

11281



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA

EFEECTO DE LA EXPOSICION AL OZONO DURANTE
LA GESTACION SOBRE EL DESARROLLO DEL
CEREBELO EN RATAS.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
DOCTORA EN CIENCIAS BIOMEDICAS
P R E S E N T A :
PATRICIA RIVAS MANZANO

DIRECTOR DE TESIS: CARLOS PAZ TRES



MEXICO, D. F.

2000

274387



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 esta 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.

DEDICATORIA

A la memoria de mi padre Eduardo Rivas Juárez y de mi hermano Eduardo Rivas Manzano, quienes han sido el motor de todas mis investigaciones.

A mi madre y hermanos, a mi esposo e hijos quienes han sido, son y serán la razón de mis mejores esfuerzos.

A todas las personas cuyo encuentro ha sido significativo en mi vida.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Carlos Paz Tres por su dirección.

A Tonatiuh Barrera, Rosario Ortiz, Verónica Custodio, Francisco Gutiérrez, Andrés Castell, Gloria Portales y Mari Rodríguez, por su apoyo y asistencia técnica.

A los miembros del jurado Dr. Luis Felipe Jiménez García, Dra. Concepción Gutiérrez, Dr. Carlos Paz Tres, Dr. Gabriel Gutiérrez Ospina, Dra. Teresa Fortoul van der Goes, Dra. Martha León Olea, y Dr. Jorge Larriva por sus acertados comentarios.

A todas las personas que de una u otra manera tuvieron que ver con la realización de este trabajo.

Invito a todos mis familiares y amigos a que se adjudiquen la autoría y se identifiquen entre estas páginas.

INDICE

RESUMEN.....	5
I. INTRODUCCIÓN	6
I.1 EL OZONO COMO CONTAMINANTE	6
I.2 LA EXPOSICIÓN AL OZONO COMO MODELO EXPERIMENTAL	7
I.2.1 <i>Efectos en la edad adulta</i>	7
I.2.1.1 Efectos conductuales	7
I.2.1.2 Efectos neuroquímicos y fisiológicos	7
I.2.2 <i>Efectos en el desarrollo</i>	8
I.2.2.1 Efectos conductuales y fisiológicos	8
I.3 EL OZONO COMO INDUCTOR DE ESTRÉS OXIDATIVO	9
I.3.1 <i>Estrés oxidativo y peroxidación lipídica</i>	10
I.3.2 <i>Estrés oxidativo y daño a los ácidos nucleicos (ADN y ARN)</i>	11
I.3.3 <i>Estrés oxidativo y muerte celular</i>	11
I.3.4 <i>Estrés oxidativo y desarrollo</i>	13
I.3.5 <i>Estrés oxidativo y sistema nervioso central</i>	14
I.4 CEREBELO	17
I.4.1 <i>Anatomía del cerebelo</i>	17
I.4.1.1 Lóbulo anterior	17
I.4.2 <i>Histología de la corteza del cerebelo</i>	19
I.4.3 <i>Citología, citogénesis y sinaptogénesis de la corteza del cerebelo</i>	22
I.4.3.1 Células de Purkinje.....	22
I.4.3.2 Glía.....	26
I.4.4 <i>Fisiología</i>	29
I.4.4.1 Conexiones aferentes y eferentes	29
I.4.4.2 Actividad rítmica y plasticidad	30
I.5 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA E HIPÓTESIS	32
II OBJETIVOS.....	32
OBJETIVO GENERAL	32
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	32
III MATERIAL Y MÉTODOS.....	33
III.1 ADMINISTRACIÓN DEL O ₃	33
III.2 CONDUCTA.....	34
III.3 PROCESAMIENTO HISTOLÓGICO.....	35
III.4 PLANIMETRÍA Y DENSIDAD CELULAR.....	37
III.5 INMUNOHISTOQUÍMICA.....	37
III.7 ESTADÍSTICA.....	38
IV RESULTADOS.....	39
IV.1 REPRODUCCIÓN	39
IV.2 CONDUCTUALES	39
IV.3 HISTOLÓGICOS.....	42
IV.4 PLANIMETRÍA Y DENSIDAD CELULAR.....	53
IV.5 INMUNOHISTOQUÍMICA (CORTES CORONALES Y SAGITALES).....	56
IV.5.1 <i>Anti-Sinaptofisina</i>	56

IV.5.2 Anti-PFAG.....	59
V. DISCUSIÓN	63
V.1 REPRODUCCIÓN.....	63
V.2 CONDUCTA.....	63
V.3 HISTOLOGÍA.....	65
V.4 PLANIMETRÍA Y DENSIDAD CELULAR.....	69
V.5 INMUNOHISTOQUÍMICA.....	70
<i>Anti-Sinaptofisina</i>	70
<i>Anti-PFAG</i>	71
VI. CONCLUSIONES	73
BIBLIOGRAFIA.....	74
APENDICE.....	84
TÉCNICA DE HEMATOXILINA-ÉOSINA.....	84
TÉCNICA DE LUXOL-FAST BLUE (MODIFICACIÓN DE KLÜVER Y BARRERA).....	84
REACCIÓN DE FEULGEN.....	84
TÉCNICA DE DOBLE IMPREGNACIÓN DE DEL RÍO-HORTEGA.....	85
TÉCNICA PARA CEREBELO DE CAJAL (FÓRMULA A LA HIDROQUINONA).....	85
TÉCNICA DE BIELCHOWSKY PARA AXONES.....	86
TÉCNICA INMUNOHISTOQUÍMICA PARA ANTI-SINAPTOFISINA Y ANTI-PROTEÍNA FIBRILAR ÁCIDA GLIAL.....	86

RESUMEN

La exposición prenatal al ozono (O_3) produce una reducción permanente del sueño de movimientos oculares rápidos en ratas. Además, la exposición a este contaminante en la edad adulta conduce a alteraciones motoras y bioquímicas en el sistema nervioso central (SNC). Nosotros evaluamos la hipótesis de que el *estrés oxidativo*, inducido prenatalmente por O_3 , puede producir daños morfológicos en el SNC. Se utilizaron tres camadas de ratas testigo expuestas durante la gestación al aire libre de contaminantes y una camada expuesta a 1.0 parte por millón (ppm) de O_3 . Los análisis histológico y planimétrico a doble ciego fueron realizados en cortes sagitales del lóbulo anterior del vermis cerebelar a las edades postnatales de 0, 12 y 60 días (P-0, P-12 y P-60). Previo al examen histológico se realizaron pruebas conductuales, presentando las ratas expuestas al O_3 madurez postural en la prueba de geotaxis negativa y en el ángulo de la cabeza respecto al nivel del agua en la prueba de nado, así como una disminución en el porcentaje de alternancia de 46.7% en la prueba del laberinto en T. Histopatológicamente, en la camada expuesta al O_3 , encontramos en las células de Purkinje: signos de necrosis como vacuolización citoplásmica y condensación de la cromatina a la edad P-0; alargamiento celular y dendrítico y cambios nucleolares a la edad P-12; y signos de apoptosis tales como dispersión de grumos de Nissl, fragmentación y condensación de la cromatina hacia la membrana nuclear a la edad P-60. En el análisis planimétrico, el lóbulo anterior del vermis cerebelar de la camada expuesta al O_3 fue significativamente menor al de las testigo. Para complementar la información obtenida, los cerebelos de las crías de otras tres ratas expuestas al O_3 durante toda la gestación y de las crías de otras tres ratas desarrolladas en un ambiente libre de contaminantes se procesaron para inmunohistoquímica y se compararon en los días posnatales 0, 5, 10, 15, 20 y 25, para determinar efectos sobre la astrogliá y la sinaptogénesis. Nuestras observaciones indicaron que la aplicación prenatal de O_3 produce entre los días P-10 y P-25 un decaimiento en la sinaptogénesis, evidenciada por una escasa inmunoreactividad al anticuerpo sinaptofisina en las áreas principales de sinaptogénesis como la capa molecular y los grandes glomérulos. Por otro lado, en las ratas expuestas al O_3 se observó, entre las edades P-15 y P-25, una gliosis focal con células de Bergmann intensamente inmunoreactivas al anticuerpo proteína fibrilar ácida glial adyacentes a las células de Purkinje. Concluimos que como resultado del *estrés oxidativo* inducido por la exposición a altas concentraciones de O_3 (1.0 ppm) durante la gestación, se produce muerte neuronal y se afectan en el corto, mediano y largo plazo los programas de desarrollo neuronal, provocando daños morfofisiológicos permanentes en el SNC de la rata.

I. INTRODUCCIÓN

I.1 EL OZONO COMO CONTAMINANTE

El hombre ha transformado de manera drástica la atmósfera, con el empleo de combustibles fósiles y sustancias químicas diversas que producen materia o energía que no puede eliminarse de manera eficaz del sistema, por lo que se modifica constantemente la composición atmosférica (Suárez, 1991).

Además de los contaminantes primarios derivados de la utilización de diversas fuentes de energía (bióxido de azufre, monóxido de carbono, hidrocarburos, bióxido de nitrógeno, óxidos de nitrógeno, etc.), en la atmósfera están presentes contaminantes secundarios como las emisiones ácidas y las fotoquímicas. Las primeras se deben a la transformación química del bióxido de azufre y de los óxidos de nitrógeno, y las segundas se producen cuando los rayos ultravioleta actúan sobre el bióxido de nitrógeno (NO₂) liberando oxígeno atómico, radicales orgánicos, nitrato de peroxiacetilo y ozono (O₃) (Favez, 1986).

En ocasiones el O₃ u otro contaminante tiene relevancia sobre los demás y es característico de una ciudad, pudiendo estar presente todo el año o parte de este, por lo que es importante conocer sus efectos nocivos.

La zona Metropolitana de la Ciudad de México se localiza en una cuenca cerrada a una altitud de 2240 metros sobre el nivel del mar, se encuentra rodeada de montañas con altitudes medias de 600-800 m., está sujeta a contrastes térmicos entre las áreas rurales y urbanas que dan como resultado una alta incidencia de inversiones térmicas, las cuales mantienen la capa de aire contaminado cerca de la superficie. La frecuencia de inversiones térmicas es de aproximadamente 200 noches por año, especialmente durante la noche y primeras horas de la mañana (Jáuregui, 1993).

En México, la Comisión Metropolitana para la Prevención y Control de la Contaminación Ambiental en el Valle de México y el Sistema denominado Red Automática de Monitoreo Atmosférico, se encargan de medir los niveles de O₃, bióxido de azufre, partículas suspendidas totales y algunos otros contaminantes (Cano-Valle y col., 1991).

El Norte de la ciudad se caracteriza por contaminantes como partículas suspendidas totales, bióxido de azufre y metales pesados, mientras que el área central tiene niveles elevados de monóxido de carbono (CO) y óxidos de nitrógeno (NO_x) y el Sur por altos niveles de contaminantes secundarios como el O₃ (Cano-Valle y col., 1991).

Se presentan anualmente un gran número de ocasiones en las que se sobrepasan los límites aceptables para la calidad del aire. Así, para el O₃ los límites de 0.11 partes por millón (ppm), por una hora, un día por año (EPA, 1991) son rebasados durante varios días al año en la Ciudad de México (Instituto Nacional de Ecología, 1993). El nivel de O₃ más alto reportado en el ámbito mundial es de 0.6 ppm (National Research Council Committee, 1977).

Con el objeto de comprender los efectos nocivos del O₃ como contaminante, se han realizado estudios epidemiológicos que muestran un aumento progresivo en la asistencia a centros hospitalarios

(Liepfert, 1993) y en el ausentismo escolar (Romieu y col., 1992) relacionados con los altos índices de contaminación ambiental por O₃. Así, en diferentes países del mundo, como en México (Spektor y col., 1988; Romieu y col., 1992; Castillejos y col., 1992), en los Estados Unidos (Kilburn y col., 1992; Gerrity y col., 1994), en Francia (Boissavy-Vinau., 1995) y en Alemania (Schwartz y col., 1991) se ha demostrado una clara relación entre las enfermedades respiratorias y la exposición al O₃ por contaminación ambiental.

Debido a que el O₃ es un gas, las alteraciones más frecuentes sobre la salud se refieren al sistema respiratorio. Estudios histológicos en individuos originarios de ciudades no contaminadas que fueron expuestos durante 60 días a los niveles de O₃ presentes en la Ciudad de México mostraron signos francos de displasia en la mucosa nasal (Calderon y Roy, 1993). También han sido demostradas hiperplasia y metaplasia en el epitelio de la mucosa nasal con un alto nivel de replicación de DNA en ratas expuestas a 0.8 ppm de O₃ durante seis horas (Johnson y col., 1990; Hotchkiss y col., 1991). Mientras que a nivel bronquioalveolar se ha reportado hiperplasia de los neumocitos tipo II y de las células no ciliadas después de 2 a 3 días de exposición con 3.0 ppm de O₃ durante cuatro horas (Hiroshima y col., 1987).

Estudios de campo y epidemiológicos han indicado efectos agudos como irritación en los ojos, nariz y garganta, dolor en el pecho, tos, dolor de cabeza y disminución en las pruebas funcionales del aparato respiratorio en niños y en asmáticos a dosis menores de 0.1 ppm de O₃ (Hackney y col., 1975, Hackney y col., 1977, Lategola y col., 1980).

I.2 LA EXPOSICIÓN AL OZONO COMO MODELO EXPERIMENTAL

I.2.1 Efectos en la edad adulta

I.2.1.1 Efectos conductuales

En ratones se ha evaluado la latencia de huida a la exposición al O₃, midiendo el tiempo requerido por los ratones para escapar de sus emanaciones, encontrándose que en 10 minutos el 100% de los animales lo lograron (Tepper y col., 1985). Se ha demostrado que la actividad motora gruesa, como la carrera, disminuye 50% en ratones expuestos por seis horas de 0.2 a 0.5 ppm de O₃ (Murphy, 1964). La carrera y el tiempo de arranque disminuyen progresivamente con el aumento de 0.5 a 1.0 ppm en la concentración de O₃ (Tepper y col., 1982). También la conducta operante en ratas expuestas durante 6 horas entre 0.1 y 2.0 ppm de O₃, muestra una disminución lineal de la conducta aprendida (Weiss y col., 1981). Así mismo, disminuyen las conductas de bebida e ingesta en ratones (Umezu y col., 1993).

I.2.1.2 Efectos neuroquímicos y fisiológicos

Estudios neuroquímicos han reportado aumentos en el metabolismo proteínico del encéfalo en ratas expuestas a 1.0 ppm de O₃ (Benuck y col., 1993) y en los niveles de neurotransmisores implicados

en la generación del sueño en ratas expuestas a diferentes tiempos y dosis (1.0-1.5) de O₃ (Huitrón-Resendiz y col., 1994, Paz y Huitrón-Resendiz, 1996, González-Piña y Paz, 1997).

Estudios fisiológicos han indicado un aumento de la frecuencia del potencial de acción el nervio nasopalatino de la rata, expuesta a 5 ppm de O₃ durante una hora (Kulle y Cooper, 1975), y déficit funcional en la vía visual de la rata expuesta a 1.5 y 3.0 ppm de O₃ consistente en una disminución de los componentes de los potenciales visuales evocados en la corteza visual y el núcleo geniculado lateral (Custodio-Ramírez y Paz, 1997). Así como una disminución significativa del sueño de movimientos oculares rápidos (MOR) en ratas (Arito y col., 1992, Paz y Huitrón-Resendiz, 1996) y gatos (Paz y Bazan-Perkins, 1992) expuestos a concentraciones de 0.2 a 1.2 ppm de O₃.

1.2.2 Efectos en el desarrollo

Estudios en ratas y ratones después de la exposición al O₃ han mostrado efectos diversos sobre el desarrollo. En ratas, la exposición a 0.2 ppm de O₃ en los días 6-9 de gestación disminuye el número de implantes. La exposición a 1 ppm durante el final de la gestación produce retraso en el crecimiento neonatal, y la exposición a 1.49 ppm a la mitad de la gestación aumenta las reabsorciones embrionarias *in útero* y reduce el peso fetal y la osificación (Kavlock y col., 1979). En ratones, la exposición a 0.2 ppm de O₃ durante la gestación y lactancia produce una disminución en el tamaño de la camada y aumento en la muerte neonatal (Veninga, 1967). También se ha encontrado que la exposición a 0.2, 0.4 y 0.6 ppm de O₃ desde el inicio y hasta el día 17 de gestación no produce efectos significativos sobre el patrón reproductivo ni sobre el desarrollo somático (Petruzzi y col., 1994). Así mismo, la exposición al O₃ (0.4, 0.8 y 1.2 ppm) no afecta significativamente la duración de la gestación, el tamaño de la camada, la proporción de sexos ni la mortalidad neonatal (Bignami y col., 1994).

1.2.2.1 Efectos conductuales y fisiológicos

La exposición de ratones al O₃ (0.2, 0.4 y 0.6 ppm) desde el inicio hasta el día 17 de gestación disminuyó la exploración y aumentó el autocuidado en los periodos prejuvenil y juvenil (Petruzzi, 1994). Por otro lado, la exposición durante la gestación tardía (E-17-20) produjo retardo de los reflejos tempranos (reflejo de enderezamiento, apertura de ojos) y en la conducta en campo abierto (erguirse sobre las patas posteriores, movimientos horizontales y autocuidado) (Kavlock y col., 1980).

En ratones jóvenes y adultos, algunas conductas se encontraron disminuidas cuando la exposición al O₃ (0.6 ppm) se aplicó durante toda la gestación y hasta los días posnatales 22-26, como son: erguirse sobre sus patas posteriores, el olfateo, la actividad de autocuidado y la adquisición de la conducta de evitación pasiva (Dell'Omo y col., 1995a; Dell'Omo y col., 1995b).

La exposición de ratones al O₃ (0.6 ppm) durante toda la gestación y extendida hasta el destete produjo en la edad adulta un aumento significativo de la velocidad de nado y una tendencia a girar a la izquierda, mientras que los controles giraron preferentemente a la derecha (Dell'Omo y col., 1995b).

El efecto fisiológico más sorprendente ha sido la disminución permanente del sueño de movimientos oculares rápidos encontrada en ratas a los 30, 60 y 90 días de edad estudiadas en un

ambiente libre de contaminantes cuyas madres permanecieron expuestas 12 horas diarias durante toda la gestación a 1.0 ppm de O₃ (Haro y Paz, 1993).

I.3 EL OZONO COMO INDUCTOR DE *ESTRÉS OXIDATIVO*

A través de la vida en una atmósfera oxigenada, las especies reactivas de oxígeno (incluidos los radicales libres) se forman constantemente. Estas especies reactivas de oxígeno atacan todas las sustancias orgánicas de las células (Günther y col., 1993).

Cuando la producción de radicales libres aumenta y el atrapamiento de estos radicales o la reparación de las moléculas oxidadas disminuye, o ambos, entonces se habla de *estrés oxidativo*. Este desequilibrio resulta en la formación y acumulación de moléculas oxidadas que pueden causar disfunción de las células y provocar su muerte (Simonian y Coyle, 1996).

Los radicales libres, especialmente el radical hidroxilo (HO·) y el peroxinitrito (ONOO-) pueden producir alteración en los lípidos, las proteínas y el ADN (Beckman, 1994). La incorporación de radicales libres a los ácidos grasos poliinsaturados inician una cadena de reacción en la cual se forman otros radicales libres (Halliwell y Gutteridge, 1985).

El daño oxidativo a los lípidos, llamado peroxidación lipídica, produce una pérdida progresiva de la fluidez de la membrana, y aumenta la permeabilidad a iones como el Ca²⁺. Los radicales libres dañan las proteínas activándolas o inactivándolas, y actúan sobre las enzimas incrementando su susceptibilidad a la proteólisis, la cual está involucrada en la degradación de enzimas y en la acumulación de sus formas alteradas. Los radicales libres también pueden dañar al ADN, el radical hidroxilo modifica los fosfatos de ribosa y nucleósidos de pirimidina y nucleótidos y reacciona con el azúcar fosfatado de la cadena rompiendo los filamentos de ADN (Simonian y Coyle, 1996).

Se sabe que el O₃ es uno de los oxidantes más poderosos, y ejerce su acción biológica por destrucción oxidativa de biomoléculas. La capacidad de penetración del O₃ en los tejidos pulmonares difícilmente puede rebasar la barrera respiratoria y atacar a las células subyacentes. El daño celular por O₃ se asocia a dos principales mecanismos: la oxidación de ácidos grasos a peróxidos ácidos y la oxidación de grupos sulfhidrilo, aminoácidos de enzimas, proteínas y péptidos. Esto hace a las membranas celulares blancas altamente sensibles (Pryor, 1992; Victorin, 1992).

El daño a distancia, inducido por O₃, se asocia a los radicales libres (como el anión superóxido O₂⁻, el perhidroxilo HO₂·, el hidroxilo HO·, y el peróxido de hidrógeno H₂O₂) derivados de la reacción inicial con este gas, que pueden difundirse desde el sitio de formación a otros lugares aumentando la peroxidación de ácidos grasos en sitios alejados del origen de la reacción (Halliwell y Gutteridge, 1985; Pryor, 1992; Menzel, 1994). En las reacciones del O₃ con los ácidos grasos también se forman epóxidos y dialdehídos (Menzel, 1994), tales como el 4-hidroxi-2-nonenal y el malondialdehído, los cuales podrían ser los responsables de la extensión del daño celular a estructuras distantes (Mustafa, 1990; Steinberg y col., 1990; Kirichenko y col., 1996). Además de provocar peroxidación lipídica de los ácidos grasos poliinsaturados, el O₃ también es capaz de modificar la configuración de las proteínas, modificando la permeabilidad de las membranas y la respuesta celular (Victorin, 1992).

Se ha propuesto que el daño provocado por la peroxidación de los epitelios en el sistema respiratorio podría diseminarse hacia otros territorios orgánicos a través del torrente circulatorio provocando algunos efectos extrapulmonares como consecuencia de la exposición al O₃ (Moore y col., 1980).

Se han encontrado cambios morfológicos y en la actividad enzimática de las células sanguíneas tales como la disminución de glutatión (GSH) y de la actividad de la acetilcolinesterasa en eritrocitos provenientes de ratones expuestos a 8.0 ppm de O₃ *in vivo* durante 4 horas (Goldstein y col., 1968). Además, se ha demostrado que las enzimas glutatión peroxidasa y glutatión reductasa son susceptibles al daño oxidativo por O₃ (Tabatabaie y Floyd, 1994).

Se han demostrado algunos otros signos indicadores de daño oxidativo inducido por O₃, como actividad proteolítica alterada en el hígado (Zidenberg-Cherr y col., 1991), inhibición en la síntesis de proteínas en el corazón (Kelly y Birch, 1993) y alteración de los sistemas antioxidantes en el cerebro (Benuck y col., 1993).

I.3.1 *Estrés oxidativo y peroxidación lipídica*

Los ácidos grasos poliinsaturados de las membranas se consideran entre los principales blancos de los radicales libres durante los eventos de *estrés oxidativo*. Por la vía de la peroxidación lipídica se generan varios productos de degradación que alteran drásticamente la estructura y función de la membrana (Tappel, 1973; Pushpendran y col., 1994).

Los dobles enlaces dentro de la estructura membranal favorecen que los átomos de hidrógeno sean removidos por las especies reactivas de oxígeno como el radical hidroxilo. Los radicales de carbono de los ácidos grasos poliinsaturados sufren entonces rearrreglo molecular para formar dienos conjugados más estables. El sostenimiento de la peroxidación lipídica combina los dienos conjugados con oxígeno para formar radicales peroxilo. Los radicales peroxilo sustraen el hidrógeno de las cadenas de ácidos grasos adyacentes, con lo que se propaga el proceso de peroxidación lipídica. Además, los radicales peroxilo se pueden combinar con los átomos de hidrógeno liberados para formar hidroperóxidos, los cuales en presencia de fierro (Fe²⁺) se descomponen en radicales alcoxi y aldehídos.

Mediante este mecanismo, la acción de un solo radical hidroxilo puede iniciar una reacción en cadena que genera sustancias tóxicas que producen rigidez de la membrana, alteran su integridad y dañan sus proteínas (Coyle y Puttfarcken, 1993).

No obstante que se forman un gran número de aldehídos durante la peroxidación lipídica, tres de ellos han sido ampliamente investigados como implicados en el daño celular, estos son: el 4-hidroxi-2-nonenal, el 4-hidroxi-2-hexenal y el malonaldehído (Mustafa, 1990; Steinberg y col., 1990, Kirichenko y col., 1996).

La peroxidación lipídica y el 4-hidroxi-nonenal se han involucrado en la muerte de células pulmonares después de la exposición a 0.25 y 2.0 ppm de O₃ (Kirichenko y col., 1996).

También se ha demostrado en el SNC que la generación de radicales libres inician la peroxidación lipídica, inhiben la función de mitocondrias aisladas del cerebro (Hillered y Ernster, 1983), inhiben la

actividad de la ATPasa de Na⁺ y K⁺ en cortes de cerebro (Chan y col., 1983), y conducen a la muerte neuronal (Zirkle y col., 1965; Chan y col., 1984).

1.3.2 *Estrés oxidativo* y daño a los ácidos nucleicos (ADN y ARN)

Se han identificado cuatro mecanismos por los cuales el *estrés oxidativo* puede alterar la expresión génica.

1) Los radicales libres estimulan cambios en la distribución celular de los iones. Se ha postulado que un aumento en la tasa de generación de radicales libres durante el desarrollo puede estimular la liberación de iones desde las mitocondrias, particularmente iones de calcio y entonces iniciar una cascada de eventos bioquímicos que conducen a cambios en la expresión génica.

2) La síntesis de proteínas puede verse afectada por las interacciones directas de los radicales libres con la cromatina que contiene los genes que controlan dicha síntesis.

3) Las influencias oxidativas con el citoesqueleto y la matriz nuclear afectan la configuración de la cromatina y el procesamiento del ARN premensajero.

4) Los cambios en el estado REDOX causado por radicales libres hacen el medio celular vulnerable a factores preexistentes pero inactivos, que se activan al cambiar la expresión génica por alteración del control de la actividad traduccional (Allen y Balin, 1989).

Un factor físico que modula fuertemente la expresión génica es el arreglo espacial de la cromatina, es decir su configuración (Weintraub y Groudine, 1976). El estado REDOX así como el medio iónico afectan la configuración de la cromatina (Aaronson y Woo, 1981) y la actividad génica.

Ha sido claramente demostrado que los oxidantes inducen la formación de cromatina esponjosa en una variedad de organismos (Bochner y col., 1984), afectan también la matriz proteica nuclear y el carioesqueleto (Mc Connell y col., 1987). Es sabido que el carioesqueleto juega un papel importante en el procesamiento del ARN al proveer puntos de anclaje para el ARN premensajero (Herman y col., 1978). Se ha demostrado que el daño al carioesqueleto por el radical superóxido estimula desde el núcleo la liberación de ARN no procesado (Schroder y col., 1987). El citoesqueleto transmite recíprocamente información entre la membrana celular y la cromatina (Scott, 1984). Durante el desarrollo los gradientes iónicos y REDOX se establecen en estadios embrionarios (Kretsinger, 1980; Borgens y col., 1979), los cambios de estos durante el desarrollo tienden a ser extremadamente largos y usualmente permanentes (Allen y Balin, 1989).

1.3.3 *Estrés oxidativo* y muerte celular

La homeostasis del organismo requiere un balance entre los procesos de proliferación y muerte (Thompson, 1995). La muerte celular es un aspecto fundamental en el mantenimiento de los tejidos adultos, así como en la diferenciación embrionaria, morfogénesis y envejecimiento (Soutschek y Supanc, 1996).

Con base en aspectos bioquímicos y morfológicos se distinguen dos formas de muerte celular: una forma es la muerte patológica o accidental denominada necrosis, que no es controlada genéticamente, y

la otra comprende una forma natural o programada denominada apoptosis. Mientras que la necrosis ocurre en respuesta a condiciones de daño (daño físico, deficiencia de oxígeno, envenenamiento, etc.), la apoptosis es más comúnmente encontrada durante el desarrollo embrionario, pero también puede resultar de una amplia gama de estímulos tóxicos que inducen la respuesta desregulada de ciertos genes (Yildiz y col., 1996), por ejemplo c-Myc, que ha sido implicado en la transformación celular, diferenciación, progresión del ciclo celular y muerte programada (Tomei y Cope, 1994).

La necrosis afecta grupos de células contiguas, las cuales muestran hinchamiento, vacuolización y ruptura de la membrana plasmática y de organelos. Como una reacción a la salida del contenido celular hacia el espacio extracelular se desencadena una reacción inflamatoria en el tejido. En contraste la apoptosis generalmente afecta células aisladas. Estas células sufren condensación nuclear y citoplásmica que resulta en una apariencia picnótica del núcleo. Eventualmente la célula se rompe en un número de fragmentos limitados por membrana que contienen organelos intactos y una fracción nuclear de 180 a 200 pares de bases o múltiplos, llamados cuerpos apoptóticos, los cuales son rápidamente fagocitados por células vecinas o macrófagos y no ocurre reacción inflamatoria (Zakeri y Ahuja, 1996).

Actualmente se considera a la apoptosis como una forma de muerte celular programada que se activa por una variedad de factores intrínsecos y extrínsecos, que permiten eliminar células que ya no son necesarias como las producidas en exceso o bien las que se han desarrollado mal o sufrieron daño genético. Este programa de suicidio celular que consiste en la autodigestión controlada de la célula presenta al menos cuatro fases secuenciales 1) fase de inducción dependiente de un estímulo, 2) fase efectora, durante la cual la señal inicial determina el encendido de un programa letal, 3) fase de ejecución, durante la cual se da la muerte de la célula con la activación de proteasas y endonucleasas, que desmontan de una manera sumamente ordenada la estructura subcelular y 4) fase de degradación de la célula y cuerpos apoptóticos dentro de macrófagos o células vecinas, lo cual evita la reacción inflamatoria (Thompson, 1995; Gerschenson y Rotello, 1992, Steller, 1995).

El programa genético para la apoptosis está regulado por varias proteínas pequeñas. El factor genético represor de la apoptosis más importante es el Bcl-2, otros factores como C-alb y H-ras tienen el mismo efecto. Los inductores de la apoptosis son el c-Myc, el p-53, el c-Fos, y varias caspasas (ICE proteasas), los cuales bajo ciertas circunstancias desencadenan la apoptosis (Fryer, 1995).

Se ha sugerido que un modelo para el mecanismo de la apoptosis puede involucrar la generación de radicales libres en las cadenas de transporte de electrones asociadas con las membranas de la mitocondria, retículo endoplásmico y núcleo, resultando en una peroxidación lipídica sostenida (Buttke y Sandstrom, 1994). Uno de los factores genéticos que controlan la apoptosis, la proteína llamada Bcl-2 esta asociada a sitios específicos de las membranas intracelulares. La sobreexpresión de Bcl-2 suprime completamente la peroxidación lipídica e inhibe la apoptosis y su posible función puede ser la regulación de la vía antioxidante en los sitios de generación de radicales libres (Benitez-Bibriesca, 1996).

Aparte de la Bcl-2 y otras proteínas que interactúan como la Bax, existen otros muchos factores bioquímicos no genéticos que puede limitar el mecanismo apoptótico de la célula. Sobre todo antioxidantes como la N-acetilcisteína, la enzima glutatión peroxidasa, el ascorbato y la vitamina E (Benitez-Bibriesca, 1996).

El *estrés oxidativo* puede inducir muerte celular por necrosis. El ataque de radicales libres sobre los lípidos puede alterar los gradientes iónicos de las membranas, producir la ruptura de la membrana plasmática y conducir a la muerte de la célula (Simonian y Coyle, 1996). El *estrés oxidativo* también puede producir muerte de tipo apoptótico. El daño oxidativo al ADN es un disparador de la apoptosis (Myers, 1980). El ADN oxidado activa una enzima nuclear, la poli ADP ribosa polimerasa (PARP) que está involucrada en la reparación del ADN. La proteólisis de la PARP evita que esta se reclute en los sitios de ADN e induce apoptosis (Nicholson y col., 1995). También el daño o desequilibrio de los sistemas antioxidantes pueden desencadenar la apoptosis. Neuronas corticales que se hacen crecer en un medio bajo en cisteína que depleta el GSH, sufren apoptosis (Ratan y col., 1994). La inhibición de superóxido dismutasa (SOD) puede inducir apoptosis en cultivos de neuronas espinales (Rothstein y col., 1994).

Otro mecanismo importante de muerte en el SNC es la excitotoxicidad, la cual se refiere a la degeneración neuronal que sigue a un insulto como hipoxia, isquemia y trauma en donde están involucrados los neurotransmisores excitatorios como el glutamato (Coyle y Puttfarcken, 1993). Se ha reportado tanto muerte de tipo necrótico como apoptótico por excitotoxicidad (Portera-Cailliau y col., 1995).

El *estrés oxidativo* se ha señalado como mediador de la muerte por excitotoxicidad (Beal, 1992). Siguiendo la activación de los receptores glutamatérgicos N-Metil-D-Aspartato (NMDA) y de ácido kaínico (KA) el número de radicales libres aumenta (Lafon-Cazal y col., 1993), produciendo daño a los lípidos y a las defensas antioxidantes que se oponen a la muerte celular (Dykens y col., 1987; Miyamoto y col., 1989). Esto puede conducir a un ciclo autoperpetuado en el cual la activación de los receptores de glutamato aumenta los radicales libres, lo cual puede conducir a mayor activación de los receptores y así sucesivamente (Simonian y Coyle, 1996).

1.3.4 *Estrés oxidativo* y desarrollo

Las variaciones en el suministro de oxígeno y su metabolismo durante el desarrollo de los mamíferos influyen en la diferenciación de las células progenitoras (Allen, 1991), la tasa de crecimiento celular (Allen y Ballin, 1989) y pueden modular la expresión génica (Sohal y Allen, 1986, 1988). Para contrarrestar estas influencias, las células contienen defensas antioxidantes que responden a las variaciones en la producción de oxidantes, pero durante el desarrollo, los sistemas antioxidantes tales como la vitamina E, la glutatión peroxidasa y la superóxido dismutasa están reducidas de 5 a 10 veces respecto a los tejidos maternos, por lo que el *estrés oxidativo* inducido por agentes externos puede ser más dañino en los tejidos fetales (Günther y col., 1993).

La mayoría de las vías de protección y eliminación de tóxicos que están presentes en el organismo adulto, son escasas y de acción limitada en el embrión. El GSH ha sido demostrado en el embrión y en el saco vitelino de rata hacia el décimo día embrionario y puede representar el principal recurso de la protección celular frente a embriotóxicos químicos (Harris, 1993). Además de su papel en la detoxificación química, al GSH también se le ha involucrado en la regulación de la síntesis de macromoléculas, del transporte celular, del mantenimiento de la integridad de la membrana, del control

de la proliferación y diferenciación celulares (Allen y Venkatraj, 1992), así como en el control de la expresión de los genes de muerte programada (Fernandes y Cotter, 1994). Se ha demostrado que los genes que juegan un papel importante en la regulación positiva o negativa de la proliferación/diferenciación celular también están involucrados en la muerte celular programada (apoptosis) (Driscoll, 1995). Se ha postulado que el inicio del daño a los embriones por productos tóxicos depende en gran medida de la formación de glutatión disulfuro (GSSG), la cual puede ocurrir por la interacción de la GSH con radicales libres (Hiranruengechok y Harris, 1993)

La peroxidación de los lípidos membranales es también una reacción básica involucrada en las alteraciones de la membrana durante procesos fisiológicos normales como crecimiento, regeneración y desarrollo (McCay, 1981; Sohal y Allen, 1986; Devasagayam, 1986). Se ha sugerido que el papel de la peroxidación lipídica durante el desarrollo es el control de la proliferación celular. Los órganos que crecen rápidamente durante el desarrollo y los tejidos en regeneración tienen bajos niveles de peroxidación lipídica (McCay, 1981; Sohal y Allen, 1986; Devasagayam, 1986).

En general el cerebro tiene bajos niveles de peroxidación lipídica en el periodo fetal y neonatal, quizá debido a bajos niveles de sustratos para la peroxidación. Una susceptibilidad reducida para la peroxidación se asocia siempre con un aumento en la proliferación. Una posible explicación puede ser que los productos de la peroxidación lipídica tales como aldehídos y peróxidos son citostáticos (Esterbauer y col., 1991), de manera que bajos niveles de peroxidación producirán correspondientemente bajos niveles de estos componentes citostáticos y permitirán una tasa alta de proliferación como se observa durante el desarrollo prenatal y postnatal (Pushpendran y col., 1994). Otros estudios han sugerido que los oxidantes producidos durante la peroxidación lipídica influyen la expresión génica durante el desarrollo y la diferenciación (Allen y Balin, 1989; Burdon y Rice-Evans, 1989).

Durante el desarrollo la proteína Bcl-x (otro miembro de la familia Bcl-2) juega un papel muy importante en el cerebro (Mizuguchi, 1996), ya que limita la peroxidación lipídica al regular la vía antioxidante en los sitios de generación de radicales libres (Benitez-Bibriesca, 1996), por lo que el daño en sus sitios blanco, causa muerte masiva de neuronas en el sistema nervioso central fetal (Motoyama y col., 1995).

I.3.5 Estrés oxidativo y sistema nervioso central

Un estudio de aproximadamente cien enfermedades del sistema nervioso (enfermedades degenerativas, epilepsia, trauma, anoxia-isquemia, exposición a toxinas, radiación) ha indicado que el *estrés oxidativo* es un común denominador en todas ellas. En la mayoría de los casos los radicales libres son consecuencia del daño tisular, pero su presencia empeora y amplifica la patología (Gutteridge, 1993).

El SNC es altamente susceptible al daño oxidativo provocado por la presencia de radicales libres (Harman, 1983; Floyd y col., 1984), esta susceptibilidad se ha atribuido a que el sistema nervioso posee un alto contenido de ácidos grasos poliinsaturados, a que las células nerviosas tienen un alto consumo de oxígeno, a la existencia de un bajo nivel de sustancias amortiguadoras tales como el glutatión y otras

enzimas antioxidantes, así como a la misma producción endógena de radicales libres que se generan durante el metabolismo celular (Mizumo y Ohta, 1986; Kaplan, 1991; Evans, 1993).

Uno de los modelos en los que el efecto del *estrés oxidativo* ha sido mejor valorado es durante los episodios de anoxia-isquemia. Los radicales libres juegan un papel importante en el daño cerebral por isquemia, además, una proporción significativa del daño sucede durante el restablecimiento de la circulación (reperusión). Después de la anoxia los niveles de ácidos grasos aumentan posiblemente debido a la activación por calcio de las fosfolipasas. Estos ácidos grasos dañan las mitocondrias e inhiben la adenosin trifosfatasa de Na⁺ y K⁺. La elevación de los ácidos grasos poliinsaturados y la subsecuente formación de prostaglandinas y leucotrienos alteran la hemodinámica y genera radicales libres. Los radicales libres causan daño a las membranas celulares a través de la peroxidación de los fosfolípidos. Después de un episodio de anoxia-isquemia, al restablecerse la circulación, la presencia de oxígeno puede iniciar la formación de más radicales de oxígeno reactivos, los cuales subsecuentemente pueden agravar el daño al tejido nervioso. De manera similar, la formación de prostaglandinas aumentan durante la reperusión (Norenberg y Bruce-Gregorios, 1997).

Las alteraciones morfológicas después de un episodio de isquemia-reperusión, son diversas, pues dependen de la interacción de un número variable de factores complejos, entre ellos, la severidad y duración del episodio, el estado nutricional, la presión intracraneal, la edad del individuo, entre otros. Sin embargo, el patrón general de una encefalopatía anóxica-isquémica muestra al tejido nervioso blando e hinchado, la sustancia gris se observa oscura o pálida. Durante las primeras horas el neuropilo se hace esponjoso debido al hinchamiento de las dendritas y de los astrocitos, también se alteran las propiedades tintoriales de las neuronas y de la glía. Poco después se observan signos inequívocos de daño neuronal, las neuronas se encogen y pierden los cuerpos de Nissl, el citoplasma se hace eosinófilo y el núcleo se hace picnótico. En pocos días hay una disolución gradual y desaparición de la neurona, seguida de hiperplasia endotelial, reacción microglial y astrogliosis. En la corteza cerebral se afecta especialmente la profundidad de los surcos (Norenberg y Bruce-Gregorios, 1997).

Muchas más neuronas mueren por necrosis después de ser atacadas por los radicales libres que se liberan de las células inflamatorias y por sustancias químicas que escapan de las células que están muriendo, en particular el neurotransmisor glutamato. Pero muchas neuronas, menos dañadas, encienden su programa de muerte, sobre todo después que la reperusión conduce a un aumento en la producción de radicales libres (Duke y col., 1996). Tanto en la necrosis como en la apoptosis el estímulo patológico aumenta la permeabilidad de la membrana mitocondrial, secundariamente se produce disfunción membranal que conduce a una catástrofe bioenergética que culmina en la pérdida de la integridad de la membrana (necrosis) o en la activación de proteasas apoptogénicas y la posterior activación de endonucleasas (apoptosis) (Kroemer y col., 1998).

La gliosis como un evento universal en respuesta al daño neuronal en el sistema nervioso central (O'Callaghan, 1993), ocurre también durante la isquemia-reperusión y precede a la aparición de la necrosis neuronal. Morfológicamente se caracteriza por la presencia de un gran número de astrocitos reactivos, que se distinguen de los normales por su gran tamaño, el engrosamiento de sus procesos y por el aumento en cantidad y capacidad tintorial de sus filamentos intermedios (PFAG). Los astrocitos

son especialmente resistentes al daño oxidativo, por su alto contenido de antioxidantes y por su capacidad de regenerar el glutatión y el ascorbato. La gliosis en condiciones de estrés oxidativo está asociada con el intento de los astrocitos de regular las defensas antioxidantes enzimáticas y no enzimáticas que protegen a las neuronas de los radicales libres, con la estabilización del calcio celular y con su actividad como amortiguadores del K⁺ extracelular (Wilson, 1997).

El cerebro no se afecta de manera uniforme por un episodio de isquemia-reperfusión, sino que hay áreas especialmente involucradas. El hipocampo, la corteza cerebral, el cerebelo, el núcleo caudado y el putamen son altamente sensibles a estos episodios. La sustancia gris es más vulnerable que la sustancia blanca, en la primera, las neuronas pequeñas son más sensibles que las grandes, sin embargo en el cerebelo las células de Purkinje son más sensibles que las neuronas granulares, y esta más sensibles que las células de Golgi (Norenberg y Bruce-Gregorios, 1997).

La vulnerabilidad del cerebelo a los radicales libres oxidantes es grande debido también a que su neurotransmisor excitatorio más abundante, el glutamato, producido por las células granulares es modulado por el Oxido Nítrico (NO). Este radical ha sido involucrado en la coordinación motora y en la plasticidad sináptica, provocando depresión en la respuesta a largo plazo de las células de Purkinje. Este sistema se ha postulado como el mecanismo celular para la memoria y el aprendizaje motor cerebelar (Shibuki y Okada, 1991; Pozo y col, 1994). Sin embargo, durante los episodios de isquemia-reperfusión se produce un aumento en la concentración extracelular de glutamato, el cual estimula los receptores glutamatérgicos. La excesiva estimulación del receptor glutamatérgico N-metil-D-aspartato (NMDA) conduce a una elevada producción de óxido nítrico (NO) por la vía de la estimulación de la NO sintasa. Este NO juega un papel principal en la cascada que conduce a la muerte neuronal por excitotoxicidad (Verrecchia y col., 1994).

I.4 CEREBELO

I.4.1 Anatomía del cerebelo

El cerebelo, es la parte de mayor tamaño del rombencéfalo, se encuentra dorsal a la protuberancia y al bulbo raquídeo, y su región media está separada de éstas regiones por el IV ventrículo.

El cerebelo está cubierto por una corteza, que es una hoja laminada de neuronas, prolongaciones, sinapsis y células de glía. El interior del cerebelo está formado por la sustancia blanca, que contiene los núcleos cerebelosos. El cerebelo de los mamíferos presenta su corteza plegada.

Longitudinalmente el cerebelo tiene tres porciones, la zona media o vermis, corresponde al cerebelo de los otros vertebrados y las porciones laterales o hemisferios es una adquisición de los mamíferos. El vermis y los hemisferios están separados por los surcos paramediales. Perpendicularmente a estos surcos longitudinales, el cerebelo está dividido por surcos (fisuras) transversales, el surco primario (fisura *prima*) divide al cerebelo en dos lóbulos, el anterior y el posterior, cada uno de los cuales puede subdividirse a su vez en lobulillos (folios) y circunvoluciones. En los mamíferos, las fisuras transversales dividen rostrocaudalmente al cerebelo en diez lobulillos transversales.

En el cerebelo de rata la fisura posterolateral separa al flóculo y al nódulo (lobulillo X) del resto del cerebelo y es la primera en aparecer durante el desarrollo. En la parte media, la fisura *prima* es la siguiente en aparecer, seguida por las fisuras posterior superior, la prepiramidal y la fisura secundaria. Posteriormente aparecen las otras fisuras en la porción rostral (lóbulo anterior). Estas fisuras limitan los diez lobulillos del vermis y se continúan hacia los hemisferios cerebelares.

Debido a que la corteza cerebelar posee una forma aproximadamente esférica, en ocasiones pueden ocultarse las verdaderas relaciones entre sus partes. Así, el lobulillo más anterior, la *lingula* del vermis cerebelar, se encuentra muy próxima al lobulillo más posterior, el *nódulo*. En orden secuencial rostrocaudalmente, los lobulillos del vermis reciben el nombre de *lingula* (I), *central ventral* (II), *central dorsal* (III), *culmen ventral* (IV), *culmen dorsal* (V), *declive* (VI), *tuber* (VII), *pirámide* (VIII), *úvula* (IX) y *nódulo* (X). El flóculo es un pequeño lobulillo caudal al pedúnculo cerebelar medio (Figura 1) (Bannister y col., 1998).

Las subdivisiones del cerebelo se basan en el patrón de plegamiento (patrón de foliación) de su corteza, aunque también se consideran otros criterios como su evolución, su histogénesis y sus conexiones aferentes y eferentes.

I.4.1.1 Lóbulo anterior

El lóbulo anterior en los mamíferos muestra un patrón uniforme formado por los cinco primeros lobulillos y está dividido del resto del vermis por la fisura *prima*.

El lóbulo anterior se refiere a la porción rostral respecto a la fisura *prima* y el lóbulo posterior incluye la porción caudal respecto a esta fisura. Los folios I-V del lóbulo anterior y IX y X del lóbulo posterior son regiones de maduración temprana, mientras que los folios VI, VII y VIII del lóbulo posterior

son regiones de maduración tardía, aunque hay en varios de ellos, áreas de maduración intermedia (Figura 1).

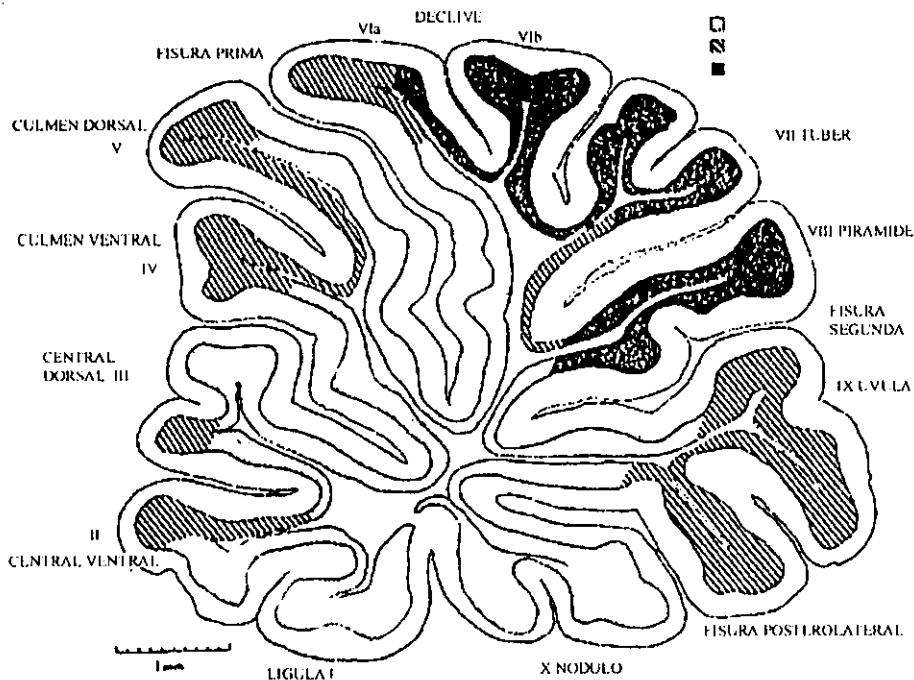


Figura 1. Patrón de foliación del vermis de ratona y clasificación tripartita del vermis adulto con base en el porcentaje de células de la capa granulosa interna marcadas en la etapa postnatal temprana con timidina tritiada. Áreas de maduración temprana (blanco), áreas de maduración intermedia (achurado) y áreas de maduración tardía (negro) (Altman, 1969).

Existen diferencias regionales dentro de la corteza, las cuales generalmente se valoran tomando como referencia el lóbulo anterior ya que es el más conocido. Filogenéticamente y ontogenéticamente el lóbulo anterior corresponde al paleocerebelo o espinocerebelo, mientras que el lóbulo floculonodular corresponde al arquocerebelo (vestibular) y los hemisferios laterales al neocerebelo (pontino). El término espinocerebelo se refiere a que esta área cerebelar está involucrada con impulsos que vienen de la médula espinal o van a ella, por lo que cada área corporal involucrada tanto aferente como eferente tiene una representación punto por punto (somatotópica) en el lóbulo anterior. Esta representación es mucho menos clara para las otras porciones del vermis y para los hemisferios cerebelares (Brodal, 1967; Ganong, 1988) (Figura 2).

Existe la idea de que el cerebelo está organizado en dos unidades anterior y posterior, cada una de las cuales expresa diferentes proteínas marcadoras durante el desarrollo y algunas alteraciones como la encontrada en el ratón mutante "meander tail" afecta sólo al lóbulo anterior, lo que sugiere que estas

dos áreas se desarrollan de acuerdo a diferentes programas intrínsecos y extrínsecos (Dominguez del Toro y col., 1997).

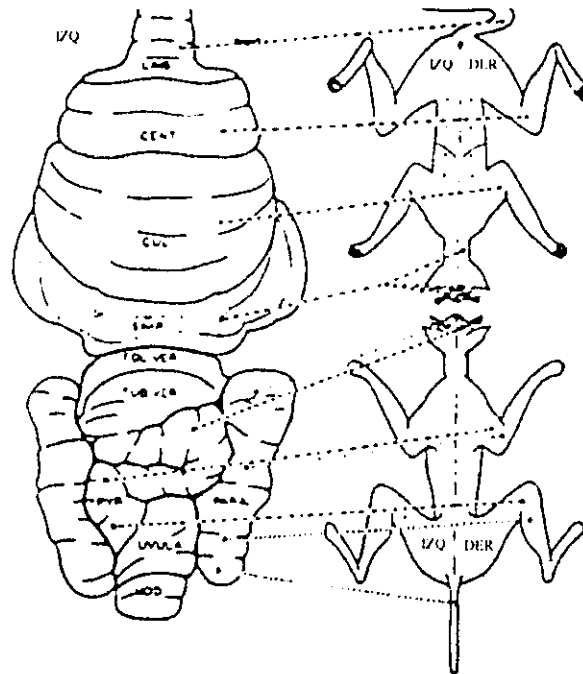


Figura 2. Lóbulo anterior y representación somatotópica en el cerebelo de gato (Pompeiano, 1967).

1.4.2 Histología de la corteza del cerebelo

Una de las regiones del encéfalo en donde mejor se ha podido establecer una relación entre estructura y función ha sido la corteza del cerebelo. La razón es porque su organización es más simple que la mayor parte del encéfalo. Los circuitos básicos de la corteza involucran sólo a siete elementos nerviosos, los activadores son las fibras trepadoras originadas en la oliva inferior y las fibras musgosas provenientes de las fibras espinocerebelares y pontocerebelares (vías aferentes). Mientras que la única vía eferente del sistema esta constituida por los axones de la célula de Purkinje. Los cuatro elementos nerviosos restantes son de asociación y están representados por las células granulares, las de Golgi, las células en canasta y las estrelladas. Las células granulares son excitadoras y su neurotransmisor es el glutamato, mientras que las otras tres son inhibitoras y su neurotransmisor es el GABA. Las células de Purkinje también son GABAérgicas y son inhibitoras de los núcleos cerebelares profundos, sin embargo los impulsos de salida de estos núcleos hacia el tallo cerebral y el tálamo son siempre excitadores. Además al cerebelo llega información de todas las áreas motoras de la corteza cerebral a través de los núcleos pontinos (Linás, 1975; Jacobson, 1978) (Figura 3).

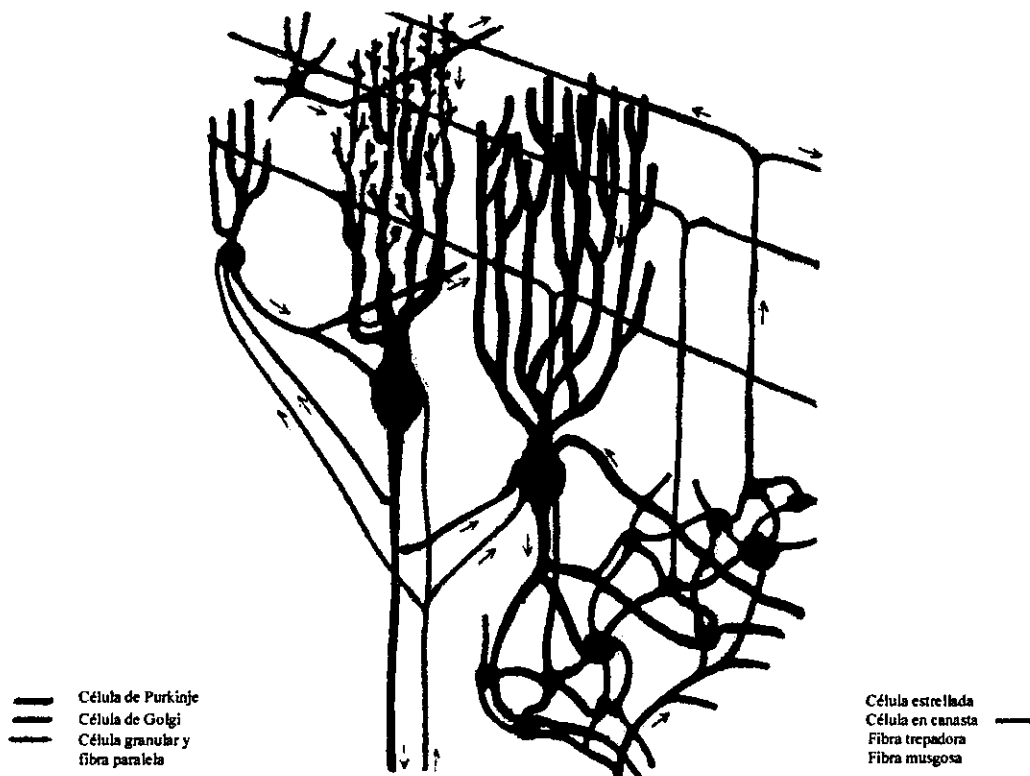


Figura 3. Elementos neuronales de la corteza cerebelar y su interconexión, la cual sigue un patrón estereotipado (Llinás, 1975).

La corteza cerebelar tiene en general una estructura uniforme formada por tres capas corticales bien definidas, las cuales han sido nombradas en orden desde la superficie externa como capa molecular, capa de células de Purkinje y capa granular.

En la corteza cerebelar las células de Purkinje están arregladas en una capa muy regular, entre la capa molecular y la capa granular. Su árbol dendrítico está sumamente ramificado y se extiende bidimensionalmente por toda la capa molecular en ángulo recto respecto al eje longitudinal del folio. Los axones de las células de Purkinje forman el sistema eferente de la corteza cerebelar y terminan principalmente en los núcleos cerebelares profundos; los del vermis sobre el núcleo fastigial. Juntos todos los axones forman la proyección corticonuclear. Las fibras aferentes del cerebelo son de dos tipos, las fibras trepadoras y las fibras musgosas. Las fibras trepadoras atraviesan la capa granular, alcanzan la base del árbol dendrítico de las células de Purkinje y trepan a lo largo de sus ramas. Las fibras musgosas se ramifican y terminan en la capa granular, donde hacen sinapsis con las dendritas de un gran número de células granulares. Las células granulares extienden sus axones en forma de T dentro de la capa molecular, estas ramificaciones corren paralelas y en ángulo recto al plano de ramificación de las dendritas de las células de Purkinje y hacen sinapsis con numerosas células de Purkinje. Cada célula de Purkinje hace sinapsis una sola vez con cada fibra paralela.

La capa molecular contiene células dispersas denominadas estrelladas cuyas ramificaciones axónicas hacen sinapsis con las dendritas de las células de Purkinje y con las fibras paralelas. Otras células de esta capa, situadas más profundamente son las células en canasta, sus axones corren justo en la capa de células de Purkinje y sus numerosas colaterales descendentes forman una cesta alrededor del soma de las células de Purkinje.

La capa granular contiene además de las pequeñas neuronas granulares unas células multipolares grandes y escasas, las células de Golgi, cuyas dendritas se extienden por la capa molecular y sus axones se ramifican intensamente en la capa granular formando un plexo denso. Sus cortas ramificaciones se relacionan sinápticamente con las dendritas en forma de garra de las células granulares y las cortas colaterales de las fibras musgosas y en conjunto forman el complejo sináptico conocido como glomérulo (Nieuwenhuys, 1967) (Figura 4).

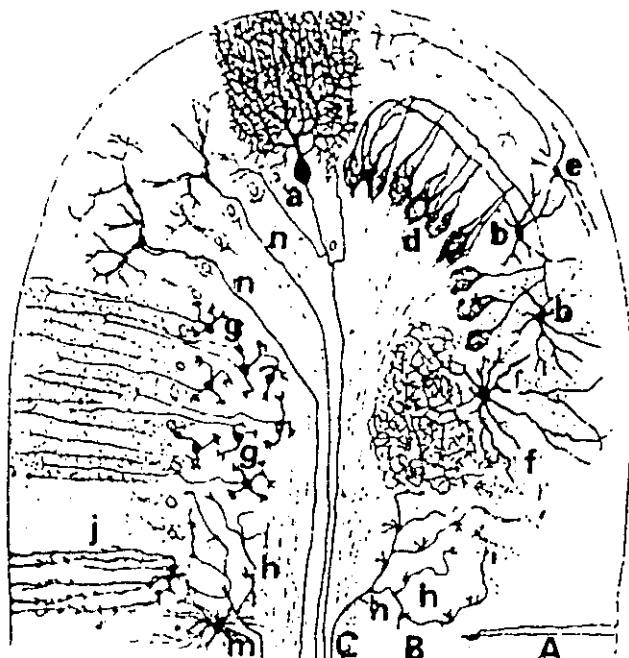


Figura 4. Corte transversal semiesquemático de una circunvolución cerebelar de mamífero. (A) capa molecular, (B) capa granular, (C) sustancia blanca, (a) célula de Purkinje, (b) células en canasta, (d) cestas terminales, (e) células estrelladas, (g) célula granular con su axón, (f) célula de Golgi, (h) fibras musgosas, (j) neuroglía de Bergmann, (m) astrocito protoplásmico (n) fibra trepadora (Ramón y Cajal, 1981).

I.4.3 Citología, citogénesis y sinaptogénesis de la corteza del cerebelo

I.4.3.1 Células de Purkinje

Citología

Las células de Purkinje son la característica más sobresaliente de la citoarquitectura de la corteza cerebelar porque ellas son grandes, están alineadas en una monocapa y tienen un árbol dendrítico aplanado sumamente amplio, equipado con numerosas espinas y porque sus axones representan la única vía eferente de la corteza cerebelar.

El soma de las células de Purkinje es piriforme y su tamaño varía entre las diferentes especies, pero oscila entre 16 y 30 μm en su eje menor y 21-40 μm en su eje mayor (Mugnaini, 1972). Su número en la rata es de 0.61×10^6 , su densidad por mm^3 es de 10.1×10^3 y su volumen en la rata es de $4900 \mu\text{m}^3$ (Korbo y Andersen, 1995). Con la técnica de Ácido peryódico-Schiff se pueden identificar dos tipos de células de Purkinje: uno que muestra gránulos basófilos de tamaño irregular dispersos en un citoplasma pálido y otro que contiene gránulos basófilos gruesos en un citoplasma teñido intensamente en forma difusa y se observan hipercrómicas con otras técnicas (Khan, 1994). Estos dos tipos de células muestran diferencias en su inmunoreactividad a GABA-descarboxilasa (GAD), motilina y taurina (Chan-Palay y col., 1981) y poseen diferentes concentraciones de fosfolípidos, proteínas, ARN y ADN-complejos proteicos (Khan, 1994). Entre las células que se observan hipercrómicas, algunas muestran signos de degeneración y su número aumenta con la edad (Khan, 1994; Loberg y Torvik, 1993).

Ultraestructuralmente el soma de las células de Purkinje contiene el núcleo, los cuerpos de Nissl, el retículo endoplásmico liso, las mitocondrias, el aparato de Golgi, los lisosomas, los microtúbulos y los neurofilamentos. Los cuerpos de Nissl consisten en retículo endoplásmico granular en relación con cúmulos de ribosomas que ocupan la matriz circundante. El retículo endoplásmico liso está sumamente desarrollado y forma una red laxa a través de todo el citoplasma; a la periferia de la célula el retículo agranular forma de manera característica una cisterna fenestrada por debajo de la membrana plasmática, la cisterna hipolemal. Las células de Purkinje son particularmente ricas en lisosomas (Chan Palay, 1971).

Un patrón de arborización único caracteriza a las células de Purkinje, está formado básicamente por ramas lisas primarias, secundarias y terciarias, las cuales se adelgazan gradualmente y se extienden en un plano transversal al folio. Finalmente las ramificaciones terminales brotan principalmente de las ramas terciarias (Ito, 1984). El área del campo dendrítico de una célula de Purkinje de rata es de $26\ 316.32 \mu\text{m}^2$ (Hollingworth y Berry, 1975).

El axón de las células de Purkinje emerge de la base del soma y su segmento inicial es amielínico (17.1 μm), el cual es cubierto en parte por sinapsis axoaxónicas de las células en canasta y el resto es cubierto por glía. Mientras cruza la capa granulosa interna o al entrar en la sustancia blanca forma dos o más colaterales recurrentes las cuales terminan en el soma y dendritas de las células en canasta, de Golgi u otras células de Purkinje (Chan-Palay, 1971).

Las principales ramas de los axones de las células de Purkinje pasan dentro de los núcleos cerebelares profundos y cada axón hace sinapsis hasta con 35 células de los núcleos y desarrollan en promedio 500 terminaciones (Polkovits y col., 1977).

Citogénesis

Las neuronas cerebelares corticales se derivan de dos zonas germinales separadas, la zona del techo de cuarto ventrículo origina a las células de Purkinje y a las de Golgi, así como a algunas células gliales, todas ellas migran para formar la capa del manto de la lámina cerebelar. Tiempo después, otra zona germinal, denominada capa granular externa es formada bajo la Pía que cubre la lámina cerebelar, la cual da origen a las células granulares, estrelladas, en canasta y a la mayoría de las células gliales, todas migran después hacia el interior de la corteza cerebelar (Jacobson, 1978; Ito, 1984).

Las células de Purkinje se originan entre los días 14 y 17 de gestación en la rata, comenzando y cesando su producción antes que cualquier otra neurona de la corteza del cerebelo. Su diferenciación es lenta y prolongada. Se acepta que el primer signo de diferenciación neuronal es un aumento ostensible en la cantidad de retículo endoplásmico rugoso el cual continúa aumentando durante la maduración junto con los ribosomas libres, el aparato de Golgi y los neurotúbulos (Fujita y col., 1966). Las neuronas más maduras tienen generalmente un sólo nucleolo, mientras que nucleolos múltiples son la regla en las neuronas en desarrollo. Las neuronas jóvenes contienen muy poca sustancia de Nissl y el ADN nucleolar está concentrado como un cuerpo denso en el centro del nucleolo. Durante el desarrollo neuronal el ARN nucleolar aumenta y el ADN nucleolar se dispersa a la periferia del nucleolo y al parecer permanece constante en cantidad y se tiñe intensamente con tiónina o con la técnica de Feulgen. El primer signo de desarrollo nucleolar está siempre relacionado con el aumento de basofilia de los grumos de Nissl. Las células de Purkinje maduras tienen una moderada cantidad de grumos de Nissl y el ADN nucleolar forma como un anillo de cuentas alrededor del nucleolo (Jacobson, 1978).

Inicialmente las células de Purkinje son pequeñas y fusiformes, están distribuidas en varias capas y su axón puede ser visto al momento del nacimiento. Posnatalmente asumen una forma multipolar y a los cuatro días forman una sola hilera de células, el soma muestra procesos perisomáticos que finalmente desaparecen y se dibuja el árbol dendrítico plano y perpendicular al eje longitudinal del folio. Crecen muy lentamente hasta que ocurre la proliferación de las células de la capa granular externa y se diferencian rápidamente después de que las células granulares migran pasando por su capa hasta la capa granular interna, este evento ocurre de 4 a 20 días después del nacimiento. Las puntas de las dendritas alcanzan la pía a los 20 o 25 días postnatales (Altman, 1972 a y b; Ito, 1984), cuando la capa granular externa desaparece. Las células granulares tienen una compleja transformación conforme migran de la capa granular externa a la interna, en donde se diferencian rápidamente. Esta migración no sería posible sin la presencia de una senda preformada por la glía de Bergmann, que guía a las células granulares entre las fibras paralelas densamente acomodadas, particularmente en los estadios tardíos de desarrollo del cerebelo (Rakic y Sidman, 1970).

Sinaptogénesis

Entre P-5 y P-21 el cerebelo de rata experimenta su periodo principal de sinaptogénesis (Altman, 1972 a y b). Durante los primeros 4 días después del nacimiento, las 2-3 hileras de células de Purkinje se mueven alineándose hasta formar una monocapa y presentan pocas o ninguna sinapsis. Entre los días 5-7 se desarrolla un prominente cono apical y procesos perisomáticos laterales, los cuales son contactados por las fibras trepadoras. Entre los 8 y 15 días postnatales, los procesos perisomáticos desaparecen y el citoplasma fluye hasta la creciente dendrita. Entonces el soma recibe sinapsis de las células en canasta. Finalmente la maduración del soma es anunciada por la envoltura dada por los procesos gliales. A la edad de 12-15 días las fibras paralelas hacen sinapsis con las espinas dendríticas en la mitad inferior de la capa molecular y a los 21 días, cuando la capa granular externa desaparece, las fibras paralelas establecen sinapsis con las espinas dendríticas en la mitad superior de la capa molecular. Un aumento sostenido del número de uniones sinápticas ocurre entre la tercera y cuarta semana postnatal (Altman, 1972 b; Ito, 1984) (Figura 5).

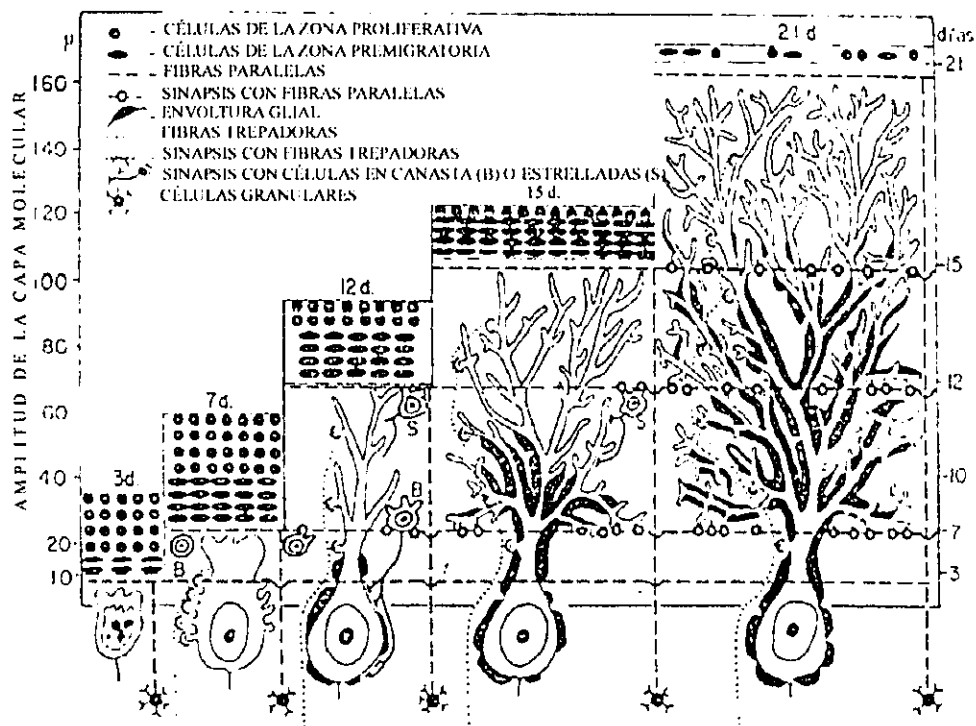


Figura 5. Desarrollo de las células de Purkinje y proceso de sinaptogénesis que se verifican entre el día postnatal 3 y el día postnatal 21 en el cerebelo de rata (Altman, 1972 b).

A la edad P-5, en las células de Purkinje, la morfología de las ramificaciones terminales varía de grandes terminaciones bulbosas sin filopodios a pequeñas terminaciones filamentosas con 1 a 3 filopodios. El árbol dendrítico se observa en general liso con varicosidades y pocos filopodios colaterales. Muy pocas espinas postsinápticas con forma de palillo de tambor están presentes a esta edad. Por el día P-10 las terminales dendríticas se hacen más complejas, con más filopodios, los cuales se ramifican a menudo. Los filopodios colaterales y las espinas con forma de palillo de tambor también aumentan. Por el día postnatal 15 los filopodios quedan confinados principalmente a los segmentos terminales. Las espinas en forma de palillo de tambor cubren los segmentos proximales maduros. A los 30 días postnatales las dendritas con espinas alcanzan la forma madura y los filopodios desaparecen (Berry y Bradley, 1976). La forma madura de la arborización de la célula de Purkinje ortogonal con las fibras paralelas permite la máxima divergencia y convergencia de conexiones entre estos dos elementos.

Las proteínas asociadas a las vesículas sinápticas tales como sinapsina I, sinaptofisina, sinaptogamina y glucoproteínas se acumulan dentro de los axones y arborizaciones terminales en la mayoría de las áreas que experimentan sinaptogénesis (Leclerc, 1989; Mayanil y Kneper, 1993). La fosforilación-desfosforilación de estas proteínas juega un papel clave en la regulación del tráfico y liberación de neurotransmisores (Greengard y col., 1993). Además de su unión a las vesículas sinápticas, la sinapsina I y sinaptofisina están también asociadas a los elementos esqueléticos tales como neurofilamentos y microtúbulos (Goldenring y col., 1986), los cuales acumulados en los axones y dendritas son fosforilados por kinasas y se estabilizan durante la sinaptogénesis (Carden y col., 1987; Nixon y Shea, 1992).

Las células granulares comienzan a transportar vesículas sinápticas y forman varicosidades desde antes que se inicie el contacto sináptico con sus células blanco. Las proteínas asociadas a las vesículas sinápticas se detectan desde la edad P-6 en la rata entre las células premigratorias de la capa granular externa, asimismo por toda la capa molecular sin graduación entre fibras paralelas maduras (profundas) e inmaduras (superficiales), y las varicosidades llenas de vesículas pueden ya ser identificadas con microscopía electrónica (Altman 1972a; Cambray y col., 1987). A pesar del desarrollo temprano de las especializaciones presinápticas, las especializaciones postsinápticas en las espinas dendríticas de las células de Purkinje no son frecuentes y durante la primera semana postnatal la mayoría de las sinapsis de las fibras paralelas es con las protuberancias de las dendritas de las células de Purkinje.

La aferencia de las fibras musgosas hace su primera aparición en la capa granular interna de la rata por el día P-5. En este momento unas pocas dendritas de las células granulares pueden observarse con microscopía electrónica. En el día P-12 es detectable la primera indicación clara de la formación sináptica de las terminales de las fibras musgosas en las dendritas de las células granulares. En este momento las células de Golgi comienzan a hacer sus conexiones inhibitorias sinápticas en las dendritas de las células granulares en el glomérulo (Altman, 1972 b; Ito 1984). Durante la tercera semana postnatal el glomérulo aumenta en complejidad y la tinción inmunohistoquímica para las proteínas asociadas a las vesículas sinápticas revela un marcado aumento en las terminales de las fibras musgosas hasta la edad P-18 (Cambray y col., 1987; Altman, 1972 b).

I.4.3.2 Glía

La glía del cerebelo incluye, al igual que en otras regiones del sistema nervioso central, astrocitos (protoplásmicos y fibrosos), oligodendrocitos (satélites e interfasciculares) y células de microglía. Además, de manera característica presenta un tipo de glía radial, localizada en el nivel de la capa de células de Purkinje, denominadas glía de Bergmann. Se trata de células positivas a la proteína fibrilar ácida glial (PFAG+) por lo que se consideran pertenecientes a la estirpe astrogliar y su función, entre otras es la de servir como guía para la migración de las células granulares desde la capa granular externa a su sitio definitivo en la capa granular interna (Figura 6).



Figura 6. Glía de la corteza cerebelar. Células de Bergmann (B), Astrocitos protoplásmicos (AP), Astrocitos fibrosos (AF), Oligodendrocitos (o) y Microglía (mi) (Modificado de Sotelo, 1967).

Astroglía

Con técnicas inmunohistoquímicas se ha visto que los cultivos de astrocitos del nervio óptico de rata contienen tres tipos de células neurogliales antigénicamente distintos: oligodendrocitos y dos tipos de astrocitos, tipo 1 y tipo 2, los cuales aparecen en diferentes etapas de desarrollo, y se derivan de dos linajes celulares distintos: los astrocitos tipo 1 se originan de un precursor diferente del que da origen a los oligodendrocitos y a los astrocitos tipo 2. Los astrocitos tipo 1 aparecen en el cerebro de rata en el día embrionario 15-16 y están presentes antes que los oligodendrocitos (al nacimiento) y que los astrocitos tipo 2 (en el día postnatal 6-8). Estos hallazgos en cultivos se han confirmado en cortes de cerebelo con marcaje doble (Curtis y col., 1988).

Las interacciones entre neuronas y glía se establecen por una vía directa a través de difusión y señales de superficie celular, y otra indirecta por los efectos sobre el medio intersticial y la barrera hematoencefálica, por lo que la astroglía juega un papel importante en el desarrollo neuronal, influenciando su forma, la emigración de neuroblastos y de los conos de crecimiento, la sobrevivencia y la diferenciación neuronal. Así, en el cerebelo, la glía de Bergmann es en buena parte responsable de la estructura laminada y correcto funcionamiento del cerebelo, ya que la disminución en su número, su alteración morfológica o el desorden en su arreglo, produce fallas en la migración de las células granulares y por lo tanto en sus contactos sinápticos con las células de Purkinje y con las fibras trepadoras y musgosas (Rakic y Sidman, 1970; Sievers y col., 1994).

Se ha sugerido una función dinámica para la neuroglía en el control del microambiente neuronal (Attwell y col., 1991) para la cual existe una señalización entre las neuronas y la neuroglía (Barres, 1991; Van der Zee y col., 1993). Las membranas astrogliales están involucradas activamente en el intercambio de nutrientes, neurotransmisores, segundos mensajeros, iones y factores de crecimiento, los cuales juegan un papel preponderante en el desarrollo normal del Sistema Nervioso Central (Rakic, 1991). Tenemos por ejemplo que las interacciones metabólicas pueden ocurrir por la transferencia de diferentes sustancias como la glutamina desde el astrocito hacia la neurona, la cual no tiene la maquinaria metabólica para hacerlo y por la liberación de glutamato desde la neurona para regular la actividad metabólica del astrocito (Hertz, 1993). Los astrocitos proporcionan también el oxígeno que necesitan las neuronas y los oligodendrocitos para la producción oxidativa de energía (Hamprecht, 1993). Se ha visto en cultivos primarios que los astrocitos sobreviven largo tiempo en ausencia de oxígeno, tanto como la glucosa esté disponible en el medio, mientras que las neuronas cultivadas sucumben rápidamente durante la anoxia y la isquemia (Hertz, 1993).

Otro de los caminos a través de los cuales interactúan las neuronas y la neuroglía tanto durante el desarrollo como durante la función neural adulta y los estados patológicos, es la comunicación desde las neuronas hacia la glía a través del ion K^+ , y de los neurotransmisores.

Se ha mostrado que la neuroglía posee los mismos tipos de receptores y canales iónicos presentes en las neuronas (Van der Zee y col., 1993). Los receptores de los astrocitos regulan la mayoría de los sistemas de segundos mensajeros y la activación de estos sistemas influyen muchos procesos intracelulares diferentes (Enkvist y col., 1993).

Otra forma de participación de la astrogliá en la función y comunicación entre las células del cerebelo es a través de óxido nítrico (NO), utilizado por los astrocitos y células de Bergmann durante la estimulación de la guanilato ciclasa para la activación del sistema de segundos mensajeros (GMPcíclico) (De Vente y col., 1990). El mayor estímulo para la liberación de NO es la activación de los receptores de glutamato. Se sugiere que la toxicidad del glutamato que contribuye al daño isquémico es mediada a través de NO (Garthwaite, 1991). Se ha propuesto que los astrocitos suministran L-arginina a las neuronas como sustrato para la óxido nítrico sintasa (NOS) que convierte la L-arginina en citrulina y NO (Murphy y Simmons, 1993).

Oligodendrogliá

Durante la diferenciación del cerebelo, los precursores de los oligodendrocitos aparecen primero en el *velum* superior, adyacentes al IV ventrículo, como células redondeadas, más largas que anchas y positivas al gangliósido GD3, alcanzan la región profunda del cerebelo al nacimiento y forman procesos cortos y escasos, los cuales se van haciendo cada vez más complejos y largos; estas células migran al interior de los folios en desarrollo justo antes de la mielinización, adquiriendo la expresión de galactocerebrósido y la morfología adulta (Goldman y Vaysse, 1990; Curtis y col., 1988). Durante el proceso de mielinización los oligodendrocitos presentan un complejo de Golgi y un nucleolo prominente, así como una gran concentración de ribosomas, lo que se correlaciona temporalmente con el incremento de síntesis de proteínas y lípidos para formar la mielina (Davidson, 1991).

En condiciones patológicas el aumento en la permeabilidad vascular permite que varios mediadores solubles se concentran en torno a los capilares cerebrales produciéndose un edema local intenso, en estas condiciones el número de oligodendrocitos se reduce, las células que sobreviven se muestran anormales y la mielina es removida por macrófagos (Compston y Scolding, 1991). Las células fagocíticas forman productos tales como proteasas y radicales libres, capaces de dañar a la membrana de los oligodendrocitos y a la mielina (Raine, 1997).

Microglía

En el cerebelo de ratón se reconoce microglía amiboide en el día embrionario 11, y su número se incrementa constantemente después de este tiempo. La microglía amiboide se sigue reconociendo hasta el día postnatal 10, después sólo se encuentra microglía ramificada (Aswell, 1990). Las células de microglía se caracterizan por la carencia de una corriente de salida de K⁺ lo que las hace muy sensibles a los agentes despolarizantes y por lo tanto a los cambios microambientales que se suceden en condiciones normales y patológicas (Kettenmann y col., 1993), estos cambios inducen en estas células una respuesta morfológica que es acompañada por modificaciones en la expresión de moléculas de complejo principal de histocompatibilidad, que es la característica más notable de la participación de la microglía en la respuesta inmune (Theele y Streit, 1993). Por las características mencionadas la microglía responde al daño neuronal con una respuesta graduada que incluye migración, proliferación, presentación antigénica, liberación de productos de secreción, desplazamiento de sinapsis

(deafferentación), y si se produce la muerte neuronal, remueve a la neurona muerta (Banati y col., 1993). Esta célula actúa como un macrófago residente alerta con capacidad de vigilancia y control inmune. La microglía activada puede destruir microorganismos invasores, remover restos celulares y tisulares y residuos potencialmente dañinos, promueve la reparación tisular al secretar factores de crecimiento y facilita el retorno a la homeostasis tisular (Kreutzberg, 1996).

1.4.4 Fisiología

El gran tamaño del cerebelo está relacionado con sus funciones. Las partes laterales de los hemisferios cerebelares tienen conexiones extensas con la corteza motora y se relacionan principalmente con la planeación y programación de los movimientos. Las porciones mediales de los hemisferios se proyectan hacia el tallo cerebral y la corteza motora y reciben abundante información de los propioceptores periféricos; su función primordial parece ser el comparar el plan de movimiento con la ejecución real durante el mismo y efectuar ajustes que los suavicen y coordinen. La porción del vermis y el lóbulo floculonodular es fundamentalmente vestibular y está relacionada con el control de la postura y los movimientos oculares.

El cerebelo participa también en los ajustes aprendidos que hacen más fácil la coordinación cuando se efectúa una y otra vez una tarea determinada. Las bases de este aprendizaje se encuentran probablemente en la información recibida a través de los núcleos olivares.

Puede considerarse la organización del cerebelo en términos de sus conexiones aferentes y eferentes y su relación con las funciones mencionadas. De acuerdo a esto se ha observado la existencia de conexiones específicas en el cerebelo de los mamíferos para las tres porciones que reflejan su historia evolutiva: el arquicerebelo (lóbulo floculonodular), el paleocerebelo (lóbulo anterior) y el neocerebelo (hemisferios laterales) (Shepherd, 1994).

1.4.4.1 Conexiones aferentes y eferentes

Conexiones aferentes. Las fibras vestibulares hacen conexión con el lóbulo floculonodular. Las fibras espinales ascienden por el tracto espinocerebelar y terminan principalmente en el lóbulo anterior. Las fibras que llegan al neocerebelo vienen principalmente de grandes grupos celulares del puente y del núcleo olivocerebelar.

Conexiones eferentes. Las fibras eferentes de la corteza cerebelar proyectan a los núcleos cerebelares profundos. La relación entre la corteza y los núcleos profundos es más complicada que la simple división tripartita mencionada. El núcleo fastigial recibe fibras de la corteza del vermis anterior y lóbulo floculonodular y proyecta al núcleo vestibular lateral, Existe también una vía directa desde la corteza floculonodular con el núcleo vestibular. El núcleo emboliforme recibe fibras desde la corteza cercana a la línea media y proyecta al núcleo rojo mesencefálico y hacia el núcleo ventrolateral del tálamo. El núcleo dentado es el mayor de los núcleos profundos y recibe fibras de los grandes

hemisferios cerebelares, proyecta algunas fibras al núcleo rojo, pero la mayoría de ellas al núcleo ventrolateral del tálamo (Figura 7).

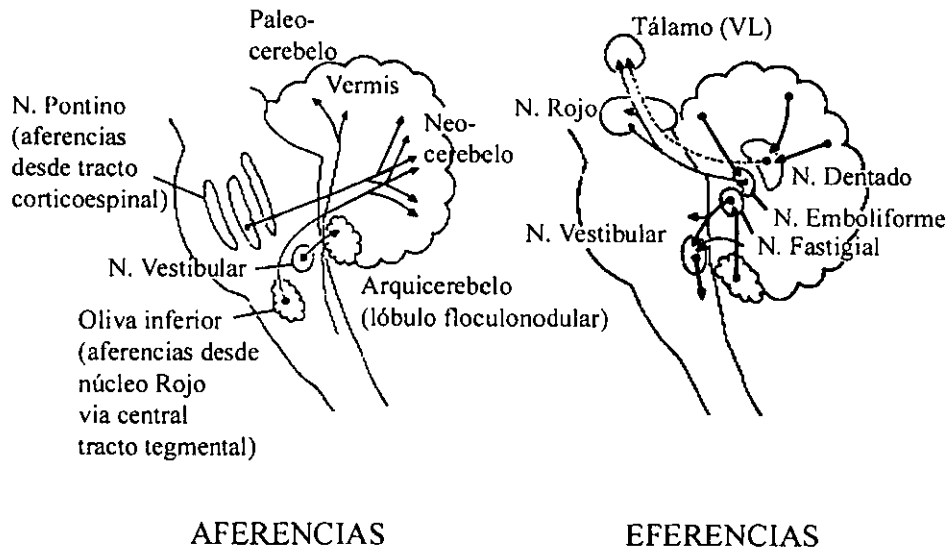


Figura 7. Principales aferencias y eferencias del cerebelo de los mamíferos (Shepherd, 1994).

A las conexiones con el núcleo vestibular se debe el control que el cerebelo ejerce sobre el equilibrio. Las conexiones con el núcleo rojo median el control sobre los reflejos y el tono muscular a través de proyecciones de estos núcleos hacia la médula espinal. El papel del circuito que establecen los hemisferios laterales con el núcleo dentado y el tálamo ventrolateral, es la coordinación sensoriomotora. (Shepherd, 1994).

I.4.4.2 Actividad rítmica y plasticidad

Dentro de las complejas operaciones que median la coordinación sensoriomotora, resaltan dos propiedades de la maquinaria neuronal cerebelar: actividad rítmica y plasticidad.

Actividad rítmica

Las células de la oliva inferior están eléctricamente acopladas y tiene una fuerte actividad de marcapasos tal, que sus axones transmiten señales excitatorias, sincrónicas y rítmicas a las células de los núcleos cerebelares y a través de las fibras trepadoras a las células de Purkinje de la corteza cerebelar. Las fibras trepadoras activan intensa y sincrónicamente bandas de células de Purkinje, las

cuales responden mediante un complejo de espigas que es transmitido como impulsos inhibitorios fásicos a las células de los núcleos cerebelares. Las células de los núcleos cerebelares son manejadas por una excitación desde las células olivares, seguida de una inhibición desde las células de Purkinje que conduce a un rebote de excitación. Las células nucleares entonces excitan rítmicamente sus células blanco en el núcleo rojo y en el tálamo. Hay también una retroalimentación inhibitoria GABAérgica a la oliva inferior, en donde se reduce el acoplamiento electrotónico entre las células olivares que restringe su disparo (Shepherd, 1994).

El sistema fibras musgosas-fibras paralelas provee una regulación continua y delicada de la excitabilidad que el núcleo cerebelar trae de todos lados. La activación tónica de una simple espiga en la célula de Purkinje genera finalmente el control fino de los movimientos conocido como coordinación motora. El hecho de que las fibras musgosas informan a la corteza cerebelar tanto de los mensajes ascendentes como descendentes hacia y desde los centros motores en la médula espinal y tallo cerebral, da una idea de la importancia de estas fibras que informan a la corteza del lugar y magnitud de los movimientos de los miembros y pone a tiempo la intención motora generada por el cerebro en el contexto del estado del cuerpo, con el movimiento que será ejecutado (Shepherd, 1994).

Plasticidad

Los circuitos neurales se caracterizan por su plasticidad y los circuitos cerebelares no son la excepción.

La plasticidad cerebelar se manifiesta en tres caminos principales: 1) actividad dependiente de cambios relacionados al aprendizaje motor; 2) regeneración axonal y recrecimiento sináptico en respuesta a daño y 3) remodelación de neuronas y conexiones durante el desarrollo.

Uno de los cambios de mayor interés actual por ser posiblemente la base para el aprendizaje cerebelar es la depresión a largo plazo (LTD) de la sinapsis de las fibras paralelas después de la excitación repetida por fibras trepadoras a las células de Purkinje. Las evidencia señalan al glutamato como el neurotransmisor de la sinapsis de las fibras paralelas.

La activación de las fibras trepadoras produce potenciales excitatorios postsinápticos (EPSPs), los cuales conducen a una fuerte despolarización debida a espigas de Ca^{2+} dendríticos y potenciales en meseta. El Ca^{2+} intracelular liberado activa el mecanismo de segundos mensajeros, el cual conduce a una desensibilización de los receptores de AMPA (amino-3 hidroxil-5 metil-4 isoxazol ácido propiónico) en la espina sináptica que recibe las terminaciones de las fibras paralelas. Posiblemente varios mecanismos inducidos por segundos mensajeros están involucrados. Uno de ellos es la activación de receptores metabotrópicos a glutamato acoplados a la producción de inositol trifosfato, la cual puede contribuir al aumento interno de los niveles de Ca^{2+} . Otro es la activación de la óxido nítrico sintasa. La producción de óxido nítrico y la subsecuente activación de guanilato ciclasa, para producir el segundo mensajero guanosin 3'5' monofosfato-cíclico (cGMP), el cual puede entonces activar la cGMP-dependiente de protein-kinasa para desensibilizar los receptores de AMPA (Ito, 1991; Shepherd, 1994).

I.5 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA E HIPÓTESIS

Con base en los antecedentes de que el *estrés oxidativo* daña a las células y afecta la expresión de sus programas de desarrollo se planteó el presente proyecto de investigación con las siguientes:

HIPÓTESIS

1. Si los efectos de la exposición prenatal al O₃ en el SNC en desarrollo se corresponden con los producidos por *estrés oxidativo*, entonces se podrán encontrar algunos signos morfológicos de daño tisular y neuronal característicos de este modelo.
2. Si como resultado del *estrés oxidativo* inducido por O₃ hay muerte neuronal, entonces se espera encontrar cambios conductuales en las ratas expuestas prenatalmente al O₃.

II OBJETIVOS

Objetivo general

Analizar los cambios conductuales y neuromorfológicos en el cerebelo de crías de ratas expuestas durante el desarrollo a *estrés oxidativo* inducido por O₃.

Objetivos específicos

1. Valorar postnatalmente los reflejos de enderezamiento, geotaxis negativa, habilidad de nado y la alternancia espacial en ratas cuyas madres fueron expuestas al O₃ durante la gestación.
2. Comparar planimétricamente el lóbulo anterior del cerebelo y la densidad de células de Purkinje en cerebelos de rata de 0, 12 y 60 días de edad expuestas prenatalmente al O₃ frente a sus controles no expuestas.
3. Analizar el lóbulo anterior del cerebelo de ratas a los 0, 12 y 60 días postnatales expuestas prenatalmente al O₃ para definir los parámetros morfológicos de daño a corto, mediano y largo plazo, sobre la histología de la corteza cerebelar en desarrollo.
4. Hacer un análisis histopatológico del desarrollo de las células de Purkinje a las edades P-0, P-12 y P-60 en el cerebelo de ratas expuestas prenatalmente al O₃.
5. Comparar la inmunoreactividad de las capas de la corteza cerebelar con los anticuerpos sinaptofisina y proteína fibrilar ácida glial en ratas de 0, 5, 10, 15, 20 y 25 días postnatales expuestas prenatalmente al O₃ frente a las ratas que se desarrollaron en un ambiente libre de contaminantes.

I.5 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA E HIPÓTESIS

Con base en los antecedentes de que el *estrés oxidativo* daña a las células y afecta la expresión de sus programas de desarrollo se planteó el presente proyecto de investigación con las siguientes:

HIPÓTESIS

1. Si los efectos de la exposición prenatal al O₃ en el SNC en desarrollo se corresponden con los producidos por *estrés oxidativo*, entonces se podrán encontrar algunos signos morfológicos de daño tisular y neuronal característicos de este modelo.
2. Si como resultado del *estrés oxidativo* inducido por O₃ hay muerte neuronal, entonces se espera encontrar cambios conductuales en las ratas expuestas prenatalmente al O₃.

II OBJETIVOS

Objetivo general

Analizar los cambios conductuales y neuromorfológicos en el cerebelo de crías de ratas expuestas durante el desarrollo a *estrés oxidativo* inducido por O₃.

Objetivos específicos

1. Valorar postnatalmente los reflejos de enderezamiento, geotaxis negativa, habilidad de nado y la alternancia espacial en ratas cuyas madres fueron expuestas al O₃ durante la gestación.
2. Comparar planimétricamente el lóbulo anterior del cerebelo y la densidad de células de Purkinje en cerebelos de rata de 0, 12 y 60 días de edad expuestas prenatalmente al O₃ frente a sus controles no expuestas.
3. Analizar el lóbulo anterior del cerebelo de ratas a los 0, 12 y 60 días postnatales expuestas prenatalmente al O₃ para definir los parámetros morfológicos de daño a corto, mediano y largo plazo, sobre la histología de la corteza cerebelar en desarrollo.
4. Hacer un análisis histopatológico del desarrollo de las células de Purkinje a las edades P-0, P-12 y P-60 en el cerebelo de ratas expuestas prenatalmente al O₃.
5. Comparar la inmunoreactividad de las capas de la corteza cerebelar con los anticuerpos sinaptofisina y proteína fibrilar ácida glial en ratas de 0, 5, 10, 15, 20 y 25 días postnatales expuestas prenatalmente al O₃ frente a las ratas que se desarrollaron en un ambiente libre de contaminantes.

III MATERIAL Y MÉTODOS

III.1 Administración del O₃

Seis ratas hembras Wistar adultas de 250 g de peso en estro, con presencia de esperma y tapón vaginal después de permanecer con machos adultos sanos, fueron consideradas para la obtención de crías a los 0, 12 y 60 días de nacidas. Con objeto de obtener camadas control, tres de estas ratas fueron mantenidas en cámaras provistas de humedad, temperatura y ciclos de luz/obscuridad controlados, así como con alimentación y agua *ad libitum* en un medio libre de contaminantes atmosféricos durante toda la gestación. Mientras que otras tres ratas permanecieron en iguales condiciones excepto que durante toda la gestación fueron expuestas 12 horas diarias (20:00 - 8:00 horas) a 1.0 ppm de O₃. El O₃ fue administrado a las cámaras mediante un generador P15 Triozon y mantenido en concentraciones constantes a través de un analizador 1008-PC Dasibi de luz ultravioleta (Figura 8).

De las seis madres gestantes se obtuvieron sólo 4 camadas ya que una no presentó ninguna cría y otra parió todas sus crías muertas. Las crías fueron pesadas y reducidas a 9 por camada para ser alimentadas por sus propias madres, con el objeto de tener iguales condiciones de desarrollo. Las camadas fueron asignadas al azar como C1, C2, C3 y C4 con objeto de ser analizadas las crías a los 0, 12 y 60 días postnatales, en un esquema doble ciego para descubrir cuales camadas fueron expuestas al O₃.

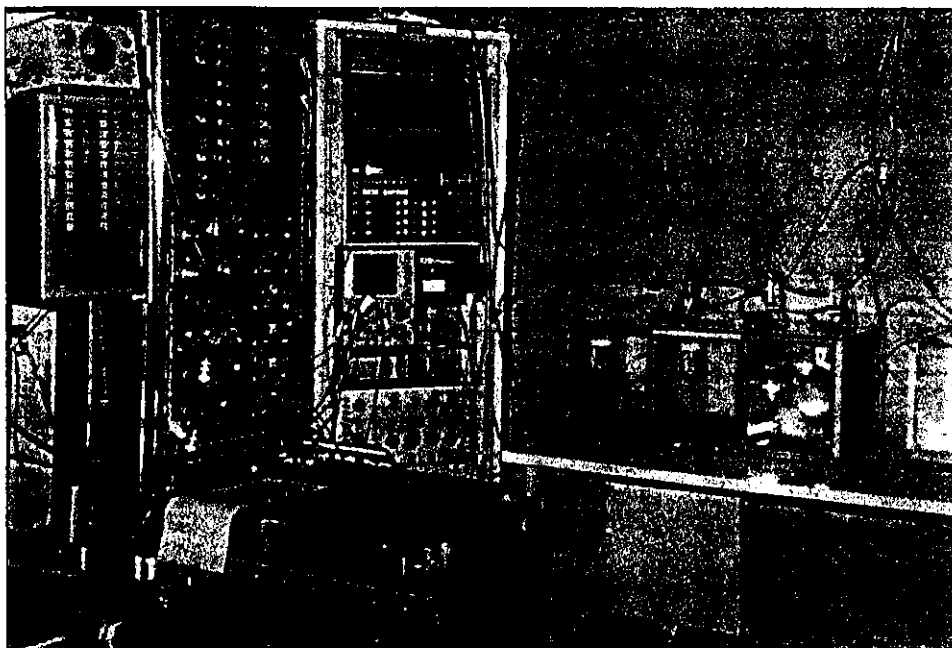


Figura 8. Cámaras en las que fue administrado el O₃ a las ratas gestantes. Las cámaras están conectadas a un generador P15 Triozon y este a un analizador 1008-PC Dasibi de luz ultravioleta, para medir y mantener la concentración de 1 ppm de O₃ constante.

III.2 Conducta

A partir de los 6 días postnatales cada grupo de crías se probó en las conductas de enderezamiento, geotaxis negativa y habilidad de nado. En el reflejo de enderezamiento, el animal puesto boca arriba tiende a voltearse lo más rápidamente posible a su posición normal. En esta prueba se midió el tiempo que transcurre desde que se colocó a la cría en posición supina hasta que se enderezó por sí misma, colocando las cuatro patas en contacto con la superficie. Para considerarse dentro del patrón normal de desarrollo esta prueba debe realizarse en un tiempo menor o igual a 2 segundos. La prueba de geotaxis negativa consistió en medir el tiempo que tardó la cría en completar un giro de 180° cuando se colocó con la cabeza hacia abajo en una rampa inclinada a 25°. La prueba debe realizarse como máximo en 60 segundos (Vorhees y col., 1979). La conducta de nado consistió en colocar a las ratas durante 5 a 10 segundos en un acuario de 25X50X30 cm con agua a 25 cm de profundidad y a una temperatura de 27°C. Se consideraron diferentes parámetros del patrón de nado con una escala arbitraria: la dirección de nado (escala del 0 al 3), la posición de la cabeza y la nariz respecto al nivel del agua (escala del 0 al 4); cuando la nariz y toda la oreja se mantienen fuera del agua es un indicativo de coordinación neuromuscular. Se valoró también el movimiento de las extremidades anteriores (escala del 0 al 2), ya que esta es una conducta de inmadurez que tiende a inhibirse progresivamente, los adultos no utilizan estos miembros para nadar (Schapiro y col., 1970; Salas, 1972). A los resultados de las pruebas de enderezamiento, geotaxis negativa y nado se aplicó un análisis de varianza de una vía y una prueba de Tukey.

A partir de los 30 días de edad se aplicó a los animales una prueba de alternancia espacial diferida, consistente en entrenarlos a encontrar el agua en un laberinto de dos brazos (Figura 9). Un depósito de agua se colocó como reforzador de manera alternada en uno de los brazos ya que durante las doce horas de oscuridad previas a la prueba las ratas fueron privadas del agua. Todos los animales tuvieron una fase de habituación, una de pre-entrenamiento y una de entrenamiento. Esta última fase consistió de 11 ensayos diarios durante 22 días consecutivos, cuando las ratas cumplieron 60 días de edad. Se consideró una conducta adquirida cuando las ratas lograron el 80% de respuestas correctas en dos días consecutivos. Se registraron y compararon entre los grupos las latencias de salida del compartimento inicial del laberinto y de llegada a alguno de los brazos del mismo, mediante una prueba de Correlación de Pearson. Al porcentaje de alternancia y al tiempo de adquisición de la respuesta se les aplicó un análisis de varianza de una vía y la prueba de Tukey. Así mismo se registró durante toda la prueba el número de veces que cada rata se dirigió hacia la derecha o hacia la izquierda y el promedio de cada camada se expresó en porcentaje (Hinojosa-Cabrera y col, 1995).

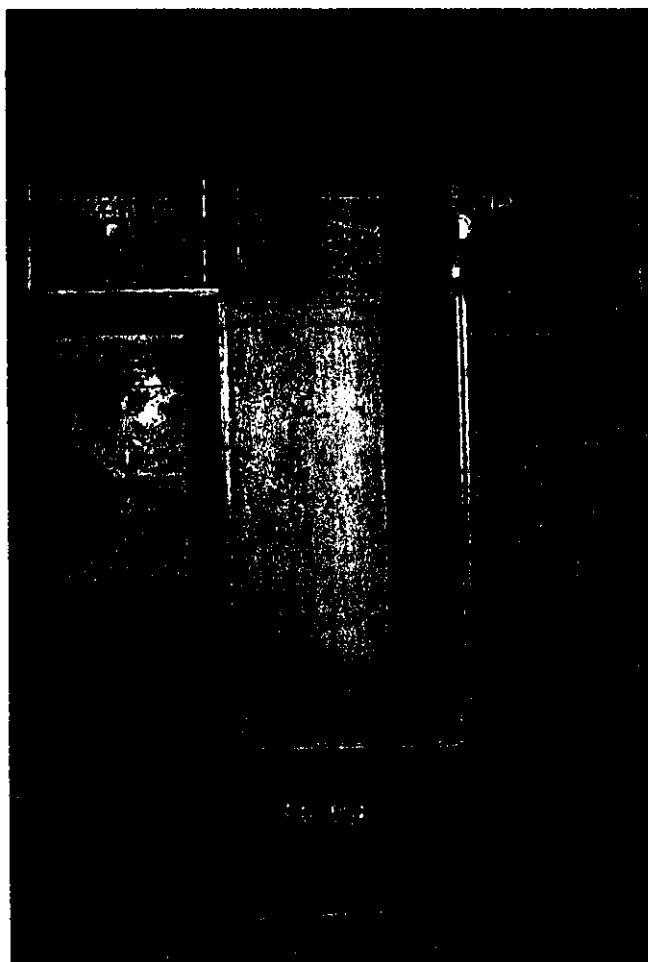


Figura 9. Vista superior del laberinto en T que se utilizó en la prueba de alternancia espacial. Compartimento de salida, brazo derecho y brazo izquierdo.

III.3 Procesamiento histológico.

Ratas recién nacidas de cada camada y de las edades P-12 y P-60, que participaron en las pruebas conductuales, se sacrificaron para el estudio histológico, durante el cual nuevamente se ignoraron deliberadamente las condiciones de gestación de cada camada con objeto de ser analizadas en un esquema doble ciego.

Tres crías por camada fueron anestesiadas al nacimiento (P-0), otras tres por camada a los 12 días de nacidas (P-12) y otras tres por camada a los 60 días de edad (P-60) con vapores de éter y perfundidas intraventricularmente con solución salina y formol al 10% amortiguado. Los encéfalos fueron extraídos después de permanecer 48 horas a 4° C dentro de su cavidad craneana con objeto de completar la fijación y evitar artefactos. El hemiserebelo derecho de cada una de las crías fue

seccionado en cortes sagitales seriados de 5 μm para ser teñidos alternativamente con el método de hematoxilina-eosina, de luxol fast blue-violeta de cresilo (Técnica de Klüver-Barrera), de Feulgen para ADN (Thompson, 1966) e impregnadas con plata según los métodos de Bielchowsky (Bancroft y Stevens, 1977), de Cajal para cerebelo y de doble impregnación de Del Río-Hortega (Ramón y Cajal y de Castro, 1972) (ver apéndice). Todas las técnicas argénticas se adecuaron para ser impregnadas en horno de microondas (Rugiero-Vargas y col., 1994). Cada 45 μm se repitió la secuencia de tinciones, haciendo un total de 3 cortes teñidos con cada técnica.

Se hizo el análisis histológico e histopatológico con todas las técnicas empleadas de cada hemisferio derecho de P-0, P-12 y P-60 en los cortes mediales del vermis. En cortes equivalentes, se tomaron fotomicrografías con la técnica y el aumento (31X, 78X, 200X, 500X o 1250X) que evidenció mejor cada estructura o detalle, con un fotomicroscopio Zeiss II.

Se utilizaron dos técnicas histológicas generales, la de hematoxilina-eosina y la doble impregnación de Río-Hortega para hacer la descripción histológica y el análisis histopatológico de la corteza y para describir los detalles citológicos de las células de Purkinje. En éstos análisis se consideraron también como indicadores de alteración cambios en la basofilia, la acidofilia y la argirofilia de las estructuras celulares y tisulares.

Se emplearon también tres técnicas semiespecíficas para prolongaciones nerviosas. Las técnicas de Klüver-Barrera y de Bielchowsky con el objeto de analizar las características cualitativas y cuantitativas de los axones y el proceso general de mielinización; y la técnica de Cajal para hacer el análisis morfológico del árbol dendrítico de las células de Purkinje.

Con la técnica de Klüver-Barrera se determinó por gravimetría la cantidad de sustancia blanca entre la corteza y los núcleos profundos en el inicio del folio 1 y en la base de la fisura prima. El método consistió en fotografiar con un objetivo de 16X un área equivalente para cada corte de 0.37 mm^2 que incluyera la corteza, la sustancia blanca y los núcleos profundos. Las imágenes impresas en papel bond de 24 kg se les eliminó la corteza y los núcleos profundos. La sustancia blanca restante se pesó en una balanza analítica SAUTER 404/18. A los promedios de 18 valores por camada ($n=3$) se les aplicó un análisis de varianza de una vía y la prueba de Tukey. En las mismas porciones del lóbulo anterior y con la misma técnica se cuantificó el número de células gliales en la sustancia blanca a 40X, en un área de 44388 μm^2 , para tal efecto se capturaron las imágenes fotográficas con un scanner Scan Jet IIc y fueron analizadas con una computadora Gateway 2000 P5 166 y el programa Image Pro Plus (IPPLUS) versión 2.0 para Windows. A los promedios de 18 valores por camada se les aplicó un análisis de varianza de una vía y la prueba de Tukey. Esta técnica se empleó también para buscar signos morfológicos de cromatolisis en las células de Purkinje.

Con la técnica de Bielchowsky, después de digitalizar las imágenes, se cuantificaron las fibras nerviosas a 100X en un área de 7706 μm^2 en el inicio del folio 1 y en el fondo de la fisura prima, en tres cortes no consecutivos de cada rata. Se contaron todas las fibras paralelas al eje mayor del campo y que se extendían de extremo a extremo del mismo. Al promedio de cada camada se aplicó un análisis de

varianza de una vía y la prueba de Tukey. Esta técnica se utilizó también para analizar la estructura, desarrollo y distribución de las cestas pericelulares de las células en canasta, así como para confirmar cambios en la argirofilia de las estructuras nucleares y nucleolares.

Finalmente, la técnica específica para ADN de Feulgen se aplicó para describir el patrón cromático de las células de Purkinje durante el desarrollo y para determinar posibles alteraciones en la organización del ADN.

III.4 Planimetría y Densidad celular.

Las células de Purkinje y las células en apoptosis fueron contadas en toda el área de la capa molecular (incluyendo la capa de células de Purkinje) en los lóbulos anteriores a las edades P-0, P-12 y P-60 en tres cortes parasagitales por cría, separados 45 μm entre cada uno. Se utilizaron cortes teñidos con Hematoxilina-Eosina. Posteriormente los mismos tres cortes por rata de las diferentes camadas y edades fueron fotografiados a 31 aumentos y las imágenes fotográficas capturadas con un scanner Scan Jet IIc y analizados con una computadora Gateway 2000 P5 166 y el programa Image Pro Plus (IPPLUS) versión 2.0 para Windows. Estas imágenes se utilizaron para medir el área de las capas granular externa, molecular y granular interna así como el área total del lóbulo anterior del cerebelo y su longitud externa. Para determinar la amplitud de las capas a las edades P-12 y P-60 fueron tomadas 6 mediciones desde el fondo a la superficie separados 250 μm a lo largo de la fisura prima en 3 cortes no consecutivos de cada animal con una reglilla micrométrica a 16X (Dumesnil-Bousez y Sotelo, 1992). El promedio de 54 mediciones por camada ($n=3$) fue analizado para cada edad mediante un análisis de varianza de una vía y la Prueba de Tukey. Se calculó la densidad de células de Purkinje en el espesor de la capa molecular (Número de células de Purkinje/Área de la capa molecular) en todo el lóbulo anterior y se aplicaron las mismas pruebas estadísticas.

III.5 Inmunohistoquímica.

Para el estudio inmunohistoquímico se siguió el mismo procedimiento para la administración del O_3 y el mantenimiento de las ratas que para el estudio histológico, pero se analizaron crías de las edades P-0, P-5, P-10, P-15, P-20 y P-25 de madres mantenidas en un ambiente libre de contaminantes y expuestas al O_3 durante la gestación. Esto fue debido a que durante este periodo se verifica principalmente la sinaptogénesis y la gliogénesis en el cerebelo.

Tres crías por edad desarrolladas en un medio libre de contaminantes y tres crías de cada edad expuestas al O_3 durante su desarrollo fueron anestesiadas con vapor de éter y perfundidas intraventricularmente con solución salina y paraformaldehído al 4%. Se extrajeron los cerebelos y se fijaron por inmersión en paraformaldehído al 4% a 4°C por 3 horas, se lavaron en sacarosa al 12%

durante 24 horas y en sacarosa al 16% y 18% a 4°C durante 2 horas en cada una. Posteriormente se procesaron para incluirlos en parafina y la mitad derecha del vermis cerebelar se cortó sagitalmente en forma seriada y con la mitad izquierda se hicieron cortes coronales seriados, ambos a 5 µm de grosor. Los cortes fueron montados en portaobjetos con poli-L-lisina (Sigma No P89920) previamente preparados; se desparafinaron, hidrataron hasta agua destilada y se bloquearon las proteínas inespecíficas con albúmina sérica bovina.

Se utilizaron cortes sagitales y coronales para hacer la comparación de inmunoreactividad con anti-sinaptofisina y anti-proteína fibrilar ácida glial (PFAG) entre las crías de edades P-0 a P-25 expuestas al O₃ y no expuestas.

La tinción inmunohistoquímica para la proteína sinaptofisina, asociada a las vesículas sinápticas, se utilizó para determinar diferencias en la sinaptogénesis de las capas de la corteza del cerebelo entre las crías de edades P-0 a P-25 expuestas al O₃ y no expuestas.

La tinción inmunohistoquímica para PFAG se utilizó para determinar gliosis como signo de daño neuronal entre las crías de edades P-0 a P-25 expuestas al O₃ y no expuestas.

Para cada edad tres cortes sagitales y tres coronales no consecutivos (separados 45 µm) del vermis cerebelar de las ratas expuestas al O₃ y sus cortes equivalentes de las ratas no expuestas fueron incubados con el anticuerpo monoclonal sinaptofisina (Boehringer Mannheim Biochemica No 902314) en una dilución 1:10 en una cámara húmeda a temperatura ambiente durante 2 horas. De la misma manera se procedió a la incubación con el anticuerpo monoclonal proteína fibrilar ácida glial (Boehringer Mannheim Biochemica No 814369).

Los cortes se lavaron con PBS (3 cambios de 5 min.) y se incubaron a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario biotinado (Dako LSAB kit Universal K676) durante 30 minutos. Después de tres lavados con PBS se incubaron a temperatura ambiente con el complejo estreptoavidina-fosfatasa alcalina (Dako LSAB kit Universal K676) por 20 minutos. Los cortes se lavaron con PBS (3 cambios de 10 minutos) y se revelaron con nueva fucsina (Dako LSAB kit Universal K676) a temperatura ambiente durante 20 minutos. Se lavaron con agua destilada, se contratiñeron con hematoxilina de Harris por 10 minutos, se lavaron con agua corriente y destilada y se cubrieron con medio de montaje acuoso (Dako S3025).

Los controles negativos correspondientes se realizaron mediante el mismo procedimiento con la omisión del anticuerpo primario.

III.7 Estadística.

Los resultados numéricos de las pruebas conductuales, de la planimetría y de la densidad celular de cada camada se compararon como grupos independientes.

La significancia estadística entre camadas fue establecida mediante un análisis de varianza (ANOVA $p < 0.02$) de una vía y la diferenciación entre grupos fue identificada con la prueba de Tukey ($p < 0.05$).

IV RESULTADOS

IV.1 Reproducción

Las camadas C1, C3 y C4 representaron en conjunto al grupo control y tuvieron un promedio de 11.6 crías, mientras que la camada C2 correspondió al grupo de las madres gestantes expuestas al O₃ junto con la madre que abortó todas sus crías y con la madre que no tuvo crías a pesar de presentar tapón vaginal y presencia de espermatozoides en su frotis vaginal. La camada C2, expuesta al O₃, tuvo 9 crías con un promedio de peso 5% menor que el promedio de las crías no expuestas (5.86 g y 6.14 g respectivamente).

IV.2 Conductuales

En la prueba de enderezamiento ninguna camada presentó diferencias en los días postnatales 6, 9, 12 y 15 en que se realizó la prueba.

En la prueba de geotaxis negativa, la camada C2 se colocó en posición positiva más rápidamente que las camadas C1, C3 y C4 en el día postnatal 9 de manera estadísticamente significativa (Figura 10).

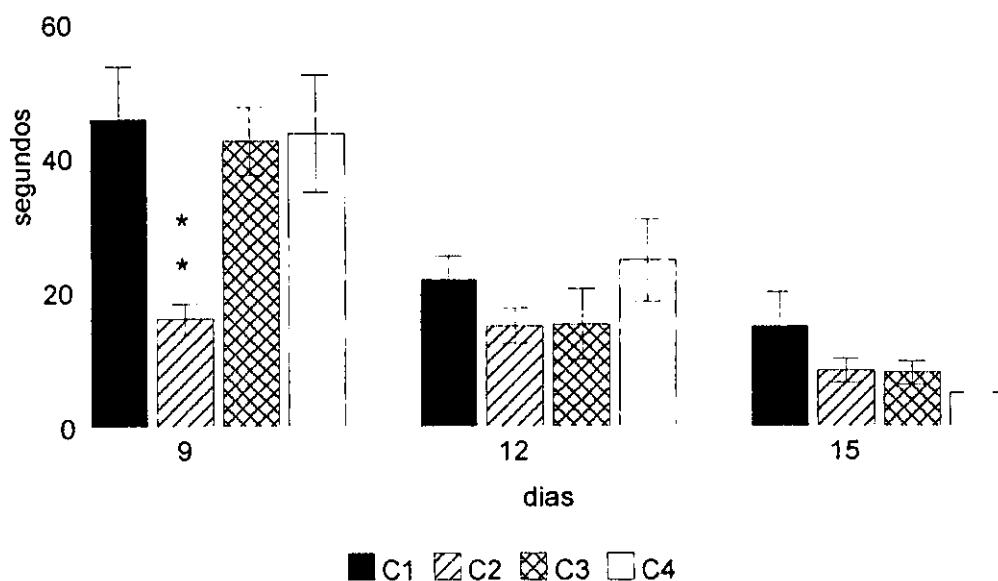


Figura 10. Resultados de la prueba de geotaxis negativa (Media \pm error estándar). La camada C2, expuesta al O₃ se observa significativamente adelantada en esta prueba el día P-9. **Diferencia significativa de C2 respecto a C1, C3 y C4, $p < 0.05$

En la prueba de nado se observaron diferencias en la camada C2 en el ángulo de la cabeza respecto al nivel del agua, mostrándose significativamente más adelantada a las edades de 9 y 12 días postnatales (Figura 11). Los otros parámetros de la prueba de nado: dirección de nado y movimiento de miembros no mostraron diferencias significativas entre las camadas.

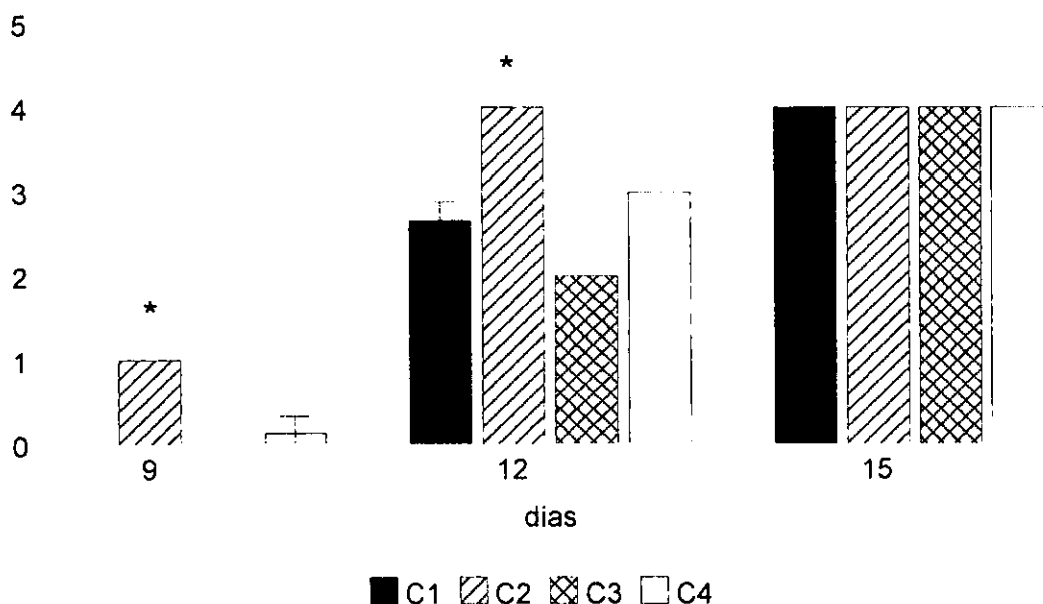


Figura 11. Resultados del parámetro de ángulo de la cabeza respecto al nivel del agua durante la prueba de nado (Media \pm error estándar). La camada C2, expuesta al O₃, se mostró más madura en este parámetro desde el día P-9. * Diferencia significativa de C2 respecto a C1, C3 y C4, $p < 0.05$

En la prueba de alternancia espacial se registraron las latencias de salida del compartimento inicial y de llegada a alguno de los brazos, la prueba de correlación de Pearson nos indicó que los tiempos de salida y llegada tienen una menor correlación en la camada C2 (Tabla 1).

Tabla 1. Coeficiente de correlación de Pearson entre las latencias de salida del compartimento inicial del laberinto y la llegada a uno de los brazos en T.

	SALIDA	LLEGADA
Camada C1	-0.7696647	-0.905299
Camada C2	-0.5993948	-0.674047
Camada C3	-0.8716307	-0.879066
Camada C4	-0.7528675	-0.861847

La camada C2 mostró menor correlación en las dos latencias respecto a las camadas C1, C3 y C4.

El tiempo de adquisición de la conducta de alternancia espacial (80% de aciertos en dos o más días consecutivos), fue de 14 días para las camadas C1, C3 y C4 y de 20 días para la camada C2. A lo largo de 22 días de prueba, el porcentaje de alternancia mostró más cerca del patrón normal (80%) a las camadas C1, C3 y C4 con un 65% y se dirigieron al brazo izquierdo 48.6% de las veces, mientras que la camada C2 se mostró más alejado del patrón de alternancia normal con un 34.9% y se dirigió al brazo izquierdo 75% de las veces. La camada C2 no alternó antes del día 18; mientras que el grupo control empezó a alternar desde el inicio, aunque con error (Figura 12).

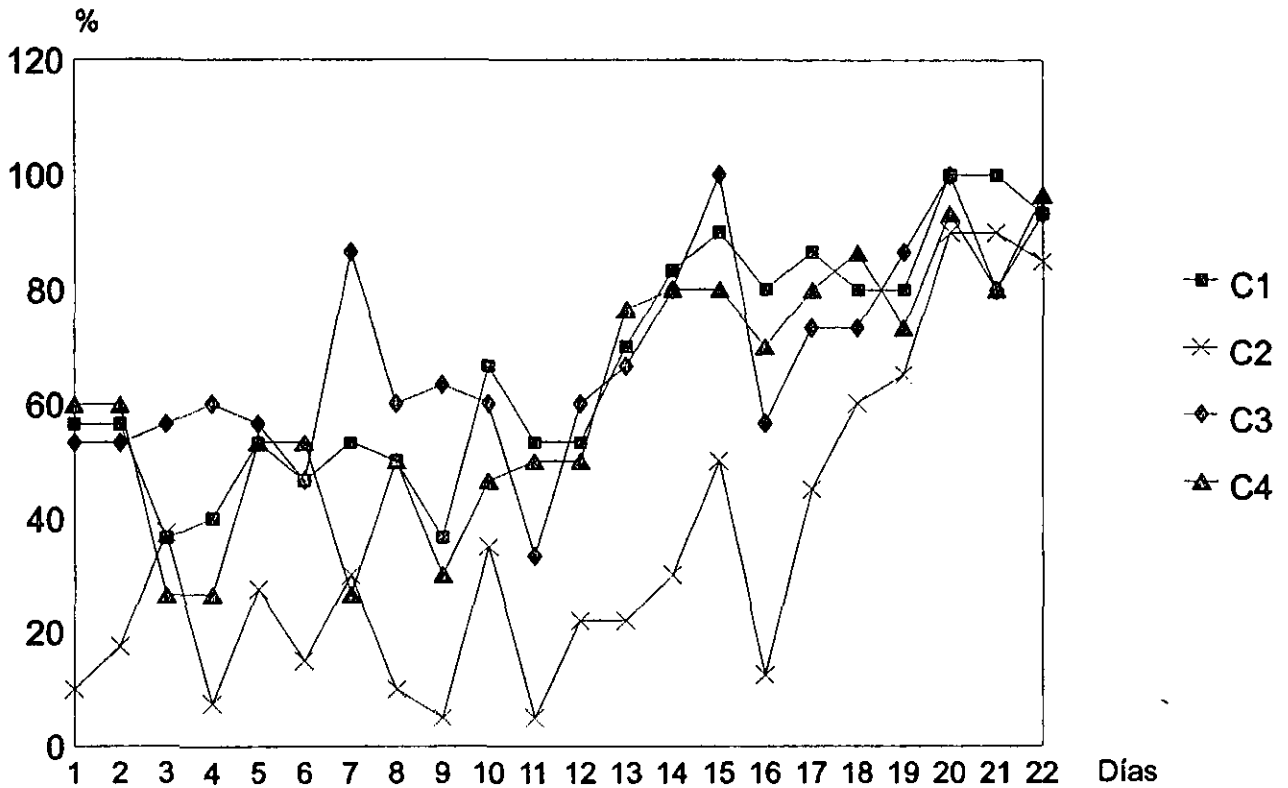


Figura 12. Porcentaje de Alternancia. La camada C2 nunca alternó antes del día 18 y adquirió la conducta hasta el día 20. Durante toda la prueba tuvo un promedio de 34.9 % de alternancia

IV.3 Histológicos.

El lóbulo anterior del cerebelo fue claramente identificado en los cortes parasagitales de todas las camadas desde el nacimiento (P-0) debido a la presencia de la fisura *prima*. La capa granular interna estuvo ausente en todas las camadas a esta edad. Encontramos que la capa molecular del lóbulo anterior de la corteza del cerebelo se encontraba poco diferenciada a la edad P-0 en las camadas C1, C3 y C4 y prácticamente indiferenciada en la camada C2, mientras que la capa granular externa se observó hipoplásica en la camada C2 (Figura 13 A y B).

Debido a la poca diferenciación de las capas en el lóbulo anterior del vermis cerebelar de las ratas recién nacidas, no se pudo medir su amplitud.

Histológicamente encontramos entre la capa granular externa y la sustancia blanca de las camadas C1, C3 y C4, células redondas o piriformes con núcleo pálido y escaso citoplasma identificadas como células de Purkinje inmaduras constituidas en 3 a 6 hileras (Figura 13 C). El núcleo presentó varios nucleolos como corresponde a las neuronas inmaduras (Figura 14 A); mientras que en la camada C2, se observó hiperplasia de estas células (Tabla 2) incluidas en un intersticio fibroso (Figura 13 D). Abundantes células de Purkinje tuvieron forma irregular y presentaron vacuolas citoplásmicas (Figura 13 D), algunas células mostraron la cromatina muy condensada y la mayoría presentó sólo un nucleolo grande (Figura 14 B). Además en la camada C2 encontramos a este nivel abundantes astrocitos (Figura 15 A), microglía (Figura 15 B), macrófagos (Figura 15 D) y cuerpos apoptóticos (Figura 15 C), los cuales fueron evidentes con las técnicas de hematoxilina-eosina, de Klüver-Barrera y con la doble impregnación de Río-Hortega. Los cuerpos apoptóticos se cuantificaron y su número fue significativamente mayor al de las otras camadas (Figura 16).

Tabla 2. Número total (Media \pm error estándar) de células de Purkinje presentes en el lóbulo anterior a la edad P-0

C1	C2	C3	C4
287.66 \pm 14.4	481.66 \pm 27.3*	155.66 \pm 5.84	196.33 \pm 3.2

Tres cortes sagitales por animal y tres animales de cada camada a la edad P-0 se utilizaron para contar todas las células de Purkinje presentes en el Lóbulo anterior de vermis cerebelar. *Diferencia significativa de C2 respecto a C1, C3 y C4, $p < 0.05$

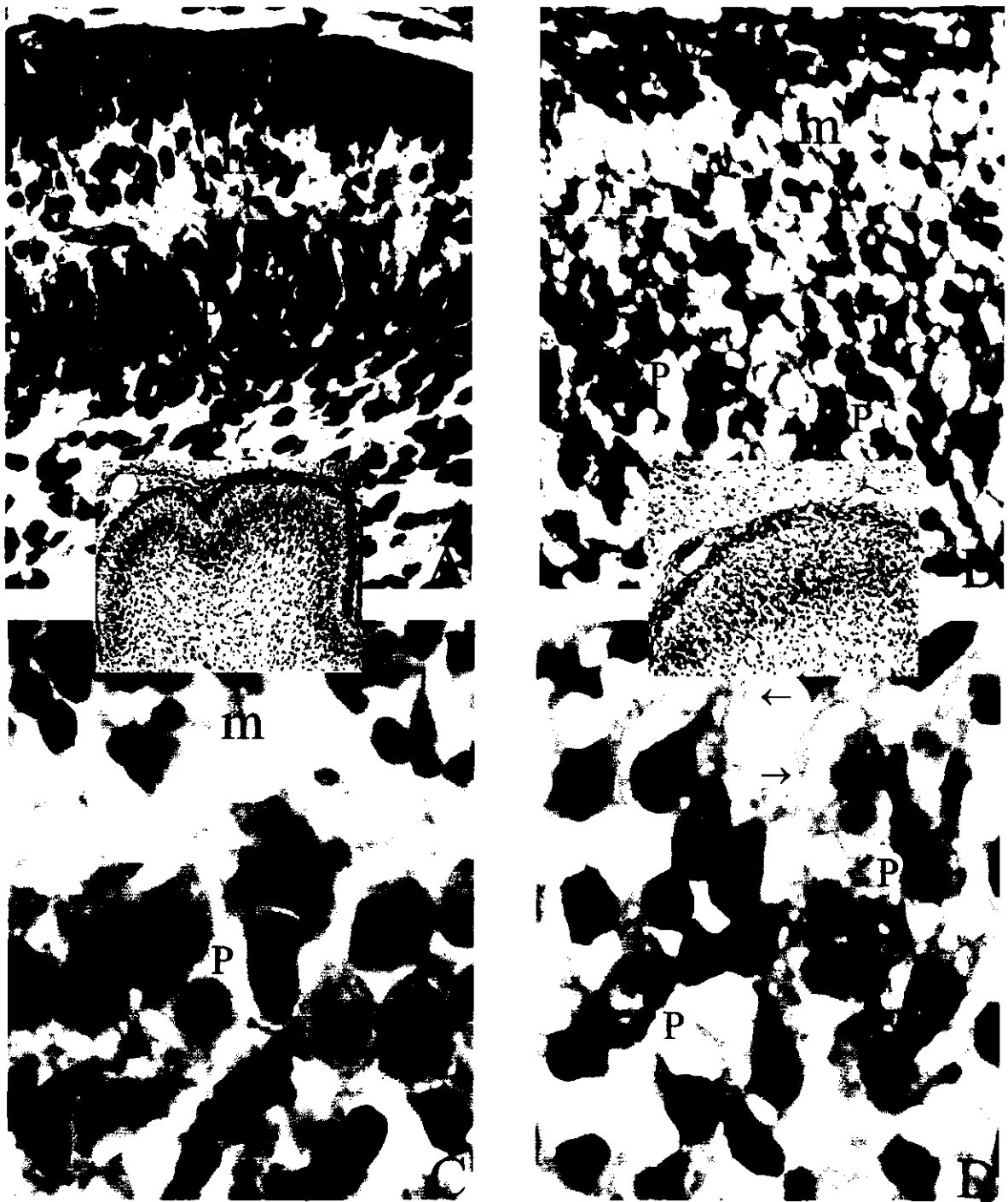


Figura 13. Cortes sagitales del lóbulo anterior del cerebelo de ratas en edad P-0, Hematoxilina-Eosina. (A) Corte representativo de las capas C1, C3 y C4, y (B) corte representativo de la camada C2. Se observan las capas granular externa (e) y molecular (m) que incluye a las células de Purkinje (P), 500X. (C) Células de Purkinje inmaduras (P) observadas en la camada C1, C2 y C3, (D) Células de Purkinje (P) de la camada C2 dispersas y vacuoladas incluidas en un neuropilo

fibroso (→), 1250X. Recuadro izquierdo, lóbulo anterior de las capas C1, C3 y C4, obsérvese la organización incipiente de las capas. Recuadro derecho, lóbulo anterior de la camada C2, obsérvese el desarreglo de las capas, 200 X.

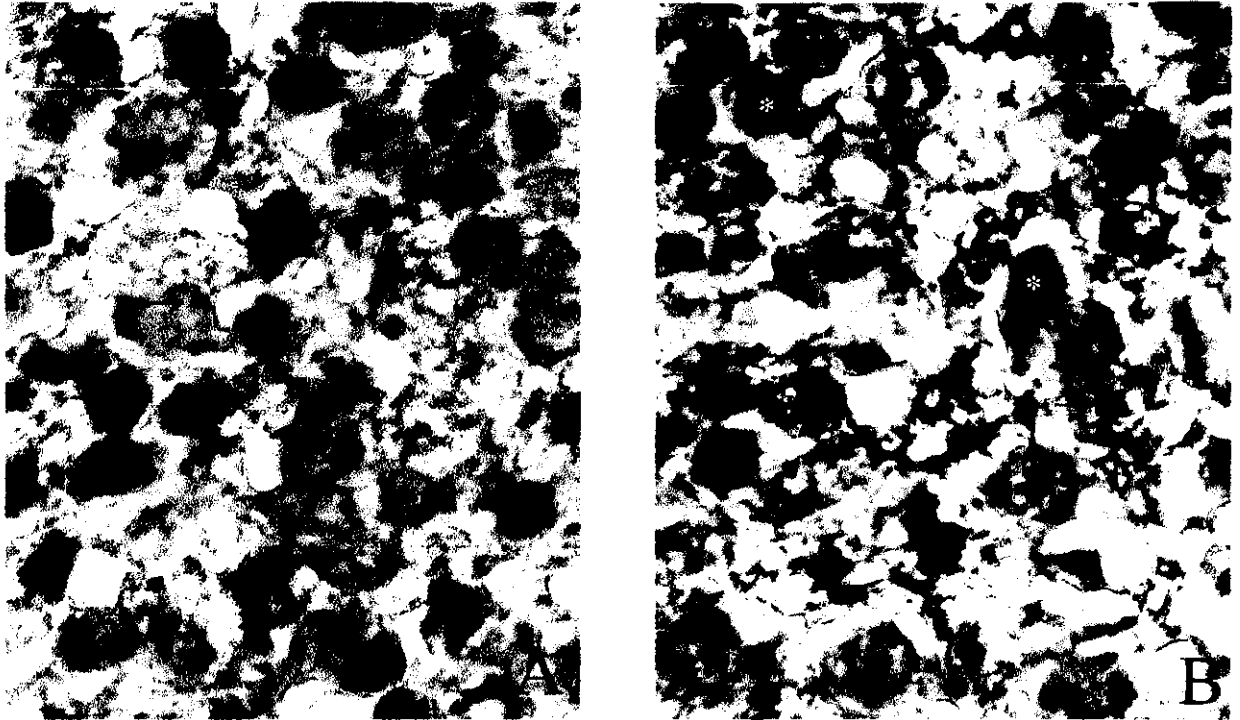


Figura 14. Cortes sagitales del lóbulo anterior del cerebelo de ratas en edad P-0, Técnica de Bielchowsky, 1250X. (A) Núcleos con varios nucleolos (→) de las células de Purkinje inmaduras de arreglo y aspecto normal de las capas C1, C3 y C4 y (B) Núcleos de las células de Purkinje pertenecientes a la camada C2, se observa un solo nucleolo grande (→), algunos núcleos tienen su cromatina condensada (*).

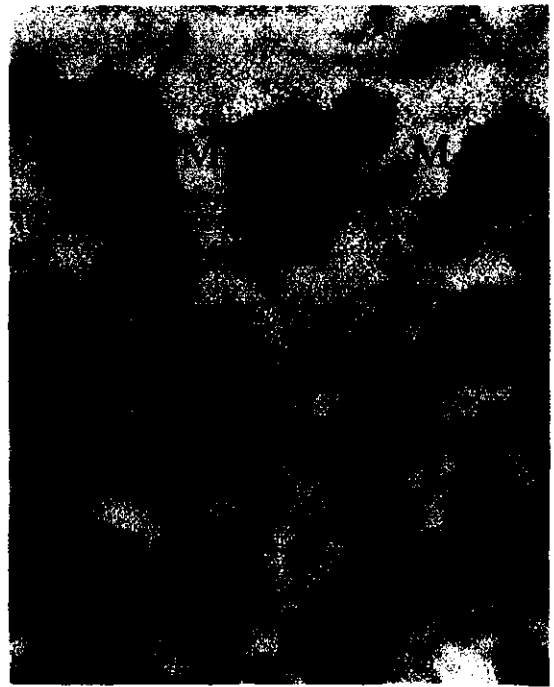
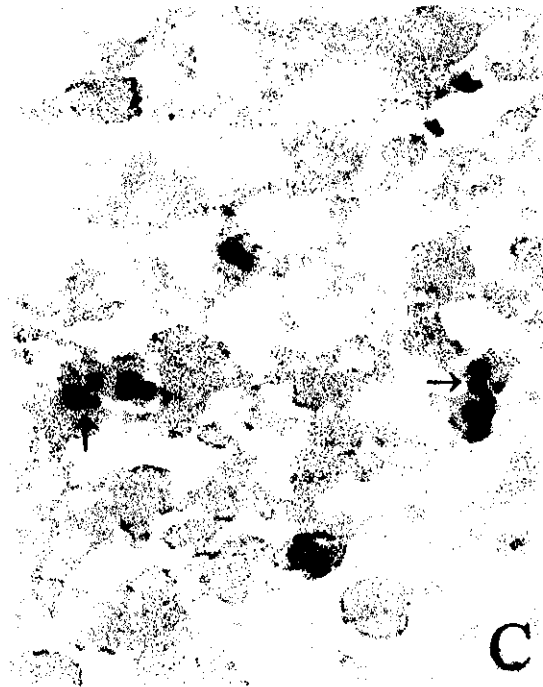
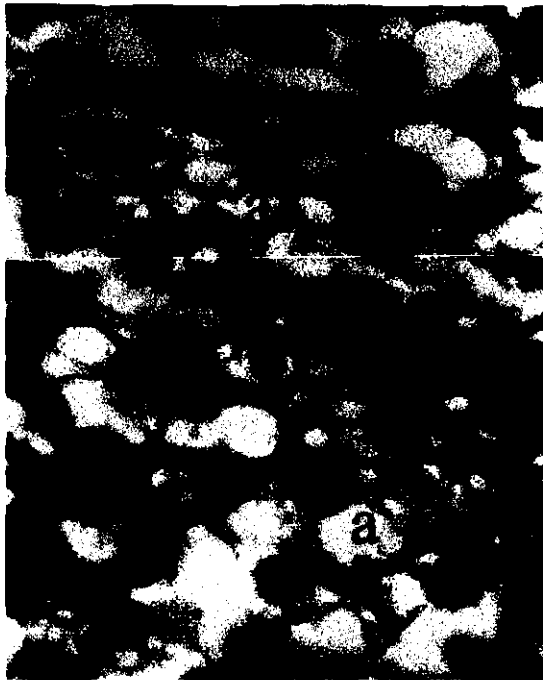


Figura 15. Células gliales y cuerpos apoptóticos localizados en la capa molecular de la camada C2 a la edad P-0, 1250X. (A) Astrocitos (a), (Hematoxilina-Eosina), (B) microglía (m), (Luxol fast blue-violeta de cresilo), (C) cuerpos apoptóticos (→) (Doble impregnación de Del Río-Hortega) y (D) macrófagos (M), (Luxol fast blue-violeta de cresilo).

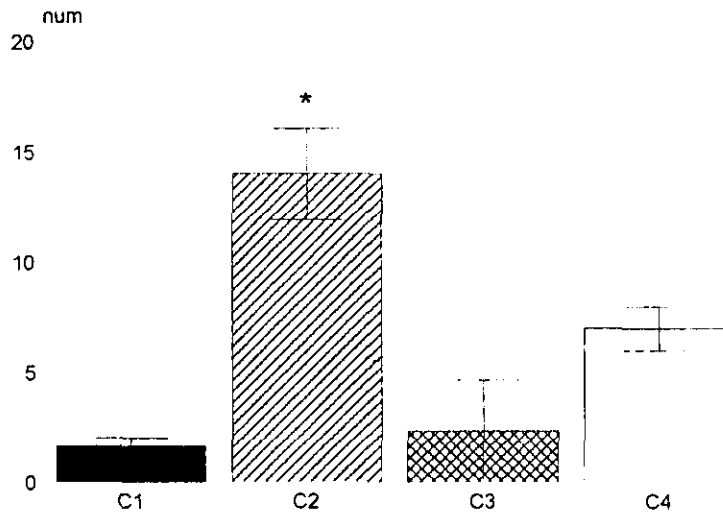


Figura 16. Número de cuerpos apoptóticos presentes en la capa molecular de la corteza del cerebelo a la edad P-0, teñidos con la técnica de hematoxilina-eosina. La camada C2, presentó un número significativamente mayor de dichos cuerpos con relación a C1, C3 y C4, * $p < 0.05$

Con respecto a la edad P-0, a la edad P-12, encontramos un aumento en el desarrollo del lóbulo anterior en las 4 capas, aunque la camada C2 mostró un tamaño menor y retraso en el patrón de plegamiento de la corteza. En la camada C2 observamos la capa granular externa hipoplásica y mayor grosor en la capa molecular respecto a la de las capas C1, C3 y C4 (Tabla 3, Figura 17 B y D).

Tabla 3. Amplitud de las capas granular externa y molecular en μm (Media \pm error estándar) a la edad P-12

	C1	C2	C3	C4
Molecular	87.73 ± 3.4	$104.10 \pm 3.9^*$	68.71 ± 1.86	85.37 ± 3.22
Granular externa	32.35 ± 0.85	$23.83 \pm 1.37^*$	40.90 ± 1.82	40.41 ± 1.10

Tres cortes sagitales por animal y tres animales de cada camada a la edad P-12 se utilizaron para tomar 6 mediciones de la grosor de las capas a lo largo de la fisura *prima*. La camada C2 mostró diferencias significativas en la amplitud de las capas granular externa y molecular respecto a C1, C3 y C4, * $p < 0.05$.

A esta edad (P-12) no se encontraron alteraciones gliales que sugirieran daño tisular en ninguna de las camadas. La sustancia blanca se observa más fasciculada en los controles pero no se encontraron diferencias significativas en la cantidad de sustancia blanca valorada por gravimetría.

En las camadas C1, C3 y C4, los somas de las células de Purkinje fueron claramente identificados, distribuidos en forma ordenada en una sola hilera, con un árbol dendrítico con sus ramas principales cortas y ramificadas (Figura 17 A y C). Presentaron su núcleo vesicular redondo con cromatina muy laxa y nucleolo prominente con el ADN nucleolar impregnado intensamente en su parte central (Figura 18 A). El citoplasma presentó cuerpos de Nissl por todo el pericarion. Mientras que en la camada C2 los somas alargados de las células de Purkinje se encontraron frecuentemente organizados en dos hileras y el árbol dendrítico con segmentos principales largos y poco ramificados (Figura 17 B y D). El núcleo presentó cromatina laxa y el nucleolo se observó débilmente impregnado y presentó en su periferia de 1 a 4 cuerpecillos de ADN nucleolar Feulgen positivos (+), basófilos e intensamente argirófilos (Figura 18 B).

A la edad P-60, encontramos el arreglo histológico adulto de las capas de la corteza cerebelar y la morfología piriforme de las células de Purkinje en todas las camadas. Las camadas C1, C3 y C4 mostraron su núcleo vesiculoso con cromatina muy laxa y su nucleolo intensamente basófilo, su citoplasma con cuerpos de Nissl por todo el citoplasma (Figura 19 A y C, Figura 20 A). Mientras que en la camada C2 encontramos que los núcleos de muchas células de Purkinje (29%) estaban descoloridos con cuerpos densos de cromatina en su periferia intensamente basófilos y Feulgen positivos (Figura 20 B y C). La técnica de Feulgen hizo posible establecer que los criterios citológicos utilizados para determinar apoptosis fueron adecuados. También éstas células mostraron deterioro del nucleolo y pérdida de basofilia citoplásmica con dispersión de ribosomas y grumos de Nissl (Figura 19 B y D). No se encontraron diferencias en la cantidad de sustancia blanca, en el número de fibras nerviosas, ni en el número de células gliales en ninguna camada. Se observaron en el lóbulo anterior de las ratas de la camada C2, cestas pericelulares por debajo de la monocapa de células de Purkinje, algunas de las cuales estaban vacías y retraídas, lo cual no se observó en las otras camadas (Figura 21 B).

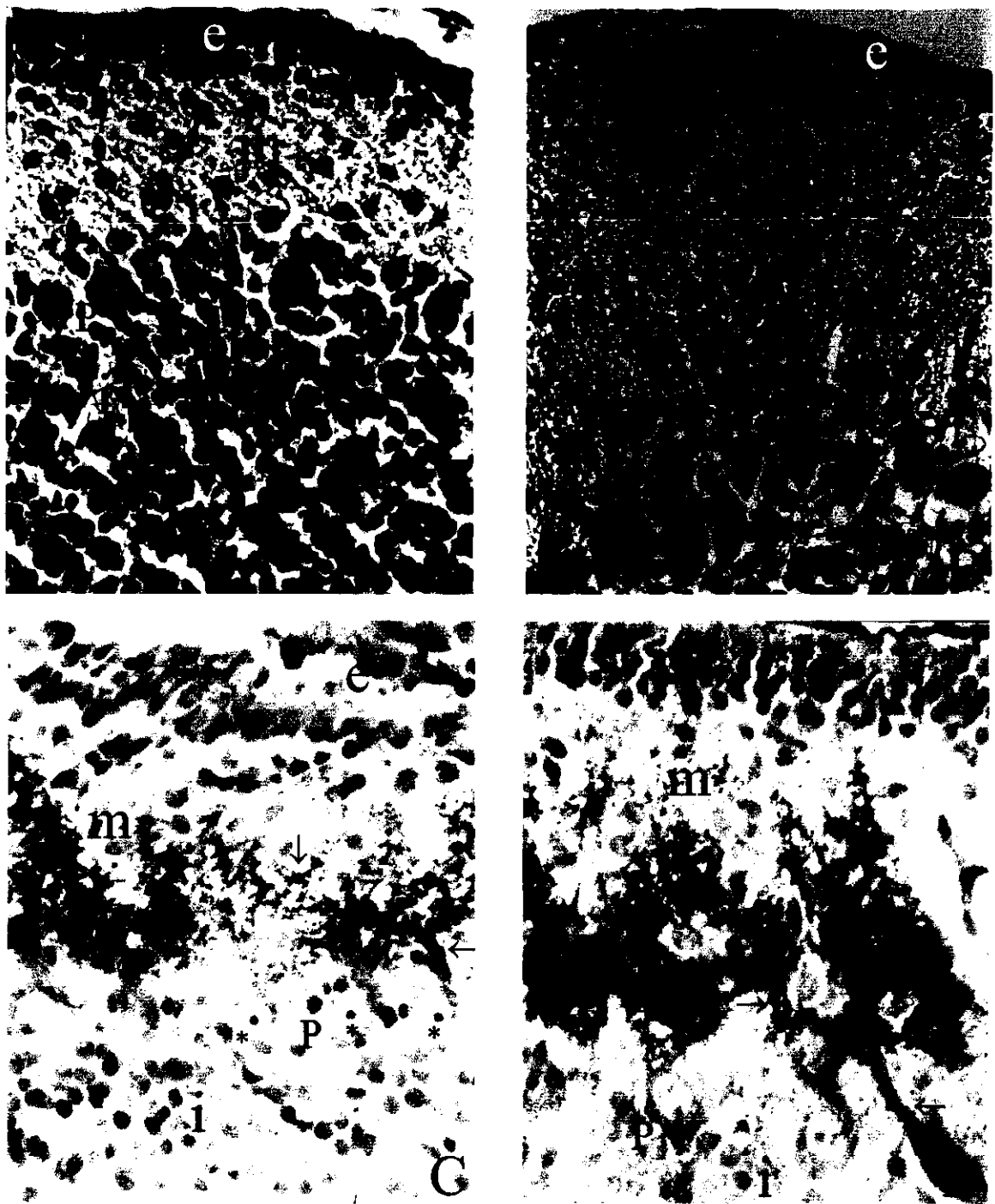


Figura 17. Cortes sagitales del lóbulo anterior del cerebelo de ratas en edad P-12. **(A)** Corte representativo de las capas C1, C3 y C4 y **(B)** corte de la camada C2, se muestran las capas granular externa (e), molecular (m), granular interna (i) y las células de Purkinje (P). Obsérvese en la camada C2 la capa molecular más ancha y las células de Purkinje en dos hileras y su soma alargado. Hematoxilina-Eosina, 500 X. **(C)** Células de Purkinje (P) representativas de las capas C1, C3 Y C4 que

muestran su árbol dendrítico (→) y su núcleo con nucleolo (*). (D) Células de Purkinje (P) de la camada C2 mostrando la longitud y ramificación de sus árboles dendríticos. Obsérvense los segmentos dendríticos más largos (→) y menos ramificados en la camada C2. Técnica para cerebelo de Cajal, 640X.



Figura 18. (A) Células de Purkinje (P) representativas de las camadas C1, C3 Y C4 a la edad P-12 mostrando sus nucleolos con un cuerpo central intensamente impregnado (→) y **(B)** Células de Purkinje de la camada C2 mostrando sus nucleolos débilmente impregnados y cuerpecillos perinucleolares intensamente argirófilos (→). Los cortes se impregnaron simultáneamente y durante el mismo tiempo por lo que la diferencia en la impregnación se debe a que el cerebelo de la camada C2 tuvo más afinidad por la plata. Doble impregnación de Del Río-Hortega, 1250X.

muestran su árbol dendrítico (→) y su núcleo con nucleolo (*). (D) Células de Purkinje (P) de la camada C2 mostrando la longitud y ramificación de sus árboles dendríticos. Obsérvense los segmentos dendríticos más largos (→) y menos ramificados en la camada C2. Técnica para cerebelo de Cajal, 640X.



Figura 18. (A) Células de Purkinje (P) representativas de las camadas C1, C3 Y C4 a la edad P-12 mostrando sus nucleolos con un cuerpo central intensamente impregnado (→) y (B) Células de Purkinje de la camada C2 mostrando sus nucleolos débilmente impregnados y cuerpecillos perinucleolares intensamente argirófilos (→). Los cortes se impregnaron simultáneamente y durante el mismo tiempo por lo que la diferencia en la impregnación se debe a que el cerebelo de la camada C2 tuvo más afinidad por la plata. Doble impregnación de Del Río-Hortega, 1250X.

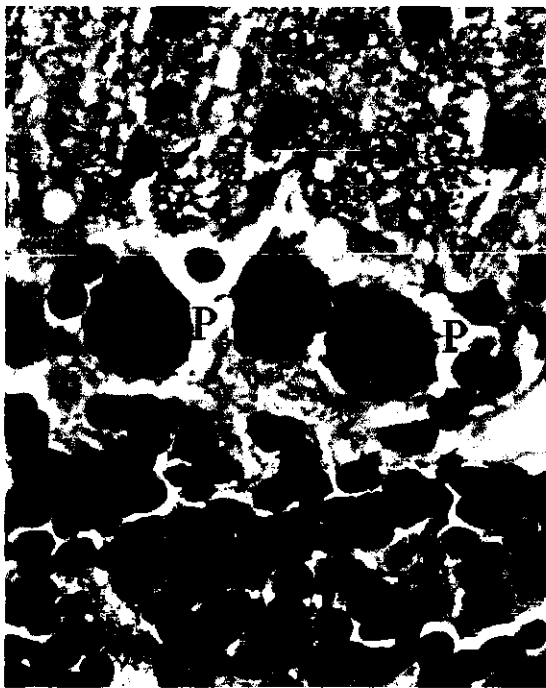


Figura 19. Cortes sagitales del lóbulo anterior del cerebelo de ratas en edad P-60. Hematoxilina-Eosina. (A) Corte representativo de las camadas C1, C3 y C4, mostrando el arreglo adulto normal de las capas molecular (m), granular interna (i) y de las células de Purkinje (P) y (B) Corte de la camada C2 mostrando las mismas capas y alteración en los núcleos (→) de las células de Purkinje, 500 X. (C) Células de Purkinje con grumos de Nissl (*), núcleo (N) , nucleolo (n) y demás

características citológicas normales de las capas C1, C3 y C4 y en (D) células de Purkinje de la camada C2 con dispersión de ribosomas y de grumos de Nissl (*) así como fragmentación y condensación de cromatina en la periferia del núcleo (→) y alteración nucleolar (n), 1250X.

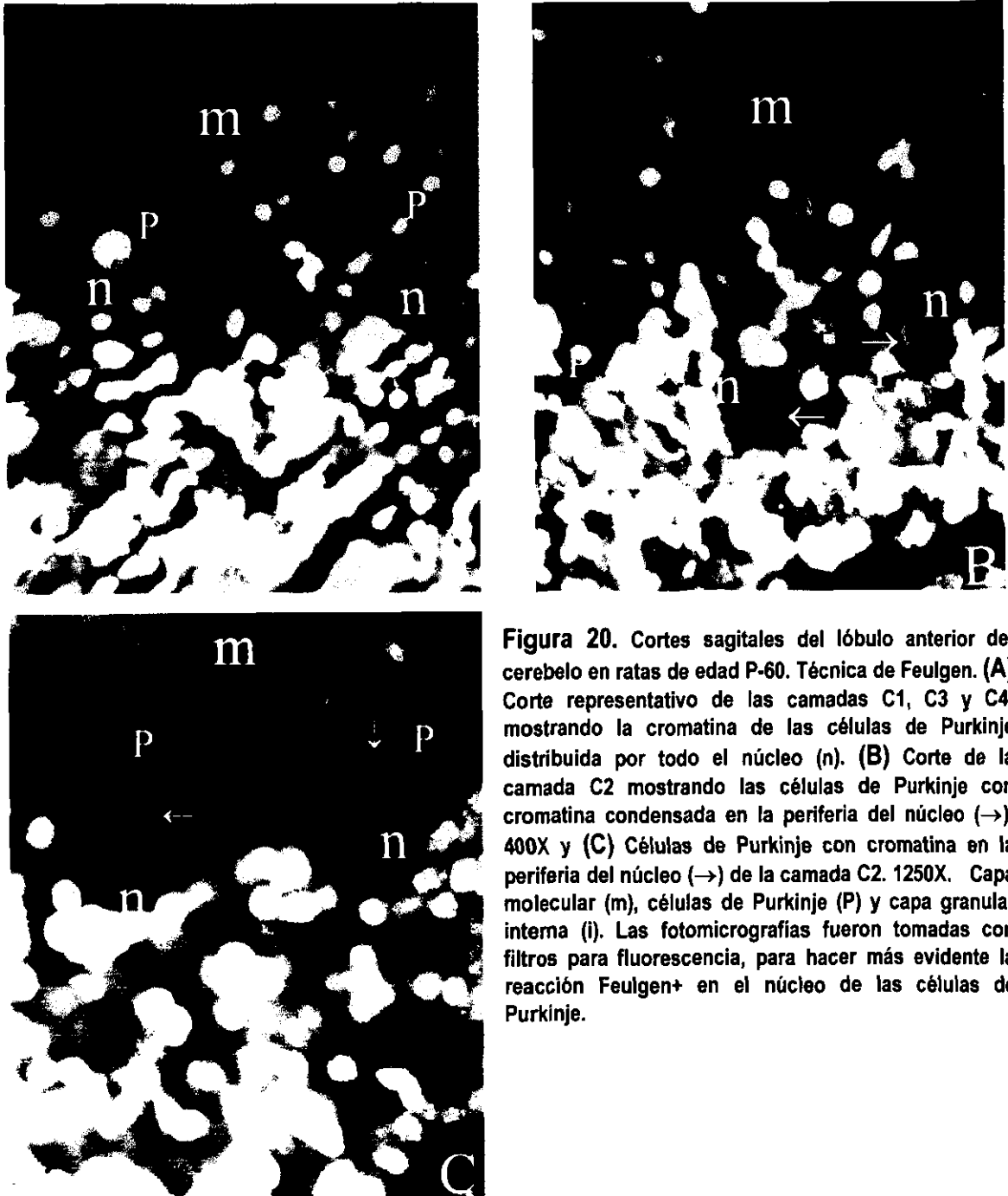


Figura 20. Cortes sagitales del lóbulo anterior del cerebelo en ratas de edad P-60. Técnica de Feulgen. (A) Corte representativo de las capas C1, C3 y C4, mostrando la cromatina de las células de Purkinje distribuida por todo el núcleo (n). (B) Corte de la camada C2 mostrando las células de Purkinje con cromatina condensada en la periferia del núcleo (→), 400X y (C) Células de Purkinje con cromatina en la periferia del núcleo (→) de la camada C2. 1250X. Capa molecular (m), células de Purkinje (P) y capa granular interna (i). Las fotomicrografías fueron tomadas con filtros para fluorescencia, para hacer más evidente la reacción Feulgen+ en el núcleo de las células de Purkinje.

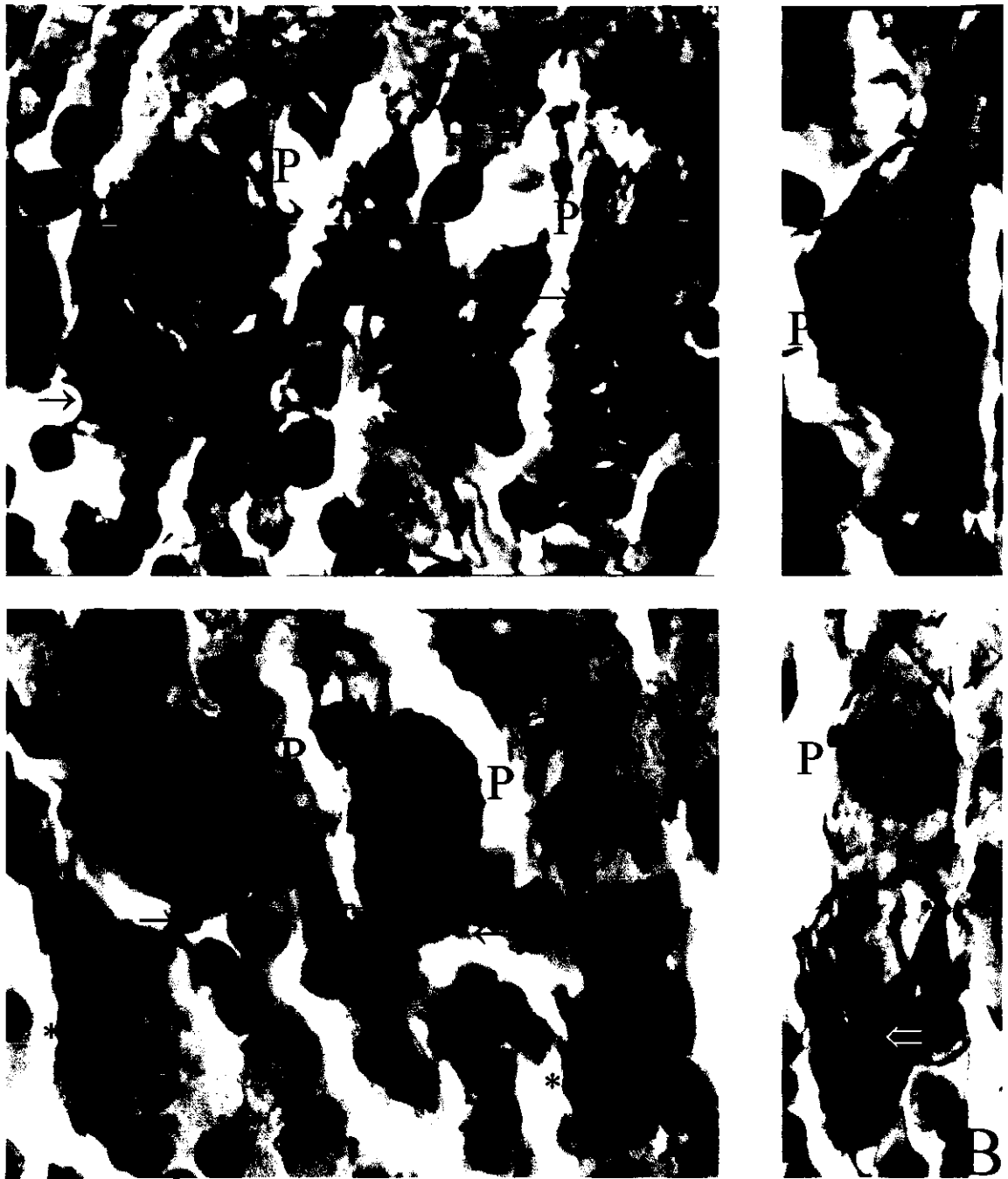


Figura 21. (A) Células de Purkinje (P) representativas de las capas C1, C3 Y C4 a la edad P-60, mostrando sus cestas pericelulares (→) en una monocapa y **(B)** Células de Purkinje (P) de la camada C2 mostrando sus cestas pericelulares (→) a diferentes niveles, las que están por debajo de la monocapa pueden estar rodeando a células de Purkinje ectópicas (⇐) o retraídas y vacías (*). Técnica de Bielchowsky, 1250X.

IV.4 Planimetría y Densidad celular

Se observó un menor desarrollo en el lóbulo anterior de la camada C2 respecto a las otras tres camadas, caracterizado por una reducción en el patrón de foliación y en el área del lóbulo anterior (Figura 22), que el análisis planimétrico mostró significativamente menor en la camada C2 tanto a la edad P-12 como a la edad P-60 (Figura 23).



Figura 22. Cortes representativos y a escala del lóbulo anterior del vermis cerebelar a las edades P-0, P-12 y P-60 comparados planimétricamente. En (A), camada C1, sin diferencia significativa con C3 y C4 y en (B), camada C2, obsérvese el menor desarrollo tanto en tamaño como del patrón de foliación del lóbulo anterior en la camada C2.

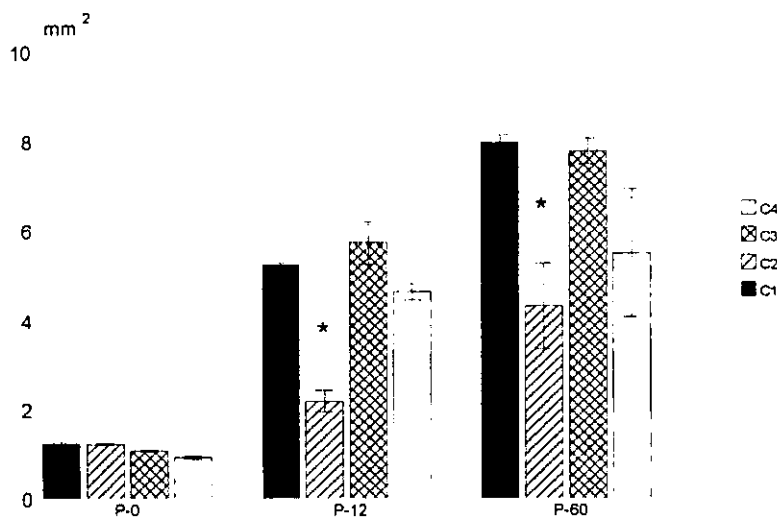


Figura 23. Área total del lóbulo anterior del vermis cerebelar a las edades P-0, P-12 y P-60 mostrando una disminución significativa * $p < 0.05$ en la camada C2 respecto a C1, C3 y C4.

Así mismo, la camada C2 mostró una disminución significativa en el área de las capas molecular y granular interna del lóbulo anterior del vermis cerebelar cuando fue comparada con las camadas C1, C3 y C4 (Figura 24 y Figura 25).

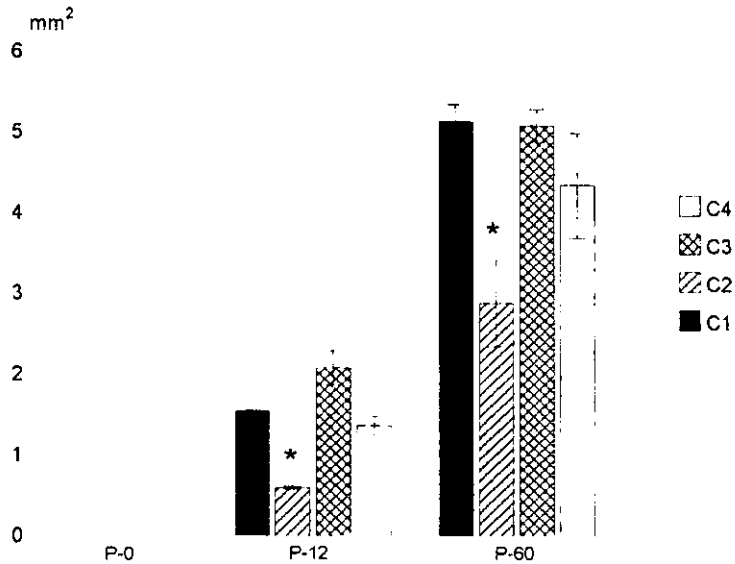


Figura 24. Área de la capa molecular analizada en las camadas C1, C2, C3 y C4 a las edades de P-12 y P-60. Los resultados muestran una disminución significativa * $p < 0.05$ para la camada C2 respecto a C1, C3 y C4.

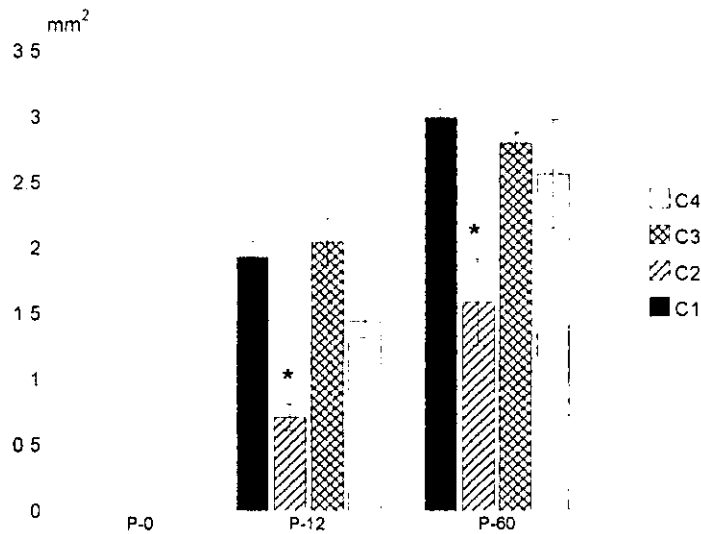


Figura 25. Área de la capa granular interna analizada en las camadas C1, C2, C3 y C4 a las edades de P-12 y P-60. Los resultados muestran una disminución significativa * $p < 0.05$ para la camada C2 respecto a C1, C3 y C4.

La camada C2 también mostró a la edad P-12 una densidad significativamente mayor de células de Purkinje en el lóbulo anterior del vermis cerebelar al ser comparada con las otras tres camadas (Figura 26), no obstante que el área de la capa molecular fue significativamente menor. A la edad P-60 no se encontró diferencia significativa en la densidad de las células de Purkinje entre ninguna de las camadas, lo que confirma que en la camada C2, hubo muerte tardía de éstas células como fue observado en los resultados histológicos.

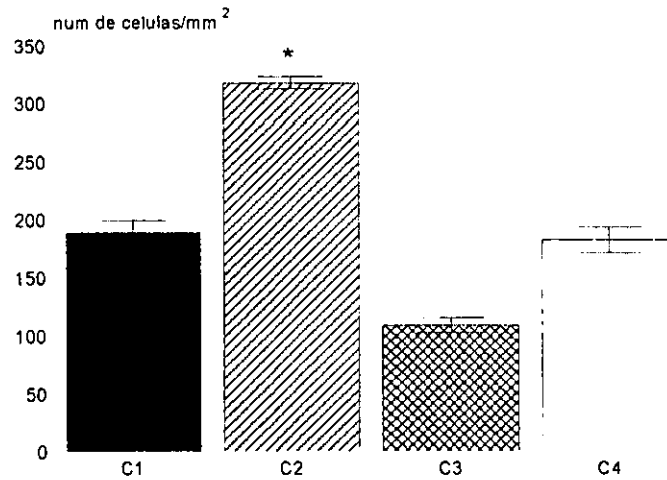


Figura 26. Densidad de células de Purkinje (Nº de células/área de la capa molecular del lóbulo anterior del cerebelo) analizada en las camadas C1, C2, C3 y C4 a la edad P-12. Los resultados muestran un aumento significativo * $p < 0.05$ en la densidad de estas células para la camada C2 respecto a C1, C3 y C4.

IV.5 Inmunohistoquímica (cortes coronales y sagitales).

IV.5.1 Anti-Sinaptofisina.

En la corteza cerebelar de todas las camadas a la edad P-0, la estructura lobulada y la organización laminar se observaron incipientes. En los cerebelos de las crías que se desarrollaron en un ambiente libre de contaminantes, las capas se observaron libres de expresión antigénica frente al anticuerpo sinaptofisina. Las fibras de la sustancia blanca se observaron ligeramente marcadas. En los animales tratados prenatalmente con O₃, el corte del cerebelo se observó más pequeño. La capa granular externa proliferante estuvo libre de marca, la capa molecular se observó difusamente marcada y las células de Purkinje mostraron una ligera marca en la periferia del soma. La inmunoreactividad a la sinaptofisina fue más intensa en los núcleos profundos del cerebelo sobre todo en el neuropilo.

A la edad de 5 días postnatales, en las ratas desarrolladas en un ambiente libre de contaminantes, las capas del vermis cerebelar se observan mejor definidas y la capa granular interna está ya presente. Las capas granular externa e interna no mostraron expresión antigénica frente al anticuerpo sinaptofisina. La capa molecular mostró una inmunoreactividad ligera en todo su espesor (Figura 27 A). La sustancia blanca subcortical se observó irregularmente marcada. En las crías expuestas prenatalmente al O₃ se observa el mismo patrón pero la capa molecular presentó marca en forma de "parches" (Figura 27 B); el soma de las células de Purkinje presentó marca en la periferia. En la capa granular interna se observaron fibras marcadas y glomérulos incipientes (Figura 27 C y D).

En el lóbulo anterior del vermis cerebelar de las ratas de 10 días de edad desarrolladas en un ambiente libre de contaminantes, todas las capas corticales se han desarrollado y cada una muestra el patrón característico de expresión antigénica frente al anticuerpo sinaptofisina. La capa granular externa permaneció desprovista de marca; la capa molecular se encontró bien definida y sus fibras, presumiblemente paralelas, reaccionaron fuertemente con el anticuerpo sinaptofisina. Los cuerpos de las células de Purkinje están ahora bien alineados y sus árboles dendríticos bien desarrollados se observaron marcados en la periferia (Figura 28 A). La capa granular interna presentó ligera expresión antigénica en pequeñas masas irregulares fuera de los cuerpos celulares, las cuales asumimos que son los glomérulos incipientes. La sustancia blanca fue fuertemente inmunoreactiva a la sinaptofisina. El lóbulo anterior de los animales tratados prenatalmente con O₃ mostró a esta edad, a la capa granular externa más delgada, a las células de Purkinje desalineadas y a la capa molecular más amplia, en esta última capa la reacción con anti-sinaptofisina se observó en forma varicosa (Figura 28 B). En general se encontró una expresión antigénica menor tanto en la corteza como en la sustancia blanca. En las células de Purkinje las dendritas se observaron rectas, largas y poco ramificadas. En la capa granular interna se vieron los glomérulos ligeramente marcados.

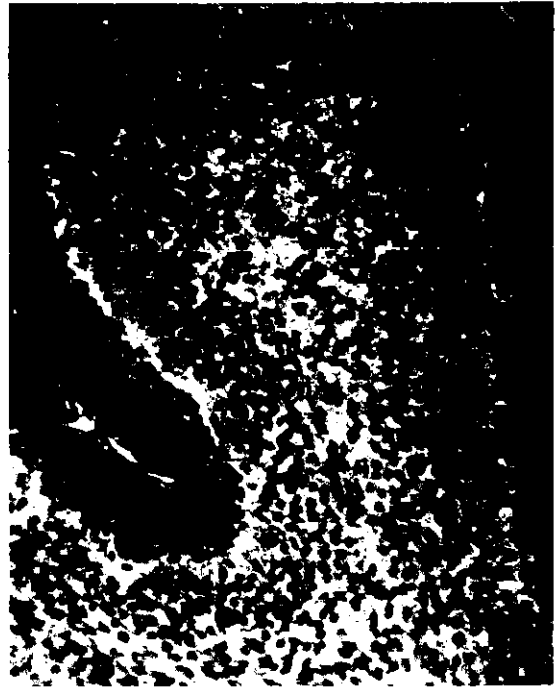


Figura 27. Cortes sagitales del lóbulo anterior del cerebelo en ratas de edad P-5. Inmunoreactividad con el anticuerpo sinaptofisina. (A) Corte representativo de las capas C1, C3 y C4 con ligera inmunoreactividad (+) en la capa molecular (m). (B) Corte de la capa C2 que muestra inmunoreactividad en forma de parches (+) en la capa molecular (m). Capa granular

externa (e), capa granular interna (i), 200X. (C) Fibras nerviosas inmunoreactivas (→) en la capa granular interna de la camada C2, (D) fibras nerviosas inmunoreactivas de la camada C2 que participan en la formación de los glomérulos (*). 1250X.

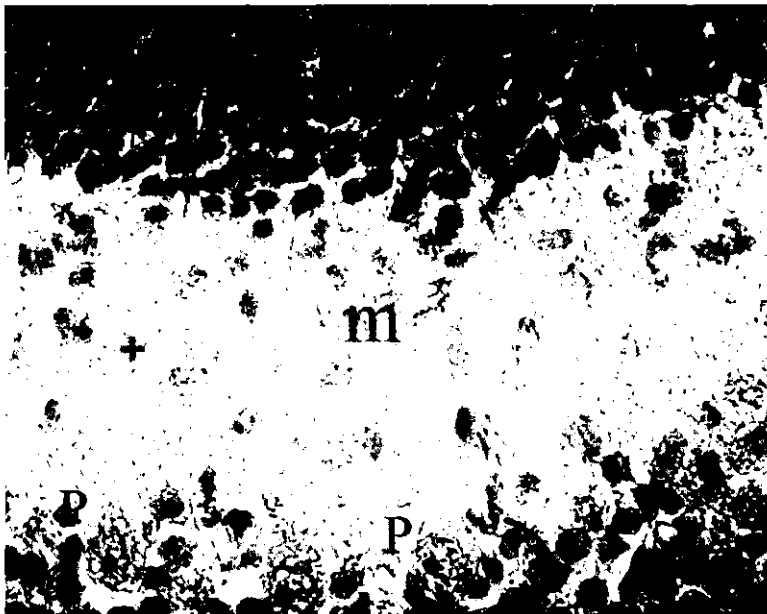
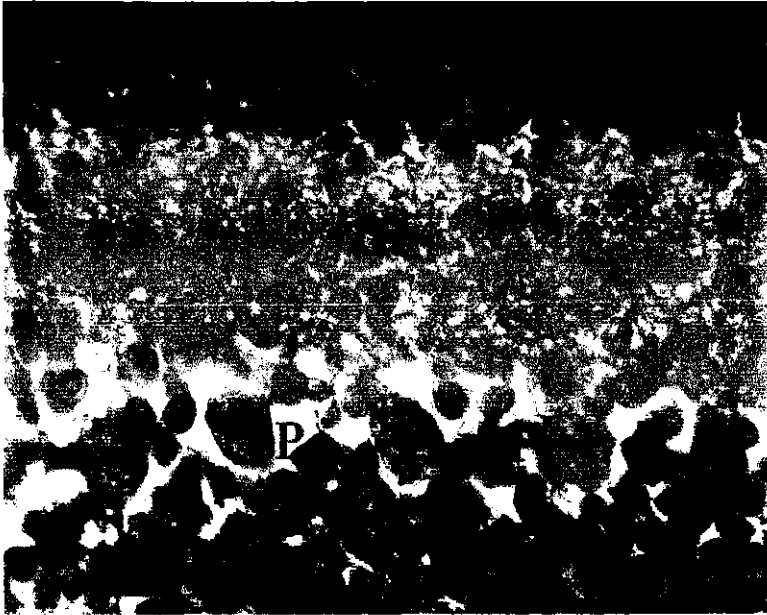


Figura 28. Lóbulo anterior del cerebelo mostrando el patrón de inmunoreactividad a la sinaptofisina de las capas a la edad P-10. 500X. (A) Corte sagital representativo de las crías desarrolladas en un ambiente libre de contaminantes. (B) Corte sagital representativo de las crías cuyas madres fueron expuestas al O₃. Obsérvese la mayor amplitud de la capa molecular (m), la marca (+) más débil y varicosa. Capa granular externa (e), células de Purkinje (P) y capa granular interna (i).

A la edad de 15 días postnatales, el patrón normal de desarrollo de la corteza observado en las crías que se desarrollaron en un ambiente libre de contaminantes, es muy similar al observado a la edad postnatal 10 pero la capa granular externa es más delgada. La capa molecular se mostró fuertemente inmunoreactiva al anticuerpo sintaptofisina, sobre todo en la base de la capa molecular. En las crías expuestas prenatalmente al O₃ la capa molecular se observó más amplia y con menos marca.

Conforme avanza el desarrollo, entre P-20 y P-25, en el cerebelo de las ratas que se desarrollaron en un ambiente libre de contaminantes, la capa granular externa desaparece completamente y el patrón de inmunoreactividad establecido en P-15 aumenta. La expresión de sinaptofisina fue intensa en las regiones de vigorosa sinaptogénesis tales como la capa molecular y los grandes glomérulos de la capa granular interna. La marca sobre las células de Purkinje fue menor, el árbol dendrítico se mostró con marca periférica en las ramas primarias, secundarias y terciarias y estas se observaron abiertas (Figura 29 A y B). En la corteza del lóbulo anterior cerebelar de los animales expuestos prenatalmente al O₃ la capa molecular y los glomérulos de la capa granular interna se vieron menos marcados (Figura 29 C y D). Algunas células de Purkinje mostraron el soma encogido e hipercrómico. Las ramas dendríticas se observaron cerradas, más largas y rectas. Las sinapsis entre fibras paralelas y espinas dendríticas de las células de Purkinje se observaron varicosas.

IV.5.2 Anti-PFAG.

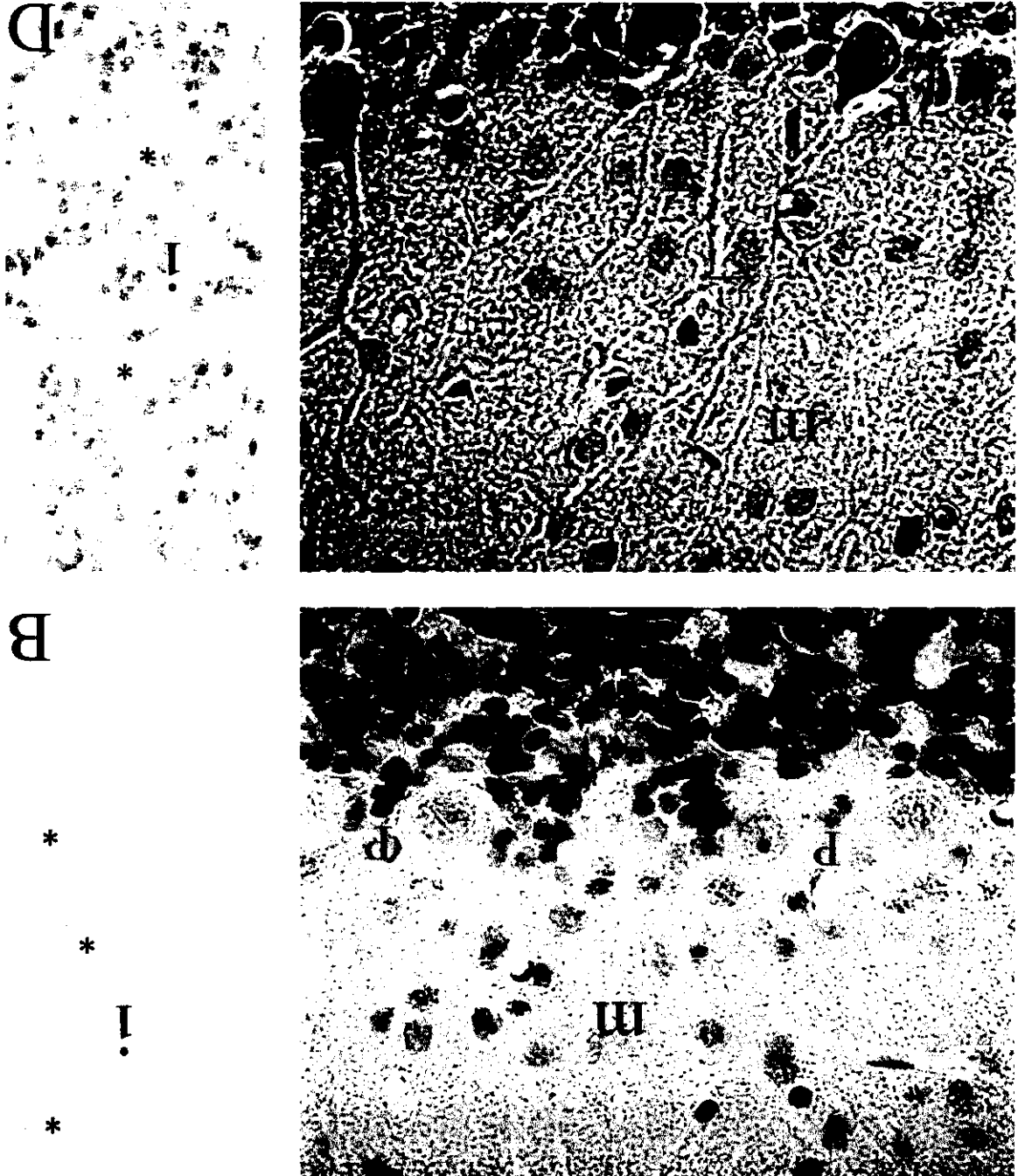
A la edad P-0 no se observó inmunoreactividad con PFAG en el lóbulo anterior de las ratas que se desarrollaron en un ambiente libre de contaminantes ni en las tratadas prenatalmente con O₃.

A la edad P-5 no se observó marca en la corteza (Figura 30 A) pero hubo abundantes células marcadas en la sustancia blanca en los cerebelos de las ratas que se desarrollaron en un ambiente libre de contaminantes. En los tratados prenatalmente con O₃ se vio inmunoreactividad en la corteza, con fibras marcadas en la capa granular externa y somas PFAG+ en la capa granular interna, pertenecientes a prolongaciones de células de Bergmann y a astrocitos respectivamente (Figura 30 B, C y D).

A los 10 días postnatales en los cerebelos de las ratas que se desarrollaron en un ambiente libre de contaminantes se observó expresión antigénica a la PFAG más intensa en todas las capas y sobre todo en células con largas prolongaciones de la sustancia blanca. En el cerebelo de las ratas que fueron expuestas al O₃, se observó el mismo patrón.

En los cerebelos de las ratas que se desarrollaron en un ambiente libre de contaminantes, entre los 15 y 25 días postnatales, células con forma estrellada presentes en la capa granular interna y particularmente en la sustancia blanca reaccionaron fuertemente con el anticuerpo PFAG. En la capa molecular, escasas células con prolongaciones cortas, dispersas por toda la capa, mostraron una marca muy ligera con PFAG (Figura 31 A). El lóbulo anterior de las ratas tratadas prenatalmente con O₃ presentó el mismo patrón de inmunoreactividad, pero se observó una gliosis focal con células intensamente inmunoreactivas a PFAG adyacentes a las células de Purkinje (Figura 31 B y C), que asumimos son células de Bergmann reactivas.

Figura 29. Patrón de inmunoreactividad a la sinaptosina de la corteza del cerebelo de rata a las edades P-20 y P-25. 500X. (A) y (B) Cortes sagitales representativos de las crías que se desarrollaron en un medio libre de contaminantes. (C) y (D) Cortes sagitales representativos de las crías madres fueron expuestas al O₃. Obsérvense los troncos dendríticos de las células de Purkinje más largos y rectos (→) y el soma (P) contraído e hipercrómico, así como menor marca anti-sinaptosina en la capa molecular (m) y en los glomérulos (*) de la capa granular interna (i).



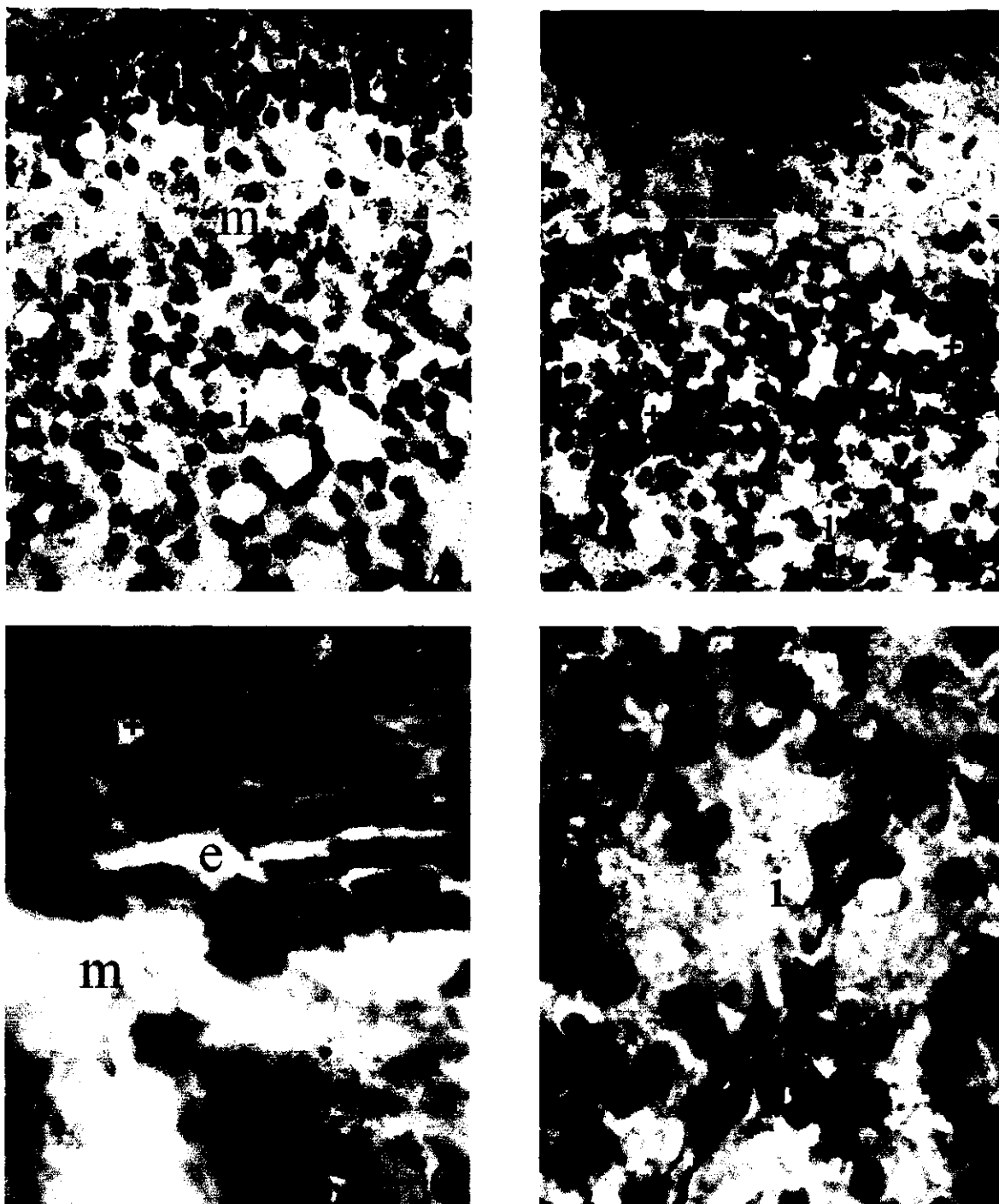


Figura 30. Corte sagital del vermis del lóbulo anterior del cerebelo de ratas a la edad P-5. Inmunoreactividad a PFAG. 200X. (A) Corte representativo de las crías que se desarrollaron en un medio libre de contaminantes. (B), (C) y (D) Cortes representativos de las crías cuyas madres fueron expuestas al O₃. Obsérvese la marca PFAG(+) en la corteza de las ratas expuestas al O₃. Capas granular externa (e), molecular (m) y granular interna (i). 200X, 500X, 500X.

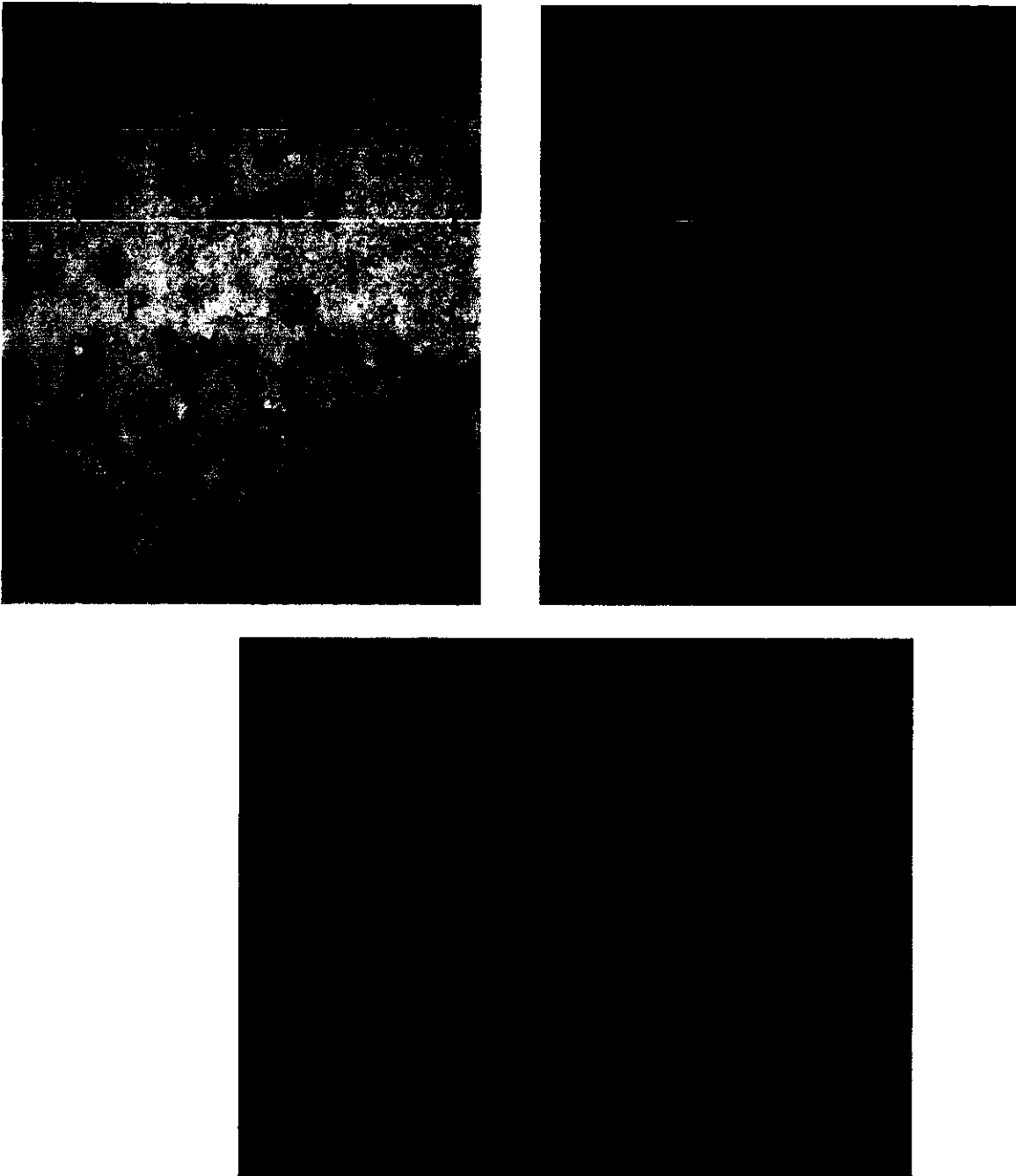


Figura 31. Capas de la corteza del lóbulo anterior del vermis cerebelar de ratas a la edad P-15. Inmunoreactividad a PFAG. **(A)** Corte representativo de las crías que se desarrollaron en un medio libre de contaminantes. **(B)** Corte representativo de las crías cuyas madres fueron expuestas al O₃. Obsérvese la marca que indica la presencia de células PFAG (+) adyacentes a las células de Purkinje (P) y cuyos procesos parecen abrazar a dichas células. Capa molecular (m), capa granular interna (i). 500X. **(C)** Aumento de la figura anterior, 1250X.

V. DISCUSIÓN

V.1 Reproducción

Con los resultados histológicos y planimétricos encontrados en el lóbulo anterior del cerebelo de las cuatro camadas estudiadas, pudimos diferenciar claramente a los animales expuestos al O₃ durante la gestación, de los animales que se desarrollaron en un ambiente libre de contaminantes y corroborar que las camadas C1, C3 y C4 representaron en conjunto al grupo control, mientras que la camada C2 correspondió al grupo de las madres gestantes expuestas al O₃. La madre de esta camada fue identificada posteriormente con la madre que abortó todas sus crías muertas y con la madre que no tuvo crías a pesar de presentar tapón vaginal y presencia de espermatozoides en su frotis vaginal. Estos resultados confirman los hallazgos previos reportados en ratas expuestas al O₃ durante la gestación, las cuales presentaron un alto índice de abortos espontáneos y malformaciones congénitas (Kavlock y col., 1979, 1980) así como disminución del peso de las crías (Kavlock y col., 1979, 1980; Haro y Paz, 1993).

Habría que considerar la posibilidad de que los efectos encontrados sobre el desarrollo del cerebelo tenga que ver con el retardo en el crecimiento y la desnutrición de los productos cuyas madres fueron expuestas al O₃, sin embargo en el cerebelo de ratas desnutridas, las células de Purkinje parecen una versión reducida de las células de Purkinje normales (Pysh y col., 1979, Mc Connell y Berry, 1978); el cual no es el patrón morfológico encontrado en el presente trabajo.

V.2 Conducta

En este trabajo, la prueba de enderezamiento aplicada en los días postnatales 6, 9, 12 y 15 no parece tener diferencias entre el grupo de crías expuestas prenatalmente al O₃ y el desarrollado en un ambiente libre de contaminantes, lo cual concuerda con lo reportado por Bignami y col (1994) quienes aplican esta prueba los días P-2 al P-18 a crías de ratones expuestos al O₃ (0.4, 0.8 y 1.2 ppm) los días 7 al 17 prenatales y por Petruzzi y col. (1994), quienes expusieron a los ratones desde el inicio hasta el día 17 de gestación a 0.2, 0.4 y 0.6 ppm de O₃.

La prueba de geotaxis negativa no ha sido considerada en las baterías conductuales o motoras que se han utilizado para ver los efectos postnatales de la aplicación prenatal de O₃, por lo que consideramos que puede ser importante, ya que las crías expuestas prenatalmente al O₃ realizan la prueba con más rapidez a la edad P-9. En esta conducta, entre otros, están involucrados los reflejos antigravitatorio y el de enderezamiento laberíntico, en donde participan los receptores vestibulares. La fuerza de gravedad en relación con la posición de la cabeza respecto al cuerpo estimula los órganos otolíticos; la respuesta es un ajuste en el movimiento de los miembros y una contracción compensadora de los músculos del cuello para mantener la cabeza nivelada (Shepherd, 1994). El vermis y el lóbulo

floculonodular tienen conexiones vestibulares y están relacionados con el control de la postura, asimismo las fibras espinales de los miembros y el cuello ascienden por el tracto espinocerebelar y terminan en el lóbulo anterior. Por lo que la diferenciación adelantada de las células de Purkinje en el lóbulo anterior en particular y el vermis en general pudiera estar relacionada con la rápida corrección postural ante el estímulo gravitatorio en los animales expuestos al O₃.

La prueba de nado ha sido considerada una de las más adecuadas para valorar la actividad motora coordinada en donde participa el cerebelo (Salas, 1972), en esta prueba, en los parámetros de ángulo de la cabeza respecto al nivel del agua, el grupo expuesto prenatalmente al O₃ alcanzó a menor edad el patrón adulto respecto al grupo que se desarrolló en un ambiente libre de contaminantes, lo que se interpreta como un signo de madurez. Se ha valorado la conducta de nado en ratones adultos (con parámetros adecuados para esta edad) expuestos prenatal y postnatalmente al O₃ (0.6 ppm), reportándose un aumento significativo en la velocidad de nado y una tendencia a girar a la izquierda, contrario a lo normal (Dell'Omo y col., 1995 b). Es posible que como resultado de la exposición al O₃ durante el desarrollo, varios sistemas del encéfalo sean dañados en forma inespecífica, pero estas alteraciones en los sistemas de formación temprana pueden ser amortiguadas por la plasticidad del desarrollo y la homeostasis de los sistemas. Sin embargo, la perturbación en la formación de estructuras y sistemas de desarrollo más tardío como el circuito dento-hipocámpal (Dell'Omo y col., 1995 b) y el cerebelo (este trabajo) pueda producir secuelas crónicas. En este sentido, es interesante hacer notar que por efecto de la aplicación del O₃ durante el desarrollo de ratones, disminuciones en el olfateo, el autocuidado y en la adquisición de la conducta de evitación pasiva sólo son evidentes a mediano (juveniles) y largo plazo (adultos) (Petruzzi y col., 1994; Dell'Omo y col. 1995 a y b). Nuestros resultados morfológicos mostraron una etapa temprana (P-0) y una etapa tardía con signos claros de muerte de las células de Purkinje, y una etapa intermedia (P-12) con algunos signos de diferenciación celular precoz, esta última coincide con el tiempo en que se aplicó la prueba de nado (P-9, P-12, P-15) y puede dar explicación a la madurez postural observada.

En la prueba de alternancia espacial se reporta que los roedores normales tienden a alternar espontáneamente en un 85% de los eventos y la no-alternancia es atribuida a alguna lesión en la corteza entorrinal o en alguna parte del sistema hipocámpico (Brailowsky y col., 1993). En este modelo se consideró una conducta adquirida con 80% de alternancia en dos días consecutivos, ya que fue el patrón conseguido por las ratas de las tres camadas control. Nosotros encontramos en el grupo con O₃, respecto al control, una disminución de 48% en el promedio de alternancia durante los 22 días que duró la prueba y una tendencia a dirigirse hacia la izquierda. Además, las ratas del grupo con O₃ sólo al final de la prueba (día 18) iniciaron la alternancia y adquirieron la conducta a partir del día 20, mientras que las ratas control alternaron desde el inicio de la prueba, aunque con error y adquirieron la conducta a partir del día 14. La baja correlación, entre las latencias de salida y de llegada durante 22 días de prueba, mostrada por este mismo grupo, sugiere desorientación en el grupo expuesto prenatalmente al O₃. Es sabido que en el aprendizaje espacial está involucrado el hipocampo (Brailowsky y col., 1993), pero también el cerebelo. Un experimento con ratas irradiadas que han perdido el 85% de sus células

granulares, mientras que el hipocampo permanece intacto, sugiere que el cerebelo juega un papel clave en las funciones cognitivas, especialmente en la orientación espacial y también se ha encontrado que disminuye la inhibición conductual (Le Marec y col., 1997). En el presente trabajo no se cuantificó la densidad de células granulares, pero en los animales expuestos prenatalmente al O₃ se observó hipoplasia de la capa granular externa durante el desarrollo postnatal y disminución en el área de la capa granular interna en la edad adulta, lo cual sugiere claramente una disminución de esta población celular, esto junto con otros daños morfológicos encontrados en las células de Purkinje y el decaimiento en la sinaptogénesis, pueden explicar la alteración en la orientación espacial encontrada en las ratas expuestas prenatalmente al O₃.

V.3 Histología

No existe ninguna referencia sobre la histología del cerebelo en animales tratados con O₃ por lo que estos resultados son el primer intento por identificar y cuantificar las alteraciones morfológicas a corto (P-0), mediano (P-12) y largo plazo (P-60) producidas por la exposición al O₃ (1ppm) durante toda la gestación. La histología nos permitió reconocer como diferente a la camada C2 en las tres edades estudiadas P-0, P-12 y P-60 de las camadas C1, C3 y C4 y reconocerla como perteneciente a una de las madres expuestas al O₃ durante la gestación. En las células de Purkinje se encontraron los datos morfológicos más significativos que permitieron agrupar los cortes histológicos como procedentes de los animales expuestos *in útero* al O₃. Estos fueron: necrosis a la edad P-0, alteraciones en el desarrollo a la edad P-12 y apoptosis a la edad P-60.

En general consideramos que, en las ratas expuestas prenatalmente al O₃, fue afectada a corto, mediano y largo plazo, la expresión de los programas de desarrollo de las células de Purkinje, tales como migración, diferenciación y muerte entre otros.

Contrario a lo normal, en las ratas expuestas al O₃ encontramos a la edad P-0 a las células de Purkinje sumamente desarregladas y ampliamente distribuidas y a la edad P-12 muchas células permanecen por debajo de la monocapa de células de Purkinje. Esto sugiere que la migración normal de las células de Purkinje ha sido afectada. No se conocen claramente los efectos del daño oxidativo sobre la migración neuronal, sin embargo se han demostrado daños al citoesqueleto neuronal después de la exposición a oxidantes (Hinshaw y col., 1993).

Además la proliferación de las células granulares parece ser afectada, como lo muestra la permanente hipoplasia de las capas granulares, la cual no podemos atribuirla a un aumento en los procesos de muerte celular, ya que no se observó un aumento en los signos morfológicos de muerte en las células granulares. Se ha demostrado que la peroxidación lipídica, una de las reacciones más comunes del *estrés oxidativo*, puede jugar un papel importante en el control de la proliferación (Pushpendran y col., 1994; Yildiz y col., 1996) a través de productos citostáticos tales como aldehidos y peróxidos (Esterbauer y col., 1991).

En las ratas expuestas al O₃, a la edad P-0 encontramos que en las células de Purkinje prevalece un nucleolo grande, en lugar de varios pequeños, como se observó en las células de Purkinje de las ratas que se desarrollaron en un ambiente libre de contaminantes. En el desarrollo normal de las neuronas, la confluencia de los pequeños nucleolos en uno solo es un signo de diferenciación (Jacobson, 1978). También en las ratas expuestas al O₃ a la edad P-12 encontramos datos que sugieren mayor diferenciación neuronal en las células de Purkinje, como la completa dispersión del ADN nucleolar hacia la periferia del nucleolo (Jacobson, 1978). Hay evidencias que implican a los oxidantes como un factor que puede producir alteraciones en la diferenciación celular (Allen y Ballin, 1989; Driscoll, 1995).

En las células de Purkinje de las ratas expuestas al O₃, también encontramos muerte celular temprana (P-0) y muerte celular tardía (P-60). En la muerte celular temprana (P-0) observamos principalmente signos de necrosis como vacuolización citoplásmica (Dumesnil-Bousez y Sotelo, 1992, Herndon y col., 1980; Ratan, 1994) y otros datos morfológicos como astrogliosis, presencia de microglia reactiva y de macrófagos (Banati y col., 1993; Gilles, 1997; Wilson, 1997). Pero también observamos signos morfológicos de apoptosis como condensación de la cromatina y un aumento en el número de cuerpos apoptóticos (Kidd, 1998; Rahman y col., 1992).

En la muerte celular tardía (P-60) observamos solamente signos de muerte de tipo apoptótico tales como compactación y marginalización de la cromatina (Kidd, 1998; Martins y Earnshaw, 1997), degradación del nucleolo y dispersión de ribosomas y cuerpos de Nissl. De acuerdo a Lafarga y col. (1997) los cambios celulares del núcleo celular en apoptosis reflejan claramente un daño en los compartimentos nucleares involucrados en la transcripción, el procesamiento y el transporte de ARN que están relacionados con los patrones de degradación del ADN y del ARN ribosomal (rARN). En el citoplasma, la presencia de ribosomas dispersos, es un signo temprano de apoptosis y refleja el daño al sistema de síntesis de proteínas. Aun más, la condensación de los componentes nucleolares, y la degradación de ribosomas y rARN representan marcadores morfológicos y bioquímicos de un estado avanzado de apoptosis.

En comparación con la edad P-0, a la edad P-12 encontramos que los cerebelos de las ratas expuestas prenatalmente al O₃ presentaron una recuperación histológica caracterizada por ausencia de signos morfológicos de muerte neuronal y de alteraciones morfológicas aparentes y numéricas en las células gliales.

No encontramos diferencias entre las camadas que permanecieron en un ambiente libre de contaminantes durante la gestación, con el desarrollo normal de la corteza del cerebelo reportado por otros autores (Altman, 1969, 1972 a y b; Altman y Winfree, 1977). Pero la camada expuesta al O₃ mostró a la edad P-12 hipoplasia de la capa granular externa, y alineación incompleta de las células de Purkinje con alargamiento de su soma y dendrita, lo cual se reflejó morfométricamente de manera significativa en un aumento en el grosor de la capa molecular. Consideramos que estos dos eventos están relacionados ya que el daño temprano a las células de Purkinje puede interferir con la proliferación de las células granulares (Mariani y col., 1977; Ralcewicz y Persaud, 1994), su migración, desarrollo y maduración (Ralcewicz y Persaud, 1994). Se ha propuesto que la penetración de los segmentos distales de las células de Purkinje en la capa granular externa, puede mediar la proliferación de las células granulares

(Dumesnil-Bousez y Sotelo, 1992), sin embargo se desconoce el mecanismo utilizado por las células de Purkinje en esta acción regulatoria.

El alargamiento del tronco dendrítico y la poca ramificación de las ramas lisas observado en las células de Purkinje de los animales expuestos al O₃, a la edad P-12 pudiera explicarse por una escasez o daño de células estrelladas que induzcan la ramificación en las ramas lisas (Altman, 1976 b y c), evento que ocurre normalmente a esta edad en la rata. La presencia de células de Purkinje con cestas terminales, aun cuando estas estén colocadas por debajo de la monocapa y se observen canastas vacías, sugiere que las células en canasta no están fallando en sus contactos y por lo tanto guían el crecimiento en longitud de los troncos dendríticos, lo cual sucede normalmente por el día P-8 en la rata (Altman, 1976 a y c). Es posible que la hipoplasia observada en la capa granular externa no sólo afecte al número de células granulares sino también el número de células de otras poblaciones neuronales que derivan de esta misma capa y que se generan tardíamente como las células estrelladas.

A esta edad (P-12) también observamos efectos en el nivel celular, como pérdida de argirofilia en el nucleolo y cambios morfológicos en la organización del ADN nucleolar que puede afectar su actividad transcripcional durante el proceso de sinaptogénesis (Vázquez-Nin y col., 1983). Se ha indicado que las neuronas inmaduras tienen el ADN nucleolar en un solo cuerpo en el centro del nucleolo, como nosotros lo observamos en las células de Purkinje de las ratas desarrolladas en un ambiente libre de contaminantes; mientras que en las neuronas maduras se dispersa hacia la periferia, y en las células de Purkinje forma como un anillo de cuentas alrededor del nucleolo (Jacobson, 1978), tal como lo vimos en las células de Purkinje de los animales inmaduros expuestos prenatalmente al O₃. Este resultado sugiere que se ha afectado la temporalidad de la maduración de estas neuronas, que se sabe sigue normalmente un horario invariante y preciso para el cerebelo de cada especie (Jacobson, 1978). Trabajos más recientes indican que estructuras perinucleolares semejantes (*cuerpos espiralados*) contienen factores de *splicing* y aparecen durante la diferenciación celular cuando aumenta de manera importante la actividad transcripcional (Santana y col., 1996; Dunn y col., 1998).

A la edad P-60 los cerebelos de las ratas expuestas prenatalmente al O₃ mantienen su histología normal, pero las células de Purkinje mostraron alteraciones nucleares, nucleolares y pérdida de basofilia citoplásmica con dispersión de ribosomas y cuerpos de Nissl. Es posible que la disminución de ARN ribosomal evidenciada por los colorantes básicos haya sido causada por una alteración temprana de la transcripción del ARN nucleolar, de su procesamiento (Vázquez-Nin y col., 1983) o de su unión con la matriz nuclear (Schröder y col., 1987) y sea morfológicamente un signo tardío de apoptosis (Lafarga y col., 1997), ya que la inhibición selectiva de la síntesis, transcripción y/o traducción de ARN son signos de apoptosis (Kidd, 1998). En neuronas jóvenes que sufren apoptosis se observa alteración en los compartimentos nucleares involucrados en la transcripción, procesamiento y transporte del ARN y está relacionado a la degradación del ADN y ARN ribosomal (Lafarga y col., 1997).

La fragmentación y coalescencia de la cromatina hacia la periferia del núcleo como indicador de apoptosis (Buttke y Sandstrom, 1994; Fryer, 1995; Lieb y col., 1996; Simonian y Coyle, 1996) fue evidenciada en el 29% de las células de Purkinje, de las crías expuestas prenatalmente al O₃, por los colorantes básicos y la técnica de Feulgen.

Debido a la alta reactividad del O_3 este gas no penetra más allá del aparato respiratorio (Pryor, 1992), sin embargo existen evidencias de la presencia de productos de reacción del O_3 con el factor surfactante y el moco de los epitelios pulmonares capaces de penetrar al torrente sanguíneo. Entre las sustancias identificadas como productos de reacción se han identificado a las prostaglandinas (Giri y col., 1980), los radicales libres (Kennedy y col., 1992), y el peróxido de hidrógeno (Goldstein y col., 1968, Pryor y Church, 1991). Estos productos de reacción interactúan con los ácidos grasos poliinsaturados del organismo formando malonaldehído (Mustafa, 1990; Steinberg y col., 1990) y el 4-hidroxi-2-nonenal (Kruman y col., 1997). El malonaldehído (Rahman y col., 1992) ha sido identificados en el cerebro y el 4-hidroxi-2-nonenal (Kirichenko y col., 1996) en el pulmón de ratas expuestas al O_3 , por lo que es muy posible que los efectos morfológicos encontrados por nosotros en el cerebelo sean por la vía de estos productos de reacción que han podido cruzar las barreras placentaria y hematoencefálica. Se ha señalado que la peroxidación lipídica es uno de los mecanismos implicados en el desencadenamiento de la apoptosis (Buttke y Sandstrom, 1994; Fryer, 1995; Lieb y col., 1996; Simonian y Coyle, 1996), más aún, se ha referido que la exposición al O_3 incrementa en el pulmón la producción de cuerpos apoptóticos (Kirichenko y col., 1996). Durante el desarrollo normal del cerebro de rata (E-18 a P-14) se han demostrado bajos niveles de peroxidación lipídica para permitir una rápida proliferación de células y reducir la posibilidad de alteraciones desfavorables durante este periodo altamente sensible (Pushpendran y col., 1994). En la etapa fetal hay, sin embargo, reportes de peroxidación lipídica alterada en el cerebro en condiciones de hipoxia (Mishra y Delivoria-Papadopulos, 1989), y de que el *estrés oxidativo* puede ser más dañino (Günther y col., 1993), especialmente en el cerebelo, en el cual se ha demostrado una alta sensibilidad a los radicales libres (Shibuki y Okada, 1991; Pozo y col., 1994). En este trabajo es posible que el *estrés oxidativo* inducido prenatalmente por O_3 , a través de una tasa aumentada de peroxidación lipídica, sea en parte responsable de la alteración y muerte de las células de Purkinje y sus bioproductos citostáticos como aldehídos y peróxidos estén asociados a la hipoplasia de las células granulares.

En las ratas recién nacidas encontramos un aumento significativo de cuerpos apoptóticos en la capa molecular y signos morfológicos de necrosis en las células de Purkinje de las crías expuestas prenatalmente al O_3 , y en ratas adultas encontramos que aproximadamente una tercera parte de las células de Purkinje presentaron evidencias morfológicas de apoptosis. Se ha señalado que el daño oxidativo, producido por los radicales libres y sus bioproductos, es el mediador tanto de la apoptosis como de la necrosis. La exposición al O_3 produce una sobreproducción de radicales libres y productos intermediarios como el 4-hidroxi-2-nonenal que dañan a las células pulmonares produciendo necrosis y adicionalmente apoptosis (Kirichenko y col., 1996).

Desconocemos la relación que existe entre la muerte temprana (P-0) y la muerte tardía (P-60) en las células de Purkinje de las ratas expuestas prenatalmente al O_3 y el *estrés oxidativo* prenatal. Sin embargo se ha postulado que si una célula alcanza un nivel umbral de daño oxidativo, entra en una fase que la compromete a morir. Este es un estado, poco entendido de variable longitud y sin marcas morfológicas notables (Johnson y col., 1995; Martins y Earnshaw, 1997). Aun más, en general, se ha

visto, que algo que produce necrosis por destrucción directa de las células puede inducir apoptosis si las células sobreviven. En este sentido, la apoptosis representa una respuesta celular coordinada a un estímulo que no es inmediatamente letal (Carson y Ribeiro, 1993). Esta puede ser la situación de las células de Purkinje observada a la edad P-12, en donde las alteraciones morfológicas observadas, no parecen sugerir que las células estén en proceso de muerte.

A pesar de que la necrosis y la apoptosis se han visto durante mucho tiempo como eventos distintos y hasta opuestos, ahora, se tiende a asumir que ambas formas de muerte constituyen dos extremos de un proceso continuo (Kroemer y col., 1998). Muchas patologías caracterizadas por necrosis, involucran también apoptosis y experimentalmente, el equilibrio entre apoptosis y necrosis puede ser influido por manipulación de los niveles de ATP y de caspasas. Altos niveles de ATP favorecen la apoptosis sobre la necrosis (Eguchi y col., 1997; Leist y col., 1997), mientras que la inhibición de caspasas transforma la apoptosis en necrosis (Hirsch y col., 1997). La misma toxina puede inducir apoptosis a bajas concentraciones y necrosis a altas concentraciones (Kroemer y col., 1998). Así mismo, el O₃ a bajas dosis (0.4ppm) causa muerte de las células pulmonares por apoptosis y a altas dosis (2.0) causa necrosis (Kirichenko y col., 1996).

Actualmente se han empezado a identificar los genes que regulan la apoptosis en las células de los animales superiores. Algunos de estos genes se han reconocido como oncogenes y se sabe que también regulan la proliferación y la diferenciación (Driscoll, 1995). Los oncogenes, representan un lazo interesante entre proliferación, diferenciación, envejecimiento, muerte celular y cáncer (Johnson y col., 1995; King y Cidlowski, 1998; Yildiz y col., 1996). Estrechamente relacionados con los oncogenes y sus efectos existen muchos factores de crecimiento y otros genes que participan en el control del crecimiento celular, la diferenciación y la sobrevivencia de las células (Thompson, 1998). En las investigaciones futuras sobre la relación entre el *estrés oxidativo* y la regulación del ciclo celular, la diferenciación celular y la muerte celular; la exposición al O₃ durante la gestación podría ser un modelo experimental útil.

V.4 Planimetría y Densidad celular

El aumento en el número de células de Purkinje en la camada expuesta al O₃ sólo se presentó a la edad P-0 (Tabla 1), lo que sugiere una respuesta proliferativa inicial de esta población neuronal. Las células de Purkinje se generan entre los días 14-17, periodo durante el cual se postula la existencia de un periodo permisible con muy bajos niveles de substratos para la peroxidación, para favorecer la proliferación celular (Esterbauer y col., 1991; Pushpendran y col., 1994). Cuando se comparó la densidad de células de Purkinje, encontramos que las ratas expuestas al O₃ mostraron una densidad mayor de estas células a la edad P-12. Esta diferencia, sin embargo, obedece más a una disminución del área de las capas molecular y granular interna en la camada expuesta al O₃, que a un aumento en el número de células, y explica también el ordenamiento de las células de Purkinje en más de una hilera. A la edad P-60 la densidad de células de Purkinje alcanza al control, lo cual indica que previamente estas células o

se han alineado o se han eliminado; la presencia de cestas pericelulares a desnivel y vacías apoya la segunda posibilidad.

Nuestros resultados planimétricos sugieren que la disminución en área total del lóbulo anterior del cerebelo, debida a la disminución de las áreas de la capa molecular y granular, podría obedecer en parte a una reducción de neuropilo, probablemente como resultado de alteraciones en las relaciones sinápticas interneuronales (Ito, 1984), ya que el volumen de la capa molecular contribuye aproximadamente a la mitad del volumen del cerebelo (Isaacs y Abbott, 1995). Podría también ser el resultado de la hipoplasia de las células granulares que se observó tanto morfológica como morfométricamente, ya que de la proliferación de estas células depende principalmente el crecimiento cerebelar postnatal (Voogd, 1967).

La ausencia de diferencias significativas en la densidad de las células de Purkinje a la edad de 60 días en el cerebelo de las ratas expuestas al O₃ durante la gestación podría explicar la ausencia de manifestaciones motoras y neurológicas gruesas en estas ratas, como la espasticidad muscular localizada que se ha observado cuando se lesionan los folios del lóbulo anterior (Ganong, 1988). Es sabido que el cerebelo requiere de una constancia numérica de las células de Purkinje por unidad de volumen de la capa molecular para operar normalmente (Braitenberg, 1967). Sin embargo como el área de las capas molecular, granular y el área total del lóbulo anterior permanecieron significativamente menores en las ratas expuestas al O₃ hasta la edad adulta, es posible la existencia de alteraciones funcionales permanentes. Conductualmente con las pruebas aplicadas, observamos cambios que sugieren precocidad postural y alteración en la orientación espacial en ratas expuestas al O₃ durante la gestación, y Haro y Paz (1993) han demostrado, en un modelo experimental semejante, una disminución permanente en el sueño MOR. Además, en varias condiciones en donde se produce estrés oxidativo, tales como envejecimiento, retraso mental y alcoholismo prenatal, se han encontrado anomalías en el sueño MOR que se han relacionado con déficits en la memoria, funciones intelectuales, incremento en la conducta locomotora y disminución en las respuestas inhibitorias (Grubar, 1989; Stone, 1988; Mirmiran y col., 1983; Stone y col., 1996).

V.5 Inmunohistoquímica

Anti-Sinaptofisina

Por efecto de la aplicación prenatal de O₃ se produce un decaimiento en la sinaptogénesis cortical entre P-10 y P-25 que se evidencia por una marca muy débil en las áreas principales de sinaptogénesis tales como la capa molecular y los grandes glomérulos de la granulosa interna, a pesar de que en el día P-5 se observan fibras inmunoreactivas y formación incipiente de glomérulos que no se observan en los controles. Esto sugiere que se ha producido en las crías expuestas al O₃ una sinaptogénesis adelantada pero la consolidación de algunas sinapsis es ineficaz.

Un resultado inesperado fue encontrar en los animales expuestos prenatalmente al O₃ entre las edades P-0 y P-5 una ligera marca en la periferia del soma de las células de Purkinje, ya que la expresión de sinaptofisina es característica de las vesículas sinápticas, sin embargo, otros autores (Leclerc y col., 1989) han reportado una ligera inmunoreactividad a sinaptofisina en la periferia del soma de las células de Purkinje de rata entre las edades P-0 a P-6, probablemente como resultado de sus aferencias transitorias tempranas, en nuestro modelo, dicho resultado pudiera indicar un adelanto de los contactos sinápticos con fibras trepadoras sobre los procesos perisomáticos tempranos de las células de Purkinje, ya que estas aferencias se dan normalmente en la rata entre P-5 y P-8.

Cuando las células estrelladas son eliminadas selectivamente, las dendritas de las células de Purkinje crecen en longitud pero la ramificación se ve seriamente dañada. Este patrón no se observa cuando la privación es sólo de células granulares (Altman, 1976 b). Se ha sugerido que las células en canasta guían el crecimiento en longitud de los troncos dendríticos y las células estrelladas inducen la ramificación de las ramas lisas, mientras que las fibras paralelas son esenciales para la formación de las ramificaciones espinosas y para la orientación planar del sistema dendrítico de las células de Purkinje (Altman, 1976 c). Nuestros resultados inmunohistoquímicos con el anticuerpo sinaptofisina y otros resultados morfológicos antes mencionados sugieren disminución en la población de células granulares y posiblemente de células estrelladas, que también se generan en la capa granulosa externa, por lo que la débil expresión antigénica observada en la capa molecular, el alargamiento anormal de los troncos dendríticos principales y la disminución en el área de la capa molecular tengan su fundamento en la reducción de estos dos tipos celulares y en número de sinapsis efectivas establecidas entre ellos y las células de Purkinje.

Con relación a los efectos del *estrés oxidativo* sobre la actividad sináptica, se ha demostrado que produce peroxidación de la membrana de las vesículas sinápticas (Urano y col., 1997), reduce la liberación de neurotransmisores (Chan y col., 1983; Braughler, 1985) e inhibe el transporte de GABA en la terminal nerviosa (Debler y col., 1986; Braughler y col., 1985). En el presente trabajo, tomando en cuenta que el *estrés oxidativo* daña también la estructura y función sináptica, sería explicable la depresión sinaptogénica observada en las capas molecular y granular del lóbulo anterior del vermis cerebelar de los animales expuestos prenatalmente al O₃.

Anti-PFAG

A pesar de que a la edad P-0 de los animales expuestos al O₃ se observan con técnicas de anilina abundantes astrocitos estrellados e hinchados en la capa molecular, no se puede asegurar que se trate de astrocitos reactivos ya que no expresaron inmunoreactividad a PFAG. La ausencia de expresión antigénica a PFAG a esta edad, concuerda con los reportes de que la astroglia primitiva carece de PFAG y la expresa conforme madura (Takashima y Becker, 1983). Pensamos que los astrocitos de las ratas recién nacidas son realmente astroblastos que mantienen sus propiedades "blásticas" como las de promover y guiar el crecimiento axonal y carecen de las moléculas características de los astrocitos maduros y reactivos (Bovolenta y col., 1991).

A la edad P-5 se presenta en las ratas expuestas prenatalmente al O₃, inmunoreactividad a la PFAG en las capas de la corteza, que puede interpretarse como un indicio de reactividad astrogliol ya que no está presente en los controles. A partir de P-10 se encontró en los animales expuestos al O₃ una marca PFAG+ en la corteza y en la sustancia blanca, semejante a la que se observó en los cerebelos de las crías que se desarrollaron en un ambiente libre de contaminantes. La astrogliosis como respuesta al daño neuronal existe de manera muy local, ya que a partir de la edad P-15 y hasta P-25 destaca la presencia de células PFAG+ marcadas intensamente y adyacentes a las células de Purkinje. Consideramos que se trata de células de Bergmann, que envuelven a las células de Purkinje en los animales tratados prenatalmente con O₃, y que no se observan en los controles. El envolvimiento astrogliol de las neuronas como regulador de la densidad sináptica se ha observado en varios paradigmas tanto normales como patológicos (Peters y col., 1970). En las células de Purkinje durante su desarrollo se produce normalmente envoltura glial por las células de Bergmann después que las sinapsis axosomáticas por las fibras trepadoras se pierden con la maduración postnatal (Peters y col., 1970), pero también aumenta dicha envoltura por deaferentación anormal (Meshul y col., 1987). En el cerebelo se ha demostrado la presencia de células de Bergmann reactivas con aumento de PFAG en forma irregular, en áreas con degeneración neuronal (Wagemann y col., 1995). Una reacción semejante fue encontrada por nosotros en el cerebelo de las ratas expuestas al O₃, entre las edades P-15 y P-25, lo cual sugiere que la gliosis específica de células de Bergman es un marcador del daño a las células de Purkinje.

VI. CONCLUSIONES

Se sugiere que a través de sus productos de reacción, el O₃ administrado en altas concentraciones (1ppm) a ratas gestantes es capaz de:

I. Cruzar la barrera placentaria provocando letalidad embrionaria y fetal y disminución en el peso de las crías que llegan a término.

II. Cruzar la barrera hematoencefálica y provocar en las crías a través de un proceso de *estrés oxidativo*, daño en el sistema nervioso central.

III. Como resultado del *estrés oxidativo*, dañar a las neuronas y afectar en el corto, mediano y largo plazo la expresión de sus programas de desarrollo, con las siguientes consecuencias:

1. Producir en las células de Purkinje, a corto plazo (P-0) muerte por necrosis, a mediano plazo (P-12) alteraciones citológicas y a largo plazo (P-60) muerte por apoptosis.

2. Afectar a otras poblaciones celulares de generación postnatal como las células granulares y quizás las células estrelladas, este efecto, entre otras alteraciones, se traduce morfológicamente en una disminución significativa del tamaño del cerebelo.

3. Alterar la sinaptogénesis de las neuronas cerebelares como lo demuestra la débil marca frente al anticuerpo sinaptofisina entre P-10 y P-25 en las áreas principales de sinapsis, como la capa molecular y los glomérulos de la capa granular.

4. Alterar la función de la astrogliá produciendo astrogliosis focal de las células de Bergmann en torno a las células de Purkinje entre las edades P15 y P-25.

5. Provocar, en la etapa postnatal temprana, precocidad postural (aumento significativo en la prueba de geotaxis negativa y en la emergencia de la cabeza respecto a nivel del agua en la prueba de nado) y en la etapa postnatal tardía, retrasar la adquisición de la alternancia espacial en un laberinto en T con tendencia a dirigirse hacia la izquierda.

BIBLIOGRAFIA

- Aaronson, R. P. and Woo, E. Organization in the cell nucleus: divalent cations modulate the distribution of condensed and diffuse chromatin. *J Cell Physiol.* 90 (1981) 181-188.
- Allen, R. G. Oxygen-reactive species and antioxidant responses during development: the metabolic paradox of cellular differentiation. *Proc Soc Exp Biol Med.* 196 (1991) 117-129.
- Allen, R. G and Ballin, A. K. Oxidative influences on development and differentiation: an overview of the free radical theory of development. *Free Radic Biol Med.* 6 (1989) 631-661.
- Allen, R. G. and Venkatraj V. S. Oxidants and antioxidants in development and differentiation. *J Nutr.* 122 (1992) 631-635.
- Altman, J. Autoradiographic and histological studies of postnatal neurogenesis. III Dating the time of production and onset of differentiation on cerebellar microneurons in rats. *J Comp Neurol.* 136 (1969) 269-294.
- Altman, J. Postnatal development of the cerebellar cortex in the rat. I. The external granular layer and the transitional molecular layer. *J Comp Neurol.* 145 (1972a) 353-398.
- Altman, J. Postnatal development of the cerebellar cortex in the rat. II. Phases in the maturation of Purkinje cells and of the molecular layer. *J Comp Neurol.* 145 (1972b) 399-464.
- Altman J. and Winfree, A.T. Postnatal development of the cerebellar cortex in the rat. V. Spatial Organization of Purkinje cell perikarya. *J Comp Neurol.* 171 (1977) 1-6.
- Altman, J. Experimental reorganization of the cerebellar cortex. V. Effects of early x-irradiation schedules that allow or prevent the acquisition of basket cells. *J Comp Neurol.* 165(1) (1976 a) 31-47.
- Altman, J. Experimental reorganization of the cerebellar cortex. VI. Effects of x-irradiation schedules that allow or prevent cell acquisition after basket cells are formed. *J Comp Neurol.* 165(1) (1976 b) 49-63.
- Altman, J. Experimental reorganization of the cerebellar cortex. VII. Effects of late x-irradiation schedules that interfere with cell acquisition after stellate cells are formed. *J Comp Neurol.* 165(1) (1976 c) 65-75.
- Arito, H., Uchiyama, I., Yokiyama, E., Acute effects of ozone on EEG activity, sleep-wakefulness and heart rate in rats. *Ind Health.* 30 (1992) 23-34.
- Aswell, K. Microglia and cell death in the developing mouse cerebellum. *Brain Res Dev Brain Res.* 55(2) (1990) 219-230.
- Atwell, D., Barbour, B., Brew, H., Sarantis, M., Szatkowski, M. Electrogenic glutamate uptake. Basic properties, modulation and failure in anoxia. In: Glial-neuronal interaction. Abbott, N. J. (Ed). The New York Academy of Sciences. (1991). pp. 610.
- Banati, R., Gehrmann, J., Schubert, P., Kreutzberg, G. Cytotoxicity of microglia. *Glia.* 7(1) (1993) 11-118.
- Bancroft, J. D. and Stevens, A. Theory and practice of histological techniques. Churchill Livingstone, New York (1977) 463 pp.
- Bannister, L. H., Berry, M. M., Collins, P., Dyson, M., Dussek, J. E. Ferguson, M.W.J. (Eds). Anatomía de Gray. Bases Anatómicas de la Medicina y la Cirugía. Tomo II. Trigésima octava edición. Harcourt Brace, Madrid (1998) 2100 pp.
- Barres, B. Five electrophysiological properties of glial cells. In: Glial-neuronal interaction. Abbott, N. J. (Ed). The New York Academy of Sciences. (1991). pp. 248-254.
- Beal, M. F. Mechanism of excitotoxicity in neurologic diseases. *FASEB J.* 6 (1992) 3338-3344.
- Beckman J. Peroxynitrite versus hydroxyl radical: the role of nitric oxide in superoxide-dependent cerebral injury. *Ann. N Y Acad. Sci.* 738 (1994) 382-387.
- Benitez, B. L. Apoptosis in cancer. *Memorias del Congreso Internacional de Microscopia Electrónica* (1996) 236-238.
- Benuck, M., Banay-Schwartz, M and Latijtha, A. Proteolytic activity is altered in brain tissue of rats upon chronic exposure to ozone. *Life Sci.* 52 (1993) 877-871.
- Berry, M. and Bradley, P. The growth of the dendritic trees of Purkinje cells in the cerebellum of the rat. *Brain Res.* 112(1) (1976) 1-35.
- Bignami, G., Musi, B., Dell'Omo, G., Lavila, G., Alleva, E. Limited effects of ozone exposure during pregnancy on physical and neurobehavioral development of CD-1 mice. *Toxicol Appl Pharmacol.* 129 (1994) 246-271.

- Bovolenta, P., Wandosell, F., Nieto-Sampedro M. Neurite outgrowth over resting and reactive astrocytes. *Restorative Neurology and Neuroscience*. 2(1991) 221-228.
- Bochner, B. R., Lee, P. C., Wilson, S. W., Cutler, C. W., Ames, B. N. AppppA and related adenylated nucleotides are synthesized as a consequence of oxidative stress. *Cell*. 37 (1984) 225-232.
- Boissavy-Vinau, M. L'ozone des villes et l'ozone des champs. *Recherche*. 26 (1995) 86-87.
- Borgens, R. B., Variable, J. W., Joffe, L. F. Bioelectricity and regeneration. *Bioscience*. 29 (1979) 468-474.
- Braitenberg, V. Is the cerebellar cortex a biological clock in the millisecond range. In: *Progress in Brain Research*. Fox, C. A. (Ed). 25 (1967) 334-346.
- Brailowsky, S., Stein, D. G., Will, B. El cerebro averiado. Plasticidad cerebral y recuperación funcional. Fondo de Cultura Económica. (1993) 299 pp.
- Braughler, J. M. Lipid peroxidation-induced inhibition of γ -aminobutyric acid uptake in rat brain synaptosomes: protection by glucocorticoids. *J Neurochem*. 44 (1985) 1282-1288.
- Brodal, A. Anatomical studies of cerebellar fibre connections with special reference to problems of functional localization. In: *Progress in Brain Research*. Fox, C. A. (Ed) 25 (1967) 135-173.
- Buttke, T. M., Sandstrom, P. A. Oxidative stress as mediator of apoptosis. *Immunol Today*. 15 (1994) 7-10.
- Burdon, R. H. and Rice-Evans, C. A. Free radicals and the regulation of mammalian cell proliferation. *Free Rad Res. Commun*. 6 (1989) 345-358.
- Calderon Garcidueñas, L., Roy Ocotla, G. Nasal cytology in southwest metropolitan Mexico city inhabitants: a pilot intervention study. *Environ Health Perspectives*. 145 (1993) 276-282.
- Cambray-Deakin, M., Norman, K., Burgoyne, R. Differentiation of the cerebellar granule cell: Expression of a synaptic vesicle protein and the microtubule-associated protein MAP 1A. *Dev Brain Res*. 34 (1987) 1-7.
- Cano-Valle, F., Hidalgo, K., Fortoul, T. Alteraciones en el aparato respiratorio por algunos contaminantes ambientales. *Rev Fac Med. UNAM*. 34(1) (1991) 48-53.
- Carden, M., Trojanowski, J., Schlaepfer, W., Lee, V. Two stages expression of neurofilament polypeptides during rat neurogenesis with early establishment of adult phosphorylation patterns. *J Neurosci*. 7 (1987) 3489-3504.
- Carson, D. A., Ribeiro, J. M. Apoptosis and disease. *Lancet*. 341 (1993) 1251-1254.
- Castillejos, M., Gold, D., Dockery, D., Tosteson, T., Baum, T., Speizer, F. E. Effects of ambient ozone on respiratory function and symptoms in Mexico City schoolchildren. *Am Rev Resp Dis*. 145 (1992) 276-282.
- Chan, P. H., Kerlan, R., Fishman, R. A. Reductions of γ -aminobutyric acid and glutamate uptake and Na⁺, K⁺-ATPase activity in brain slices and synaptosomes by arachidonic acid. *J Neurochem*. 40 (1983) 309-316.
- Chan, P. H., Schmidley, J. W., Fishman, R. A., Longan, S. M. Brain injury, edema and vascular permeability changes induced by oxygen-derived free radicals. *Neurology*. 34 (1984) 315-320.
- Chan-Palay, V. The recurrent collaterals of Purkinje cell axons: a correlated study of the rat's cerebellar cortex with electron microscopy and the Golgi method. *Z. Anat. Entwicklungsgesch*. 134(2) (1971) 200-234.
- Chan-Palay, V., Nilaver, G., Palay, S., Beinfeld, M., Zimmermann, E., Wu, J., O'Dinohue, T. Chemical heterogeneity in cerebellar Purkinje cells: Existence and coexistence of glutamic acid decarboxylase and motilin-like immunoreactivities. *Proc Natl Acad. Sci. U.S.A.*. 78 (1981) 7787-7791.
- Compston, D., Scolding, N. Immune-mediated oligodendrocyte injury. In *Glial-neuronal interaction*. Abbott, N. J. (Ed). The New York Academy of Sciences. (1991). pp. 196-203.
- Coyle, J. T., Puttfarcken, P. Oxidative stress, glutamate, and neurodegenerative disorders. *Science*. 262 (1993) 689-695.
- Curtis, R., Cohen, J., Fok-seag, J. Development of macroglial cells in rat cerebellum. I Use of antibodies to follow early *in vivo* development and migration of oligodendrocytes. *J Neurocytol*. 17 (1988) 43-54.
- Custodio-Ramirez, V. and Paz, C. Ozone produces functional deficits in the rat visual pathway, *Electroenceph Clin Neurophysiol*. 104 (1997) 269-273.
- Davidson, A. Myelin structure and demyelination in multiple sclerosis. In: *Glial-neuronal interaction*. Abbott, N. J. (Ed). The New York Academy of Sciences. (1991) 174-177.

- Debler, E. A. Sershen, H., Lajtha, A., Gennaro, J. F. Superoxide radical mediated alteration of synaptosome membrane structure and high affinity γ -[^{14}C] aminobutyric acid uptake. *J Neurochem.* 47(6) (1986) 1804-1813.
- De Vente, J., Bol, J. G., Berkemans, H.S., Schipper, J., Steinbusch, H. M. W. Immunocytochemistry of cGMP in the cerebellum of the immature, adult and aged rat: the involvement of nitric oxide. A micropharmacological study. *Eur J Neurosci.* 2 (1990) 845-862.
- Dell'Orno, G., Fiore, M., Petruzzi, S., Alleva, E., Bignami, G. Neurobehavioral development of CD-1 mice after combined gestational and postnatal exposure to ozone. *Arch Toxicol.* 69 (1995 a) 608-616.
- Dell'Orno, G., Wolfer, D., Alleva, E., Lipp, H-P. Developmental exposure to ozone induces subtle changes in swimming navigation of adult mice. *Toxicology Letters.* 8 (1995 b) 91-99.
- Devasagayan, T. P. A. Low level of lipid peroxidation in newborn rats. Possible factor for resistance in hepatic microsomes. *FEBS Lett.* 199 (1986) 203-207.
- Dominguez del Toro, E., Juiz, J. M., Smillie, F., Linstrom, J., Criado, M. Expression of a 7 neuronal nicotinic receptors during postnatal development of the rat cerebellum. *Dev Brain Res.* 98 (1997) 125-133.
- Driscoll, M. Genes controlling programmed cell death: Relation to mechanisms of cell senescence and aging. In: Esser K.; Martin G. M., eds. *Molecular aspects of aging*: England: John Wiley & Sons Ltd; (1995) 45-58.
- Duke, C., Ojcius, D. M., Young, J. D. Cell suicide in health and disease. *Scientific American.* (1996) 48-55.
- Dumesnil-Bousez, N. and Sotelo, C., Early development of the Lurcher cerebellum: Purkinje cell alterations and impairment of synaptogenesis. *J Neurocytol.* 21 (1992) 506-529.
- Dunn, M. F., Schilling, K., Mugnaini, E. Development and fine structure of murine Purkinje cells in dissociated cerebellar cultures: dendritic differentiation, synaptic maturation, and formation of cell-class specific features. *Anat Embryol.* 197 (1998) 31-50.
- Dykens, J. A., Stern, A., Trenkner, E. Mechanisms of kainate toxicity to cerebellar neurons in vitro is analogous to reperfusion tissue injury. *J Neurochem.* 49 (1987) 1222-1228.
- Esterbauer, H., Shauer, R. J. Zollner, H. Chemistry and biochemistry of 4-hidroxy-nonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Rad Biol Med.* 11 (1991) 81-128.
- Eguchi, Y., Shimizu, S., Tsujimoto, Y. Intracellular ATP levels determine cell fated by apoptosis or necrosis. *Cancer Res.* 57 (1997) 1835-1840;
- EPA. National air quality and emissions trends report. United States Environmental Protection Agency, EPA-450/4-91-023. (1991).
- Enkvist, K. M. O., Shao, Y., McCarthy, K. D. Astroglia: Receptors, second messengers, and function. In: *Biology and Pathology of Astrocyte-Neurons Interactions*. Fedoroff, S., Juurlink, B. H., Doucette, R. (Eds). Plenum Press. New York. (1993). pp. 93-102.
- Evans, P. H. Free radicals in brain metabolism and pathology. *Br Med Bull.* 49 (1993) 577-587.
- Favez, G. El impacto de la contaminación atmosférica en los pulmones. *Schweiz Med Wschr.* 116(25) (1986) 1-6.
- Fernandes R. S. and Cotter T. G. Apoptosis or necrosis: intracellular levels of glutathione influence mode of cell death. *Biochem Pharmacol.* 48 (1994) 675-681.
- Floyd, R. A., Zaleska, M.M., Harmon, J. Possible involvement of iron and oxygen free radicals in aspects of aging in brain. In: *Free Radicals in Human Biology, Aging and Diseases*. Armstrong, D., Sehgal, R. S., Cutler, R. G., Slater, T. F. (Eds). Raven Press, New York. (1984). pp. 143-161.
- Fryer, M. J. The mechanism of apoptosis, cell membrane lipid peroxidation an a novel in vivo function for antioxidant vitamin E (α tocopherol). *Redox Report.* 1 (1995) 159-161.
- Fujita, S., Shimada, M., Nakamura, T. H3-Thymidine autorradiographic studies on the cell proliferation and differentiation in the external and the internal granular layers of the mouse cerebellum. *J Comp Neurol.* 128 (1966) 191-208.
- Ganong, W. F. *Fisiología Médica. El Manual Moderno* S. A. de C. V. México. 11ª Edición. (1988). 692 pp.
- Garthwaite, J. Glutamate, nitric oxide and cell-cell signalling in the nervous system. *Trends Neurosci.* 14 (1991) 60-67.
- Gerschenson, L. E., Rotello, R. J. Apoptosis: a different type of cell death. *FASEB J.* 6 (1992) 2450.

- Gerrity, T. R., McDonnell, W. F., House, D. E. The relationship between delivered ozone dose and functional responses in humans. *Toxicol Appl Pharmacol.* 124 (1994). 275-283.
- Gilles, F.H., Perinatal Neuropathology. In: Textbook of Neuropathology. Davis, R. L. and Robertson D. M. (Eds). Williams and Wilkins. London. Third Edition. (1997) 331-406.
- Giri, S. N., Hollinger, M-A., Schiedt, M.J. The effects of ozone and paraquat on PGF₂ and PGE₂ levels in plasma and combined pleural effusion and lung lavage of rats. *Environ Res.* 21 (1980) 467-476.
- Goldenring, J., Lasher, R., Vallano, M., Tetsufumi, V., Naito, S., Sternberger, N., Sternberger, L., DeLorenzo R. Association of synapsin I with neuronal cytoskeleton: Identification in cytoskeletal preparations in vitro and immunocytochemical localization in brain of synapsin I. *J Biol Chem.* 261 (1986) 8495-8504.
- Goldman, J. E. and Vaysse, P. J. Patterns of gliogenesis in different regions of the mammalian CNS. In: Differentiation and functions of glial cells. Botwell, M. (Ed). Springer-Verlag Berlin Heidelberg, New York. (1990). pp. 119-170.
- Goldstein, B. D., Pearson, B. Lodi, C. The effect of ozone on mouse blood in vivo. *Arch Environ Health.* 16 (1968) 648-650.
- González-Piña, R. and Paz C. Brain monoamine changes in rats after short periods of ozone exposure. *Neurochem Res.* 22 (1997) (1): 63-66.
- Greengard, J., Valtorta, F., Csemik, A., Benfenati, F. Synaptic vesicle phosphoproteins and regulation of synaptic function. *Science.* 259 (1993) 780-785.
- Grubar, J. C. Sleep and mental retardation. *Brain Dysfunct.* 2 (1989) 73-83.
- Günther, T., Höllnriegl V., Vormann J. Perinatal development of iron and antioxidant defence systems. *J Trace Elem. Electrolytes Health Dis.* 7 (1993) 47-52.
- Gutteridge, J. M. C. Free radicals in disease processes: A compilation of cause and consequence. *Free Rad Res Commun.* 19 (1993) 141-158.
- Hackney, J. D., Linn, W.S., Buckley, R.D., Pederson, E.E., Karuza, S.K., Law, D.C. and Fisher, D.A., Experimental studies on human health effects of air pollutant. I. Design and considerations, *Arch Environ Health.* 30 (1975) 373-378.
- Hackney, J.D., Linn, W.S., Karuza, S.K., Buckley, R.D. Bates, D. V., Hyazuza, M., Pengelly, L.D. and Silverman, F., Effects of ozone exposure in Canadians and southern Californians, *Arch Environ Health.* 32 (1977) 110-116.
- Halliwell, B. and Gutteridge, J. M. C., Oxygen radicals and the nervous system. *Trends Neurosci.* 8 (1985) 22-26.
- Hamprecht, B., Dringen, R., Pfeiffer, B., Kurz, G. The possible roles of astrocytes in energy metabolism. In: Biology and Pathology of Astrocyte-Neurons Interactions. Fedoroff, S., Juurlink, B. H., Doucette, R. (Eds). Plenum Press. New York. (1993). pp. 83-92.
- Harman, D. Free radical theory of aging: consequences of mitochondrial aging. *Age.* 6 (1983) 69-94.
- Haro, R. and Paz, C. Effects of ozone exposure during pregnancy on ontogeny of sleep in rats. *Neurosci Lett.* 164 (1993) 67-70.
- Harris C. Glutathione biosynthesis in the postimplantation rat conceptus in vitro. *Toxicol Appl Pharmacol.* 120 (1993) 247-256.
- Hart, S. The drama of cellular death. *Bio Science.* 44(7) (1994) 451.
- Herman, R., Weymouth, L. Penman, S. Heterogeneous nuclear protein fibers in chromatin depleted nuclei. *J Cell Biol.* 78 (1978) 663-674.
- Hemdon, R. M., Coyle, J. T., Addicks, E. Ultrastructural analysis of kainic acid lesion to cerebellar cortex. *Neurosci.* 5 (1980) 1015-1026.
- Hertz, L. Metabolic interactions between neurons and astrocytes. In: Biology and Pathology of Astrocyte-Neurons Interactions. Fedoroff, S., Juurlink, B. H., Doucette R. (Eds). Plenum Press. New York. (1993). pp. 1-13.
- Hillered, L. and Ernster, L. Respiratory activity of isolated rat brain mitochondria following in vitro exposure to oxygen radicals. *J Cereb Blood Flow Metab.* 3 (1983) 207-214.
- Hinojosa-Cabrera J. M., Haro, V. R., Paz T. C. Efectos de la inhalación de ozono durante la gestación sobre el aprendizaje. X Reunión Anual de Investigación. Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía. 18 y 19 de mayo de 1995.

- Hinshaw, D. D., Miller, M. T., Omann, G. M., Bealls, T. F., Hyslop, P. A. A cellular model of oxidant-mediated neuronal injury. *Brain Res.* 615 (1993)13-26.
- Hiranruengchok R. and Harris C. Glutathione oxidation and embryotoxicity elicited by diamine in the developing rat conceptus in vitro. *Toxicol Appl Pharmacol.* 120 (1993) 62-71.
- Hiroshima, K., Khono, T., Owada, H., Hayashi, Y. A morphological study of the effects of ozone on rat lung. *Exp Molecular Pathol.* 47 (1987) 327-345.
- Hirsch, T., Marchetti, P., Sussin, S. A., Dallaporta, B., Zamzami, *et al.* The apoptosis-necrosis paradox. Apoptogenic Proteases activated after mitochondrial permeability determine the mode of cell death. *Oncogene.* 15 (1997) 1573-1582;
- Hollingworth, T. and Berry, M. Network analysis of dendritic fields of pyramidal cells in neocortex and Purkinje cells in the cerebellum of the rat. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 270(906) (1975) 227-264.
- Hotchkiss, J. A., Harkema, J. R., Henderson, R. F. Effects of cumulative ozone exposure on ozone-induced nasal epithelial hyperplasia and secretory metaplasia in rats. *Exp Lung Res.* 15 (1991) 589-600.
- Huitrón-Reséndiz, S., Custodio-Ramírez, V., Escalante-Membrillo, C., González-Piña, R., Paz, C., Sleep alteration and brain regional changes of serotonin and its metabolites in rats exposed to ozone. *Neurosci Lett.* 177 (1994) 119-122.
- Instituto Nacional de Ecología. Boletín informativo de la calidad del aire. *SEDESOL.* 13 (1993) 17.
- Isaacs, K., Abbot, L. Cerebellar volume decreases in the tottering mouse are specific to the molecular layer. *Brain Res Bull* 36 (3) (1995) 309-314.
- Ito, M. Purkinje cells: Morphology and development. In: M. Ito (Ed), *The cerebellum and neural control*, Raven Press, New York. (1984). pp. 21-39.
- Ito, M. The cellular basis of cerebellar plasticity. *Curr Opin Neurobiol.* 1 (1991) 616-620.
- Jacobson, M. *Developmental Neurobiology*. Plenum Press. U.S.A. 2^a Edition. (1978). 753 pp.
- Jauregui, E. La contaminación atmosférica. *Ciencia y desarrollo.* 19(109) (1993) 53-60.
- Johnson, M. F., Hotchkiss, J. A., Harkema, J. R., Henderson, R. F. Proliferative responses of rat nasal epithelia to ozone. *Toxicol Appl Pharmacol.* 103 (1990) 143-155.
- Jonhson, T. E., Arking, R., Bertrand, H., Driscoll, M., Esser, K., Griffiths, A. J. F., Harley, C. B., Jazwinski, S. M., Kirkwood, T. B. L., Osiewacz, H. D. Research an diverse model systems and the genetic basis of aging and longevity. In: Esser K., Martin G. M. eds. *Molecular aspects of aging*. England: John Wiley & Sons Ltd; (1995) 61-76.
- Kaplan, E. Lipid hidroperoxides in cerebrum and cerebellum obtaines from rat brains: Effect of freezing in liquid N₂. *Biochemical Archives.* 7 (1991) 227-231.
- Kavlock, R., Datson, G., Grabowski, C.T. Studies on the developmental toxicity of ozone. I. Prenatal effects. *Toxicol Appl Pharmacol.* 48 (1979) 19-28.
- Kavlock, R., Meyer, E., Grabowski, C., Studies on the developmental toxicity of ozone: Posnatal effects. *Toxicol Lett.* 5 (1980) 3-9.
- Kelly, F. J. and Birch, S. Ozone exposure inhibits cardiac protein synthesis in the mouse. *Free Rad Biol Med.* 14 (1993) 443-446.
- Kennedy, C. H., Hatch, G. E., Slade, R., Mason, R. P. Application of EPR spin-trapping technique to the detection of radicals produced *in vivo* during inhalation exposure of rats to ozone. *Toxicol Appl Pharmacol.* 114 (1992) 41-46.
- Kettenmann, H., Banati, R., Wallz, W. Electrophysiological behavior of microglia. *Glia.* 7(1) (1993) 93-101.
- Khan, M. A. Histochemical and ultraestructural investigation of heterogeneous Purkinje neurons in mammalian cerebellum. *Cell Mol Biol Res.* 39(8) (1994) 789-795.
- Kidd, V. J. Proteolytic activities that mediate apoptosis. *Annu Rev Physiol.* 60 (1998) 533-573.
- Kilburn, K. H., Warshaw, R. H. y Thornton, J. C. Expiratory flows decreased in los Angeles children from 1984-1987: Is this evidence of effects of air pollution? *Environ Res.* 59 (1992) 150-158.
- King, K. L., Cidlowski, J. A. Cell cycle regulation and apoptosis. *Annu Rev Physiol.* 60 (1998) 601-617.

- Kirichenko, A., Li, Li., Morandi, M. T., Holian, A., 4-Hydroxy-2-nonenal-protein adducts and apoptosis in murine lung cells after acute ozone exposure. *Toxicol Appl Pharmacol.* 141 (1996) 416-424.
- Korbo, L. and Andersen, B. The distribution of Purkinje cell perikaryon and nuclear volume in human and rat cerebellum with the nucleator method. *Neuroscience.* 69(1) (1995) 151-158.
- Kreutzberg, G. W. Microglia: A sensor for pathological events in the CNS. *Trends Neurosci.* 19(8) (1996) 312-318.
- Kretsinger, R. H. Mechanism of selective signalling by calcium. *Neurosci Res Prog Bull.* 19 (1980) 211-328.
- Kroemer G., Dallaporta, B., Resche-Rigon M. The mitochondrial death/life regulator in apoptosis and necrosis. *Annu Rev Physiol.* 60 (1998) 619-642.
- Kruman, I., Bruce-Keller, A. J., Bredesen, D., Waeg, G., Mattson, M. P. Evidence that 4-hydroxynonenal mediates oxidative stress-induced neuronal apoptosis. *J Neurosci.* 17 (13): (1997) 5089-5100.
- Kulle, T. J. and Cooper, G. P. Effects of formaldehyde and ozone on the trigeminal nasal sensory system. *Arch Environ Health.* 30 (1975) 237-243.
- Lafarga, M., Lerga, A., Andre, M., Polanco, J., Calle, E., Berciano, M. Apoptosis induced by methylazoxymethanol in developing rat cerebellum-organization of cell nucleus and its relationship to DNA and rRNA degradation. *Cell Tissue Res.* 289(1) (1997). 25-28.
- Lafon-Cazal, M., Pletri, S. Culcasi, M., Bockaert, J. NMDA-dependent superoxide production and neurotoxicity. *Nature.* 364 (1993) 535-537.
- Lategola, M. T., Melton, C. E., Higgins, E. Effects of ozone on symptoms and cardiopulmonary function on a flight attendant surrogate population. *Aviat. Space Environ. Med.* 51 (1980) 237-346.
- Le Marec N., Dahhaoui, M., Stelz T., Bakalian A., Delhaye-Bouchaud, N., Caston, J. and Mariani J. Effect of cerebellar granule cell depletion on spatial learning and memory and in an avoidance conditioning task: studies in postnatally X-irradiated rats. *Dev Brain Res.* 99 (1997) 20-28.
- Leclerc, N., Beesley, P. W., Brown, I., Collonnier, M., Gurd, J., Paladino, T., Hawkes, R. Synaptophysin expression during synaptogenesis in the rat cerebellar cortex. *J Comp Neurol.* 280 (1989) 197-212.
- Leist, M., Single, B., Castoldi, A. F., Kuhnle, S., Nicotera, P. Intracellular adenosine triphosphate (ATP) concentration: a switch in the decision between apoptosis and necrosis. *J Exp Med.* 185: 1997. 1481-1486.
- Lieb, S. L., Kim, Y. S., Chow, L. L., Sheldon, R. A., Täuber, M. G. Reactive oxygen intermediates contribute to necrotic and apoptotic neuronal injury in an infant rat model of bacterial meningitis due to group B streptococcus. *J Clin Invest.* 98(11) (1996) 2632-2639.
- Lipfert, F. W. A critical review of studies of the association between demands for hospital services and air pollution. *Environ. Health Persp.* 101 (1993) 229-268.
- Loberg, E. and Torvik, A. Distinction between artifactually shrunken and truly degenerated "dark" neurons by in
- Llinás, R. R. The cortex of the cerebellum. *SCI AM* 1 (2) (1975) 56-67.
- Mariani, J., Benoît, P. Hoang, M. D. Thompson, M. A., Delhaye-Bouchaud, N. Extent of multiple innervation of cerebellar Purkinje cells by climbing fibers in adult X-irradiated rats. Comparison of different schedules of irradiation during the first postnatal week. *Dev Brain Res.* 57 (1990) 63-70.
- Martins, L. M., Earnshaw, W. C. Apoptosis: alive and kicking in 1997. *Trends Cell Biol.* 7 (1997) 111-114.
- Mayanil, C. and Knepper, P. Synaptic vesicle and synaptic membrane glycoproteins during pre and postnatal development of mouse cerebral cortex, cerebellum and spinal cord. *Dev Neurosci.* 15 (1993) 133-145.
- McCay, P. B. Physiological significance of lipid peroxidation. *Fed Proc.* 40 (1981) 173.
- McConnell, P. and Berry M. The effects of undernutrition on Purkinje cell dendritic growth in the rat. *J Comp Neurol.* 177(1) (1978) 159-171.
- McConnell, M., Whalan, A. M., Smith, D. E., Fisher, P. A. Heat-shock-induced changes in the structural stability of proteinaceous karyoskeletal elements in vitro and morphological effects in situ. *J Cell Biol.* 105 (1987) 1087-1098.
- Menzel, D. B. The toxicity of air pollution in experimental animals and humans: the role of oxidative stress, *Toxicol Lett.* 72 (1994) 269.

- Meshul, Ch. K., Seil, F. J., Hemdon, R. M. Astrocytes play a role in regulation of synaptic density. *Brain Res.* 402 (1987) 139.
- Mirmiram, M., Scholtens, J., Van de Poll, N. E. Vylings, H. B. H., Van der Gugten, J. Boer, G. J. Effects on experimental suppression of active (REM) sleep during early development upon adult brain and behavior in the rat. *Brain Res.* 7 (1983) 277-286.
- Mishra, O. P. and Delivoria-Papadopoulos, M. Lipid peroxidation in developing fetal guinea pig brain during normoxia and hypoxia. *Dev Brain Res.* 45 (1989)129-135.
- Miyamoto, M., Murphy, T. H., Schnaar, R. L. Coyle, J. T. Antioxidants protect against glutamate-induced cytotoxicity in a neuronal cell line. *J Pharmacol Exp Ther.* 250 (1989) 1132-1140.
- Mizuguchi, M., Sohma, O., Takashima, S., Ikeda, K., Yamada, M., Shiraiwa, N., Ohtha, S. Immunochemical and immunohistochemical localization of Bcl-x protein in the rat central nervous system. *Brain Res.* 712 (1996) 281-286.
- Mizumo, Y., Otha, K. Regional distribution of thiobarbituric acid reactive products, activities of enzymes regulating the metabolism of oxygen free radicals, and some of the related enzymes in adult and aged rat brain. *J Neurochem.* 46 (1986) 1344-1352.
- Moore, G. S., Calabrese, E. J., Grinberg-Funes, R. A. The C57L/J mouse strain as a model for extrapulmonary effects of ozone exposure. *Bull Environ Contam Toxicol.* 25 (1980) 578-585.
- Motoyama, N., Wang, F., Roth, K., Sawa, H., Nakayama, K-I, Nakayama, K. Negishi, I., Senju, S., Zhang, Q., Fujii, S., Loh, D. Massive cell death of immature hematopoietic cells and neurons in Bcl-x-deficient mice. *Science.* 267 (1995) 1506-1510.
- Mugnaini, E. Developmental aspects of synaptology with special emphasis upon the cerebellar cortex. *UCLA Forum Med. Sci.* 14 (1972) 141-165.
- Mustafa, M. G. Biochemical basis of ozone toxicity. *Free Radic Biol Med.* 9 (1990) 145-265.
- Murphy, S. D. A review of effects on animals of exposure to auto exhaust and some of its components. *Air Pollut. Control Assoc.* 14 (1964) 303-308.
- Murphy, S. y Simmons, M. L. Production of nitrosyl mediators in astrocytes. In: *Biology and Pathology of Astrocyte-Neurons Interactions.* Fedoroff, S., Juurlink, B. H., Doucette, R. (Eds). Plenum Press. New York. (1993) 75-81.
- Myers, L. S. Free radical damage of nucleic acids and their components. In: *Free Radicals in Biology.* W. Pryor (Ed). 4 (1980) 95 New York Academic.
- National Research Council. Ozone and other photochemical oxidants. Washington, D. C. National Academy of Sciences, Committee on Medical and Biologic Effects of Environmental Pollutants. (1977).
- Nicholson, D. W., Ali, A., Thornberry, N. A., Vaillancourt, J. P., Ding, C. K. Identification and inhibition of the ICE/CED-3 protease necessary for mammalian apoptosis. *Nature* 376 (1995) 47-43.
- Nieuwenhuys, R. Comparative anatomy of the cerebellum. In: *Progress in Brain Research.* Fox, C. A. (Ed). 25 (1967) 1-93.
- Nixon, R. and Shea, T. Dynamics of neuronal intermediate filaments: A developmental perspective. *Cell Motil Cytoskel.* 22 (1992) 81-91.
- Norenberg, M. D. and Bruce-Gregorios J. Nervous system manifestations of systemic disease. In: *Textbook of Neuropathology.* Davis, R. L. and Robertson D. M. (Eds). Williams and Wilkins. London. Third Edition. (1997) 547-625.
- O'Callaghan, J. P. Quantitative features of reactive gliosis following toxicant-induced damage of the CNS. In: *Markers of neuronal injury and degeneration.* Johannessen, J. N. (Ed). *Annals of New York Academy of Sciences.* (1993) 195-210.
- Paz, C., Bazan-Perkins B. Sleep-wake disorganization in cats exposed to ozone. *Neurosci Lett.* 140 (1992) 270-272.
- Paz, C., Huitrón-Resendiz, S. The effects of ozone exposure on the sleep-wake cycle and serotonin contents in the pons of the rat. *Neurosci Lett.* 203 (1996) 49-52.
- Peters, A., Palay, S. L., Webster, H de F. The fine structure of the nervous system: The cells and their process. Harper & Row Publ. New York. (1970).
- Petruzzi, S., Fiore, M., Dell'Orno, G., Bignami, G., Alleva, E. Medium and long-term behavioral effects in mice of extended gestational exposure to ozone. *Neurotoxicol Teratol.* 17(4) (1994) 463-470.

- Polkovitz, H., Mezey, E., Hamori, J., Szentagothai, J. Quantitative histological analysis of the cerebellar nuclei in the cat. I. Numerical data on cells and on synapses. *Ex. Brain Res.* 28 (1977) 189-209.
- Pompeiano, O. Functional organization of the cerebellar projections to the spinal cord. In: Progress in Brain Research. Fox, C. A. (Ed). 25 (1967) 282-321.
- Portera-Cailliau, C. Hedreen, J., Price, D., Koliatsos, V. Evidence for apoptotic cell death in Huntington's disease and excitotoxic animal models. *J Neurosci.* 15 (1995) 3775-3787.
- Pozo, D., Reiter, R. J., Calvo, J. R., Guerrero, J. M. Physiological concentrations of melatonin inhibit nitric oxide in rat cerebellum. *Pharmacol Lett.* 55(24) (1994) 455-460.
- Pryor, W. A. and Church, D. F. The reaction of ozone with unsaturated fatty acids: aldehydes and hydrogen peroxide as mediators of ozone toxicity. In: Oxidative damage and repair: chemical, biological and medical aspects, Davies, J. A. (Ed). Pergamon Press. New York, (1991) 496-504.
- Pryor, W. A. How far does ozone penetrate into the pulmonary air/tissue boundary before it reacts? *Free Radic Biol Med.* 12 (1992) 83-88.
- Pushpendran, C. K., Subramanian, M., Devasagayam, T. P. Developmental changes in the peroxidation potential of rat brain homogenate and mitochondria. *Mech Ageing Dev.* 73 (1994) 197-208.
- Pysh, J. J., Perkins, R. E., Beck, L. S. The effect of postnatal undernutrition on the development of the mouse Purkinje cell dendritic tree. *Brain Res.* 163(1) (1979) 165-170.
- Rahman, I-U., Massaro, G. D., Massaro, D. Exposure of rats to ozone: evidence of damage to heart and brain. *Free Rad Biol Med.* 12 (1992) 323-326.
- Raine, C. S. Oligodendrocytes and central nervous system myelin. In: Textbook of Neuropathology. Davis, R. L. and Robertson D. M. (Eds). Williams and Wilkins. London. Third Edition. (1997) 137-164.
- Rakic, P. Glial cells in development. *In vivo and in vitro* approaches. In: Glial-neuronal interaction. N. J. Abbott (Ed). The New York Academy of Sciences. (1991) 96-99.
- Rakic, P. y Sidman, R. Histogenesis of cortical layers in human cerebellum particularly the lamina dissecans. *J Comp Neur.* 139(1970) 473-500.
- Ralcewicz, T. and Persaud, T. Purkinje and granule cells distribution in the cerebellum of the rat following prenatal exposure to low dose ionizing radiation. *Exp Toxicol Pathol.* 46(6) (1994) 443-452.
- Ramón y Cajal, S., De Castro, F. Elementos de técnica micrográfica del sistema nervioso. Salvat Editores S. A. México. Segunda Edición. (1972) 283 pp.
- Ramón y Cajal, S. Recuerdos de mi vida: Historia de mi labor científica. Alianza Editorial S. A. Madrid. Tercera Edición. (1981) 386 pp.
- Ratan, R. R., Murphy, T. H., Baraban, J. M. Oxidative stress induces apoptosis in embryonic cortical neurons. *J Neurochem.* 62 (1994) 376-379.
- Romieu, I., Cortez-Lugo, M., Ruiz-Velasco, S. Sanchez, S., Meneses, f. and Hernandez M., Air pollution and school absenteeism among children in Mexico city. *Am J Epidemiol*, 136 (1992) 1524-1531.
- Rothstein, J. D., Bristol, L. A., Hosler, B., Brown, R. H., Kunel, R. W. Chronic inhibition of superoxide dismutase produce apoptotic death of spinal neurons. *Proc Natl Acad Sci. U S A.* 91 (1994) 4155-4159.
- Rugiero-Vargas, C., Rivas-Manzano, P., DelaRosa-Rugiero, C., Parra-Gámez, L., Ortiz-Hernández, R. Microwaves applied to silver impregnations with ammoniacal silver carbonate. *Biotech Histochem.* 69(5) (1994) 273-278.
- Salas, M. Effects of early malnutrition on the development of swimming ability in the rat. *Physiol Behav.* 8. (1972). 119-122.
- Santana, N., Dotti, C. G., Lamond, A. I. Neuronal differentiation in the rat hippocampus involves a stage-specific reorganization of subnuclear structure both *in vivo* and *in vitro*. *Eur J Neurosci.* 8 (1996) 892-905.
- Schapiro, S., Salas, M., Vukovich, K. Hormonal effects off ontogeny of swimming ability in the rat: Assessment of central nervous system development. *Science.* 168 (1970) 147-151.
- Schröder, H. C., Messer, R., Bachmann, M., Bernd, A., Muller, W. E. G. Superoxide radical-induced loss of nuclear restriction of immature mRNA: A possible cause for ageing. *Mech Ageing Dev.* 41 (1987) 251-266.

- Schwartz, J. Spix, C. Wichmann, H. E. Malin, E. Air pollution and acute respiratory illness in five German communities. *Environ Res.* 56 (1991) 1-4.
- Scott, J. A. The role of cytoskeletal integrity in cellular transformation. *J Theor Biol.* 106 (1984) 183-188.
- Shepherd, H. D. Neurobiología. Oxford University Press. Third Edition. (1994). 760 pp.
- Shibuki, K., Okada, D. Endogenous nitric oxide release required for long-term synaptic depression in the cerebellum. *Nature.* 349 (1991) 326-328.
- Sievers, J., Pehlemann, F.W. Gude, S. y Berry, M. A time course study of the alterations in the development of the hamster cerebellar cortex after destruction of the overlying meningeal cells with 6-hydroxy dopamine on the day of birth. *J Neurocytol.* 23. (1994) 117-134.
- Simonian, N. A. and Coyle, J. T. Oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 36 (1996) 83-106.
- Sohal, R. S., Allen, R. G., Nations C. Oxygen free radicals play a role in cellular differentiation: an hypothesis. *Free Rad Biol Med.* 2 (1986) 175-181.
- Sohal, R. S., Allen, R. G., Nations, C. Oxidative stress and cellular differentiation. Membrane in cancer cells. *Ann NY Acad Sci.* 555 (1988) 59.
- Sotelo, C. Cerebellar neuroglia: Morphological and histochemical aspects. In: Progress in Brain Research. Fox, C. A. (Ed). 25 (1967) 226-250.
- Soutschek, J. and Zupanc, G. Apoptosis in the cerebellum of adult teleost fish *Apteronotus leptorhynchus*. *Dev Brain Res.* 97 (1996) 279-286.
- Spektor, D. M., Lippman, M., Lioy, P. J., Thurston, G. D., Citak, K., James, D.J., Bock, N., Speizer, F. E., Hayes C. Effects of ambient ozone on respiratory function in active, normal children. *Am Rev Respir Dis.* 137 (1988) 313-320.
- Steinberg, J. J., Gleeson, J. L., Gil, D. The pathobiology of ozone-induced damage. *Arch Environ Health.* 45 (1990) 80-87.
- Steller, H. Mechanism and genes of cellular suicide. *Science.* 269 (1995) 1445.
- Stone, W. S. And Gold, P. E. Sleep and memory relationships in intact old and amnesic young rats. *Neurobiol Aging.* 9 (1988) 719-727.
- Stone, W. S., Altman, H. J., Hall, J., Arankowsky-Sandoval, G., Parekh, P., Gold, P. E. Prenatal exposure to alcohol in adult rats: Relationships between sleep and memory deficits and effects of glucose administration on memory. *Brain Res.* 742 (1996) 98-106.
- Suárez, G. Análisis de la calidad atmosférica de la ciudad de México. *Información Científica y Tecnológica*, 13(173) (1991) 36-40.
- Tabatabaie, T. y Floyd, R. A. Susceptibility of glutathione peroxidase and glutathione reductase to oxidative damage and the protective effect of spin trapping agents. *Arch Biochem Biophys.* 314 (1994) 1
- Takashima, S., Becker, L. E. Developmental changes of glial fibrillary acidic protein in cerebral white matter. *Arch. Neurol.* 40 (1983) 14-18.
- Tappel, A. L. Lipid peroxidation damage to cell components. *Fed Proc.* 32 (1973) 1870-1874.
- Tepper, J. L., Weiss, B., Cox, C., Microanalysis of ozone depression of motor activity. *Toxicol Appl Pharmacol.* 64 (1982) 317-326.
- Tepper, J. L., Weiss B. y Wood, R. W., Alterations in behavior produced by inhaled ozone or ammonia, *Fundam Appl Toxicol.* 5 (1985) 1110-1118.
- Theele, D. y Streit, W. A chronicle of microglia ontogeny. *Glía.* 7(1) (1993) 5-8.
- Thompson, C. B. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science.* 267 (1995) 1456-1462.
- Thompson, S. Selected histochemical and histopathological methods. Charles C. Thomas Publisher U.S.A. (1966) 1639 pp.
- Thompson, E. B. The many roles of c-Myc in apoptosis. *Annu Rev Physiol.* 60 (1998) 575-600.
- Tomei, L. D. and Cope, F. O. (Eds). Apoptosis II: The molecular basis of apoptosis in disease. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York. (1994).

- Umezū, T., Suzuki, A. K., Miura, T. y Koisumi, A. Effects of ozone and nitrogen dioxide on drinking and eating behaviors in mice. *Environ Res.* 61 (1993) 51-67.
- Urano, S.; Asai, Y.; Makabe, S.; Matsuo, M.; Izumiyama N., Ohtsubo, K.; Endo, T. Oxidative injury of synapse and alteration of antioxidative defense systems in rats, and its prevention by vitamin E. *Eur J Biochem.* 245 (1): 64-70; 1997.
- Vázquez-Nin, G., Ortega-Rangel, J., Echeverría, O., Parra, M., Jiménez-García L., Changes in nuclear ribonucleoprotein constituents and chromatin disposition during neuronal differentiation and maturation., *Biol Cell.* 48 (1983) 17-24.
- Van der Zee, E., Jong, G., Strosberg, A., Luiten, P. Muscarinic acetylcholine receptor among cells of the oligodendrocytes lineage. *Glia.* 7(4) (1993) 322-328.
- Veninga, T. S. Toxicity of ozone in comparison with ionizing radiation. *Stralenterapie.* 134 (1967) 469-477.
- Verrecchia, C., Buisson, A., Lakhmeche N., Plotkine, M., Boulu R.G. Nitric oxide and cerebral ischemia. In: The neurobiology of NO[•] and [•]OH. Ch. C. Chiueh, D. L. Gilbert, C. A. Colton (Ed). *Annals of the New York Academy of Sciences.* 738 (1994) 341-368.
- Victorin, K. Review of genotoxicity of ozone. *Mutation Res.* 227 (1992) 221-238.
- Voogd, J. Comparative aspects of the structure an fibre connexions of the mammalian cerebellum. In: *Progress in Brain Research.* Fox, C. A. (Ed). 25 (1967) 94-134.
- Vorhees, C. V., Brunner, R. L., Butcher, R. E. Psychotropic drugs as behavioral teratogens. *Science.* 205 (1979) 1220-1225.
- Wagemann, E., Schmidt-Kastner, R., Block F., Sontag, K. H. Altered pattern of immunohistochemical staining for glial fibrillary acidic protein (GFAP) in the forebrain and cerebellum of the mutant spastic rat. *J Chem Neuroanat.* 8 (3) (1995) 151-163.
- Weintraub, H. and Groudine, M. Chromosomal subunits in active genes have an altered conformation. *Science.* 193 (1976) 848-856.
- Weiss, B., Ferin, J., Merigan, W., Stern, S., Cox, C. Modification of rat operant behavior by ozone exposure. *Toxicol Appl Pharmacol.* 58 (1981) 244-251.
- Wilson, J. X. Antioxidant defense of the brain: a role for astrocytes. *Can J Physiol Pharmacol.* 75(10-11) (1997) 1149-1163.
- Yildiz, D. Erçal, N., Frank, R., Mathews, R. Effects of 4-hydroxynonenal and N-acetyl-L-cysteine on Myc-induced apoptosis. *Toxicol Lett.* 89 (1996) 215-221.
- Zakeri, Z. and Ahuja, H. S. Evaluating cell death during tissue remodeling. *Memorias del Congreso Internacional de Miscoscopia Electrónica* (1996) 239-241.
- Zidenberg-Cherr, S., Han, B., Dubick, M. A. and Keen, C.L. Influence of dietary-induced copper and magnese deficiency on ozone-induced changes in lung and liver antioxidants systems. *Toxicol Lett.* 57 (1991) 81-90.
- Zirkle, L. G., Mengel, C. E., Horton, B. D., Duffy, E. J. Studies of oxygen toxicity in the SNC. *Aero Med.* 36 (1965) 1027-1032.

APENDICE

Técnica de Hematoxilina-Eosina

1. Fijar en formol al 10% amortiguado
2. Cortar con el microtomo para parafina a 5 μm .
3. Desparafinar con xilol e hidratar con alcoholes (absoluto, de 96%, de 70% y de 50%, hasta agua destilada)
4. Teñir con Hematoxilina de Harris de 3 a 5 min.
5. Virar con agua de la llave
6. Lavar con agua destilada
7. Deshidratar con alcohol de 50% y 70% por 3 min. en cada uno
8. Teñir con eosina alcoholica de 1 a 3 min.
9. Deshidratar con alcohol de 96% (dos cambios) y absoluto, por 5 min. en cada uno
10. Aclarar con xilol y cubrir con resina (Thompson 1966).

Técnica de Luxol-Fast blue (Modificación de Klüver y Barrera)

1. Fijar en formol al 10% amortiguado
2. Cortar con el microtomo para parafina a 5 μm .
3. Desparafinar con xilol, 2 cambios de 5 min. cada uno
4. Alcohol absoluto y alcohol de 96%, 2 cambios de 5 min cada uno
5. Teñir con luxol-fast blue 16 a 24 hs. a 50 °C
6. Lavar con alcohol de 96%
7. Lavar con agua destilada
8. Pasar rápidamente por sol. de carbonato de litio al 0.05%
9. Diferenciar con alcohol de 70% (hasta que se distingan una de otra las sustancias gris y blanca)
10. Lavar con agua destilada
11. Enjuagar con solución de carbonato de litio al 0.05%
12. Diferenciar en alcohol de 70% (hasta que la sustancia blanca tome un color azul verdoso)
13. Lavar con agua destilada
14. Teñir con violeta de cresilo por 6 min a 37°C
15. Deshidratar con alcohol de 96% (2 cambios) y alcohol absoluto por 5 min. en cada uno
16. Aclarar con xilol y cubrir con resina (Thompson 1966).

Reacción de Feulgen

1. Fijar en formol al 10% amortiguado
2. Cortar con el microtomo para parafina a 5 μm .
3. Desparafinar con xilol e hidratar con alcoholes absoluto, de 96%, 70% y 50% hasta agua destilada
4. Hidrolisar en ácido clorhídrico 5N frío por 1h
5. Colocar los cortes en el reactivo de Schiff de 5 a 10 min.
6. Colocar en bisulfito de sodio al 0.5%, 3 cambios de 3 min. cada uno

7. Enjuagar en agua corriente
8. Contrateñir con hematoxilina de Harris por 2 min.
9. Deshidratar con alcohol de 96% y absoluto
10. Aclarar con xilol y cubrir con resina (Thompson 1966).

Técnica de doble impregnación de Del Rio-Hortega

1. Fijar en formol al 10% amortiguado
2. Cortar con el microtomo para parafina a 5 μ m.y adherir al portaobjetos con poly-L-lisina
3. Desparafinar con xilol e hidratar con alcoholes absoluto, de 96%, 70% y 50% hasta agua destilada
4. Enjuagar en agua bidestilada
5. Impregnar con nitrato de plata al 2% en homo de microndas a intervalos de 10 seg. hasta que los cortes se observen amarillentos
6. Enjuagar en 100 ml. de agua bidestilada, 2 min.
7. Impregnar con 10 ml. de carbonato de plata amoniacal -M- más 5 gotas de piridina, en homo de microndas a intervalos de 10 seg. hasta color café oscuro
8. Enjuagar en 100 ml. de agua bidestilada más 10 gotas de piridina, 30 seg.
9. Reducir en formol al 10%, 1 min.
10. Enjuagar en agua bidestilada, 2 min.
11. Virar en cloruro de oro al 0.2%, 10 min. a temperatura ambiente y en homo de microndas durante 40 seg. a intervalos de 10 seg.
12. Enjuagar en tiosulfato de sodio al 5%, 1 min.
13. Enjuagar en agua bidestilada, 2 min.
14. Deshidratar con alcoholes de 96% y absoluto, 1 min. en cada uno
15. Aclarar con xilol 5 min. y cubrir con resina (Rugerio y col. 1994).

Técnica para cerebelo de Cajal (Fórmula a la hidroquinona)

1. Fijar en formol al 10% amortiguado
2. Cortar con el microtomo para parafina a 5 μ m.y adherir al portaobjetos con poly-L-lisina
3. Desparafinar con xilol e hidratar con alcoholes absoluto, de 96%, 70% y 50% hasta agua destilada
4. Enjuagar en agua bidestilada
5. Impregnar con la siguiente solución:

Nitrato de plata al 2%	100 cc.
Piridina pura	LX gotas
Alcohol de 96%	50 cc.

Calentar en homo de microndas a intervalos de 10 seg. hasta que tomen color tabaco

6. Lavado rápido en alcohol de 96%, 2-4 seg.
7. Reducir con la siguiente solución:

Hidroquinona	0.30 g
Agua destilada	70 cc.
Formol	20 cc.

Acetona 15 cc.

8. Lavar con agua destilada, 3 cambios de 2 min. cada uno
9. Virar en cloruro de oro al 0.2%, 10 min. a temperatura ambiente y en horno de microondas durante 40 seg. a intervalos de 10 seg.
10. Enjuagar en tiosulfato de sodio al 5%, 1 min.
11. Enjuagar en agua bidestilada, 2 min.
12. Deshidratar con alcoholes de 96% y absoluto, 1 min. cada uno
13. Aclarar con xilol, 5 min. y cubrir con resina (Ramón y Cajal y De Castro 1972).

Técnica de Bielchowsky para axones

1. Fijar en formol al 10% amortiguado.
2. Cortar con el microtomo para parafina a 5 μ m. y adherir al portaobjetos con poly-L-lisina
3. Desparafinar con xilol e hidratar con alcoholes absoluto, de 96%, 70% y 50% hasta agua destilada
4. Enjuagar en agua bidestilada
5. Impregnar en 50 cc de nitrato de plata al 20% a 37°C en la oscuridad por 15 min. Guardar esta sol. para el paso 7
6. Lavar en agua destilada
7. Impregnar por 10 min a 37 °C en la solución de nitrato de plata de paso 5 a la que se le agrega amoniaco hasta que el precipitado inicial desaparezca. Guardar esta solución para el paso 9
8. Lavar los cortes en amoniaco al 1%
9. Impregnar de 3 a 5 min. en la sol. plata del paso 7 a la que se le añaden 6-10 gotas del "desarrollador". Los cortes deben quedar casi negros
10. Lavar con agua destilada, 3 cambios de 2 min. cada uno
11. Virar en cloruro de oro al 0.2%, 10 min. a temperatura ambiente y en horno de microondas durante 40 seg. a intervalos de 10 seg.
12. Enjuagar en tiosulfato de sodio al 5%, 1 min.
13. Enjuagar en agua bidestilada, 2 min.
14. Deshidratar con alcoholes de 96% y absoluto, 1 min. en cada uno
15. Aclarar con xilol y cubrir con resina (Bancroft y Stevens 1977).

Técnica Inmunohistoquímica para Anti-sinaptofisina y Anti-proteína fibrilar ácida glial (Boehringer Mannheim Biochemica No. 902314 y 814369)

1. Fijar en paraformaldehído al 4% a 4°C, 3 hr.
2. Lavar en sucrosa al 12%, a 4°C, de 3hr a 24hr.
3. Lavar en sucrosa al 16% y al 18%, a 4°C, 2 hr cada uno
4. Deshidratar en alcoholes graduales de 30, 50, 70, 80, 96% y absoluto, 30 minutos cada uno
5. Aclarar con dos cambios de xilol de 1 hora cada uno
6. Incluir en parafina
7. Cortar con el microtomo para parafina a 5 μ m.

8. Montar los cortes con poli-L-lisina (Sigma No. P8920) y dejar secar 15 min.
9. Desparafinar e hidratar hasta agua destilada
10. Bloquear proteínas inespecíficas con albumina sérica bovina, 20 min.
11. Incubar con anticuerpo primario a temperatura ambiente durante dos horas
12. Lavar con PBS, 5 min, 3 cambios
13. Incubar con el anticuerpo secundario (Dako LSAB kit No. K-676) a temperatura ambiente durante 30 min.
14. Lavar con PBS, 10 min, 3 cambios
15. Incubar con el complejo Streptavidina-fosfatasa alcalina a temperatura ambiente por 20 min.
16. Lavar con PBS, 10 min, 3 cambios
17. Revelar con nueva fucsina (Dako LSAB kit No. K-676), a temperatura ambiente, 20 min.
18. Lavar con agua destilada
19. Contrateñir con hematoxilina de Harris, 15 min.
20. Lavar con agua corriente y destilada
21. Cubrir con medio de montaje acuoso (Dako S3025).