se ha venido manejando que el O_3 no llega como tal al cerebro, sino que más bien su efecto es indirecto mediante la producción de radicales libres que viajan por el torrente sanguíneo formando a su vez más radicales libres, pero se sabe que 15 minutos después de cesada la inhalación de O_3 , la frecuencia respiratoria se normaliza, pero una hora después de la supresión se mantienen todavía los efectos nocivos debidos a la exposición, con excepción de los respectivos metabolitos. Un estudio más fino de todos estos efectos podría contribuir en la búsqueda de un modelo de formación de radicales libres *in vivo*, añadido a los modelos *in vitro* que se utilizan en la actualidad, o con los modelos que utilizan la exposición a O_3 hiperbárico. Un modelo de producción de radicales libres mediante el uso del O_3 , tendría como ventaja que se podría manejar solamente con mezclas gaseosas donde este gas está presente en cantidades tan pequeñas como 1 ppm., a diferencia del uso del O_3 hiperbárico, por lo que es de imperativa necesidad continuar con este tipo de estudios para caracterizar detalladamente este modelo de formación de radicales libres los cuales se han involucrado en la generación de trastornos tales como la Enfermedad de Parkinson

VII. DISCUSION.

o la degeneración retrógrada posterior al accidente vascular cerebral y en procesos biológicos tales como el envejecimiento.

VIII. CONCLUSIONES.

De los resultados se puede entonces concluir que:

- a) Los efectos nocivos del O_3 están regionalizados en las diferentes áreas del encéfalo estudiadas.
- b) La exposición al O_3 afecta a las monoaminas cerebrales de manera progresiva en función al tiempo de exposición.
- b) No hay recuperación de los efectos sobre los niveles normales de 5-HT, NA y DA cerebral en las regiones afectadas una hora después de cesada la inhalación de O_3 .
- c) Los efectos se revierten 3 horas después de la supresión del O_3 .
- d) El metabolismo de la DA se ve afectado de distinta forma en dos rutas metabólicas diferentes.

Tales observaciones pueden sugerir que:

- e) La disminución que previamente se ha reportado sobre el SP puede ser el resultado de alteraciones en otros neurotransmisores distintos a la 5-HT más susceptibles al O_3 o a sus productos de reacción.
- f) El tiempo de permanencia en SOL durante las primeras horas de exposición puede estar compensado por algún mecanismo plástico que se altera después de diez horas de exposición o bien puede ser un efecto compensatorio consecuencia de la privación de SP.
- g) Es posible que se induzcan respuestas autonómicas como taquicardia, taquipnea, dilatación de las pupilas y modificaciones de la conductividad eléctrica de la piel después de la primera hora de exposición al O_3 .
- h) La disminución de la vigilia y de la actividad motora previamente reportada por otros autores puede deberse, en parte, a una disminución de la sensibilidad de los receptores postsinápticos a la NA y a la DA.

IX. REFERENCIAS.

- Adrien, J., y Dugovic, C. (1985) PS-inducing factors and the noradrenergic system. En: Inoué, S. y Borbély A.A. ed. *Endogenous sleep substances and sleep regulation*. Japan Scientific Societies Press. Tokio. pp. 227-236.
- Agnew, H., Webb, W.B. y Williams, R.L. (1967) Comparison of stage IV and REM stage deprivation. *Perceptual Motor Skills*. 24:851.
- Ali, S.F. y Bondy, S.C. (1989) Triethyllead-induced peroxidative damage in various regions of the rat brain. *J. Toxicol. Environ. Health*. 26:235-242.
- Arito, H., Tsuruta, H. y Oguri, M. (1988). Changes in sleep and wakefulness following single and repeated exposures to toluene vapor in rats. *Arch. Toxicol.* 62:76-80.
- Arito, H., Uchiyama, I., Arakawa, H. y Yokoyama, E. (1990). Ozone-induced bradycardia and arrhythmia and their relations 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.
- Arulison, M., Javoy-Agid, F., Feuerstein, C., Tauc, M., Verrier, M. y Mailly, P. (1982). Autofluorescence analysis of several systems of catecholaminergic nerve fibres within the rat neostriatum revealed by either restricted lesions of the substantia nigra or gamma-hydroxybutyrate. *Brain Res. Bull.* 9:355-366.
- Azmitia E.C. (1987) The CNS serotonergic system: progression toward a collaborative organization. En: Meltzer, H.Y. ed. *Psychopharmacology: the third generation of progress*. Raven Press, New York. pp. 61-73.
- Azmitia E.C. y Gannon P.J. (1986) *Advances in neurology, Vol. 43: Myoclonus*. S. Fahn y cols. ed. Raven Press, New York. pp. 407-468.
- Balis, J.U., Paterson, J.F., Lundh, J.M., Haller, E.M., Shelley, S.A. y M.R. Montgomery. (1991). Ozone stress initiates acute perturbations of secreted surfactant membranes. *Am. J. Pathol.* 138(4):847-857.
- Beck, E.G. y Schmidt, P. (1993) Umweltemedizinische gruppendiagnostische Kinderuntersuchungen 1982-1990. *Zbl. Hyg.* 193:395-418.

IX. REFERENCIAS.

- Bergonzi, P., Chiurulla, C., Cianchetti, C. y Tempesta, E. (1974) Clinical pharmacology as an approach to the study of biochemical sleep mechanisms. The action of L-DOPA. *Confin. Neurol.* 36:5-22.
- Binz, C. (1963). ozonized air: hypnotic gas. *Berl. Klin. Wochenschr.* 19:113-125.
- Bonasegla, F. y Manegati, E. (1968) Effect of administration of L-DOPA on the phases of the sleep. *Rass. Stud. Psichiat.* 57:797-804.
- Braugher, J.M. (1985) Lipid peroxidation-induced inhibition of gamma-aminobutyric acid uptake in rat brain synaptosomes: protection by glucocorticoids. *J. Neurochem.* 44:1282-1288.
- Braugher J.M., Duncan, L.A. y Chase, R.L. (1986) The involvement of iron in lipid peroxidation. *J. Biol. Chem.* 261 (22):10282-89.
- Bravo, H.A., Pérez, M. y Siliceo, M.L. (1958) *Muestreo y análisis de gases en la atmósfera*. Reporte Técnico. Dirección de Higiene Industrial, S.S.A., México, D.F.
- Bravo, H.A. y Torres, J.R. (1986) *Relationships of nitrogen oxides to oxidants in the Mexico City atmosphere during 1985*. Technical report. Proyecto CONACyT-UNAM: PCECBNA-001067. Centro de Ciencias de la Atmósfera. UNAM, México, D.F.
- Bucher, J.R., Tien, M. y Aust, S.D. (1983) The requirement for ferric in the initiation of lipid peroxidation by chelated ferrous iron. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 111:777-784.
- Chan, P.H., Kerlan, R. y Fishman, R.A. (1983) Reductions of gamma-butyric acid and glutamate uptake and (Na⁺K⁺)-ATP-ase activity in brain slices and synaptosomes by arachidonic acid. *J. Neurochem.* 40:309-316.
- Clemes, S. y Dement, W.C. (1967) Effect of REM sleep deprivation on psychological functioning. *J. Nerv. Ment. Dis.* 144:485.
- Cochrane, C.J., Scraufstatter, I.V., Hyslop, P. y Jackson, J. (1988) Cellular and biochemical events in oxidant injury. En: Halliwell, B. ed. *Oxygen radicals and tissue injury*. *FASEB*. pp 49-54.

IX. REFERENCIAS.

- Cohen G. (1988) Oxygen radicals and Parkinson's disease. En: Halliwell B. ed. *Oxygen radicals and tissue injury*. FASEB. 130-135.
- Connett R.J. y Kirshner N. (1970) Purification and properties of bovine phenylethanolamine-N-methyltransferase. *J. Biol. Chem.* 245:329-334.
- Cooper J.R., Bloom F.E. y Roth R.H. (1984) *Las bases bioquímicas de la neurofarmacología*. Manual Moderno, ed. México, D.F. pp. 179-199.
- Costa, L.G. (1992) Effect of neurotoxicants on brain neurochemistry. En: Tilson, H. y Mitchell, C. ed. *Neurotoxicology*. Raven Press, Ltd., New York.
- Craine J.E., Daniels G. y Kaufman S. (1973) Dopamine-B-hydroxylase: the subunit structure and anion activation of the bovine adrenal enzyme. *J. Biol. Chem.* 248:7838-7844.
- Dahlstrom, A. y Fuxe, K. (1964) Evidence for the existence of monoamine containing neurons in the central nervous system. I. Demonstration of monoamine in the cell bodies of brainstem neurons. *Acta Physiol. Scand.* 62:1-55.
- Dement, W.C. y Fisher, C. (1963) Experimental interference with the sleep cycle. *J. Can. Psychiat.* 8:400
- Dement, W. (1965) Recent studies on the biological role of REM sleep. *Am. J. Psychiat.* 122:404-408.
- Deutch, A.Y., Goldstein, M. y Roth, R.H. (1986) Activation of the locus coeruleus by selective stimulation of the ventral tegmental area. *Brain Res.* 363:307-314.
- Diggory, G.L. y Buckett, W.R. (1984) An automated method to measure monoamines and metabolites using elevated temperature reversed phase HPLC with electrochemical detection. Application to striatal dopamine and hippocampal serotonin turnover. *J. Pharmacol. Methods.* 11:207-217
- Escalante-Membrillo, C. (1995) Efectos del ozono en la evolución del kindling amigdalino en ratas. Tesis de maestría. Facultad de Psicología, UNAM. México, D.F.
- Fallon, J.H. y Moore, R.Y. (1978) Catecholamine innervations of the basal forebrain. *J. Comp. Neurol.* 180:545-580.

- Frankenhaeuser, M. (1986) A psychobiological framework for research on human stress and coping. En: A. Baum y J.E. Singer (eds.) *Handbook of psychology and health*. LEA, Nueva Jersey.
- Fujimaki, H., Shiraishi, F., Ashikawa, T. y Murakami, M. (1986) Changes in delayed hypersensitivity reaction in mice exposed to O₃. *Environmental research*. 43:186-190.
- Fuxe, K., Agnati, L.F., Ogren, S.-O., Kohler, C., Calza, L., Benfenati, F., Goldstein, M., Anderson, K. y Neroth, P. (1983) The heterogeneity of the dopamine systems in relation to the actions of dopamine agonists. *Acta Pharm. Suec. (Suppl 1)*. pp. 60-79.
- Galarraga, F., Corsi-Cabrera, M. y Sangri, M. (1981) Paradoxical sleep reduction after L-DOPA administration in rats. *Sleep Res*. 10:80.
- Garner, C.D. y Nachtman, J.P. (1989) Manganese-catalyzed auto-oxidation of dopamine to 6-hydroxy-dopamine in vitro. *Chem. Biol. Interact.* 69:345-351.
- Glowinski, J. y Iversen, L.L. (1966) Regional studies of catecholamines in the rat brain. Disposition of ³H-norepinephrine, ³H-dopamine and ³H-DOPA in various regions of the brain. *J. Neurochem.* 13:655-669.
- Graham, D.G. (1984) Catecholamine toxicity: a proposal for the molecular pathogenesis of manganese neurotoxicity and Parkinson's disease. *Neurotoxicology*. 5:83-96.
- Hackney, J.D., Linn, W.S., Buckley, R.D., Pedersen, E.E., Karuza, S.K., Law, D.C. y Fisher, D.A. (1975) Experimental studies on human health effects of air pollutants. I. Design and considerations. *Arch. Environ. Health*. 30:373-378.
- Halliwel, B. (1987) Oxidants and human disease: some new concepts. *FASEB J.* 1:358-364.
- Halliwel, B. (1989) Oxidants and the central nervous system: some fundamental questions. *Acta Neurol. Scand.* 126:23-33.
- Halliwel, B. y Gutteridge, J.M.C. (1984) Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem. J.* 219:1-14.
- Halliwel, B. y Gutteridge, J.M.C. (1985) The importance of free radicals and catalytic metal ions in human disease. *Mol. Asp. Med.* 8:89-193.

IX. REFERENCIAS.

- Haro, R. y Paz, C. (1993). Effects of ozone exposure during pregnancy on ontogeny of sleep in rats. *Neurosc. Lett.* 164:67-70.
- Haydon P.G., McCobb D.P. y Kater S.B. (1984) Serotonin selectively inhibits growth cone motility and synaptogenesis of specific identified neurons. *Science*, 226:561-564.
- Heninger, G.R. y Dennis, S.C. (1987) Mechanism of action of antidepressant treatments: implications for the etiology and treatments of depressive disorders. En: Meltzer, Herbert (ed.) *Psychopharmacology: the third generation of progress.* (pp. 535-52) New York: Raven Press.
- Hotchkiss, J.A., Harkema, J.R. y R.F. Henderson. (1991). Effect of cumulative ozone exposure on ozone-induced nasal epithelial hyperplasia and secretory metaplasia in rats. *Experimental Lung Research.* 15:589-600.
- Hotchkiss, J.A. y J.R. Harkema. (1992). Endotoxin or cytokines attenuate ozone-induced DNA synthesis in rat nasal transitional epithelium. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 114:182-187.
- Huitrón-Reséndiz, S., Custodio-Ramírez, V., Escalante-Membrillo, C., González-Piña, R. y Paz, C. (1994) Sleep alterations and brain regional changes of serotonin and its metabolite in rats exposed to ozone. *Neuroscience Letters.* 177:119-122.
- Huitrón-Reséndiz, S., Murillo-Rodríguez, E. y Paz, C. (1995) Serotonergic changes in pons and sleep alterations in rats exposed to different ozone concentrations. *Sleep Res.* 24A:30.
- Jimenez-Castellanos, J. y Reinoso-Suarez, F. (1985) Topographical organization of the afferent connections of the principal ventromedial thalamic nucleus in the cat. *J. Comp. Neurol.* 236(3):297-314.
- Jones, B.E. (1972) The respective involvement of noradrenaline and its deaminated metabolites in waking and paradoxical sleep: a neuropharmacological model. *Brain. Res.* 39:121-136.
- Jouvet, M. (1969) Biogenic amines and the states of sleep. *Science.* 163:32-41.
- Jouvet, D., Vimont, P., Delorme, F. y Jouvet, M. (1964) Etude de la privation sélective de la phase paradoxal de sommeil chez le chat. *C.R. Soc. Biol.* 158:756.

- Jouvet, M. (1972) Some monoaminergic mechanisms controlling sleep and waking. En: *Brain and human behavior*. Karczmar y Eccles. Springer Verlag, Nueva York.
- Kalivas, P.W., Jenés, L. y Miller, J.S. (1985) A catecholaminergic projection from the ventral tegmental area to the diagonal band of Broca: modulation by neurotensin. *Brain Res.* 326:229-238.
- Kennedy C.H., Hatch G.E., Slade R., y Mason R.P. (1992) Application of the EPR spin-trapping technic to the detection of radicals produced *in vivo* during inhalation exposure of rats to ozone. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 114:41-46
- Komulainen, H. y Bondy, S.C. (1988) Increased free intracellular Ca^{++} by toxic agents: an index of potential neurotoxicity? *Trends Pharm. Sci.* 9:154-156.
- Labrador, F.J., Cruzado, J.A., Muñoz, M. y De la Puente, M.L. (1990) El estrés: problemas e intervenciones. En: Fuentenebro, F. y Vázquez, C. ed. *Psicología médica*. Vol. 1: Psicopatología y psiquiatría. Interamericana-McGraw-Hill. Madrid. pp. 561-577.
- LeBel, C.P., Ali, S.F., McKee, M. y Bondi, S.C. (1990) Organometal-induced increases in oxygen reactive species: the potential of 2',7' dichlorofluorescein diacetate as an index of neurotoxic damage. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 104:17-24.
- Liccione, J.J. y Maines, M.D. (1988) Selective vulnerability of glutathione metabolism and cellular defense mechanism in rat striatum to manganese. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 247:156-161.
- Lindvall, O. y Björklund, A. (1983) *Chemical Neuroanatomy*. Raven Press, New York. pp. 229-255.
- Lindvall, O. y Björklund, A. (1984) *Monoamine innervation of cerebral cortex*. L. Descarries ed, T.R. Reader and H.H. Jasper, New York pp. 9-40.
- Marsden, C.A. y Martin, K.F. (1986) Involvement of 5-HT_{1A} and α_2 -receptors in the decrease 5-hydroxytryptamine release and metabolism in rat suprachiasmatic nucleus after intravenous 8-hydroxy-2-(di-n-propylamino)tetralin. *Br. J. Pharmacol.* 89:277-286.
- Masashi Ozawa, Hidekasu Fujimaki, Toru Imai, Yoshio Honda y Naohiro Watabe. (1985) Suppression of IgE antibody production after exposure to ozone in mice. *Int. Archs. Allergy appl. Immun.* 76:16-19.

- McConkey, D.J., Hartzell, P., Nicotera, P., Wyllie, A.H. y Orrenius, S. (1988) Stimulation of endogenous endonuclease activity in hepatocytes exposed to oxidative stress. *Toxicol. Lett.* 42:123-130.
- Meiners, B.A., Peters, R.E. y Mudd, J.B. (1977) Effects of ozone on indole compounds and rat lung monoamine oxidase. *Environ. Res.* 14:94-112.
- Moore, R.Y. y Bloom, F. (1978) Central catecholamine neuron systems: anatomy and physiology of the dopamine systems *Annu. Rev. Neurosci.* 1:129-169.
- Morden, B., Conner, R. Mitchel, G., Dement, W. y Levine, S. (1968) Effects of rapid eye movement (REM) sleep deprivation on shock-induced fighting. *Physiol. Behav.* 3:425.
- Mustafa, M. G. (1990) Biochemical basis of ozone toxicity. *Free Radical Biol. Med.* 9:245-265.
- Mustafa, M.G., Hacker, A.D., Ospital, J.J., Hussain, M.Z. y Lee, S.P. (1977) Biochemical effects of environmental oxidants pollutants in animal lungs. En: Lee, S.D. ed. *Biochemical effects of environmental pollutants*. Ann Arbor, MI: Ann Arbor Science Publishers, Inc. pp. 151-172.
- Mustafa, M.G., DeLucia, A.J., York, G.K., Arth, C. y Cross, C.E. (1973) Ozone interaction with rodent lung. II. Effects on oxygen consumption of mitochondria. *J. Lab. Clin. Med.* 82:357-365.
- Olson, L. Seiger, A. y Fuxe, K. (1972) Heterogeneity of striatal and limbic dopamine innervation: highly fluorescent islands in developing and adult brain. *Brain Res.* 44:283-288.
- Palomo, T. (1990) Bases neurofisiológicas y neuroanatómicas de la conducta. En: Fuentenebro, F. y Vázquez, C. ed. *Psicología médica*. Vol. 1: Psicopatología y psiquiatría. Interamericana-McGraw-Hill. Madrid. pp. 3-77.
- Paz, C. y Bazan-Perkins, B. (1992). Sleep-wake disorganization in cats exposed to ozone. *Neurosc. Lett.* 140:270-272.
- Petitjean, F. y Jouvet, M. (1970) Hypersomnie et augmentation de l'acide 5-hydroxyindoleacétique cerebral par lésion isthmique chez le chat. *C.R. Soc. Biol.* 164:2288-2293.

IX. REFERENCIAS.

- Pinsky, C. y Bose, R. (1988) Pyridine and other coal tar constituents as free radical-generating environmental neurotoxicants. *Mol. Cell. Biochem.* 84:217-222.
- Ramos, J.A., Fernández, J.J. (1990) Bases neuroquímicas de la conducta. En: Fuentenebro, F. y Vázquez, C. ed. *Psicología médica*. Vol. 1: Psicopatología y psiquiatría. Interamericana-McGraw-Hill. Madrid. pp. 79-117.
- Restrepo, I. (1992) I. Algunos antecedentes y consecuencias del problema. En: *La contaminación atmosférica en México. Sus causas y efectos en la salud*. Comisión Nacional de Derechos Humanos. pp. 9-13.
- Roth, R.H., Wolf, M.C. y Deutch, A.Y. (1987) Neurochemistry of midbrain dopamine systems. En: *Psychopharmacology: the third generation of progress*. Herbert and Meltzer ed. Raven Press, New York. pp 81-94.
- Sallanon, M, Janin, M, Buda, C. y Jouvét, M. (1983) Serotonergic mechanisms and sleep rebound. *Brain Res.* 268:95-104.
- Sampson, H. (1966) Psychological effects of deprivation of dreaming sleep. *J. Nerv. Ment. Dis.* 143:305-317.
- Schelegle, E.S., M.L. Carl, H.M. Coleridge, J.C.G. Coleridge y J.F. Green. (1993). Contributions of vagal afferents to respiratory reflexes evoked by acute inhalation of ozone in dogs. *J. Appl. Physiol.* 74(2):2338-2344.
- Schneider-Helmert, D. (1985). Clinical evaluation of DISP. En: A. Wauquier, J.M. Gaillard, J.M. Monti and M. Radulovacki (Eds.), *Sleep: Neurotransmitters and neuromodulators* (pp. 279-291) New York: Raven.
- Selye, H. (1980) *Selye's guide to stress research*. Van Nostrand, Nueva York.
- Shiman R., Akino M. y Kaufman S. (1971) Solubilization and partial purification of tyrosine hydroxylase from bovine adrenal medulla. *J. Biol. Chem.* 246:1330-1340.
- Skillen, R.G., Thienes, C.H., Cangelosi, J. y Strain, L. (1961). Brain 5-hydroxytryptamine in ozone-exposed rats. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 108:121-122.
- Spina, M.B. y Cohen, G. (1989) Dopamine turnover and glutathione oxidation: implication of Parkinson's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 86:1398-1400.

- Steriade, M. (1992) Basic Mechanism of sleep generation. *Neurology*. 42 (Suppl. 6) 9-17.
- Steriade, M. y McCarley, R.W. (1990) Neuronal control of the sleep-wake states. En: Steriade, M. y McCarley, R.W. (Eds.), *Brainstem Control of Wakefulness and Sleep*, Plenum, New York, pp. 326-353.
- Subbarao K.V. y Richardson J.S. (1990) Iron-dependent peroxidation of rat brain: a regional study. *J. Neuro. Res.* 24:224-232.
- Swanson, L.W. (1982) The projections of the ventral tegmental area and adjacent regions: a combined fluorescent retrograde tracer and immunofluorescence study in the rat. *Brain Res. Bull.* 9:321-353.
- Tepper, J.S., Weiss, B. y C. Cox. (1982). Microanalysis of ozone depression of motor activity. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 64:318-326.
- Trams, E.G., Lauter, C.J., Branderburger Brown, E.A. y Young, O. (1972). Cerebral cortical metabolism after chronic exposure to ozone. *Arch. Environ. Health.* 24:153-9.
- United States Protection Environmental Agency (1986) Properties, chemistry and transport of ozone and others photochemical oxidants and their precursors. Research triangle park. Report no. EPA/600/8-84/020bF.
- Umezu T., Shimojo, N., Tsubone, H., Suzuki A.K., Kubota K. y A. Shimizu. (1987). Effect of ozone toxicity in the drinking behavior of rats. *Arch Environ Health.* 42:58-62.
- Vega-Gleason, S. (1992) III. Como determinar las normas de calidad del aire. En: *La contaminación atmosférica en México. Sus causas y efectos en la salud*. Comisión Nacional de Derechos Humanos. pp. 43-60.
- Verney, C., Baulac, M., Berger, B., Alvarez, C., Vigny, A. y Helle, K.B. (1985) Morphological evidence for a dopaminergic terminal field in the hippocampal formation of young and adult rat. *Neurosci. Lett.* 14:1039-1051.
- Victorin, K. (1992). Review of the genotoxicity of ozone. *Mutation Research.* 277:221-238.
- Wallace, J.A. y Lauder J.M. (1983) Development of the serotonergic system in the rat embryo: an immunocytochemical study. *Brain Res. Bull.* 10:459-479.

IX. REFERENCIAS.

Weast, R.C. (1977) *CRC handbook of chemistry and physics*. 57th ed. Boca Raton, FL: CRC Press; p. D-194.

Weiner N. y Molinoff P.B. (1989) Catecholamines. En: *Basic neurochemistry: molecular, cellular and medical aspects*. G.J. Siegel, et. al. ed. 4th Ed. Raven Press, Ltd, New York.

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

Willner y Scheel-Kringer. (1990) The mesolimbic dopamine system. En: *motivation to action*, Ed. Wiley.

Wyatt, R.J., Chase, T.N., Scott, J. y Snyder, F. (1970) Effect of L-DOPA on the sleep of man. *Nature*. 228:999-1001.

Wyatt, R.J., Chase, T.N., Kupfer, D.J., Scott, J. Snyder, F. Sjoerdsma, A. y Engelman, K. (1971) Brain catecholamine and human sleep. *Nature*. 233:63-65.

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

Yamamoto, K. (1985) Biological significance of the central noradrenergic system: A study of skin cochlear evoked potential. En: Inoué, S. y Borbély A.A. ed. *Endogenous sleep substances and sleep regulation*. Japan Scientific Societies Press. Tokio. pp. 249-258.