

00381  
6



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO**

**FACULTAD DE CIENCIAS  
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO**

**EFEECTO DE LA TAURINA EN EL SISTEMA NERVIOSO DE  
LA RATA EXPUESTA A UN MODELO DE ESTRES  
OXIDATIVO PRODUCIDO POR OZONO:  
ANALISIS MORFOLOGICO - BIOQUIMICO  
Y SU RELACION CON LA CONDUCTA**

200533

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE  
DOCTOR EN CIENCIAS  
BIOLOGIA**

**P R E S E N T A:**

**MARIA ROSA DE LOURDES AVILA COSTA**

**DIRECTORA DE TESIS: DRA. SELVA RIVAS ARANCIBIA**



**MEXICO, D.F.**

**2001**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

El trabajo experimental se realizó en el Laboratorio de Fisiología y en el Laboratorio de Biología Celular y Tisular de la Facultad de Medicina, UNAM. Así como también, en el Laboratorio de Neuromorfología del Proyecto de Neurociencias de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM.

Este trabajo fue apoyado en parte por el proyecto CONACyT No. 25496-M y por el proyecto DGAPA No. IN219998.

GREAT SPIRITS HAVE ALWAYS  
ENCOUNTERED VIOLENT OPPOSITION  
FROM MEDIOCRE MINDS

ALBERT EINSTEIN

A MIS PAPÁS CON TODO MI CARIÑO, AGRADECIMIENTO Y ADMIRACIÓN, PORQUE CON SU EJEMPLO ME ENSEÑARON A SER TENAZ.

A LEO, MI COMPAÑERO, MI AMIGO... MI VIDA ENTERA... SIN TU APOYO Y CARIÑO ESTO NO SE HUBIERA CONCLUIDO... TE ADORO!

MUY ESPECIALMENTE PARA TÍ , MI HIJITO, MI CHICHARITO... ERES LO MAS GRANDE QUE LA VIDA ME PUDO DAR... ERES MI ALEGRÍA Y LA RAZÓN DE TODA MI VIDA...

A MI PADRE ACADÉMICO, EL DOCTOR MACHADO...POR TODO LO QUE ME HAS ENSEÑADO, POR TODO LO QUE ME HAS AGUANTADO... POR HABERME PUESTO EN EL CAMINO DE LA INVESTIGACIÓN, EL MÁS EXCITANTE Y GENIAL... POR HABERME INCULCADO LAS GANAS DE APRENDER Y SEGUIR APRENDIENDO Y SOBRE TODO POR ENSEÑARME QUE LA HUMILDAD Y LA DISCIPLINA SON EL MEJOR CAMINO... GRACIAS POR TODO!

A TERE FORTOUL, POR SER LA MEJOR MAESTRA Y AMIGA QUE HE TENIDO EN MI VIDA, ERES UNA PERSONA EXCEPCIONAL! TU SABES BIEN QUE ESTO LLEGÓ A SU TÉRMINO GRACIAS A TÍ... NO TENGO PALABRAS PARA AGRADECÉRTELO...

A SELVA, GRACIAS POR TODO TU APOYO Y CONFIANZA.... LO LOGRAMOS!!!

A MI FRIEND OF MINE... LA MEJOR QUE EXISTE!!! GRACIAS POR TU APOYO.

A MIS HERMANOS: PANCHO, LUIS Y JOSÉ EDUARDO, PORQUE SIEMPRE ME HAN INSPIRADO A SER MEJOR, PORQUE JUNTO CON USTEDES APRENDÍ A LUCHAR EN LA VIDA...

A MIS AMIGAS LA GÜERA Y LA HEIDI... POR HABER PASADO CON USTEDES  
LOS MEJORES MOMENTOS!!

A LAURIS... EMPEZAMOS JUNTAS, LUCHAMOS JUNTAS ... Y DESPUÉS DE TODO  
LO QUE PASAMOS... VALIÓ LA PENA!

A MIS COMPAÑEROS Y AMIGOS DEL LABORATORIO: ENRIQUE, CHUCHO, PATY,  
CÉSAR Y VERO... GRACIAS POR TODO SU APOYO!!!

A MIS COMPAÑEROS Y AMIGOS DEL OTRO LABORATORIO: IRMA, IVONNE,  
PATY, SANDRA, IRENE, SILVIA Y RODRIGO, GRACIAS POR SU APOYO Y POR LOS  
BUENOS MOMENTOS QUE HEMOS PASADO.

A LICHITA, MI HEMANITA... ERES GENIAL! GRACIAS POR TODO!!!

PARA CAMELITA Y EL HIJÍN... GRACIAS POR SU EJEMPLO

Y FINALMENTE A MI PROFE JORGE QUIEN ME HA ENSEÑADO A SER MEJOR,  
A SACAR FUERZAS DE DONDE YA NO LAS HAY... POR AYUDARME A DESCUBRIR  
QUE PUEDO LOGRAR MUCHO MÁS DE LO QUE ME IMAGINÓ... GRACIAS.

## AGRADECIMIENTOS

A MIS TUTORAS SELVA RIVAS ARANCIBIA Y TERESA FORTOUL, POR EL APOYO BRINDADO PARA LA REALIZACIÓN DE ESTE TRABAJO Y POR LA PACIENCIA MOSTRADA PARA GUIARME EN LA CULMINACIÓN DE MI TESIS.

A LA MAESTRA CONCEPCIÓN RUGERIO-VARGAS, GRACIAS POR SU AYUDA CON LOS "GOLGIS" Y POR SU PACIENCIA

A GABINO BORGONIO POR TODO TU APOYO CON MIS EXPERIMENTOS

A FRANCISCO PASOS POR TUS GENIALES FOTOGRAFÍAS

A MI COMITÉ DE TESIS:

DRA. SELVA RIVAS ARANCIBIA  
DRA. TERESA FORTOUL VAN DER GOES  
DR. JESÚS MACHADO SALAS  
DRA. MARGARITA GONZÁLEZ DEL PLIEGO  
DRA. ERZSEBET MAROSI HOLCZBERGER  
DRA. MARÍA LUISA FANJUL PEÑA  
DR. ANDRÉS ELIU CASTELL RODRÍGUEZ

POR SU APOYO Y POR SUS EXCELENTES COMENTARIOS A MI TRABAJO

# INDICE

RESUMEN	
INTRODUCCIÓN	1
RADICALES LIBRES Y OZONO	2
OZONO Y SISTEMA NERVIOSO	9
ESTRÉS OXIDATIVO Y DAÑO NEURONAL	11
CORTEZA	19
- ELEMENTOS NEURONALES	20
- ASPECTOS FUNCIONALES	22
ESTRIADO	23
- ELEMENTOS NEURONALES	24
- ASPECTOS FUNCIONALES	24
HIPOCAMPO	27
- ELEMENTOS NEURONALES	28
- ASPECTOS FUNCIONALES	30
ESPINAS DENDRÍTICAS	31
MEMORIA Y APRENDIZAJE	36
ANTIOXIDANTES	41
JUSTIFICACIÓN	44
HIPÓTESIS	45
OBJETIVO GENERAL	45
- OBJETIVOS ESPECÍFICOS	45
DISEÑO EXPERIMENTAL	46
- CONDICIONAMIENTO	47
- MÉTODO DE GOLGI	48
- MICROSCOPIA ELECTRÓNICA	49
- PEROXIDACIÓN DE LÍPIDOS	50
- PRUEBAS ESTADÍSTICAS	51
RESULTADOS	51



- CITOLOGÍA	51
- ULTRAESTRUCTURA	53
- MEMORIA	54
- PEROXIDACIÓN DE LÍPIDOS	55
DISCUSIÓN	55
- ALTERACIONES MORFOLÓGICAS	55
- ALTERACIONES EN LA MEMORIA	60
- PEROXIDACIÓN DE LÍPIDOS	61
- EFECTO DE LA TAURINA	62
CONCLUSIÓN	64
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	66

## RESUMEN

Los procesos de deterioro cerebral se deben a múltiples factores tanto ambientales como aquellos inherentes al estado en que se encuentre el organismo. Dentro de los factores ambientales está la generación de radicales libres. Entre las fuentes más comunes se encuentra la contaminación por ozono. La exposición aguda a ozono determina cambios morfológicos y fisiológicos en varias especies. Estos cambios son el resultado de un desbalance en el equilibrio entre prooxidantes y antioxidantes, lo cual provoca un estado de estrés oxidativo. Se sabe que el estrés oxidativo afecta de diferente forma a diversas estructuras cerebrales. Por otra parte, existen sustancias antioxidantes que inhiben a los radicales libres y protegen a las células, entre ellas se encuentra la taurina. El objetivo del presente trabajo fue analizar los posibles cambios histológicos, ultraestructurales y bioquímicos de la corteza frontal, cuerpo estriado e hipocampo, así como también las alteraciones conductuales de ratas expuestas a ozono, y observar si dichas alteraciones se pueden prevenir con la aplicación de un antioxidante como la taurina. 1) **Grupo experimental:** a) Ratas expuestas a O<sub>3</sub> durante 4 horas (n= 6) y b) Ratas expuestas a O<sub>3</sub> durante 4 horas tratadas con taurina (43 mg/Kg i.p.) cinco minutos después de la exposición (n= 6). 2) **Grupo control:** a) Ratas expuestas a aire filtrado durante 4 horas (n= 6) y b) Ratas expuestas a aire filtrado durante 4 horas tratadas con taurina (43 mg/Kg i.p.) cinco minutos después de la exposición (n= 6).

**Exposición a ozono:** Se realizó en una cámara hermética de acrílico conectada a un generador de O<sub>3</sub> que permite la administración de una dosis constante durante un tiempo determinado, el que a su vez, está conectado a un monitor PCI, que permite medir la concentración de O<sub>3</sub> de la cámara durante todo el tiempo de exposición. Los animales se exponen a una dosis de O<sub>3</sub> de 1 ppm durante cuatro horas. Una hora después de la exposición al O<sub>3</sub>, los animales se sometieron a un condicionamiento de evitación pasiva. Veinticuatro horas después se midió la memoria de largo plazo.

En la primera fase del experimento, los animales se perfundieron y se tomaron fragmentos de la corteza prefrontal, estriado e hipocampo para el análisis histológico y ultraestructural, el cual consistió en el conteo de espinas dendríticas y en el análisis ultramicroscópico de las alteraciones. En una segunda fase experimental se repitieron los grupos con los tratamientos ya mencionados (n = 24) y se sacrificaron mediante decapitación a las 24 hrs, se extrajo la corteza frontal, el estriado y el hipocampo con el fin de medir la peroxidación de lípidos. Nuestros resultados muestran que ante la exposición a ozono se observan alteraciones en la memoria, una disminución significativa del número de espinas dendríticas, degeneración neuronal caracterizada por células oscuras con edema mitocondrial, y cisternas dilatadas del aparato de Golgi y del retículo endoplásmico; asimismo encontramos aumento en la peroxidación de lípidos en las tres estructuras comparadas con los grupos control. Las alteraciones antes mencionadas fueron prevenidas con la aplicación i.p. de taurina.

Nuestros datos revelan que este modelo de estrés oxidativo produce severas alteraciones en las tres estructuras analizadas, siendo el hipocampo el más afectado. Más aún, nuestros datos proveen evidencias de que el deterioro de la memoria es debido probablemente a la reducción de espinas dendríticas y al daño celular. Por último, confirmamos que el tratamiento con taurina reduce en forma importante las alteraciones arriba mencionadas.

## ABSTRACT

Brain deterioration is due to multiple factors, environment and the organism by itself. The generation of free radicals is an example of an environmental factor. Environmental pollution is a public health problem throughout the world. Ozone is the main photochemical component of polluted air and produces a state of oxidative stress -depending on the dose- which is due to an increased production of free radicals resulting in lipoperoxidation of cell membranes, protein oxidation, enzymatic inactivation, destruction of DNA and cell damage. Oxidative stress causes different alterations on different brain structures. Furthermore, there are different antioxidant substances that inactivate free radicals actions and protect the cells against damage. Taurine have been considered as a free radical scavenger. The aim of this study was to determine the morphological and biochemical changes on the prefrontal cortex, striatum and hippocampus of rats exposed to ozone and correlate those changes with conductual alterations, and to determine if the administration of taurine, can prevent the alterations. **Experimental group:** a) Ozone exposed rats (n=6); b) Ozone exposed rats for 4 hours and taurine treated (43 mg/Kg i.p.) five minutes after the exposure (n=6). **Control Group:** a) Flowing air exposed rats (n=6) and b) Flowing air exposed rats treated with taurine (43 mg/Kg i.p.) five minutes after the exposure (n=6).

Ozone Exposure: Was 1 p.p.m. during 4 hrs. in a closed chamber with a difusser connected to a variable flux ozone generator (5 lt/seg), was used. The control animals were exposed to flowing air for the same time. Twenty-four hours after ozone exposure, the passive avoidance memory test was measured. In the first phase of our experiments we perfused the rats and took brain fragments of prefrontal cortex, striatum and hippocampus for histological and ultrastructural analysis, which consisted in counting dendritic spines and analyzing electron microscope alterations. In the second stage we carry out the same experiments but the animals were sacrificed by decapitation for the lipid peroxidation analysis.

Our results showed memory alterations and a significant reduction of dendritic spines in the three analyzed structures, also, we found a dramatic ultrastructural damage which consisted in dark cells with mitochondrial, Golgi apparatus and endoplasmic reticulum edema (necrosis). On the other hand, we found a great increase in lipid peroxidation after ozone exposure in comparison with the control group. These alterations were significantly reduced with the taurine treatment.

Our data reveal that this oxidative stress model causes severe damage on the three analyzed structures, being the hippocampus the most affected structure. Moreover, our data provided evidence that the memory deterioration is probably due to the reduction in spine density and cell damage in the neurons of prefrontal cortex, striatum and hippocampus. On the other hand, we confirm that taurine treatment reduces in a very important manner the alterations mentioned above.

## INTRODUCCION

La investigación en el área de la biología se caracteriza por seguir fundamentalmente la metodología científica positivista, lo que supone el descubrir la realidad y las leyes que regulan ésta a través del uso de la observación y la experimentación. Una vez aprehendido el conocimiento científico, debe desarrollarse la explicación. Para ello, el científico utiliza modelos teóricos, que permiten describir tanto la realidad como las operaciones necesarias para descubrirla, es decir, la metodología. El uso de modelos en este marco positivista lleva al científico a tratar de explicar sus conocimientos desde la perspectiva de los modelos ideales utilizando a la física y a las matemáticas como las herramientas para este fin. Es en ese contexto en el que se desarrollan las investigaciones sobre estrés.

El término **estrés** fué introducido a partir de la concepción física de *tensión (strain)*, con lo que los investigadores trataban de dar explicación mecanicista a una relación lineal causa - efecto entre diferentes estímulos y respuestas. De esta forma el término estrés se utiliza para dar explicación a distintos procesos reactivos de los seres vivos que ante la presencia del estímulo adecuado posibilita la aparición de respuestas específicas en diferentes dimensiones y por ende su estudio en diferentes niveles (Reynoso-Erazo, 1990). Como ejemplos de lo anterior podemos citar los siguientes:

a) el uso del término **estrés fisiológico** como expresión de reacciones específicas del organismo ante estímulos físicos intensos , químicos o biológicos específicos, capaces de generar estas respuestas.

b) el uso del término **estrés psicológico** como explicación de las conductas, pensamientos y emociones de un sujeto que se presentan ante su incapacidad para afrontar las demandas inmediatas, entendidas como metas o retos internos o externos.

c) el uso del término **estrés post-traumático** como la identificación de una serie de condiciones fisiológicas y psicológicas generadas por cambios del ambiente social y que afecta directamente la integridad del individuo.

d) el uso del término **estrés oxidativo** para ofrecer una explicación acerca de los cambios

morfológicos y funcionales en el nivel celular y subcelular producidos por cambios oxidativos.

Los cambios químicos en el ambiente se han utilizado como estímulos en el estudio del estrés oxidativo. Por ejemplo, el oxígeno molecular ( $O_2$ ) presenta una paradoja para los organismos aeróbicos: es esencial y potencialmente tóxico. Aunque no es reactivo en su estado básico, el  $O_2$  es reducido a agua bajo condiciones metabólicas normales durante las cuales se producen intermediarios sumamente reactivos. Estas especies reactivas de oxígeno (ROS) incluyen al radical superóxido ( $O_2^{\cdot -}$ ), al peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y al oxidante más potente, el radical hidroxilo ( $OH^\circ$ ). Dichos intermediarios son también generados en las células vivas que han sido expuestas a agresiones ambientales tales como la radiación, la contaminación ambiental (ozono y óxido de nitrógeno), los herbicidas y cualquier otro compuesto activo o estresor ambiental (Scandilios, 1992). El incremento en los niveles de las ROS produce una situación conocida como estrés oxidativo, la cual ocasiona gran variedad de lesiones bioquímicas y fisiológicas resultando en la muerte celular.

Los modelos de estrés oxidativo permiten el estudio de una serie de cambios que se inician desde la formación de radicales libres, hasta las alteraciones específicas provocadas por la inhabilidad del organismo para inactivar dichos radicales, así como la demostración experimental de los efectos protectores de los antioxidantes.

## **RADICALES LIBRES Y OZONO**

Un radical libre es una molécula (orgánica o inorgánica) altamente reactiva que contiene un electrón no apareado que está involucrado en mecanismos químicos de toxicidad (Freeman y Crapo, 1982; McCord, 1985). Los radicales libres, al poseer un número de electrones no apareados en su órbita externa, reaccionan fácilmente con las uniones insaturadas de los ácidos grasos de la membrana, desencadenando una serie de reacciones que causan peroxidación y a la vez mayor producción de radicales libres que afectan a las células y tejidos vecinos (Freeman y Crapo, 1982).

morfológicos y funcionales en el nivel celular y subcelular producidos por cambios oxidativos.

Los cambios químicos en el ambiente se han utilizado como estímulos en el estudio del estrés oxidativo. Por ejemplo, el oxígeno molecular ( $O_2$ ) presenta una paradoja para los organismos aeróbicos: es esencial y potencialmente tóxico. Aunque no es reactivo en su estado básico, el  $O_2$  es reducido a agua bajo condiciones metabólicas normales durante las cuales se producen intermediarios sumamente reactivos. Estas especies reactivas de oxígeno (ROS) incluyen al radical superóxido ( $O_2^{\cdot -}$ ), al peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y al oxidante más potente, el radical hidroxilo ( $OH^{\cdot}$ ). Dichos intermediarios son también generados en las células vivas que han sido expuestas a agresiones ambientales tales como la radiación, la contaminación ambiental (ozono y óxido de nitrógeno), los herbicidas y cualquier otro compuesto activo o estresor ambiental (Scandilios, 1992). El incremento en los niveles de las ROS produce una situación conocida como estrés oxidativo, la cual ocasiona gran variedad de lesiones bioquímicas y fisiológicas resultando en la muerte celular.

Los modelos de estrés oxidativo permiten el estudio de una serie de cambios que se inician desde la formación de radicales libres, hasta las alteraciones específicas provocadas por la inhabilidad del organismo para inactivar dichos radicales, así como la demostración experimental de los efectos protectores de los antioxidantes.

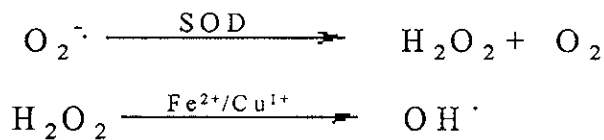
## **RADICALES LIBRES Y OZONO**

Un radical libre es una molécula (orgánica o inorgánica) altamente reactiva que contiene un electrón no apareado que está involucrado en mecanismos químicos de toxicidad (Freeman y Crapo, 1982; McCord, 1985). Los radicales libres, al poseer un número de electrones no apareados en su órbita externa, reaccionan fácilmente con las uniones insaturadas de los ácidos grasos de la membrana, desencadenando una serie de reacciones que causan peroxidación y a la vez mayor producción de radicales libres que afectan a las células y tejidos vecinos (Freeman y Crapo, 1982).

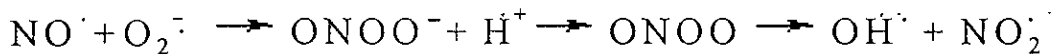
Ahora bien, como ya se mencionó los radicales libres son productos normales del metabolismo aeróbico de la célula, las especies  $O_2^{\cdot-}$  y el  $OH^{\cdot}$  son los radicales libres predominantes. El  $H_2O_2$  y el peroxinitrito ( $ONOO^{\cdot}$ ), aunque en sí no son radicales libres, contribuyen de forma importante al estado redox de la célula.

El  $O_2^{\cdot-}$  se forma por la salida de electrones ( $e^-$ ) a través del transporte mitocondrial y mediante la unión de enzimas citosólicas y membranales incluyendo la xantina oxidasa, el complejo citocromo p450 y la fosfolipasa  $A_2$ .

El  $H_2O_2$  también se produce a través de la cadena de transporte mitocondrial de electrones ( $e^-$ ), así como por la autooxidación de pequeñas moléculas y por la dismutación del  $O_2^{\cdot-}$  mediante la superóxido dismutasa (SOD). El  $H_2O_2$ , aunque por sí mismo no es reactivo, en presencia de metales como el hierro o el cobre forma radicales hidroxilo que son altamente reactivos (Freeman y Crapo, 1982; McCord, 1985; Simonian y Coyle, 1996; Thomas et al. 1997):



El  $ONOO^{\cdot}$  se forma por la reacción del óxido nítrico ( $NO^{\cdot}$ ) con  $O_2^{\cdot-}$ , la cual es una molécula altamente reactiva que forma  $OH^{\cdot}$  (Simonian y Coyle, 1996):



En suma, los radicales libres provienen de tres fuentes diferentes: el organismo, el ambiente y las reacciones en cadena.

- El organismo: Este forma radicales libres en todo momento, ya que las células vivas necesitan energía para sus funciones básicas; dicha energía proviene de reacciones de óxido-reducción. Durante este proceso, se forman intermediarios

del oxígeno, incluyendo los radicales superóxido e hidroxilo (Scandilios, 1992). El ejercicio, las enfermedades y algunos medicamentos incrementan reacciones asociadas con el oxígeno, y consecuentemente aumenta la formación de radicales libres. Más aún, el sistema inmune produce radicales libres para destruir virus y bacterias. Los radicales libres son también importantes en la producción de hormonas y/o de mensajeros químicos en el organismo, por lo cual es importante aclarar que la producción de radicales libres no es del todo negativa. Sin embargo, el exceso y el descontrolado aumento de éstos produce un estado de estrés oxidativo que daña el organismo (Freeman y Crapo, 1982; Halliwell y Gutteridge, 1984; Janssen et al. 1993; Aikawa et al. 1997).

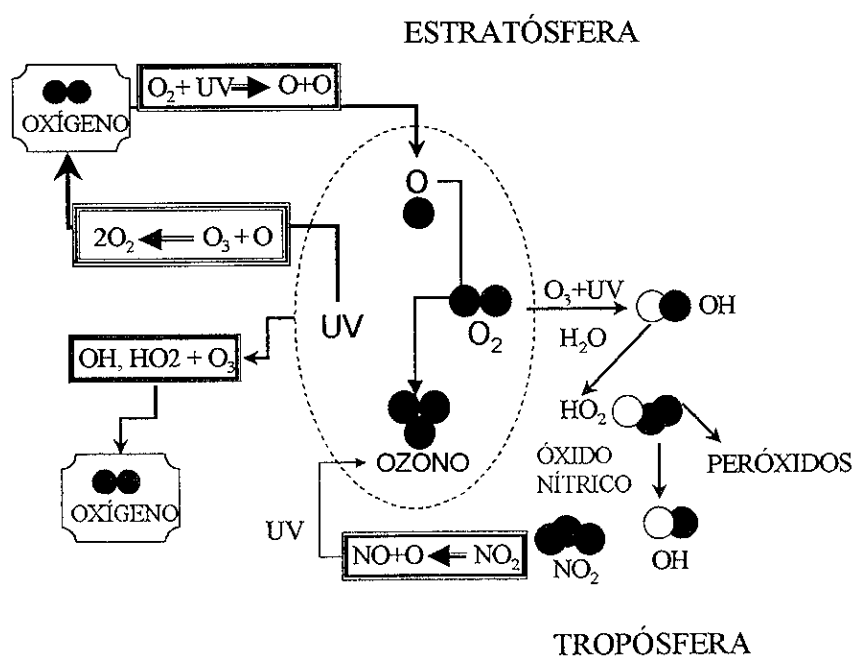
- ▶ El ambiente: La contaminación del aire, el humo del tabaco, la radiación solar excesiva, los desperdicios tóxicos, herbicidas y pesticidas forman radicales libres. Por ejemplo, el ozono ( $O_3$ ) es un contaminante ambiental extremadamente reactivo que cuando es inhalado forma radicales libres en el tejido pulmonar. Más aún, como la sangre es bombeada constantemente a los pulmones para saturarse de oxígeno, los radicales libres producidos por el  $O_3$ , pueden dañar a los glóbulos rojos, disminuyendo el suministro de oxígeno al organismo (Castleman et al. 1980; Pryor y Church, 1991; Cross et al. 1992; Kennedy et al. 1992; Luah, 1992; Pryor, 1992; Harkema et al. 1997; Paz, 1997; Rivas-Arancibia et al. 1998).
- ▶ Reacciones en cadena: Una característica de los radicales libres es que producen reacciones en cadena, que a su vez producen otros radicales que reaccionan con otras moléculas. Si este proceso no es controlado, se produce daño celular. Este efecto dominó es lo que hace que los radicales libres sean tan dañinos en algunos casos. Aunque un radical libre obtenga el electrón que le hace falta de otra molécula, no puede regresar a su estado y función originales (Wolff et al. 1986).

Ahora bien, ya que el  $O_3$  produce gran cantidad de radicales libres, ha sido



utilizado como modelo en el estudio del estrés oxidativo debido fundamentalmente a que en el ambiente se encuentra en grandes cantidades (McCord, 1985; Halliwell y Gutteridge, 1984; Ciriolo et al. 1991; Cross et al. 1992).

El ozono ( $O_3$ ) se genera a través de la disociación del bióxido de nitrógeno mediante la fotólisis de la luz solar para producir óxido nítrico y un átomo de oxígeno, el cual se combina con el oxígeno molecular ( $O_2$ ) del aire y forma  $O_3$  (Menzel y Meacher, 1999). En la estratósfera, la función del  $O_3$ , forma una capa que protege de los rayos solares ultravioletas, pero en la tropósfera es uno de los gases contaminantes más importantes en las zonas urbanas, ya que es el precursor de los radicales  $OH^\cdot$ . Por otro lado, el grado de toxicidad del  $O_3$  depende de la concentración y duración de la exposición a éste (Devlin et al. 1997) (ver figura 1).



**FIGURA 1.** Procesos de la formación y destrucción del ozono atmosférico. En la estratósfera el ozono se forma cuando la radiación ultravioleta (UV) disocia el oxígeno molecular en atómico, el cual se combina con moléculas de oxígeno en el aire. Al mismo tiempo se observa otro ciclo, en donde la UV disocia el ozono en oxígeno atómico y molecular, los cuales se recombina para formar ozono nuevamente; en dichas reacciones se forman radicales libres. En la tropósfera, los compuestos orgánicos y el óxido de nitrógeno reaccionan en presencia de la luz solar para formar ozono.

El  $O_3$  reacciona preferentemente con los grupos sulfhidrilo de las proteínas membranales y con los enlaces dobles de carbón de los ácidos grasos poliinsaturados, que forman parte de las membranas de las células epiteliales del pulmón (Castleman et al. 1980; Kennedy et al. 1992; Harkema et al. 1997; Putman et al. 1997), dando como resultado la formación de aldehídos e hidroxihidroperóxido, este último al reaccionar con el agua en el citoplasma forma otra molécula de aldehído y  $H_2O_2$  induciendo la peroxidación de los lípidos y perpetuando el daño celular (ver figura 2) (Wolff et al. 1986; Luah, 1992; Segura-Aguilar, 1993; Paz, 1997).

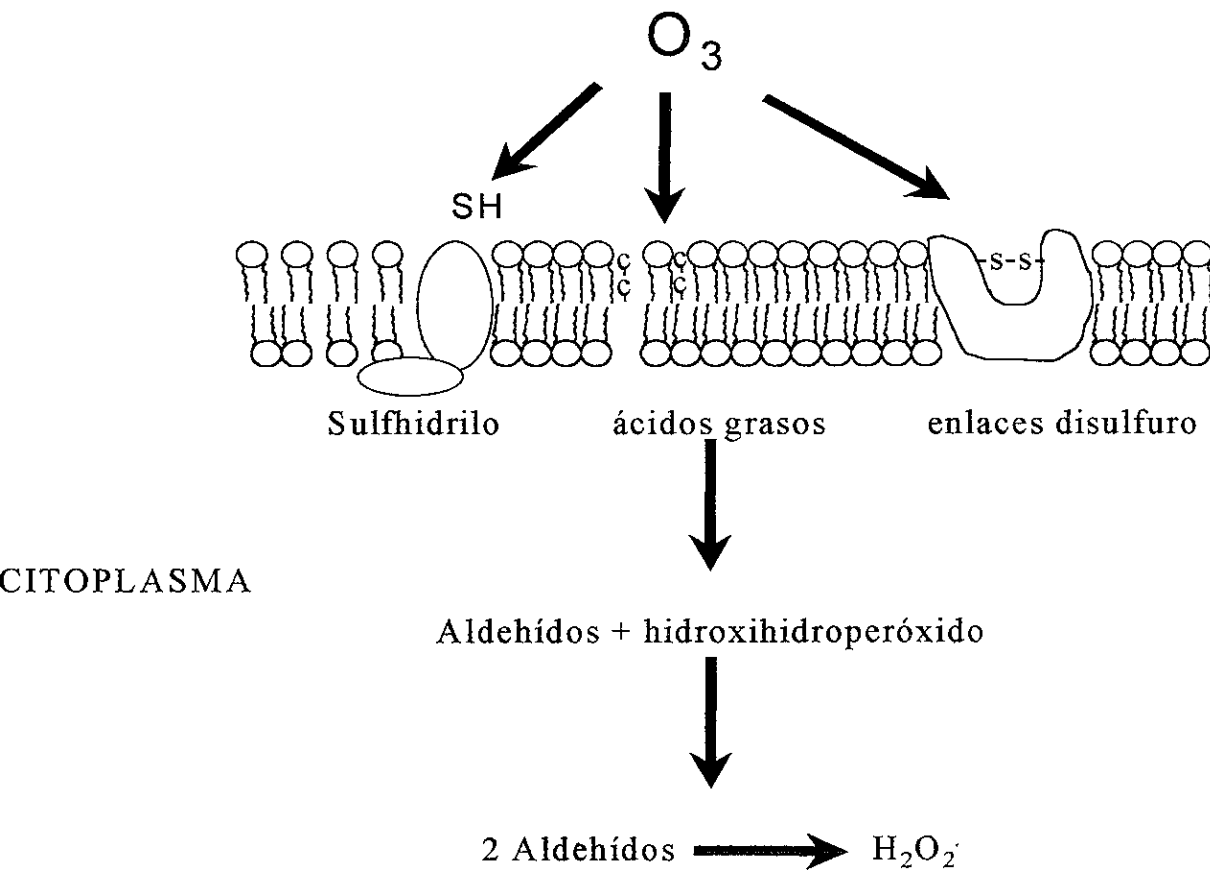
El proceso bioquímico de la peroxidación lipídica consta de tres etapas diferentes:

1. La fase inicial tiene lugar cuando un radical libre derivado del oxígeno reacciona con un ácido graso poliinsaturado extrayendo un protón y formando un radical ácido graso.
2. La siguiente etapa o fase de propagación es la interacción de radicales ácidos grasos peroxídicos, los que a su vez reaccionan con más lípidos, proteínas o radicales libres, perpetuando la transferencia de protones y la consecuente oxidación de sustratos.
3. La resultante de esta cadena son dienos y otros productos de elevado peso molecular con propiedades fluorescentes debido a la acción de la glutathion peroxidasa y el reordenamiento de ligaduras en la molécula. (Newsholme y Lee, 1987).

Los radicales libres pueden difundir desde el sitio de su formación hasta otros lugares incrementando la peroxidación de ácidos grasos en sitios distantes al origen de la reacción inicial con el  $O_3$  (Halliwell y Gutteridge, 1984; Pryor, 1992). En las reacciones del  $O_3$  con los ácidos grasos también se forman epóxidos y dialdehídos, los cuales podrían ser los responsables de la extensión del daño celular a estructuras distantes.

El  $H_2O_2$  es un agente oxidante que contribuye de manera importante en la generación de radicales libres debido a su gran afinidad con las moléculas de hierro formando radicales  $OH^\bullet$  que pueden iniciar el proceso de la peroxidación de lípidos

(Pryor y Church, 1991; Leikauf et al. 1995; Wyllie y Liehr, 1997; Menzel y Meacher, 1999). Además de provocar peroxidación lipídica de los ácidos grasos poliinsaturados, el  $O_3$  también es capaz de cambiar la configuración de las enzimas, modificando la permeabilidad de las membranas citoplasmáticas y la respuesta celular (Halliwell y Gutteridge, 1984; Cross et al. 1992; Victorin, 1992; Laszczyca et al. 1996; Paz, 1997).



**Figura 2.** Sitios de reacción del  $O_3$  con macromoléculas celulares. Los tres sitios principales son: los grupos sulfhidrilo libres en las membranas de las proteínas, los enlaces dobles de carbón de los ácidos grasos poliinsaturados y en los enlaces dobles disulfuro (ver texto). Modificado de Leikauf y colaboradores (1995).

Los primeros estudios realizados sobre  $O_3$  y daño orgánico se llevaron a cabo principalmente en el sistema respiratorio. Los radicales libres producidos por la

exposición a  $O_3$  pueden dañar las células pulmonares, tales como los macrófagos y las células epiteliales (Tepper et al. 1989; Koren et al. 1989; Salmon et al. 1998), iniciando una cascada de reacciones que producen daño pulmonar, inflamación y cambios en los sistemas de defensa (Zwick et al. 1991). El  $O_3$  o sus productos pueden también interactuar con las fibras nerviosas en las vías aéreas produciendo cambios en la función pulmonar (Devlin et al. 1997; Paz, 1997).

Ya que el  $O_3$  es una molécula tan reactiva, se cree que no participa directamente en las reacciones químicas fuera del tracto respiratorio, pero es posible que otras moléculas con vida media más prolongada, como las citocinas, o los radicales relativamente estables, producidos por las células pulmonares después de la exposición a  $O_3$ , puedan entrar a la circulación y extender sus efectos a otras partes del organismo (Menzel, 1994; Menzel y Meacher, 1999).

El síntoma más evidente después de la exposición a  $O_3$  es la sensación de malestar en el pecho, dificultad para inspiraciones profundas y tos. Mediante el lavado bronquioal, se ha tenido la oportunidad de tomar muestras de epitelio alveolar de gente expuesta a  $O_3$  y determinar el grado del daño pulmonar y de inflamación (Graham y Koren, 1990). Se observa influjo de neutrófilos hacia el pulmón, así como también incremento en los niveles de citocinas, como la interleucina 8, que es quimiotáctica para los neutrófilos (Menzel y Meacher, 1999). Se ha observado también incremento en los niveles de proteínas, lo que indica salida de ciertos componentes del plasma hacia las vías aéreas y sugiere edema potencial (Koren et al. 1989; Graham y Koren, 1990). Más aún, en los lavados bronquioalveolares de personas expuestas a  $O_3$ , se han medido otros factores con acción proinflamatoria, dichos factores incluyen a la interleucina 6, fibronectina, y las inmunoglobulinas G y E (Graham y Koren, 1990).

Además, mediante pruebas funcionales se encontró una disminución significativa en la capacidad vital y en el volumen espiratorio máximo del primer segundo en sujetos sanos, no fumadores, los cuales fueron medidos durante el ejercicio realizado en un ambiente de 0.02 a 0.12 ppm de  $O_3$  (Spektor et al. 1988). Estudios histológicos en individuos originarios de ciudades no contaminadas que fueron expuestos durante 60

días a los niveles de  $O_3$  medidos en la ciudad de México, mostraron signos francos de displasia en la mucosa nasal (Calderón y Roy, 1993).

Si bien la mayoría de los efectos del  $O_3$  sobre la salud han sido estudiados en el aparato respiratorio del hombre y en animales de experimentación, también se ha sugerido que su efecto no está necesariamente limitado a este sistema, ya que algunos efectos extrapulmonares han sido referidos como consecuencia de la exposición a este gas en tejidos aislados estudiados *in vitro*. Se ha propuesto que el daño provocado por la peroxidación de los epitelios del aparato respiratorio se disemina hacia el torrente circulatorio, lo cual puede ocasionar la dispersión de radicales libres a otros sistemas (Paz, 1995).

## OZONO Y SISTEMA NERVIOSO

El sistema nervioso central es altamente susceptible a la presencia de radicales libres provocada, secundariamente, por la exposición a  $O_3$  (Simonian y Coyle, 1996; Dykens, 1997; Paz, 1997; Sohal, 1997; Urano et al. 1998, entre otros). Dicha susceptibilidad es atribuida a: 1) el sistema nervioso posee un alto contenido de ácidos grasos insaturados; 2) las células nerviosas tienen un alto consumo de oxígeno; 3) existen bajos niveles de sustancias amortiguadoras tales como la glutatión peroxidasa, principalmente en el estriado, y de catalasa en todo el cerebro, y 4) la producción endógena de radicales libres que se generan durante el metabolismo celular, por ejemplo durante el catabolismo de la dopamina (Evans, 1993; Cottet-Emard et al. 1997; González-Piña y Paz, 1997; Luo et al. 1998).

Se ha reportado un incremento en el metabolismo proteico del encéfalo en ratas expuestas *in vivo* a 1.00 ppm de  $O_3$  (Benuck et al. 1993) y disminución en los niveles de las enzimas monoaminoxidasa y catecol-o-metil transferasa en la corteza parietal del perro relacionada con el tiempo de exposición a 1.00 ppm de  $O_3$  (Trams et al. 1972). Entre las manifestaciones neurológicas reportadas por los sujetos expuestos al  $O_3$  se refieren los síntomas de fatiga, letargo y cefalea (Luah, 1992). Experimentalmente se

días a los niveles de O<sub>3</sub> medidos en la ciudad de México, mostraron signos francos de displasia en la mucosa nasal (Calderón y Roy, 1993).

Si bien la mayoría de los efectos del O<sub>3</sub> sobre la salud han sido estudiados en el aparato respiratorio del hombre y en animales de experimentación, también se ha sugerido que su efecto no está necesariamente limitado a este sistema, ya que algunos efectos extrapulmonares han sido referidos como consecuencia de la exposición a este gas en tejidos aislados estudiados *in vitro*. Se ha propuesto que el daño provocado por la peroxidación de los epitelios del aparato respiratorio se disemina hacia el torrente circulatorio, lo cual puede ocasionar la dispersión de radicales libres a otros sistemas (Paz, 1995).

## OZONO Y SISTEMA NERVIOSO

El sistema nervioso central es altamente susceptible a la presencia de radicales libres provocada, secundariamente, por la exposición a O<sub>3</sub> (Simonian y Coyle, 1996; Dykens, 1997; Paz, 1997; Sohal, 1997; Urano et al. 1998, entre otros). Dicha susceptibilidad es atribuida a: 1) el sistema nervioso posee un alto contenido de ácidos grasos insaturados; 2) las células nerviosas tienen un alto consumo de oxígeno; 3) existen bajos niveles de sustancias amortiguadoras tales como la glutatión peroxidasa, principalmente en el estriado, y de catalasa en todo el cerebro, y 4) la producción endógena de radicales libres que se generan durante el metabolismo celular, por ejemplo durante el catabolismo de la dopamina (Evans, 1993; Cottet-Emárd et al. 1997; González-Piña y Paz, 1997; Luo et al. 1998).

Se ha reportado un incremento en el metabolismo proteico del encéfalo en ratas expuestas *in vivo* a 1.00 ppm de O<sub>3</sub> (Benuck et al. 1993) y disminución en los niveles de las enzimas monoaminoxidasa y catecol-o-metil transferasa en la corteza parietal del perro relacionada con el tiempo de exposición a 1.00 ppm de O<sub>3</sub> (Trams et al. 1972). Entre las manifestaciones neurológicas reportadas por los sujetos expuestos al O<sub>3</sub> se refieren los síntomas de fatiga, letargo y cefalea (Luah, 1992). Experimentalmente se

ha reportado: 1) disminución de la actividad motora en ratas expuestas entre 1.20 y 1.50 ppm de O<sub>3</sub> durante 6 horas (Tepper et al. 1985); 2) disminución en la frecuencia para ingerir agua y alimentos (Umezú et al. 1993); 3) retardo para responder durante las pruebas de condicionamiento operante (Weiss et al. 1981), y 4) alteraciones en la memoria después de 4 horas de exposición a 0.1, 0.2, 0.5 y 1 ppm de O<sub>3</sub> (Rivas-Arancibia et al. 1998).

En un estudio electroencefalográfico realizado en gatos expuestos a 0.40, 0.80 y 1.20 ppm de O<sub>3</sub> durante 24 horas, se encontró una disminución significativa en el tiempo total y el número de períodos del sueño paradójico, así como también aumento en la duración total del sueño de ondas lentas. Este estudio también reveló que el sueño paradójico se ve afectado desde las primeras ocho horas de exposición a 0.40 ppm de O<sub>3</sub> y que el sueño de ondas lentas se ve afectado después de ocho horas de exposición (Paz y Bazan Perkins, 1992). En un estudio similar realizado en ratas, se encontró que los animales expuestos tres horas a 1.00 ppm de O<sub>3</sub> mostraban taquipnea, bradicardia y una disminución significativa en la potencia de las bandas de 8-24 Hz del espectro del electroencefalograma con un efecto de rebote tres horas después de la exposición; mientras que la vigilia y el sueño de ondas lentas se incrementaron significativamente y el sueño paradójico disminuyó con respecto a los valores control (Arito et al. 1990; Haro y Paz, 1993). Alteraciones del sueño similares a las referidas anteriormente, han sido relacionadas con un incremento significativo de serotonina a nivel pontino, así como con un incremento de este neurotransmisor y de su metabolito el ácido 5-hidroxiindolacético, tanto en el puente como en el mesencéfalo; mientras que ambas sustancias se encontraron disminuidas en el hipotálamo (Huitrón-Resendiz et al. 1994)

Además, existen evidencias de daño neuronal secundario provocado por los radicales libres derivados de los ácidos grasos y del oxígeno (Sinet et al. 1980; Hsiang et al. 1997), produciendo alteraciones en las membranas y alteraciones en la degradación de fosfolípidos en la corteza cerebral, lo cual da como resultado edema y cambios en la permeabilidad vascular (Chan y Fiskman, 1980; McCord, 1985).

Ahora bien, las células tienen sistemas que contrarrestan a las ROS, estos

incluyen antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos que disminuyen las concentraciones de los radicales libres y reparan el daño celular. Por ejemplo, la SOD convierte el  $O_2^{\cdot -}$  en  $H_2O_2$ , la mayor parte de  $H_2O_2$  en el cerebro es removido por la glutatión peroxidasa, ésta junto con la NADPH reducen la peroxidación de lípidos, los radicales libres y el  $H_2O_2$ . Otro ejemplo más de antioxidantes enzimáticos es la catalasa, que aunque se encuentra en muy bajos niveles en el cerebro, remueve el  $H_2O_2$  (Simonian y Coyle, 1996).

Por otra parte, la vitamina E, la cual es un antioxidante no enzimático, es liposoluble; evita la ruptura de las cadenas de lípidos, inhibiendo la peroxidación y el consecuente daño celular (Stahelin, 1991; Socci et al. 1995; Kuo et al. 1997).

## **ESTRES OXIDATIVO Y DAÑO NEURONAL**

El estrés oxidativo se refiere a los eventos bioquímicos y moleculares producto del desbalance entre la producción de radicales libres y la habilidad de la célula para defenderse de ellos. El origen de lo anterior puede ser una gran variedad de condiciones, entre las que se incluyen alteraciones nutricionales, exposición a agentes físicos y químicos ambientales como el  $O_3$ , actividad física extenuante y lesiones o trastornos hereditarios (Olanow, 1993b; Schulz et al. 1996). Este desbalance resulta en la producción de ROS, lo que provoca peroxidación de lípidos, pérdida progresiva de la fluidez de la membrana, reducción del potencial de membrana y aumento de la permeabilidad a iones como el calcio  $Ca^{2+}$  (Oyama et al. 1996; Clarke, 1999; Leist y Nicotera, 1999), produciendo excitotoxicidad (Ingvar et al. 1988; Kucukkaya et al. 1996; Dykens, 1999). Además, las proteínas y el DNA se oxidan, provocando susceptibilidad a la proteólisis y mutaciones genéticas (Olanow, 1993 a y b; Schulz et al. 1996). Lo anterior da como resultado disfunción celular, y muerte en el caso de las neuronas (Oyama et al. 1996; Leist y Nicotera, 1999).

El sistema nervioso es altamente susceptible al daño producido por estrés oxidativo. Existen datos de modelos experimentales y de estudios en cerebros humanos



incluyen antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos que disminuyen las concentraciones de los radicales libres y reparan el daño celular. Por ejemplo, la SOD convierte el  $O_2^{\cdot -}$  en  $H_2O_2$ , la mayor parte de  $H_2O_2$  en el cerebro es removido por la glutatión peroxidasa, ésta junto con la NADPH reducen la peroxidación de lípidos, los radicales libres y el  $H_2O_2$ . Otro ejemplo más de antioxidantes enzimáticos es la catalasa, que aunque se encuentra en muy bajos niveles en el cerebro, remueve el  $H_2O_2$  (Simonian y Coyle, 1996).

Por otra parte, la vitamina E, la cual es un antioxidante no enzimático, es liposoluble; evita la ruptura de las cadenas de lípidos, inhibiendo la peroxidación y el consecuente daño celular (Stahelin, 1991; Socci et al. 1995; Kuo et al. 1997).

## **ESTRES OXIDATIVO Y DAÑO NEURONAL**

El estrés oxidativo se refiere a los eventos bioquímicos y moleculares producto del desbalance entre la producción de radicales libres y la habilidad de la célula para defenderse de ellos. El origen de lo anterior puede ser una gran variedad de condiciones, entre las que se incluyen alteraciones nutricionales, exposición a agentes físicos y químicos ambientales como el  $O_3$ , actividad física extenuante y lesiones o trastornos hereditarios (Olanow, 1993b; Schulz et al. 1996). Este desbalance resulta en la producción de ROS, lo que provoca peroxidación de lípidos, pérdida progresiva de la fluidez de la membrana, reducción del potencial de membrana y aumento de la permeabilidad a iones como el calcio  $Ca^{2+}$  (Oyama et al. 1996; Clarke, 1999; Leist y Nicotera, 1999), produciendo excitotoxicidad (Ingvar et al. 1988; Kucukkaya et al. 1996; Dykens, 1999). Además, las proteínas y el DNA se oxidan, provocando susceptibilidad a la proteólisis y mutaciones genéticas (Olanow, 1993 a y b; Schulz et al. 1996). Lo anterior da como resultado disfunción celular, y muerte en el caso de las neuronas (Oyama et al. 1996; Leist y Nicotera, 1999).

El sistema nervioso es altamente susceptible al daño producido por estrés oxidativo. Existen datos de modelos experimentales y de estudios en cerebros humanos

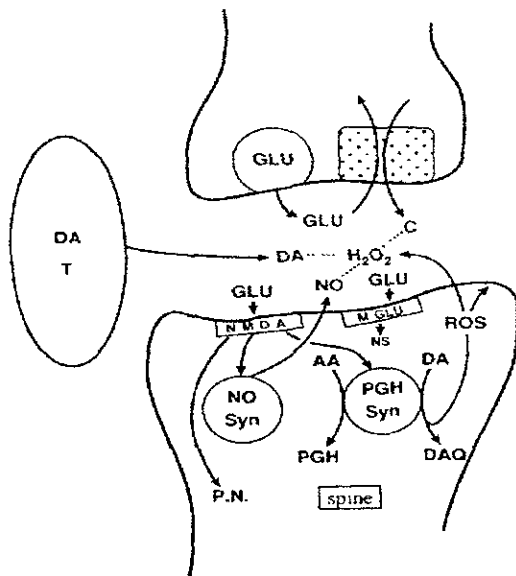
que sugieren que el estrés oxidativo juega un importante papel en las enfermedades neurodegenerativas, como por ejemplo en la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson y la esclerosis lateral amiotrófica (Janssen et al. 1993; Roche y Romero-Alvira, 1993; Sendtner y Thoenen, 1994; Borlongan et al. 1996; Castellani et al. 1996; Gerlach et al. 1996; Jenner y Olanow, 1996; Simonian y Coyle, 1996; Yoritaka et al. 1996; Markesbery, 1997; Sohal, 1997; Urano et al. 1998; Wei, 1998; Dykens, 1999, Vincenza et al. 2001, entre otros).

Una de las vías involucradas con la muerte neuronal es la excitotoxicidad, la cual se refiere a la excesiva activación de los receptores a glutamato y a la consecuente muerte celular (Ingvar et al. 1988). El glutamato es el neurotransmisor excitatorio más importante en el cerebro. La excitotoxicidad es relevante en la degeneración neuronal producida por alteraciones como la hipoxia, la isquemia o el trauma (Choi, 1988; Coyle y Puttfarcken, 1993; Kucukkaya et al. 1996; Irving et al. 1997; Numagami et al. 1997). Existen evidencias de que la excitotoxicidad juega un papel importante en las enfermedades neurodegenerativas (Kucukkaya et al. 1996; Simonian y Coyle, 1996), y se ha considerado que el estrés oxidativo es el inductor de la muerte celular por excitotoxicidad (Beal, 1992; Coyle y Puttfarcken, 1993; Kucukkaya et al. 1996).

Las sinapsis se están formando y removiendo continuamente en un proceso llamado plasticidad sináptica (Cramer y Sur, 1995; Segal, 1995a; Quartz y Sejenowski, 1997). Las sinapsis glutamatérgicas son establecidas principalmente en las espinas dendríticas. Las espinas están cambiando continuamente en forma y en número, y se considera que existen mecanismos bioquímicos que median dicha actividad. Algunos de estos mecanismos incluyen la interacción de neuromoduladores o neurotransmisores que actúan sobre sus receptores específicos. Los receptores a su vez activan cascadas postsinápticas que involucran nucleótidos cíclicos y la fosforilación de las proteínas del citoesqueleto produciendo el crecimiento de los elementos sinápticos (Smythies, 2000).

El glutamato es una neurotoxina potente y como ya se mencionó, su toxicidad está mediada por radicales libres (Coyle y Puttfarcken, 1993; Lafon-Cazal et al. 1993; Dubinsky et al. 1995; Rothman y Olney, 1995; Patel et al. 1996). La sinapsis

glutamatérgica (figura 3) posee varias características que indican que el estrés oxidativo mediado por los radicales libres y las defensas antioxidantes, juega un papel importante en la muerte celular:



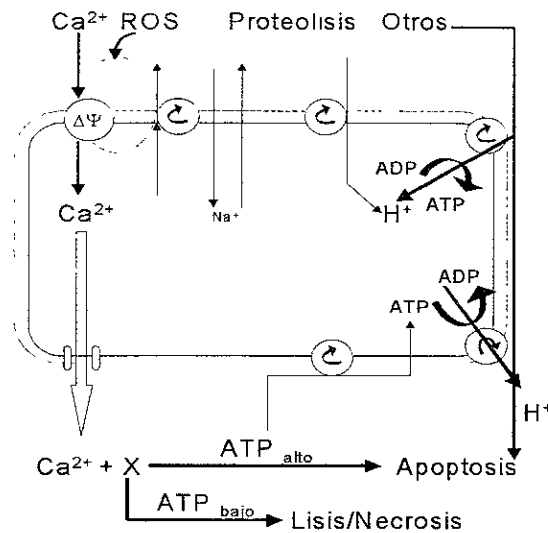
**FIGURA 3.** Diagrama Simplificado de la sinapsis glutamatérgica. AA, ácido araquidónico; C, ascorbato; DA T, terminal dopaminérgica; DAQ, quinonas dopaminérgicas; glu, glutamato; M glu, receptores metabotrópicos; NO, óxido nítrico; NS, citoesqueleto; P.N., proteasas y nucleasas; PGH, prostaglandina H; PGH syn, prostaglandina H sintasa (ciclooxigenasa); ROS, especies reactivas de oxígeno. En los sitios que no contienen dopamina, el cofactor de PGH sintasa será otra molécula. (Tomado de Adams et al. 2000).

1. Cuando el glutamato es liberado desde la terminal axónica durante la sinapsis, su actividad se mantiene hasta que es recapturado por los transportadores glutamatérgicos. La energía del proceso anterior proviene de la ATPasa dependiente de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ . La recaptura de glutamato está acompañada de la liberación simultánea de ascorbato, el cual compite con el glutamato por los sitios de unión intracitoplásmicos (Grünewald, 1993).
2. El receptor glutamatérgico *N*-methyl-*D*-aspartato (NMDA), es un sitio sensible al redox que contiene grupos sulfhidriilo, la oxidación de estos últimos produce

cambios en el receptor (Volterra et al. 1994). La activación de los receptores NMDA produce la liberación de radicales libres neurotóxicos.

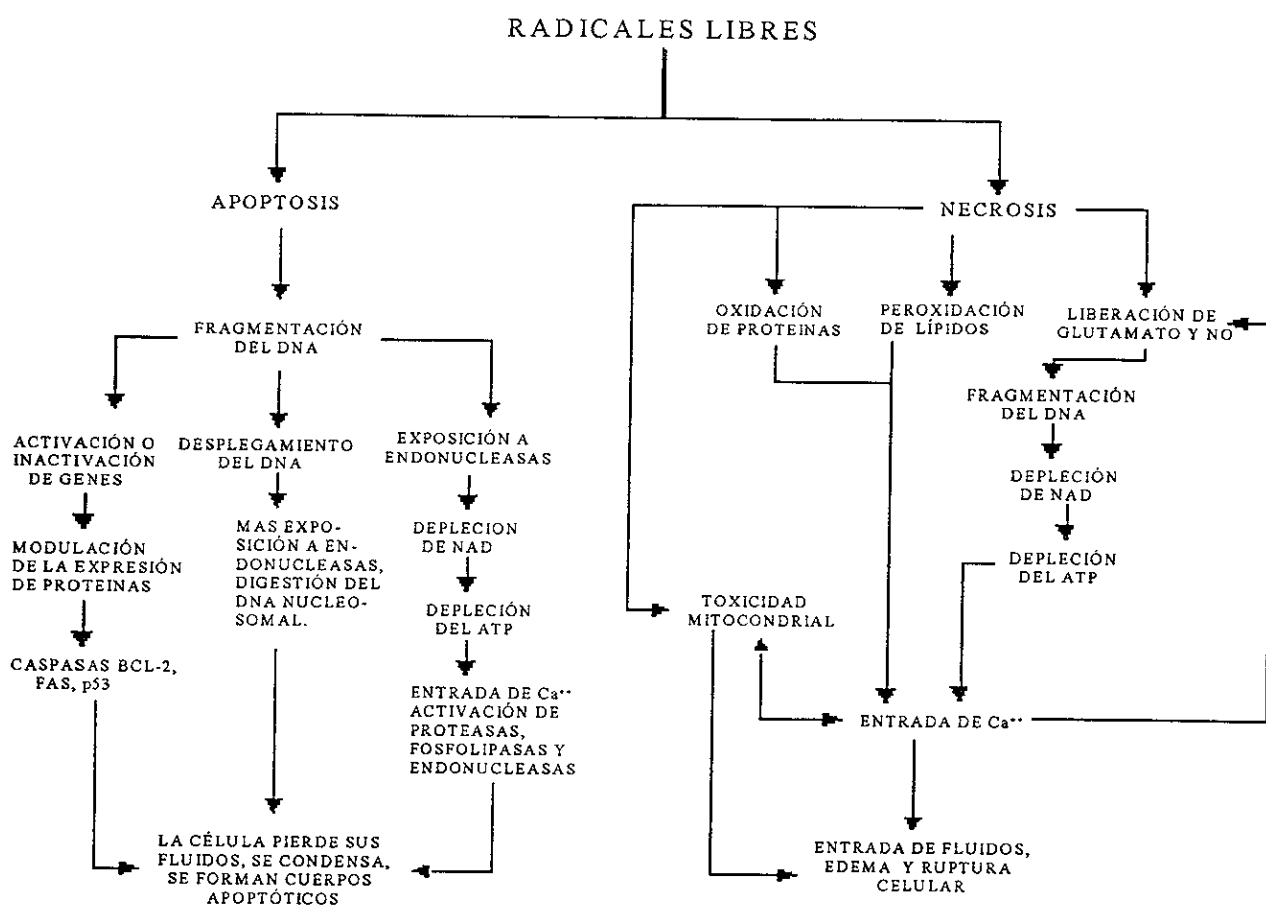
3. La activación de los receptores NMDA provoca la apertura de los canales de calcio. La entrada de calcio en las espinas dendríticas produce la activación de la fosfolipasa A2. Esta actúa sobre los fosfolípidos de la membrana para liberar ácido araquidónico, lo cual lleva a la activación de la prostaglandina H sintetasa. Dicha reacción produce la liberación de grandes cantidades de ROS, incluyendo  $H_2O_2$ , el cual en presencia de hierro produce el radical  $OH^\bullet$  que, como ya se mencionó, es altamente nocivo.
  
4. La entrada de  $Ca^{2+}$  a la región postsináptica también activa la óxido nítrico sintasa, lo cual también lleva a la producción de radicales libres. La forma redox predominante del óxido nítrico es el radical óxido nítrico  $NO^\bullet$  que es altamente tóxico, el cual, al igual que el  $H_2O_2$ , en presencia de hierro produce el radical  $OH^\bullet$ .

Por otra parte, estudios recientes han relacionado la disfunción mitocondrial y el estrés oxidativo con los procesos de envejecimiento y con la patogénesis de las enfermedades neurodegenerativas. En el sistema nervioso el envejecimiento está relacionado con un daño progresivo de la función mitocondrial ocasionado por el estrés oxidativo (Socci et al. 1995; Herrero y Barja, 1997). En la enfermedad de Parkinson se ha demostrado una disminución en el complejo I de la respiración mitocondrial, daño oxidativo y alteración en los sistemas de defensa antioxidantes. Asimismo, en pacientes con enfermedad de Alzheimer y Parkinson se han reportado mutaciones en el DNA mitocondrial (Sohal, 1997; Burke 1999; Dykens, 1999; Foster et al. 2001) ver figura 4.



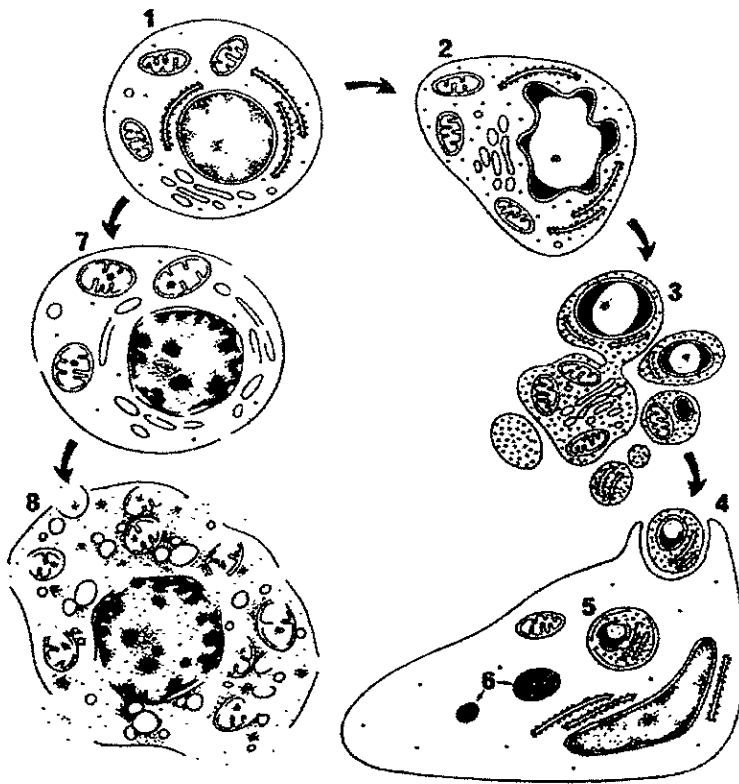
**Figura 4.** El papel hipotético de la mitocondria en la muerte celular por necrosis o apoptosis. El incremento del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular o del ciclo del  $\text{Ca}^{2+}$  mitocondrial puede provocar disminución en el potencial de membrana con la subsecuente transición de la permeabilidad. La presencia del ATP citosólico puede amortiguar este efecto. La transición de la permeabilidad está asociada con la liberación de los factores mitocondriales (X) involucrados en los eventos de la apoptosis (por ejemplo la degradación nuclear) y de la necrosis. Modificado de Sohal, 1997.

Existen dos tipos de muerte celular, la necrosis y la apoptosis. La necrosis, se caracteriza por la ruptura de la membrana, entrada de iones de  $\text{Ca}^{2+}$  y agua, y subsecuentemente lisis celular (Ingvar et al. 1988; Farber, 1990; Nicotera et al. 1997; Clarke, 1999; Kirkland y Franklin, 2001; McLaughlin et al. 2001). En contraste, muchas células mueren por procesos que involucran condensación celular, denominada apoptosis –muerte celular “programada”– a través de una nueva síntesis de proteínas y de RNA (Raff et al. 1993; Steller, 1995; Clarke, 1999; Afford y Randhawa, 2000; Kirkland y Franklin, 2001; McLaughlin et al. 2001). Las células apoptóticas muestran encogimiento del núcleo, condensación y fragmentación de la cromatina y en ocasiones, degradación del DNA mediante endonucleasas (Wyllie et al. 1980) (Ver figura 5).



**FIGURA 5.** Esquema de los mecanismos que inducen la apoptosis y la necrosis. Modificado de Adams et al. 2000. NO- óxido nítrico.

La necrosis es un proceso rápido que ocurre desde los primeros minutos después del daño (figura 6). El citoplasma se edematiza por la entrada de agua. Se observan vacuolas y gránulos de lipofusina. Además se pierde la función de las mitocondrias, y se observa destrucción de las crestas y edema; dilatación de las cisternas del retículo endoplásmico, dispersión de los ribosomas; el núcleo se edematiza y se vuelve electrodenso, se forman poros en la membrana celular lo que produce que sus contenidos se liberen hacia el espacio extracelular; después de un tiempo, lo que resta de la célula es fagocitado (Trump et. al. 1981; Farber, 1990; Kerr et al. 1995; Clarke, 1999; Adams et al. 2000).



**FIGURA 6.** Secuencia de los cambios ultraestructurales en la apoptosis (2-6) y en la necrosis (7 y 8). En 1 se muestra una célula normal. La apoptosis temprana (2) está caracterizada por la compactación y la segregación de la cromatina en masas circunscritas que terminan en la superficie interior del núcleo, condensación del citoplasma con preservación de la integridad de los organelos y el inicio de la circunvolución de la superficie celular. En la siguiente fase (3) los fragmentos del núcleo y el citoplasma condensado se asocian con la superficie celular seguida de la separación de las protuberancias de la superficie para producir los cuerpos apoptóticos. Dichos cuerpos son fagocitados (4) por células cercanas y son degradados por enzimas de los lisosomas (5), siendo reducidos rápidamente a residuos indefinidos dentro de los telolisosomas (6). En el daño celular irreversible, el inicio de la necrosis (7) se manifiesta con el agrupamiento de la cromatina sin cambios radicales en su distribución, se observa total edema de las mitocondrias con destrucción de sus matrices, disolución de los ribosomas y ruptura focal de las membranas. En estadios más avanzados (8) todos los componentes celulares se desintegran. Modificado de Kerr et al. 1995.

La necrosis puede continuar varios días después del daño y puede ser provocada por eventos secundarios, como la pérdida del soporte astrocítico, ruptura de la barrera hemato encefálica, inflamación y otros factores.

Por otro lado, el cambio morfológico más evidente de la muerte por apoptosis se encuentra en el núcleo ya que la cromatina se condensa; se observan grandes vacuolas y condensación del citoplasma (figura 6). No hay ruptura obvia de membranas, sin embargo se observa gran pérdida del fluido intracelular hacia los espacios extracelulares y se ve como un área edematosa que rodea a la célula. Al parecer la función mitocondrial está intacta, sin embargo algunas se observan muy oscuras. El material nuclear cambia al grado de que el nucleolo desaparece y la cromatina se dispersa; se forman pequeñas vacuolas en el núcleo. Pronto el núcleo se vuelve muy oscuro y empieza a cambiar de forma. El núcleo y la célula forman muchas estructuras pequeñas, llamadas cuerpos apoptóticos. Los cuerpos apoptóticos son fagocitados en pocas horas, lo que hace difícil su identificación (Trump et al. 1981; Farber, 1990; Kerr et al. 1995; Clarke, 1999; Adams et al. 2000; Kirkland y Franklin, 2001). Algunos cuerpos apoptóticos no son fagocitados y presentan degeneración en horas. Sus membranas se rompen y se observa edema y disolución de los organelos, dichos cambios son semejantes a los observados en la necrosis (Kerr et al. 1995).

Ahora bien, ya que se ha sugerido que algunas enfermedades neurodegenerativas pueden ser debidas a daño por estrés oxidativo y que las principales alteraciones que se observan en dichas enfermedades son motoras y de memoria, nuestro interés se centra en estructuras cerebrales involucradas con estas funciones, como son: Corteza prefrontal, Cuerpo Estriado e Hipocampo.



## CORTEZA

Muchas de las áreas de la corteza cerebral procesan o integran información sensorial la cual es muy importante para el control del movimiento. Específicamente, la corteza prefrontal, que ocupa la mayor parte rostral del lóbulo frontal, una de sus funciones principales es la planeación de los movimientos voluntarios (Kelly y Dodd, 1991; Douglas y Martin, 1998).

En todos los mamíferos la corteza consta de un manto celular de 2 mm de grosor. Dicho manto está dividido en seis capas numeradas secuencialmente desde la superficie pegada a la piamadre hasta la sustancia blanca que está por debajo de la corteza (Carpenter, 1991; Kelly y Dodd, 1991; Shepherd, 1998). Ver figura 7.

- Capa molecular (I): contiene algunos cuerpos neuronales, está compuesta principalmente por axones que corren horizontalmente a través de la capa (paralelos a la superficie pial) y por células gliales. Los axones que pasan a través de esta capa establecen contactos sinápticos con las dendritas apicales de las células que están en capas corticales más profundas e interconectan áreas corticales locales.
- Capa granulosa externa (II): contiene principalmente neuronas piramidales pequeñas.
- Capa piramidal externa (III): contiene neuronas piramidales más grandes, estas neuronas proveen gran parte de las eferencias a otras regiones corticales.
- Capa granulosa interna (IV): esta capa es rica en neuronas no piramidales y recibe la mayoría de las aferencias provenientes del tálamo.
- Capa piramidal interna (V): esta capa contiene las neuronas piramidales más grandes, estas células dan lugar a largos axones que salen de la corteza y descienden hacia los ganglios basales, el tallo cerebral y la médula espinal.
- Capa fusiforme o pleomórfica (VI): contiene células piramidales, muchas de las cuales proyectan de regreso al tálamo. También está formada por células

esenciales para el control del movimiento. Estas áreas están directamente relacionadas con los aspectos motores primarios (que son las áreas motoras o sensoriales primaria, secundaria y terciaria). Se encuentran otras tres áreas, las llamadas de asociación. Su función es integrar la información que entra a la corteza, estas áreas están relacionadas con las tres funciones principales del cerebro: percepción, movimiento y motivación.

El área de interés en el presente trabajo es la corteza de asociación prefrontal, ya que está involucrada directamente con la planeación de los movimientos voluntarios (Douglas y Martin, 1998) y con ciertos aspectos de la memoria motora (Kelly y Dodd, 1991) y el tipo de neurona a analizar es la neurona piramidal.

## **ESTRIADO**

El cuerpo estriado pertenece a los ganglios o núcleos basales. El término ganglios basales es utilizado para referirse a un grupo de núcleos anatómica y funcionalmente relacionados, localizados en el telencéfalo, diencefalo y mesencéfalo.

Los ganglios basales están formados por cinco núcleos subcorticales que participan en el control de los movimientos, entre otras cosas. Estos son: el núcleo caudado, el putamen (cuerpo estriado en los roedores), el globo pálido, núcleo subtalámico (NST) y la sustancia nigra (SN) (Alexander y Crutcher, 1990; Coté y Crutcher 1991; Wilson, 1998).

En los primates el estriado está separado por la cápsula interna en dos partes: una porción dorsomedial (el núcleo caudado) y una porción ventrolateral (el putamen) los cuales están considerados como los núcleos de entrada de los ganglios basales. El núcleo caudado y el putamen se desarrollan de la misma estructura telencefálica, por lo que estos dos núcleos se componen del mismo tipo de células (Carpenter, 1981). El globo pálido (GP) de los primates es una estructura formada por un segmento externo (GPe) y uno interno (Gpi). El GPe y el Gpi son los homólogos respectivos del pálido y del núcleo entopeduncular en mamíferos inferiores. El núcleo subtalámico (NST) se encuentra en la porción basal del diencefalo, en la unión con el mesencéfalo. La SN está en el

esenciales para el control del movimiento. Estas áreas están directamente relacionadas con los aspectos motores primarios (que son las áreas motoras o sensoriales primaria, secundaria y terciaria). Se encuentran otras tres áreas, las llamadas de asociación. Su función es integrar la información que entra a la corteza, estas áreas están relacionadas con las tres funciones principales del cerebro: percepción, movimiento y motivación.

El área de interés en el presente trabajo es la corteza de asociación prefrontal, ya que está involucrada directamente con la planeación de los movimientos voluntarios (Douglas y Martin, 1998) y con ciertos aspectos de la memoria motora (Kelly y Dodd, 1991) y el tipo de neurona a analizar es la neurona piramidal.

## **ESTRIADO**

El cuerpo estriado pertenece a los ganglios o núcleos basales. El término ganglios basales es utilizado para referirse a un grupo de núcleos anatómica y funcionalmente relacionados, localizados en el telencéfalo, diencefalo y mesencéfalo.

Los ganglios basales están formados por cinco núcleos subcorticales que participan en el control de los movimientos, entre otras cosas. Estos son: el núcleo caudado, el putamen (cuerpo estriado en los roedores), el globo pálido, núcleo subtalámico (NST) y la sustancia nigra (SN) (Alexander y Crutcher, 1990; Coté y Crutcher 1991; Wilson, 1998).

En los primates el estriado está separado por la cápsula interna en dos partes: una porción dorsomedial (el núcleo caudado) y una porción ventrolateral (el putamen) los cuales están considerados como los núcleos de entrada de los ganglios basales. El núcleo caudado y el putamen se desarrollan de la misma estructura telencefálica, por lo que estos dos núcleos se componen del mismo tipo de células (Carpenter, 1981). El globo pálido (GP) de los primates es una estructura formada por un segmento externo (GPe) y uno interno (Gpi). El GPe y el Gpi son los homólogos respectivos del pálido y del núcleo entopeduncular en mamíferos inferiores. El núcleo subtalámico (NST) se encuentra en la porción basal del diencefalo, en la unión con el mesencéfalo. La SN está en el

mesencéfalo y presenta dos divisiones: una porción ventral llamada *pars reticulata* (SNr) que se asemeja citológicamente al globo pálido y una porción dorsal pigmentada llamada *pars compacta* (SNc), compuesta por células dopaminérgicas cuyos cuerpos neuronales contienen neuromelanina. Este pigmento oscuro, el cual parece ser un polímero de la dopamina o sus metabolitos, da a la SN su nombre, y el grado de su pigmentación está correlacionado con la concentración de dopamina, pero la función del pigmento es desconocida (Coté y Crutcher, 1991). El GPi y la SNr constituyen los principales núcleos de salida de los ganglios basales (Carpenter, 1984; Alexander y Crutcher, 1990; Wilson, 1998).

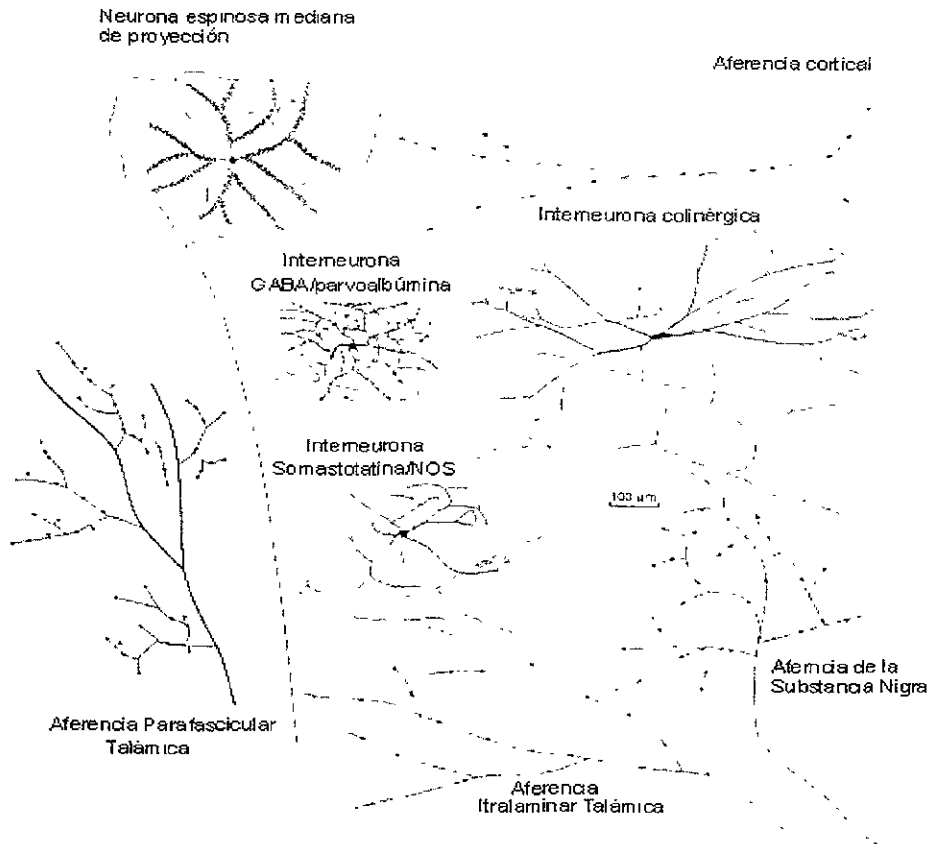
## ELEMENTOS NEURONALES

Estudios celulares con tinción de Nissl revelan la existencia de aproximadamente 111 millones de neuronas en el estriado de humano. De las cuales, se han descrito siete diferentes tipos de neuronas (Gravenland et al. 1985). Se estima que el 95% de las neuronas estriatales son neuronas espinosas medianas caracterizadas por un cuerpo celular que mide entre 10-20 $\mu$ m de diámetro, estas neuronas proyectan hacia el globo pálido y a la SN y contienen GABA como neurotransmisor. Las neuronas espinosas medianas además, emiten colaterales que establecen contactos sinápticos con las dendritas, las espinas de las dendritas y el soma de otras neuronas espinosas medianas. Ha sido descrito otro tipo de neurona GABAérgica de proyección, también de tamaño mediano, pero con pocas espinas. Se piensa que los otros tipos de neuronas estriatales tienen axones colaterales dentro del estriado. Entre estas interneuronas están las neuronas grandes sin espinas (con un diámetro de entre 20-30 $\mu$ m), las cuales son colinérgicas y otras más, entre medianas y grandes, algunas de las cuales contienen somatostatina y GABA (Wilson 1998). Ver figura 8.

## ASPECTOS FUNCIONALES

Existen evidencias de que las funciones de los ganglios basales no solamente incluyen aspectos sensoriomotores de programación de los movimientos, también están

involucrados en aspectos de planeación de los movimientos, selección y memoria motora (Coté y Crutcher, 1991; Alexander y Crutcher, 1990; Parent y Hazratj, 1993).



**FIGURA 8.** Fibras aferentes y neuronas de proyección del estriado. Tomado de Wilson (1998).

El circuito motor ganglios basales-tálamo-corteza es visto como una vía de reentrada, a través de la cual, la inervación proveniente de las áreas sensoriomotoras de la corteza precentral y postcentral (área motora suplementaria, corteza premotora, corteza motora y corteza somatosensorial) van de regreso a ciertas áreas motoras precentrales después de procesos intermedios dentro de los ganglios basales y el tálamo (Alexander y Crutcher, 1990; Wichmann y DeLong, 1993).

Las áreas específicas de la corteza envían proyecciones glutamatérgicas (y

posiblemente aspartérgicas) excitatorias a regiones específicas del estriado (caudado y putamen), los cuales representan los núcleos de entrada de los ganglios basales. Por otra parte, los núcleos de salida de los ganglios basales (GPi y SNr), ejercen efectos inhibitorios mediados por GABA sobre los núcleos del tálamo (Alexander y Crutcher, 1990).

Las fibras córtico-estriatales provienen de todas las áreas de la neocorteza. En los primates, la corteza prefrontal proyecta al núcleo caudado, mientras que la corteza sensoriomotora proyecta al putamen (Alexander y Crutcher, 1990). Por lo que se ha señalado que las funciones motoras de los ganglios basales se llevan a cabo principalmente mediante el putamen y las funciones cognitivas mediante el núcleo caudado (Coté y Crutcher, 1991).

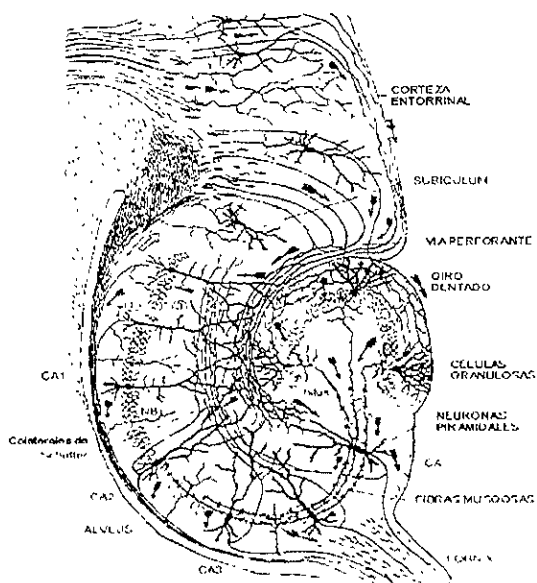
Ahora bien, se observa especificidad funcional en las proyecciones al putamen y al caudado, en donde diferentes funciones cognitivas están influenciadas por diferentes áreas. Por ejemplo en primates las lesiones bilaterales específicas de la corteza prefrontal dorsolateral producen déficit en la ejecución de tareas alternadas, tareas que miden la capacidad de memoria espacial. Mientras que lesiones en la corteza orbitofrontal provocan deficiencia en la ejecución de tareas en donde hay que invertir objetos. Estas dos áreas de la corteza tienen proyecciones organizadas que van a la cabeza del núcleo caudado (Coté y Crutcher, 1991).

En cuanto a los ganglios basales, el área de análisis en el presente trabajo será el núcleo caudado por sus implicaciones con la memoria y con la conducta motora. En este caso específico se le denominará estriado, ya que el estudio se llevará a cabo en ratas. Las células que se analizarán serán las neuronas espinosas medianas.

## HIPOCAMPO

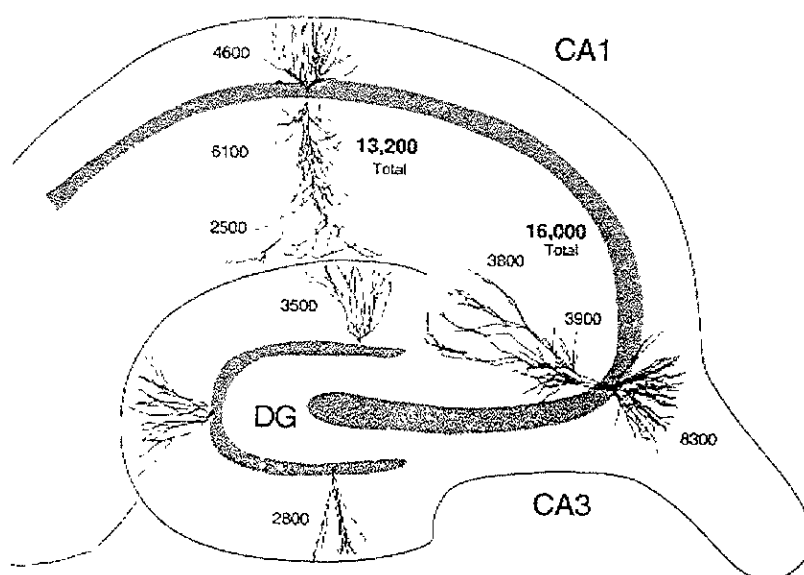
El hipocampo forma parte de un grupo de estructuras dentro del sistema límbico denominado comúnmente formación hipocámpal, el cual incluye al giro dentado, el hipocampo, subículum, presubículum, parasubículum y la corteza entorrinal. El hipocampo juega un papel muy importante en ciertas formas de memoria y aprendizaje, se le ha considerado como la más compleja de las áreas de asociación supramodal, ya que esta estructura recibe e integra información de todas las modalidades sensoriales (Brown y Zador, 1990); asimismo se ha demostrado que el hipocampo presenta una alta susceptibilidad a las descargas epilépticas. Se ha reportado que la formación hipocámpal, particularmente la corteza entorrinal, es la primera estructura afectada en la enfermedad de Alzheimer y que el hipocampo es altamente vulnerable a los efectos de la isquemia y la anoxia (Johnston y Amaral, 1998).

El hipocampo es una estructura cortical primitiva, (también llamada asta de Amón) que se extiende a todo lo largo del piso del piso del asta inferior del ventrículo lateral y se continúa con el fórnix por debajo del rodete del cuerpo calloso (ver figura 9). En etapas tempranas del desarrollo y en mamíferos primitivos el hipocampo está localizado en posición anterior, y constituye parte del manto externo del cerebro. El hipocampo en humanos está formado por el giro dentado, las astas de Amón (CA) y el subículo. Posee una corteza trilaminar a nivel del giro dentado y del asta de Amón, pero existe una transición en el subículo en donde se observa la formación de hasta cinco capas (Johnston y Amaral, 1998).



**FIGURA 9.** Elementos neuronales de la formación del hipocampo. Las zonas marcadas incluyen al subículo, parte de la corteza entorrinal, giro dentado, y las regiones de CA1a CA4. El hipocampo está dividido en estratum oriens (1), estratum piramidal (2; capa de los cuerpos celulares), estratum radiatum (3) y el estratum lacunosum-moleculare (4). Las células piramidales de la región CA3 proyectan a las neuronas piramidales de CA1 mediante la vía de las colaterales de Schaffer, a otras células piramidales de CA3. La vía perforante se muestra en todas las regiones del hipocampo y del giro dentado (Modificado de Cajal, 1911 (Modificado de Carpenter, 1991).

En los mamíferos el hipocampo se divide en cuatro regiones que están designadas como CA1, CA2, CA3 y CA4. En donde CA2 es tan pequeña que en algunas especies es ignorada, la región CA1 y CA3 constituyen propiamente la mayor parte del hipocampo; el área entre el giro dentado y el estrato granuloso de la región CA3 es llamado hilus (Kupfermann, 1991; Shepherd, 1998). Ver figura 10.



**FIGURA 10.** Esquema del hipocampo de rata que muestra la forma y el tamaño de las neuronas principales del giro dentado (DG) y del hipocampo (CA3 y CA1). Los números indican el largo total (en micras) de las dendritas de las neuronas granulares y las porciones de los árboles dendríticos localizados en el stratum-lacunosum molecular, radiado y oriens del hipocampo. Modificado de Johnston y Amaral, 1998.

## ELEMENTOS NEURONALES

Tanto el hipocampo como el giro dentado tienen cortezas de tres capas. Las tres capas del hipocampo son el estrato oriens (capa polimórfica), estrato piramidal (capa piramidal) y el estrato lacunoso molecular (área molecular). El giro dentado consiste de una capa polimórfica (hilus), un estrato granular y un estrato molecular. La capa molecular



del giro dentado se continúa con la del hipocampo. El principal tipo neuronal del giro dentado es la célula granular y la del hipocampo es la piramidal (Mainen y Sejnowski, 1996).

Las células granulares tienen un soma pequeño (aproximadamente de 10 $\mu$ m de diámetro), son esféricas y se encuentran en grupos de 4-6 células dentro de la capa granular. Las dendritas de las células granulares se extienden perpendicularmente desde la capa granular hasta la capa molecular, en donde reciben conexiones sinápticas de diferentes fuentes. Los axones de estas células son conocidos como las fibras musgosas debido a la apariencia peculiar de sus terminales sinápticas.

Los somas de las neuronas piramidales se encuentran en grupos de 3-6 células en lo profundo de la capa piramidal. Estas neuronas presentan árboles dendríticos muy elaborados que se extienden perpendicularmente en ambas direcciones del soma. Las dendritas apicales son más largas que las basales y se extienden desde la punta de la célula piramidal hacia el centro del hipocampo. Las dendritas de las neuronas piramidales están cubiertas por espinas en donde terminan las sinapsis excitatorias (Mainen y Sejnowski, 1996; Johnston y Amaral, 1998).

Las neuronas intrínsecas o interneuronas, han sido definidas tradicionalmente como neuronas sin espinas y con axones restringidos al área en donde se encuentran sus somas y que liberan GABA (Freund y Buzsaki, 1996).

En el giro dentado el tipo de interneurona más común son las llamadas células piramidales en canasta y sus somas están localizados en el borde entre la capa granular y la capa polimórfica. Los axones de estas células inervan los somas de las células granulares. Las interneuronas del hipocampo tienen sus somas neuronales cerca o dentro de la capa piramidal y son clasificadas en tres grupos de acuerdo a sus blancos postsinápticos: las células axo-axónicas, las células en canasta y las células candelabro. Como su nombre lo indica, las células axo-axónicas establecen contactos sinápticos con los segmentos iniciales de los axones de las neuronas piramidales, ejerciendo control

sobre el inicio del potencial de acción. Las células en canasta establecen contacto sináptico con los somas de las neuronas piramidales. Finalmente, las células candelabro establecen contacto sináptico con las dendritas apicales y basales de las neuronas piramidales. Muchas interneuronas GABAérgicas también contienen y liberan péptidos neuroactivos (Freund y Buzsaki, 1996).

## ASPECTOS FUNCIONALES

Probablemente la propuesta más ampliamente aceptada acerca de la función del hipocampo se refiere al papel que juega en la memoria espacial (Kupfermann, 1991; Eichembaum, 1994; Tranel y Damasio, 1995, entre otros). Desde hace más de un siglo se consideraba que el daño a ciertas regiones del cerebro puede dar como resultado un síndrome amnésico caracterizado por una completa o casi completa pérdida de la memoria. Se sabe ahora que el daño restringido a la formación hipocampal es suficiente para producir este tipo de desorden de memoria (Tranel y Damasio, 1995).

Como ya se mencionó, el hipocampo ha sido implicado con algunas enfermedades neurológicas y psiquiátricas, incluyendo la epilepsia, la enfermedad de Alzheimer y la esquizofrenia (en donde se reportan trastornos de conducta y/o alteraciones de memoria) (Kupfermann, 1991). Además se ha reportado que sujetos sometidos a isquemia o anoxia presentan muerte neuronal en el hipocampo. Al parecer esta pérdida es debida a la excitotoxicidad, la cual está mediada por los receptores NMDA. Algunos autores han propuesto que el precio que el hipocampo paga por su gran capacidad para codificar rápidamente nueva información es su inestabilidad y vulnerabilidad ante cierto número de estresores metabólicos (Johnston y Amaral, 1998).

El hipocampo CA1 será analizado en el presente trabajo por su participación en la memoria espacial y la neurona que se analizará será la piramidal.

Una característica común a los grupos neuronales de estas tres estructuras es la

presencia de espinas en sus dendritas, por lo cual se hará una breve mención acerca de su importante función ya que son precisamente esas neuronas las que se analizarán en el presente trabajo.

## ESPINAS DENDRITICAS

El término espinas fué introducido por Cajal en 1888 en su primera descripción de los pequeños apéndices que salen de las ramificaciones de las células de Purkinje. El término se extendió a los apéndices similares observados en las dendritas de las neuronas piramidales y estrelladas de la corteza, a las neuronas espinosas medianas estriatales, a las neuronas granulares olfatorias, a las neuronas piramidales de hipocampo, entre otras (Shepherd, 1996).

Dichos apéndices son las terminales más cortas de los árboles dendríticos. Sus diferentes formas han dado lugar a diversos nombres, incluyendo "espinas", "gémula" entre otros. El término espinas es el más utilizado para nombrar la pequeña terminal caracterizada por una cabeza y un tallo delgado llamado cuello, que está adherido a la dendrita o al soma.

Las espinas dendríticas son blancos postsinápticos primarios de las sinapsis glutamatérgicas excitatorias en el cerebro maduro. Las espinas presentan diversas formas y tamaños. Hay espinas desde menos de  $0.01 \mu\text{m}^3$  hasta de  $0.8 \mu\text{m}^3$ . Las espinas y las sinapsis de diferentes tamaños ocurren en la misma dendrita.

Se puede distinguir a las espinas dendríticas por la composición de sus organelos subcelulares. Por ejemplo, cerca del 50% de las espinas de las neuronas del hipocampo y de otras estructuras contienen retículo endoplásmico liso, el cual está especializado en formar el "aparato espinoso" en el 80% de las espinas grandes. Algunas espinas contienen vesículas, cuerpos multivesiculares o polirribosomas (Spacek y Harris, 1997). Así, la remodelación de la estructura sináptica mediante la inserción de vesículas postsinápticas o mediante la síntesis de proteínas, podría tener lugar dentro o cerca de las espinas, y la degradación podría ser iniciada en las espinas mediante la endocitosis (Harris, 1999). (ver figura 11).

presencia de espinas en sus dendritas, por lo cual se hará una breve mención acerca de su importante función ya que son precisamente esas neuronas las que se analizarán en el presente trabajo.

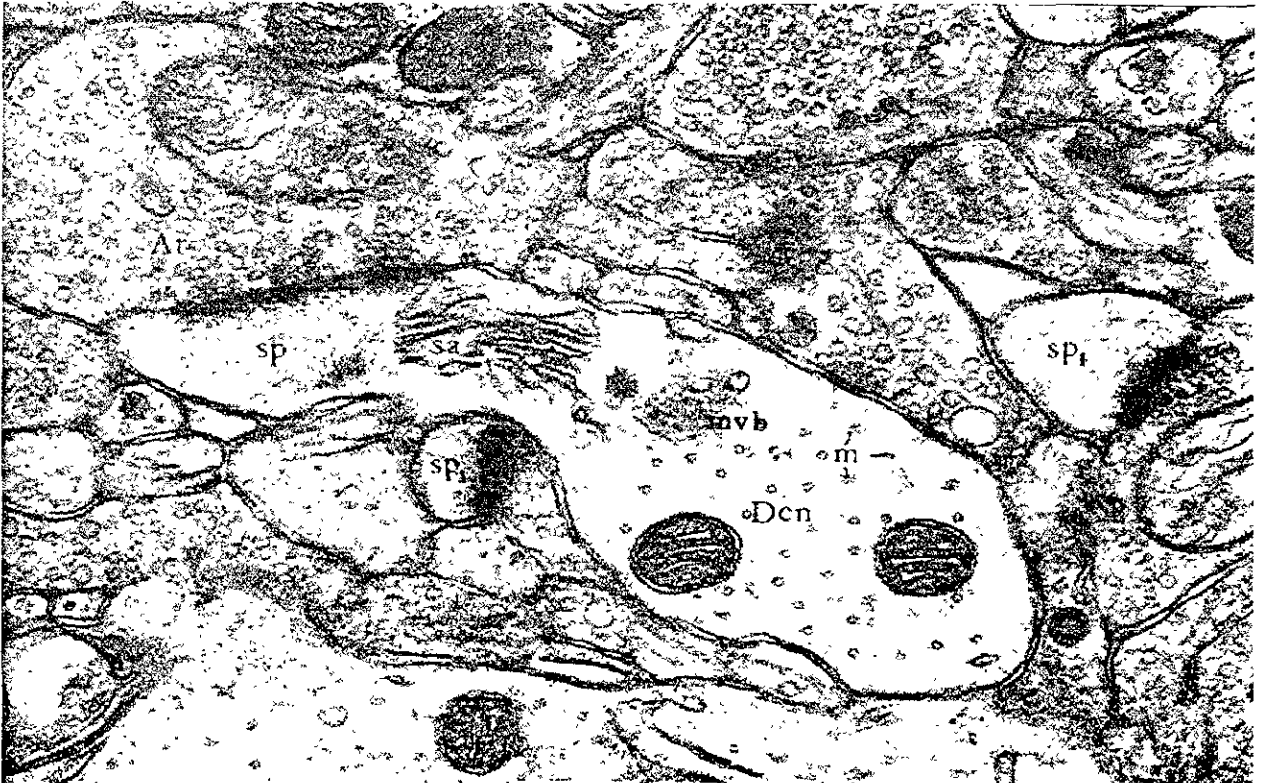
## ESPINAS DENDRITICAS

El término espinas fué introducido por Cajal en 1888 en su primera descripción de los pequeños apéndices que salen de las ramificaciones de las células de Purkinje. El término se extendió a los apéndices similares observados en las dendritas de las neuronas piramidales y estrelladas de la corteza, a las neuronas espinosas medianas estriatales, a las neuronas granulares olfatorias, a las neuronas piramidales de hipocampo, entre otras (Shepherd, 1996).

Dichos apéndices son las terminales más cortas de los árboles dendríticos. Sus diferentes formas han dado lugar a diversos nombres, incluyendo "espinas", "gémulas" entre otros. El término espinas es el más utilizado para nombrar la pequeña terminal caracterizada por una cabeza y un tallo delgado llamado cuello, que está adherido a la dendrita o al soma.

Las espinas dendríticas son blancos postsinápticos primarios de las sinapsis glutamatérgicas excitatorias en el cerebro maduro. Las espinas presentan diversas formas y tamaños. Hay espinas desde menos de  $0.01 \mu\text{m}^3$  hasta de  $0.8 \mu\text{m}^3$ . Las espinas y las sinapsis de diferentes tamaños ocurren en la misma dendrita.

Se puede distinguir a las espinas dendríticas por la composición de sus organelos subcelulares. Por ejemplo, cerca del 50% de las espinas de las neuronas del hipocampo y de otras estructuras contienen retículo endoplásmico liso, el cual está especializado en formar el "aparato espinoso" en el 80% de las espinas grandes. Algunas espinas contienen vesículas, cuerpos multivesiculares o polirribosomas (Spacek y Harris, 1997). Así, la remodelación de la estructura sináptica mediante la inserción de vesículas postsinápticas o mediante la síntesis de proteínas, podría tener lugar dentro o cerca de las espinas, y la degradación podría ser iniciada en las espinas mediante la endocitosis (Harris, 1999). (ver figura 11).



**Figura 11.** En esta figura se observa una dendrita (Den) de una neurona piramidal de la corteza cerebral con una espina dendrítica (sp) que contiene aparato espinoso (sa). El citoplasma de la dendrita contiene microtúbulos (m), mitocondria (mit). La terminal axónica (At) está formando una sinapsis asimétrica con la espina.

Las diferencias estructurales de las espinas parecen ser importantes para la integración sináptica y para la compartimentalización molecular. Ambas funciones son especialmente sensibles a la longitud y al diámetro del cuello de la espina. Algunos modelos teóricos muestran que los cuellos más delgados y largos presentan mayor depolarización de la cabeza de la espina ante un estímulo dado (Schiller et al. 1998).

Como ya se mencionó, las espinas dendríticas son estructuras especializadas que reciben la mayoría de las aferencias excitatorias en las neuronas de los mamíferos (Palay, 1956). Aunque existe gran cantidad de información sobre la morfología de las espinas (Juraska et al. 1989; Trommald et al. 1995; Bannister y Larkman, 1995; Papa et al. 1995;

Svoboda et al. 1996; Jacobs et al. 1997; Harris, 1999; van Rossum y Hanisch, 1999, entre otros), la explicación sobre sus propiedades funcionales comienza con el desarrollo de las imágenes de alta resolución del calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ), las cuales permiten la caracterización de la dinámica de las concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  libre intracelular en las espinas de neuronas vivas bajo una gran variedad de condiciones fisiológicas. Estos estudios han demostrado que las espinas dendríticas constituyen compartimentos químicos que parcialmente aíslan su citoplasma de la dendrita (Perkel y Perkel, 1985; Müller y Connor, 1991; Segal, 1995a y 1995b; Yuste y Denk, 1995; Shepherd, 1996; Svoboda et al. 1996; Yuste et al. 1999). Dicha compartimentalización del  $\text{Ca}^{2+}$  en las espinas podría señalar la especificidad de las aferencias en la plasticidad cerebral (Koch y Zador, 1993).

Existen diversas teorías acerca de la función de las espinas dendríticas:

1. Las espinas dendríticas son sitios de conexión sináptica. Esta inferencia original surgió de las observaciones de Cajal en 1890, las cuales fueron confirmadas por Gray en 1959, en donde muestra que las espinas son el sitio en donde se llevan a cabo las sinapsis tipo I, es decir, sinapsis asimétricas asociadas con vesículas sinápticas esféricas. Posteriormente se realizó la correlación entre la morfología de las sinapsis tipo I con la acción excitatoria de las sinapsis glutamatérgicas. Además se demostraron otro tipo de sinapsis, las tipo II, las cuales son inhibitorias y se establecen en el cuello de la espina o en la dendrita (Shepherd, 1990 y 1998). La simple demostración de que las sinapsis tipo I se establecen con la cabeza de la espina y de que las sinapsis tipo II se establecen con el cuello y con las dendritas se ha sugerido que las espinas podrían funcionar como compuertas de entrada hacia las dendritas (Shepherd, 1996). Uno de los primeros ejemplos es el reportado en las neuronas espinosas medianas del estriado, en donde una sola espina recibe una aferencia glutamatérgica de la corteza en la cabeza de la espina y otra aferencia dopaminérgica de la sustancia nigra en el cuello de la misma espina (Freund et al. 1984; Goldman-Rakic y Selemon, 1990).
2. La espina como sitio de daño cerebral: Se ha mostrado que las espinas son

sensibles a una gran variedad de condiciones patológicas. Esto es, la deafferentación de la vía visual por ejemplo, produce degeneración en las espinas de las neuronas del núcleo geniculado lateral (Globus y Scheibel, 1967; Valverde, 1967; Scheibel y Scheibel, 1968); las espinas de las células piramidales de corteza (Purpura, 1974; Huttenlocher, 1975) y del hipocampo (Müller et al. 1993; Díaz-Cintra et al. 1994; Isokawa, 1998; Jiang et al. 1998; Masako, 1998; McEwen et al. 1999) degeneran en varios tipos de desórdenes cerebrales como la epilepsia (Drakew et al. 1996), en el síndrome de Down y retardo mental (Hinton et al. 1991; Wisniewski et al. 1991), en los desórdenes mentales (Marín-Padilla, 1974; Purpura, 1974) las neuronas espinosas medianas del estriado pierden espinas en modelos de la enfermedad de Parkinson (Ingham et al. 1989; Machado-Salas et al. 1990; Ingham et al. 1991; Arbutnott e Ingham, 1993; Ingham et al. 1997), esto mismo se ha observado en modelos animales y humanos de alcoholismo crónico (Ferrer et al. 1986; Lescaudron et al. 1989) y ante estrés crónico (Watanabe et al. 1992; Sunanda et al. 1995; Magariños et al. 1996; Magariños et al. 1997). La naturaleza de los cambios en las espinas en estos desórdenes aún no es entendida, pero podría ser el resultado de los desórdenes primarios de esas neuronas, desutilización o sobreutilización de esas espinas con sinapsis, o efectos tóxicos del influjo de  $Ca^{2+}$ , o de otros factores bioquímicos (Shepherd, 1996).

3. Las espinas promueven la sumación lineal de los potenciales postsinápticos excitatorios (Horwitz, 1981). Se ha pensado que la linearización promueve la asociación de las sinapsis coactivadas que subyacen a la potenciación a largo plazo (LTP) (Harris y Kater, 1994). Además dicha sumación lineal parece que juega un importante papel en las funciones de aferencias-eferencias en las neuronas piramidales de la corteza (Rose y Call, 1992; Bernander et al. 1994; Svoboda et al. 1996).
4. Las espinas son consideradas como unidades funcionales en la plasticidad cerebral (Horwitz, 1981). Existen varios estudios que indican que los cambios en la morfología de las espinas produce variaciones en la potencia sináptica, por

ejemplo en la LTP, dichos cambios en la forma y en el número de espinas han sido también observados en presencia de otros procesos de aprendizaje y memoria. (Burgess y Coss, 1983; Moser et al. 1994; Hosokawa et al. 1995; Segev y Rall, 1998; Engert y Bonhoeffer, 1999; Smythies, 1999; Goldin et al. 2001).

5. Las espinas son compartimentos que controlan las concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$ . La posibilidad de que las espinas sean compartimentos discretos de  $\text{Ca}^{2+}$  y que activen procesos de plasticidad sináptica, son conceptos muy utilizados y han requerido de demostración experimental. Los experimentos de Müller y Connor (1991) acerca de lo anterior fueron a base de técnicas de microfluorometría en neuronas de CA3, estos autores demostraron que con una estimulación presináptica débil de las fibras comisurales, el  $\text{Ca}^{2+}$  se acumula en las espinas postsinápticas pero no en su dendritas. Una estimulación más potente también provoca cambios en las dendritas. Un antagonista del receptor NMDA bloquea dichos cambios en las espinas. La compartimentalización observada permite la especificidad, cooperación y asociación que se observa en los modelos de memoria tales como la LTP (Müller y Connor, 1991; Segal, 1995b; Shepherd, 1996; Harris, 1999; van Rossum y Hanisch, 1999; Yuste et al. 1999).
6. Las espinas dendríticas como neuroprotectores: Los posibles efectos que producen las altas concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  provocados por la actividad sináptica, ha sugerido la hipótesis de que el principal papel de las espinas es prevenir a su dendrita de los incrementos del  $\text{Ca}^{2+}$ , niveles que en ocasiones pueden ser tóxicos para la célula (Segal, 1995a). Lo anterior podría ser particularmente importante en las dendritas distales, en donde, debido a sus pequeños diámetros, las concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  podrían alcanzar niveles muy altos (Shepherd, 1996). El principal mecanismo de la espina al parecer, es atrapar el  $\text{Ca}^{2+}$  en el retículo endoplásmico, particularmente en el aparato espinoso (Segal, 1995a; Yuste y Denk, 1995; Shepherd, 1996).
7. Las espinas median la amplificación de los potenciales sinápticos pasivos y generan potenciales postsinápticos excitatorios locales (Perkel y Perkel, 1985;



Shepherd, 1996; Kiebler et al. 1999).

Finalmente, después de observar los diferentes hallazgos experimentales, se puede decir que las espinas dendríticas presentan una amplia gama de propiedades que son críticas tanto para el procesamiento rápido de información como para los cambios plásticos lentos que subyacen a la memoria y al aprendizaje. Por lo cual se puede concluir que:

- Existen canales de calcio en las cabezas de las espinas.
- Las espinas son compartimentos individuales de  $\text{Ca}^{2+}$ .
- Las espinas se pierden ante procesos patológicos y aumentan ante mecanismos de plasticidad cerebral tales como el aprendizaje y la memoria.

## **MEMORIA Y APRENDIZAJE**

Los conceptos de aprendizaje y memoria están íntimamente relacionados. Aprendizaje es el proceso de adquisición de información, mientras que la memoria se refiere al almacenamiento de esta información, la cual puede recuperarse después de un tiempo. La memoria se refiere al conocimiento que es almacenado en el cerebro y a los procesos de adquisición y evocación de dicho conocimiento (Tranel y Damasio, 1995).

El proceso de formación de la memoria incluye tres estadios básicos:

1. **Adquisición:** se refiere a los procesos de apropiación de conocimientos en el cerebro, en un primer momento la memoria se acomoda mediante los órganos sensoriales y las cortezas sensoriales primarias.
2. **Consolidación:** Es el proceso de ejercitación del conocimiento adquirido y de la construcción firme de su representación en el cerebro.
3. **Almacenamiento:** Se refiere a la creación de registros estables de conocimiento en el cerebro para su evocación.

Anteriormente se consideraban tres tipos de memoria: inmediata, de corto plazo y de largo plazo (o remota), sin embargo, estos sistemas unitarios no explicaban

Shepherd, 1996; Kiebler et al. 1999).

Finalmente, después de observar los diferentes hallazgos experimentales, se puede decir que las espinas dendríticas presentan una amplia gama de propiedades que son críticas tanto para el procesamiento rápido de información como para los cambios plásticos lentos que subyacen a la memoria y al aprendizaje. Por lo cual se puede concluir que:

- Existen canales de calcio en las cabezas de las espinas.
- Las espinas son compartimentos individuales de  $\text{Ca}^{2+}$ .
- Las espinas se pierden ante procesos patológicos y aumentan ante mecanismos de plasticidad cerebral tales como el aprendizaje y la memoria.

## **MEMORIA Y APRENDIZAJE**

Los conceptos de aprendizaje y memoria están íntimamente relacionados. Aprendizaje es el proceso de adquisición de información, mientras que la memoria se refiere al almacenamiento de esta información, la cual puede recuperarse después de un tiempo. La memoria se refiere al conocimiento que es almacenado en el cerebro y a los procesos de adquisición y evocación de dicho conocimiento (Tranel y Damasio, 1995).

El proceso de formación de la memoria incluye tres estadios básicos:

1. **Adquisición:** se refiere a los procesos de apropiación de conocimientos en el cerebro, en un primer momento la memoria se acomoda mediante los órganos sensoriales y las cortezas sensoriales primarias.
2. **Consolidación:** Es el proceso de ejercitación del conocimiento adquirido y de la construcción firme de su representación en el cerebro.
3. **Almacenamiento:** Se refiere a la creación de registros estables de conocimiento en el cerebro para su evocación.

Anteriormente se consideraban tres tipos de memoria: inmediata, de corto plazo y de largo plazo (o remota), sin embargo, estos sistemas unitarios no explicaban

adecuadamente su funcionamiento.

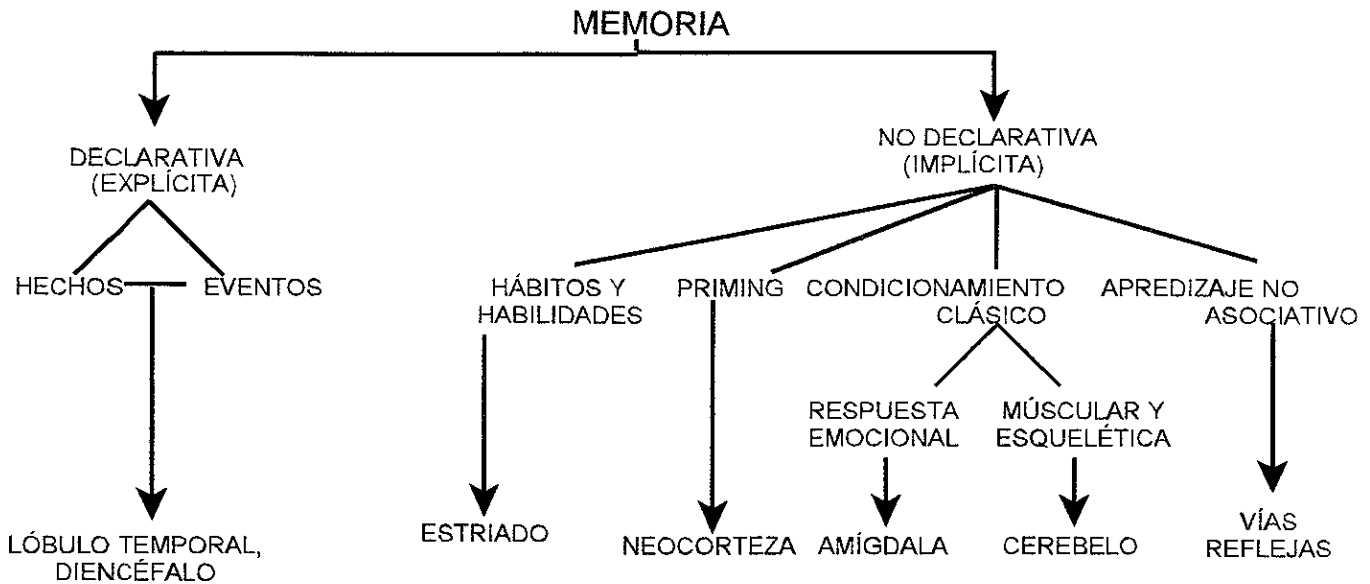
Los conceptos de los procesos y sistemas de memoria han cambiado considerablemente. La búsqueda para el entendimiento de la identidad y la localización de los sustratos neurales de aquello a lo que llamamos “memoria” se han modificado hacia la búsqueda de los correlatos neurales de la codificación, consolidación, almacenaje y evocación, en forma separada para las diferentes formas de memoria.

Existen varias propuestas; Baddeley (1995) propone el término de memoria de trabajo, la cual se refiere al almacenaje temporal de información en conexión con la ejecución de otras tareas más complejas. Este autor señala que la memoria de trabajo comprende de un sistema de control de la atención, llamado centro ejecutor, apoyado por sistemas responsables del almacenaje temporal y de la manipulación del material visual o del verbal que no cubre totalmente las funciones de la memoria de corto plazo. Es un sistema de multicomponentes de almacenamiento temporal que trabaja en forma paralela, y es necesario para la ejecución de una amplia gama de habilidades cognitivas que incluyen la comprensión, el aprendizaje y el razonamiento. Este sistema tiene limitada capacidad de memoria y se considera que subyace a la memoria de largo plazo.

Tulving y Schacter (1990), propusieron un modelo jerárquico para la memoria de largo plazo, cuyas divisiones son: memoria de procedimiento (la habilidad para ejecutar tareas basadas en operaciones); representación perceptual (priming (anticipación) sensorial), memoria semántica (conocimiento general) y memoria episódica (recolección del pasado personal).

Squire (1992), menciona aspectos similares a los de Tulving, pero los llama memoria declarativa o explícita (memoria para hechos y eventos) –esto corresponde a lo que Tulving considera como la memoria semántica y episódica– y memoria no declarativa o implícita (habilidades, priming (anticipación) sensorial, condicionamiento clásico y aprendizaje no asociativo) (ver figura 12). En el modelo de Tulving corresponde a la memoria de procedimientos y al priming.

Algunos estudios con emisión de positrones (PET) determinaron que la memoria declarativa se establece en la neocorteza y la no declarativa en el sistema límbico.(Ver figura 12).



**FIGURA 12** Taxonomía de la memoria de Largo Plazo y las estructuras cerebrales involucradas (Squire y Zola-Morgan, 1991).

Por su parte, la psicología experimental ha subdividido el aprendizaje en dos categorías principales: aprendizaje asociativo y no asociativo.

El aprendizaje asociativo, como el condicionamiento clásico o el operante, involucra cambios en la conducta como resultado de experimentar dos tipos de estímulos que tienen una reacción asociada temporal. En el condicionamiento clásico o Pavloviano, el estímulo condicionado es neutral y precede al estímulo no condicionado, el cual provoca alguna respuesta conductual y tiene un valor de reforzador positivo (alimento) o negativo (descarga eléctrica). En el aprendizaje operante la presentación del reforzador se asocia con la conducta del organismo (por ejemplo presionar una palanca o evitar un choque). La retención temporal es crítica en el aprendizaje asociativo. Tanto para el aprendizaje clásico como para el operante; el estímulo condicionado debe preceder al estímulo no condicionado para que ocurra el aprendizaje.

y Rahmann, 1992; Olanow, 1993b).

La plasticidad cerebral es una propiedad fundamental del SNC, que determina una modificación morfológica y funcional duradera en respuesta a un estímulo o una combinación de estímulos adecuados (Kupfermann, 1991). Puede explicarse por diversos mecanismos, entre los cuales podría citarse la reorganización sináptica posterior que se observa después de un daño, en donde se observan terminales axónicas cercanas al sitio de la denervación, donde se promueve un crecimiento de axones a distancias cortas (Cotman y Nadtler, 1978) y, como ya se mencionó, aumento en el número de espinas dendríticas (Bailey y Kandel, 1993; Horner, 1993; Harris y Kater, 1994). Este fenómeno permite explicar la recuperación funcional posterior a una lesión. En los últimos años se ha relacionado el envejecimiento y algunas enfermedades degenerativas que cursan con deterioro de los procesos mnésicos y con alteraciones en la plasticidad cerebral con un estado de estrés oxidativo (Olanow, 1993a). Otras evidencias indican que los procesos normales de envejecimiento que deterioran las operaciones cognitivas están relacionadas con alteraciones en la función del hipocampo, ocasionadas posiblemente por la formación de radicales libres. La disminución de los niveles de hormonas esteroideas y de la hormona del crecimiento que se presenta durante el envejecimiento, podría relacionarse con una menor capacidad antioxidante (Mukai et al. 1990; Ames et al. 1993; Moorandian, 1993; Fu et al. 1994).

En un estudio previo se demostró que la exposición aguda a ozono de ratas jóvenes produce deterioro en los procesos mnésicos y alteraciones electrofisiológicas en el hipocampo (Vazquez Sandoval et al. 1994). En experimentos que actualmente se están llevando a cabo, en donde se han expuesto ratas jóvenes a bajas dosis de ozono, se ha encontrado deterioro en la memoria de corto plazo y en la memoria de largo plazo, así como alteraciones en la actividad motora y de los niveles de superóxido-dismutasa cerebral que se correlacionan con las dosis de ozono utilizadas (Rivas-Arancibia et al. 1998).

## ANTIOXIDANTES

La presencia de radicales libres da lugar a la activación de sistemas antioxidantes celulares, los cuales inician una cascada enzimática de protección, dichos protectores incluyen sistemas enzimáticos como las derivadas del sistema de la citocromo oxidasa, la superóxido dismutasa (SOD), las catalasas y peroxidasas, como la glutatión peroxidasa y la glutatión reductasa (Chan y Fiskman, 1980; McCord, 1985; Nilsson et al. 1993), así como las vitaminas A, C, E que se denominan barredores (o atrapadores) de radicales libres (Englard y Seifer, 1986; Stahelin, 1991; Socci et al. 1995; Kuo et al. 1997) los cuales son capaces de controlar o prevenir los efectos adversos del estrés oxidativo (Pryor, 1976; Socci et al. 1995). Sin embargo, los sistemas antioxidantes disminuyen con la edad (Harman, 1986; Olanow, 1993a; Socci et al. 1995), en ciertos procesos patológicos (Olanow, 1993b) y bajo condiciones ambientales adversas como la contaminación atmosférica.

Se ha postulado que la administración de sustancias antioxidantes puede prevenir o revertir el daño provocado por la liberación de radicales libres; entre las sustancias con propiedades antioxidantes se incluyen a las vitaminas C, E, A (Englard y Seiffer, 1986; Stahelin, 1991; Socci et al. 1995; Kuo et al. 1997) y la taurina (aminoácido sulfurado no proteínico) entre otros (Lombardi, 1992a; Saransaari y Oja, 1996).

La taurina (ácido 2-aminoethasulfónico) es un aminoácido libre sulfonado, está considerado como el segundo aminoácido libre más abundante al menos en algunas especies. La taurina está involucrada con un número importante de procesos fisiológicos tales como la estabilización de la membrana, antioxidación, osmorregulación, modulación del flujo de calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) y neuroregulación (Huxtable, 1992; Lombardini, 1992b; Wu et al. 1992; Kim, et al. 1996; Saransaari y Oja, 1999a). Se ha considerado como un modulador nervioso influenciando la liberación de ciertos neurotransmisores, mantiene la integridad estructural de las membranas celulares, regula la unión y el transporte del  $\text{Ca}^{2+}$  y de cloro en la neurona, inhibe la fosforilación de proteínas, y funciona como neurotransmisor inhibitorio y al parecer está involucrada con funciones de desarrollo y

plasticidad cerebral (Huxtable, 1992; Lombardini, 1992b; Wu et al. 1992).

Los fluidos corporales, tales como la sangre, líquido cerebrospinal y el líquido extracelular contienen bajas concentraciones de taurina en un rango de 10-100  $\mu\text{M}$ . En contraste, las más altas concentraciones se encuentran en el cerebro y en el corazón. En el corazón, la taurina comprende más del 60% del total de aminoácidos libres (Huxtable, 1992).

Se ha reportado que la taurina produce efectos inotrópicos en el músculo cardíaco, tiene efectos benéficos en el tratamiento de la insuficiencia cardíaca congestiva y efectos protectores en contra de la sobrecarga de  $\text{Ca}^{2+}$  (Bkaily et al. 1996), y ya que es tan abundante en el corazón, se considera que es esencial en el mantenimiento de las funciones cardíacas, además de poseer funciones cardioprotectoras (Sato, 1996; Nittynen et al. 1999).

Por otra parte la taurina también se encuentra en el hígado, en donde se sabe que juega un importante papel en la conjugación de los ácidos biliares que son formados a partir del colesterol, sugiriendo que existe una estrecha relación entre el metabolismo del colesterol y el metabolismo de la taurina (Kibe et al. 1980) en donde la taurina estimula la actividad del colesterol  $7\alpha$ -hidroxilasa, la enzima limitante de la síntesis de los ácidos biliares. En experimentos en donde se induce hipercolesterolemia, se ha reportado que la taurina tiene un efecto protector, produciendo reducción de los niveles de colesterol (Yamori et al. 1980). Además, al igual que se ha reportado en el cerebro y en el corazón, en el hígado la taurina modula la homeostasis del  $\text{Ca}^{2+}$  mitocondrial, protegiendo a esta estructura de daño por estrés oxidativo (Palmi et al. 1996). Finalmente, las condiciones hepatotóxicas que ocasionan necrosis producen elevación en los niveles de liberación de taurina, posiblemente como un mecanismo protector (Trimbell y Waterfield, 1996).

Los niveles de taurina aumentan en presencia de daño y en condiciones patológicas tales como isquemia-anoxia, en ciertas formas de epilepsia, en la ceguera de origen retiniano y en el desarrollo sensorial anormal (van Gendler, 1992); se ha observado también, liberación de taurina en las neuronas granulares apoptóticas del cerebelo (Moran et al. 2000), así como en los astrocitos de la corteza en presencia de daño neuronal

(Saransaari y Oja, 1999b). Además los niveles de taurina tienden a subir en ciertas regiones del cerebro durante la hipertensión. Estos cambios en los niveles de taurina parece que son debidos al edema de la célula y/o a la osmorregulación, y probablemente en ciertos casos, en respuesta al edema neurotóxico celular producto de la liberación de aminoácidos excitatorios tales como glutamato y aspartato (Lombardini, 1992a; Phillis et al. 1999; Saransaari y Oja, 1999a). Más aún, desempeña un papel modulador durante la excitotoxicidad ya que protege a las neuronas de la muerte provocada por la presencia de glutamato y kainato, las cuales producen un estado de estrés oxidativo; este mecanismo protector es fisiológicamente importante en el cerebro y es posible, que después del daño cerebral, se induzca la síntesis de taurina en altas concentraciones. Se ha visto además, que en animales jóvenes la taurina es transportada por los axones a través de grandes extensiones y que este transporte axonal ocurre antes y durante el periodo de formación sináptica (Sturman, 1988; Magnusson, 1994; Saransaari y Oja, 1996).

Ahora bien, la presencia de taurina también ha sido demostrada en el tejido pulmonar. La exposición a gases oxidantes tales como dióxido de nitrógeno y ozono, producen daño pulmonar. Los cambios morfológicos que se observan en el tejido pulmonar incluyen destrucción de las células endoteliales capilares, edema, hipertrofia e hiperplasia del epitelio bronquial y el influjo de macrófagos y leucocitos polimorfonucleares hacia el espacio alveolar. Los cambios metabólicos que se observan como resultado del daño oxidativo a los pulmones incluyen peroxidación de lípidos y la movilización de antioxidantes celulares (Banks et al. 1992).

Se ha demostrado que la taurina exógena también ejerce un efecto protector ante el daño inducido por oxidantes y radicales libres al actuar como barredor o limpiador (scavenger), lo que le da un poderoso efecto antioxidante (Auroma et al. 1988; Schuller-Levis et al. 1994; Yamori et al. 1996). Además, al parecer, la función protectora de la taurina es debida a la modulación que ejerce sobre el  $Ca^{2+}$ . Lo anterior ha sido comprobado en experimentos en donde la hipoxia –al producir liberación excesiva de



glutamato-- provoca que los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular aumenten provocando daño neuronal irreversible (Hansen, 1985; Oyama et al. 1996). Ya que la taurina inhibe la recaptura de  $\text{Ca}^{2+}$ , se considera que tiene un efecto protector en presencia de excitotoxicidad provocada por la liberación excesiva de neurotransmisores excitatorios como el glutamato (Magnusson et al. 1990; Wu et al. 1994; Lidsky et al. 1995; Hada et al. 1996).

## JUSTIFICACION

Se ha hecho hincapié sobre la relación que existe entre el estrés oxidativo y la neurodegeneración. La exposición aguda a  $\text{O}_3$  a grandes dosis produce un estado de estrés oxidativo, probablemente comparable al observado en las enfermedades neurodegenerativas; sin embargo, debido a la inexistencia de información detallada acerca de los efectos estructurales y ultraestructurales, bioquímicos y conductuales de la exposición a  $\text{O}_3$  a dosis tóxicas no se ha podido llegar a una comparación sólida.

Asimismo se considera que no existen datos concretos, cualitativos ni cuantitativos acerca de la prevención de las alteraciones neurobiológicas inducidas por el estrés oxidativo cuando se administra un antioxidante como la taurina.

Finalmente, existe una enorme necesidad biomédica de prevenir o revertir el deterioro motor e intelectual del sujeto que se encuentre involucrado con alteraciones relacionadas con el estrés oxidativo.

glutamato-- provoca que los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular aumenten provocando daño neuronal irreversible (Hansen, 1985; Oyama et al. 1996). Ya que la taurina inhibe la recaptura de  $\text{Ca}^{2+}$ , se considera que tiene un efecto protector en presencia de excitotoxicidad provocada por la liberación excesiva de neurotransmisores excitatorios como el glutamato (Magnusson et al. 1990; Wu et al. 1994; Lidsky et al. 1995; Hada et al. 1996).

## JUSTIFICACION

Se ha hecho hincapié sobre la relación que existe entre el estrés oxidativo y la neurodegeneración. La exposición aguda a  $\text{O}_3$  a grandes dosis produce un estado de estrés oxidativo, probablemente comparable al observado en las enfermedades neurodegenerativas; sin embargo, debido a la inexistencia de información detallada acerca de los efectos estructurales y ultraestructurales, bioquímicos y conductuales de la exposición a  $\text{O}_3$  a dosis tóxicas no se ha podido llegar a una comparación sólida.

Asimismo se considera que no existen datos concretos, cualitativos ni cuantitativos acerca de la prevención de las alteraciones neurobiológicas inducidas por el estrés oxidativo cuando se administra un antioxidante como la taurina.

Finalmente, existe una enorme necesidad biomédica de prevenir o revertir el deterioro motor e intelectual del sujeto que se encuentre involucrado con alteraciones relacionadas con el estrés oxidativo.

## **HIPOTESIS**

Un estado de estrés oxidativo inducido por ozono produce alteraciones estructurales, ultraestructurales, bioquímicas y conductuales. Se postula que la administración temprana de taurina deberá tener un efecto protector.

## **OBJETIVO GENERAL**

a) Identificar los cambios neurobiológicos inducidos por estrés oxidativo, mediante la exposición aguda a O<sub>3</sub>, y b) Identificar el potencial efecto protector de la taurina.

## **OBJETIVOS ESPECIFICOS**

1. Analizar la citología del estriado, hipocampo y de la corteza frontal después de la exposición aguda a ozono y determinar cuál de las tres estructuras es la más susceptible.
2. Analizar la ultraestructura del estriado, hipocampo y de la corteza frontal después de la exposición aguda a ozono y determinar cuál de las tres estructuras presenta mayor vulnerabilidad.
3. Determinar los niveles de peroxidación de lípidos en las tres estructuras.
4. Analizar los cambios en la memoria de largo plazo.
5. Identificar el potencial efecto protector de la taurina ante los cambios observados.

## **HIPOTESIS**

Un estado de estrés oxidativo inducido por ozono produce alteraciones estructurales, ultraestructurales, bioquímicas y conductuales. Se postula que la administración temprana de taurina deberá tener un efecto protector.

## **OBJETIVO GENERAL**

a) Identificar los cambios neurobiológicos inducidos por estrés oxidativo, mediante la exposición aguda a O<sub>3</sub>, y b) Identificar el potencial efecto protector de la taurina.

## **OBJETIVOS ESPECIFICOS**

1. Analizar la citología del estriado, hipocampo y de la corteza frontal después de la exposición aguda a ozono y determinar cuál de las tres estructuras es la más susceptible.
2. Analizar la ultraestructura del estriado, hipocampo y de la corteza frontal después de la exposición aguda a ozono y determinar cuál de las tres estructuras presenta mayor vulnerabilidad.
3. Determinar los niveles de peroxidación de lípidos en las tres estructuras.
4. Analizar los cambios en la memoria de largo plazo.
5. Identificar el potencial efecto protector de la taurina ante los cambios observados.

## DISEÑO EXPERIMENTAL

Se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar de 250 g, con libre acceso a la comida y al agua que se dividieron en dos grupos diferentes

1) Grupo experimental:

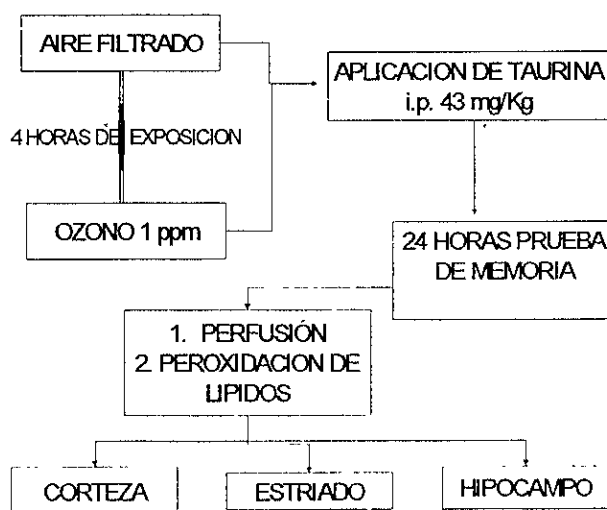
- a) Ratas expuestas a  $O_3$  durante 4 horas (n= 6)
- b) Ratas expuestas a  $O_3$  durante 4 horas tratadas con taurina (43 mg/Kg i.p.) cinco minutos después de la exposición (n= 6)

2) Grupo control:

- a) Ratas expuestas a aire filtrado durante 4 horas (n= 6)
- b) Ratas expuestas a aire filtrado durante 4 horas tratadas con taurina (43 mg/Kg i.p.) cinco minutos después de la exposición (n= 6)

En la segunda fase experimental se repitieron los grupos con los tratamientos ya mencionados (n = 24) y se sacrificaron mediante decapitación a las 24 hrs y se extrajo la corteza frontal, el estriado y el hipocampo para la medición de peroxidación de lípidos (ver más adelante).

## ESQUEMA DEL DISEÑO EXPERIMENTAL



Exposición a ozono: Se realizó en una cámara hermética de acrílico conectada a un generador de O<sub>3</sub> que permite la administración de una dosis constante durante un tiempo determinado, el que a su vez, está conectado a un monitor PCI (Ozone and Control System Inc), que permite medir la concentración de O<sub>3</sub> de la cámara durante todo el tiempo de exposición. Los animales fueron expuestos a una dosis de O<sub>3</sub> de 1 ppm durante cuatro horas. Una hora después de la exposición al O<sub>3</sub>, los animales fueron sometidos a un condicionamiento de evitación pasiva. Veinticuatro horas después se midió la memoria de largo plazo (Rivas-Arancibia et al. 1998).

CONDICIONAMIENTO (para la prueba de evitación pasiva): El entrenamiento se hizo una hora después de la exposición y se llevó a cabo en una cámara de condicionamiento, constituida por dos compartimientos, uno de seguridad y otro de castigo (de 30 cm de largo, 30 cm de ancho y 30 cm de alto cada uno), separados por una puerta deslizable tipo guillotina. El piso del compartimiento de seguridad está formado por una rejilla de tubos de aluminio de 0.5 cm de diámetro, separados por una distancia de 1.5 cm uno de otro; en el compartimiento de castigo, tanto el piso como las paredes laterales son de lámina de acero inoxidable; cada pared se continúa con la mitad del piso y está separada por una distancia de 1 cm una de otra. El piso está conectado a una unidad de corriente constante, alimentada por un estimulador Grass modelo S58, que permite administrar un tren de choques de 50 pulsos cuadrados por segundo, con una intensidad de 3 mA, y una duración de 5 ms para cada pulso, durante 5 segundos. El estimulador controla de manera automática la duración de los estímulos. La medición de las latencias se realiza manualmente por medio de cronómetros, y se procede de la siguiente forma: se saca al animal de su caja individual y se coloca en el compartimiento de seguridad durante 10 segundos; al cabo de los cuales se levanta la puerta deslizable y se mide el tiempo que tarda en pasar al otro compartimiento, si el sujeto tarda más de 100 segundos se elimina del experimento. Cuando el sujeto pase sus cuatro patas (latencia de adquisición), se

cierra la puerta deslizante y se le administra un choque de 3 mA durante 5 seg, al cabo de los cuales se abre la puerta deslizante, se mide el tiempo que el sujeto tarda en escapar al compartimiento de seguridad (latencia de escape) y se deja durante 30 seg en este compartimiento, regresándolo después a su caja de alojamiento. A las 24 horas se realizó la prueba de retención (memoria de largo plazo), para lo cual el animal se colocó en el compartimiento de seguridad por 10 seg, se abre la puerta deslizante y se mide la latencia de entrada al compartimiento de castigo. En esta sesión el animal no recibió choque. La sesión de prueba termina cuando el animal entra en el compartimiento de castigo o permanece en el de seguridad por 600 seg (criterio de retención) (Dunnet et al. 1981).

Después de la prueba de memoria, los animales se sacrificaron con una dosis letal de pentobarbital sódico i.p. y se perfundieron por vía intracardiaca con un fijador que contenía glutaraldehído al 2% y paraformaldehído al 2% en buffer de fosfatos (PBS). Después de la perfusión, se extrajeron los cerebros y se tomaron la corteza frontal, el estriado y el hipocampo para procesarlos con el método de Golgi (para el análisis citológico) y para la microscopía electrónica de transmisión, se tomaron fragmentos de dichas estructuras indistintamente del lado derecho o izquierdo.

## METODO DE GOLGI

1. Induración del tejido: a las 24 horas, las muestras ya fijadas se lavaron en buffer fosfatos y se sumergieron en una mezcla de osmio-dicromato ( $\text{OsO}_4$  1g,  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$  8g,  $\text{H}_2\text{O}$  300ml) durante 7 días a temperatura ambiente, en la oscuridad. Se utilizaron 30ml de mezcla para cada cerebro.
2. Impregnación argéntica: Las muestras se lavaron rápidamente con agua destilada, después con nitrato de plata al 0.75%. Los fragmentos se colocaron en el nitrato de plata durante 24 horas a temperatura ambiente.
3. Corte: Para realizar los cortes, se quitó primero el exceso de nitrato de plata a los

fragmentos con papel filtro y se encastraron en un bloque de parafina. La parte libre de la muestra se bañó en alcohol al 95% y se realizaron los cortes de 120 $\mu$ m, lubricando constantemente la cuchilla con alcohol. Los cortes se deshidrataron en 2 baños de alcohol absoluto (30 minutos cada uno), se colocaron en eugenol durante 20 minutos para ser aclarados y después dos cambios de xilol, finalmente se montaron en un portaobjetos con resina sintética.

Los cortes se observaron en un microscopio óptico y se realizó un análisis cualitativo y cuantitativo de las neuronas piramidales tanto de corteza motora (capa V) del hipocampo área CA1, así como de las neuronas espinosas medianas del estriado en donde se contó el número de espinas dendríticas en una longitud de 10 $\mu$ m a partir del inicio de la bifurcación.

El conteo del número de espinas dendríticas se llevó a cabo tanto en 5 dendritas secundarias como en 5 dendritas terciarias de 20 neuronas de cada estructura de cada uno de los grupos.

#### MICROSCOPIA ELECTRONICA DE TRANSMISION:

Después de lavar los fragmentos en PBS, se colocaron durante una hora en tetraóxido de Osmio al 1% preparado con PBS para la postfijación; posteriormente los fragmentos se lavaron con PBS en tres cambios de 10 minutos cada uno. El siguiente paso consistió en la deshidratación del tejido con alcoholes en concentraciones crecientes (del 50% al 100%); el tejido se bañó en cada concentración de alcohol durante 10 minutos (de 50 a 90%). Finalmente, el tejido se colocó en alcohol al 100% por tres ocasiones de 10 minutos cada una. Posteriormente, el tejido se colocó en tolueno durante dos períodos de 10 minutos cada uno. Los fragmentos se infiltraron en una mezcla de resina 1:1 araldita-tolueno a 60°C y finalmente se mantienen por 12 horas en una mezcla 3:1 de araldita-tolueno a temperatura ambiente. Los fragmentos ya infiltrados se incluyeron en araldita pura y se polimerizaron a 60°C durante 24 horas.

Una vez que se polimerizó la resina, se hicieron los cortes finos de 900Å en un ultramicrotomo Reichert-Jung utilizando cuchillas de diamante. Se montaron los cortes en



rejillas de cobre y se contrastan con acetato de uranilo al 5% durante 20 minutos y con citrato de plomo al 0.4% por cinco minutos. Los cortes se observaron en un microscopio electrónico Zeiss EM 10 realizando el análisis directamente de la pantalla.

La observación en el microscopio electrónico consistió en el análisis de las posibles alteraciones y/o cambios que presente el neuropilo, los cuerpos neuronales (incluyendo a la membrana nuclear y a sus organelos), específicamente, se observarán 50 neuronas de cada estructura.

## PEROXIDACION DE LIPIDOS

En la segunda fase experimental se repitieron los grupos con los tratamientos ya mencionados (n = 24) y se sacrificaron mediante decapitación a las 24 hrs y se extrajo la corteza frontal, el estriado y el hipocampo.

Los niveles de peroxidación de lípidos se midieron utilizando un ensayo (K-ASSAY LPO-CC de Kamiya Biomedical Company). Se obtuvieron muestras de la corteza frontal, estriado e hipocampo, cada muestra se homogeneizó con PBS en una relación 1:20 peso/vol, este homogeneizado se congela a  $-70^{\circ}\text{C}$ . Los lípidos peroxidados se producen por la oxidación de los ácidos grasos insaturados, y normalmente se encuentran a niveles bajos, por lo que la determinación cuantitativa de peróxidos puede ser útil en los estados patológicos. El principio de funcionamiento de la prueba es que en presencia de hemoglobina, los hidroperóxidos lípidos se reducen a sus derivados hidroxilos (alcoholes lipídicos) y el cromógeno 10-Metilcarbamoil-3,7-dimetilamino-10 H fenotiazina (MCDP) se une oxidativamente para formar azul de metileno en una reacción equimolar.

Los lípidos peroxidados se cuantificaron midiendo el azul de metileno por un método colorimétrico a 675 nm.

Para medir el nivel de peroxidación de lípidos, se descongeló la muestra, se centrifugó y se tomó el sobrenadante y se agregaron 80  $\mu\text{l}$  de una solución de oxidasa ascórbica y lipoproteín-lipasa en buffer, se mezclaron y se incubaron a  $30^{\circ}\text{C}$  durante 15 minutos y se leyó la absorbancia en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 675 nm. Se siguió el mismo procedimiento para el estandar y el blanco. A partir de las

mediciones del blanco, que corresponde a 0 nmol/ml y el estándar de hidroperóxidos de Cumeno, que corresponde a 50 nmol/ml se hizo una curva de calibración según la siguiente fórmula:

$$\text{LPO}[\text{nmol/ml}] = (\text{Es} - \text{Eb}) \times 50.0 / (\text{Estd} - \text{Eb})$$

Donde Es = absorbancia de la muestra

Estd= absorbancia de 50 nmol/ml

Eb= absorbancia del blanco

El rango lineal para esta prueba está entre 2 y 300 nmol/ml

## PRUEBAS ESTADISTICAS

Se utilizó el análisis de varianza de Kruskal Wallis para muestras independientes para determinar la homogeneidad de la población.

Para el estudio de las diferencias entre el grupo control y los grupos experimentales en la prueba de memoria se utilizó la prueba de U de Mann Whitney.

El análisis morfométrico del número de espinas dendríticas se realizó aplicando la prueba de t de Student para muestras no pareadas.

Para el análisis ultraestructural se utilizarán porcentajes.

## RESULTADOS

Después de haber sometido a los animales a aire filtrado ó a O<sub>3</sub> durante cuatro horas se encontró:

## CITOLOGIA

En la corteza frontal se observó pérdida estadísticamente significativa de las espinas dendríticas, tanto en las dendritas secundarias como en las dendritas terciarias de los animales que fueron expuestos a 1ppm de O<sub>3</sub> con respecto al grupo control. En el grupo control se observa que la media del número total de espinas en las dendritas

mediciones del blanco, que corresponde a 0 nmol/ml y el estándar de hidroperóxidos de Cumeno, que corresponde a 50 nmol/ml se hizo una curva de calibración según la siguiente fórmula:

$$\text{LPO}[\text{nmol/ml}] = (\text{Es} - \text{Eb}) \times 50.0 / (\text{Estd} - \text{Eb})$$

Donde  $E_s$  = absorbancia de la muestra

$E_{std}$  = absorbancia de 50 nmol/ml

$E_b$  = absorbancia del blanco

El rango lineal para esta prueba está entre 2 y 300 nmol/ml

## PRUEBAS ESTADISTICAS

Se utilizó el análisis de varianza de Kruskal Wallis para muestras independientes para determinar la homogeneidad de la población.

Para el estudio de las diferencias entre el grupo control y los grupos experimentales en la prueba de memoria se utilizó la prueba de U de Mann Whitney.

El análisis morfométrico del número de espinas dendríticas se realizó aplicando la prueba de t de Student para muestras no pareadas.

Para el análisis ultraestructural se utilizarán porcentajes.

## RESULTADOS

Después de haber sometido a los animales a aire filtrado ó a  $O_3$  durante cuatro horas se encontró:

## CITOLOGIA

En la corteza frontal se observó pérdida estadísticamente significativa de las espinas dendríticas, tanto en las dendritas secundarias como en las dendritas terciarias de los animales que fueron expuestos a 1ppm de  $O_3$  con respecto al grupo control. En el grupo control se observa que la media del número total de espinas en las dendritas

secundarias fue de  $9.8 \pm 1.6$  y de  $9.88 \pm 1.7$  en las dendritas terciarias, en comparación con el grupo expuesto en donde la media del número total de espinas en las dendritas secundarias fue de  $8.3 \pm 1.9$  y de  $8.01 \pm 1.9$  en las dendritas terciarias (ver gráfica 1).

Por otra parte, el tratamiento con taurina evitó en parte dicha pérdida, no obstante sus efectos no fueron tan evidentes, ya que como se observa en la gráfica 1, aún existen diferencias estadísticamente significativas con respecto al grupo control. La media del número total de espinas en las dendritas secundarias del grupo expuesto y tratado con taurina fue de  $8.9 \pm 1.5$  y de  $9.2 \pm 1.4$  en las dendritas terciarias.

En la figura 13 (A, B y C) se pueden apreciar fotografías de neuronas piramidales de la corteza frontal impregnadas con la técnica de Golgi, en donde se observa claramente la pérdida de espinas dendríticas en el grupo de animales expuestos a  $O_3$  (B) en comparación con el grupo control (A) y con el grupo expuesto y tratado con taurina (C).

En el estriado se observa gran pérdida de espinas tanto en las dendritas secundarias ( $\bar{x} = 8.3 \pm 1.5$ ) como en las terciarias ( $\bar{x} = 8.4 \pm 1.7$ ), observándose diferencias estadísticamente significativas con respecto al grupo control ( $\bar{x} = 10.01 \pm 1.4$  en las dendritas secundarias y  $\bar{x} = 9.86 \pm 1.3$  en las dendritas terciarias) (ver gráfica 2). Ahora bien, con la aplicación de taurina observamos que se previno de forma muy evidente la pérdida de espinas dendríticas, siendo los valores similares a los observados en el grupo control ( $\bar{x} = 9.8 \pm 1.6$  en las dendritas secundarias y  $\bar{x} = 9.73 \pm 1.62$  en las dendritas terciarias), existiendo diferencias estadísticamente con respecto al grupo expuesto como se observa en la gráfica 2.

En la figura 14 (A, B y C) se pueden observar neuronas espinosas medianas impregnadas con la técnica de Golgi en donde se evidencian las diferencias en el número de espinas dendríticas entre el grupo expuesto (B), en comparación con los grupos control (A) y expuesto a ozono y tratado con taurina (C).

Con respecto al hipocampo, además de presentar diferencias significativas con respecto al grupo control, observamos que ésta fue la estructura que mayor pérdida de

espinas dendríticas presentó en comparación con la corteza y el estriado. La media en el número total de espinas en las dendritas secundarias en el grupo control fue de  $11.4 \pm 1.5$  en comparación con el grupo expuesto en donde la media fue de  $7.6 \pm 1.9$ , asimismo en las dendritas terciarias, en donde la media del grupo control fue de  $10.8 \pm 1.4$  en comparación con el grupo expuesto en donde la media fue de  $7.8 \pm 1.9$ . Sin embargo, el tratamiento con taurina previno de manera importante la pérdida de espinas, llegando los valores a ser muy similares al grupo control ( $\bar{x} = 10.1 \pm 1.4$  en las dendritas secundarias y  $\bar{x} = 9.7 \pm 1.56$  en las dendritas terciarias) (ver gráfica 3).

En la figura 15 (A, B y C) se observan dendritas de neuronas piramidales impregnadas con la técnica de Golgi. Aquí se puede apreciar la dramática pérdida de espinas que presentó el grupo expuesto a ozono (B) en comparación con el grupo control (A), y la evidente prevención de la pérdida en el grupo expuesto y tratado con taurina (C).

## ULTRAESTRUCTURA

En la corteza frontal, a diferencia del grupo control (fig. 16), se observa que el  $O_3$  produjo daño neuronal caracterizado por la presencia de citoplasma denso con cisternas dilatadas de retículo endoplásmico y del aparato de Golgi, edema mitocondrial, y gran cantidad de vacuolas en el citoplasma, dendritas y neuropilo en general, asimismo se aprecian gránulos de lipofuscina (fig. 17). De 50 neuronas que se analizaron, el 42% presentaba este tipo de alteraciones, en comparación con el grupo control en donde no se observó ningún tipo de daño neuronal (ver gráfica 4). Las alteraciones neuronales que se observaron son características de la muerte celular por necrosis.

Ahora bien, el tratamiento con taurina redujo de manera significativa dichas alteraciones ya que de 50 neuronas analizadas, 19% presentaban daño evidente (ver gráfica 4 y figura 18).

En cuanto al estriado se observan, al igual que en en la corteza, alteraciones neuronales características de la muerte celular por necrosis, es decir, células con

citoplasma electrodens y edema en los organelos en comparación con el grupo control (ver figuras 19 y 20), siendo el 52% de las neuronas analizadas las que presentaban alteraciones en comparación con el grupo control (gráfica 4). Nuevamente, el grupo que recibió taurina después de la exposición a  $O_3$ , se observó una disminución significativa en el número de neuronas con alteraciones, ya que de 50 neuronas analizadas únicamente el 14% mostró signos de degeneración (ver gráfica 4 y figura 21).

Con respecto al hipocampo se pudo observar, al igual que en la citología, que ésta fue la estructura con mayor daño neuronal en comparación con la corteza frontal y el estriado (ver gráfica 4). En el hipocampo se observa gran cantidad de neuronas en proceso de degeneración, en comparación con las neuronas de los animales del grupo control (ver figuras 22 y 23); en este caso 33 células de 50 presentaban daño, siendo esto el 67% del total de las neuronas analizadas (gráfica 4).

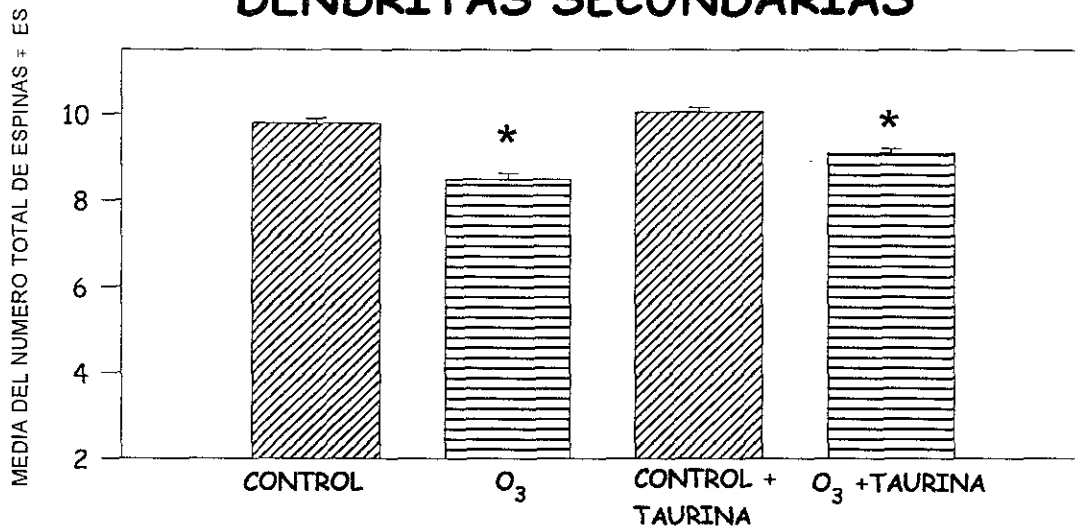
Ahora bien, al igual que en las otras estructuras, en el hipocampo, después de la exposición a  $O_3$  y con la aplicación de taurina, se previno de manera importante la neurodegeneración, siendo únicamente el 36% de las neuronas las que presentaban alteraciones (ver gráfica 4 y figura 24).

## MEMORIA

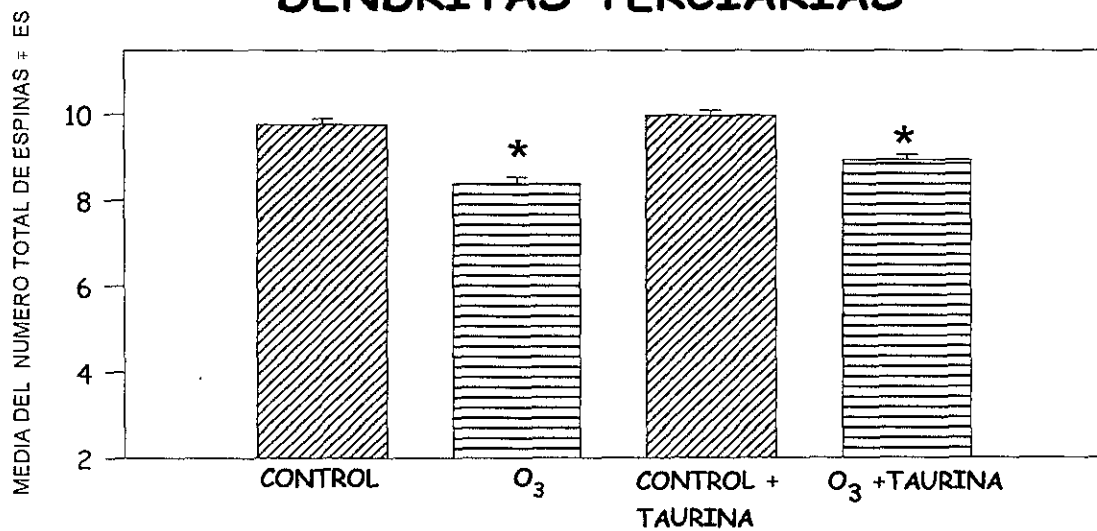
Con respecto a la prueba de evitación pasiva cuando se evaluó la memoria de largo plazo, encontramos que después de 24 horas de exposición a  $O_3$  hubo una disminución significativa ( $p < 0.01$ ) en la latencia de retención en comparación con los grupos control; asimismo observamos que el deterioro en la memoria de largo plazo de los animales expuestos a  $O_3$  presentaba diferencias significativas con respecto al grupo expuesto a  $O_3$  y tratado con taurina. Este último grupo no presentó deterioro en la prueba de memoria de largo plazo llegando incluso a ser similar a la de los animales control, no existiendo diferencias estadísticamente significativas (ver gráfica 5).

# CORTEZA

## DENDRITAS SECUNDARIAS



## DENDRITAS TERCIARIAS

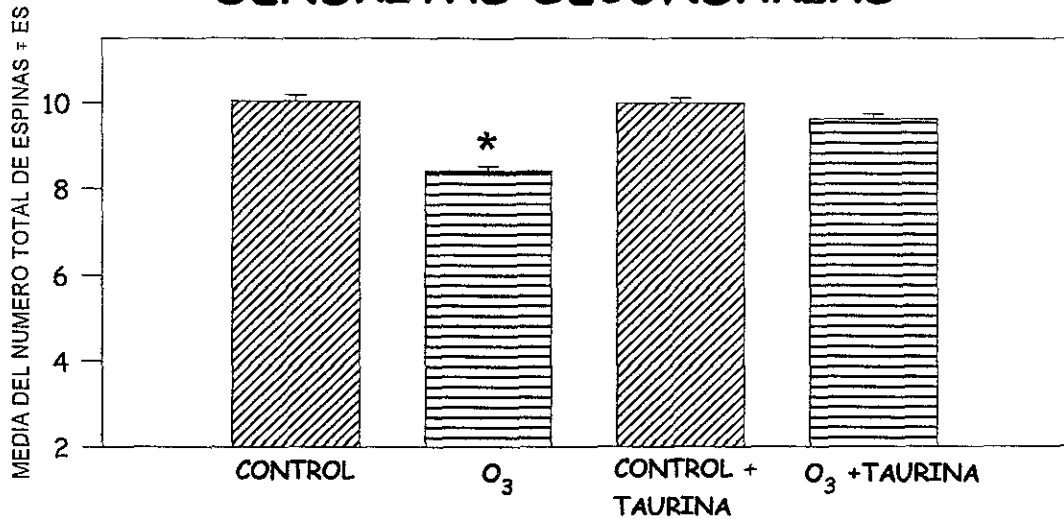


GRAF. 1 En esta gráfica se muestra la media del número total de espinas en la corteza cerebral de los grupos control y experimental con y sin aplicación de taurina.

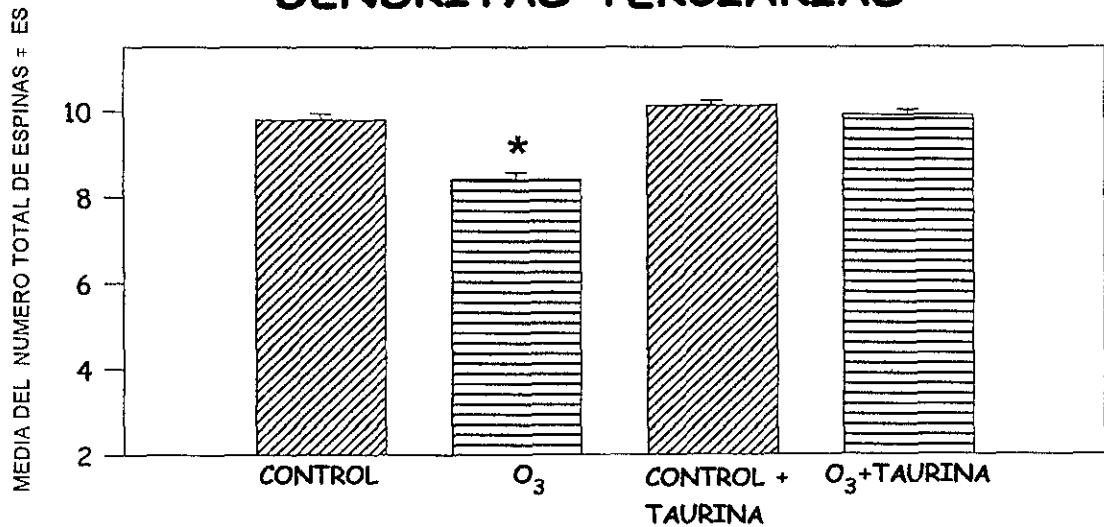
\* =  $P < 0.001$

# ESTRIADO

## DENDRITAS SECUNDARIAS



## DENDRITAS TERCIARIAS



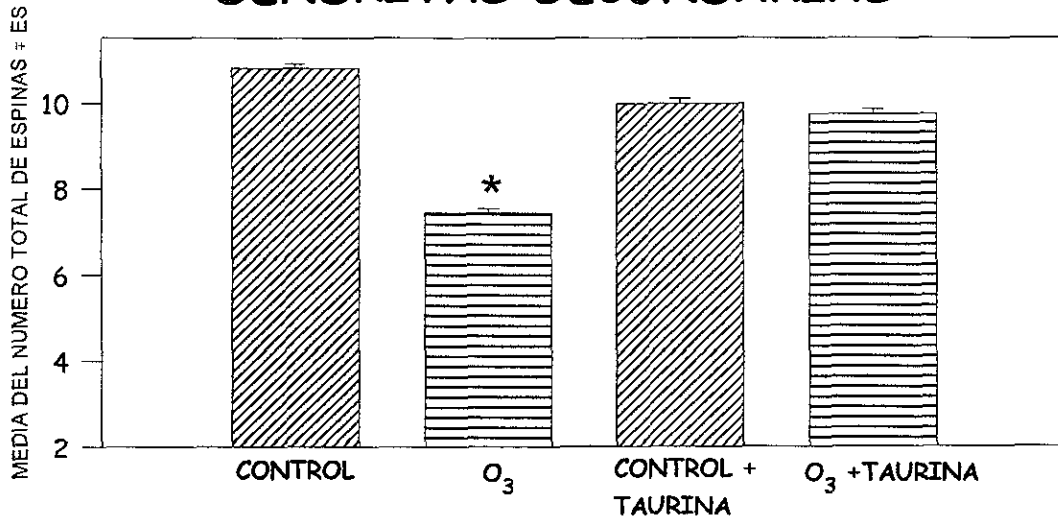
GRAF. 2 En esta gráfica se muestra la media del número total de espinas en el estriado de los grupos control y experimental con y sin aplicación de taurina.

\* =  $P < 0.001$



# HIPOCAMPO

## DENDRITAS SECUNDARIAS



## DENDRITAS TERCIARIAS

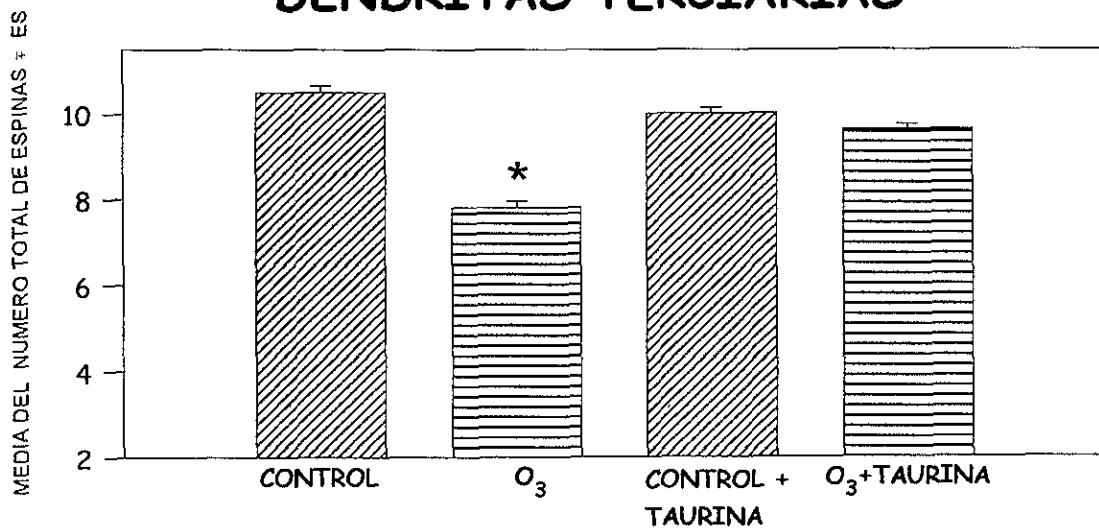
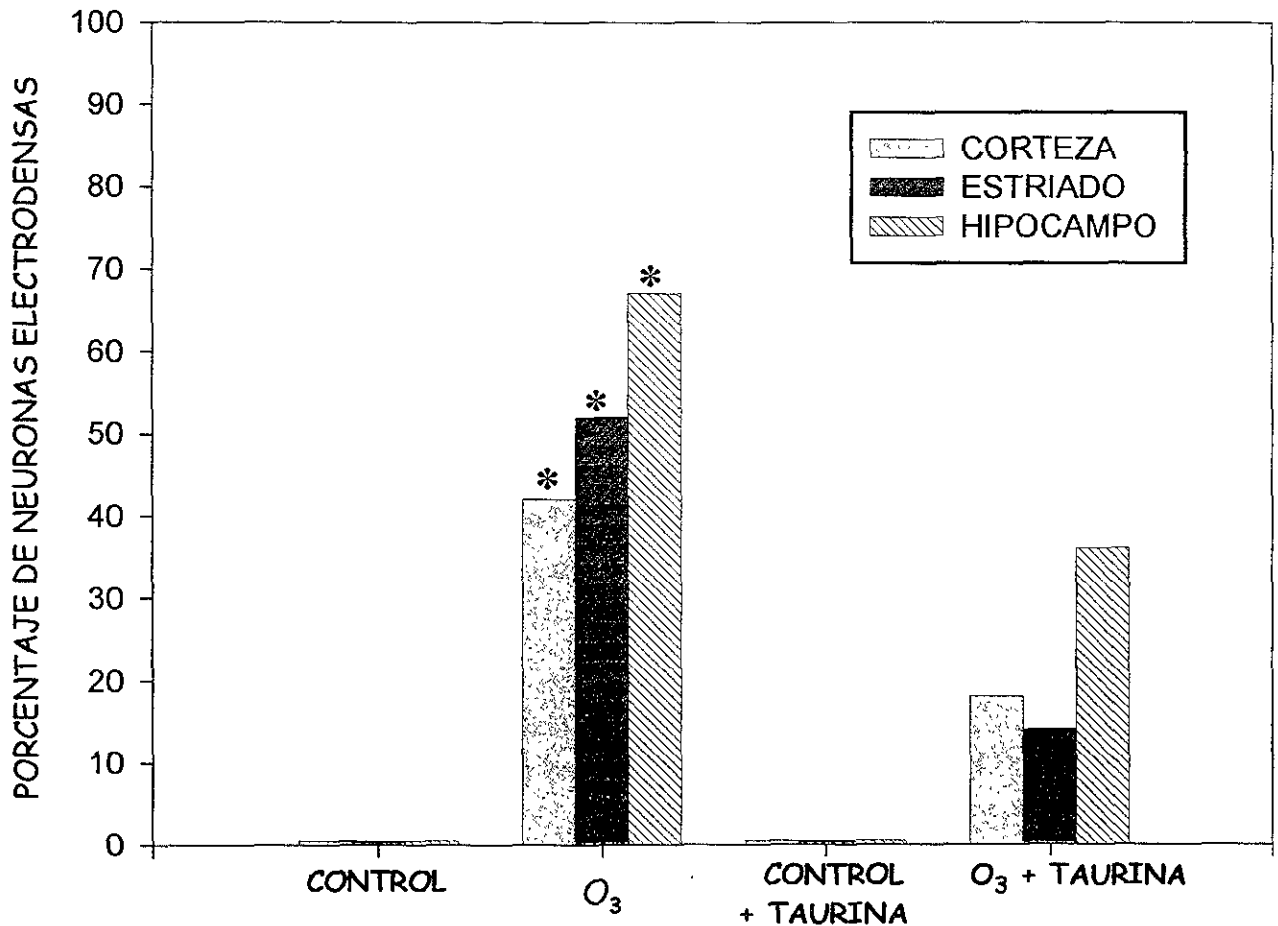


FIG. 3 En esta gráfica se muestra la media del número total de espinas en el hipocampo de los grupos control y experimental con y sin aplicación de taurina.

\* =  $P < 0.001$

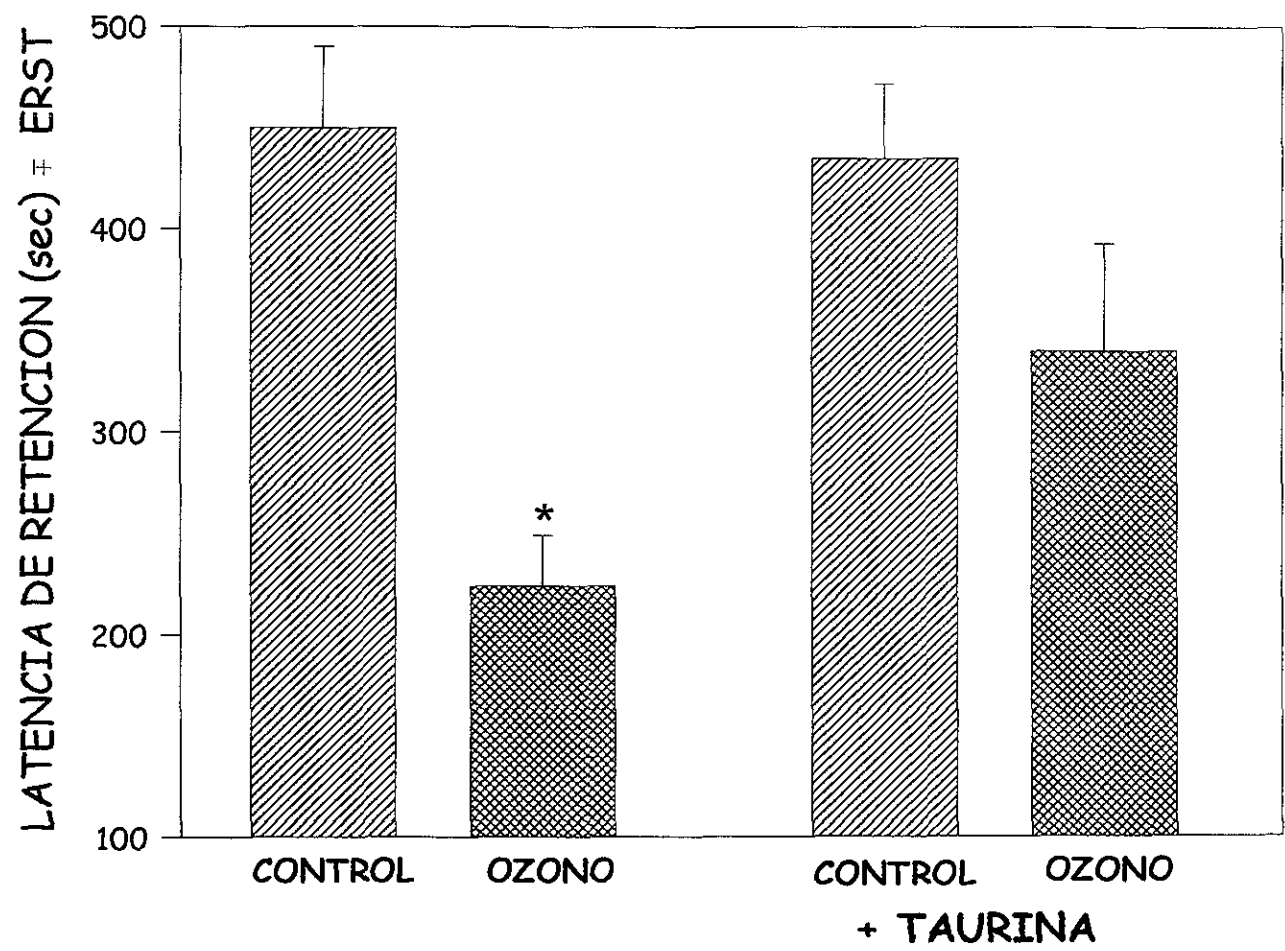
# DEGENERACION NEURONAL



GRAF. 4 En esta gráfica se muestran los porcentajes de las neuronas que presentaban signos evidentes de necrosis de los grupos expuestos a ozono y expuestos tratados con taurina en comparación con el grupo control.

\* =  $P < 0.001$

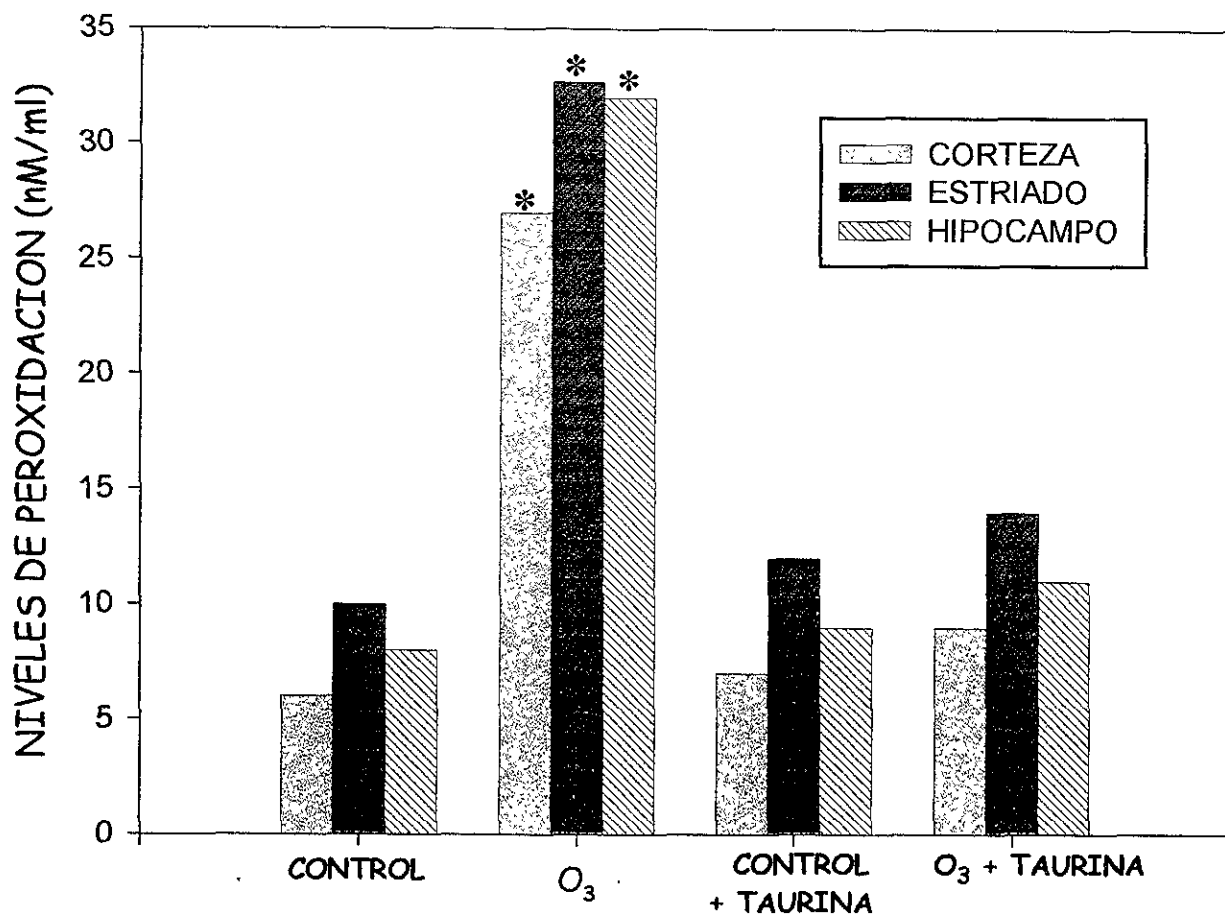
## MEMORIA DE LARGO PLAZO



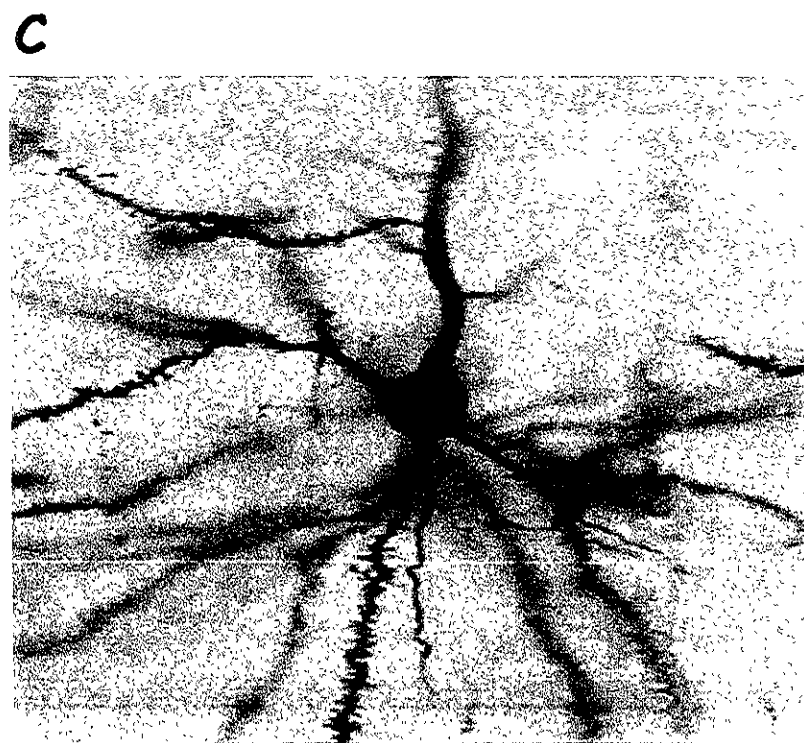
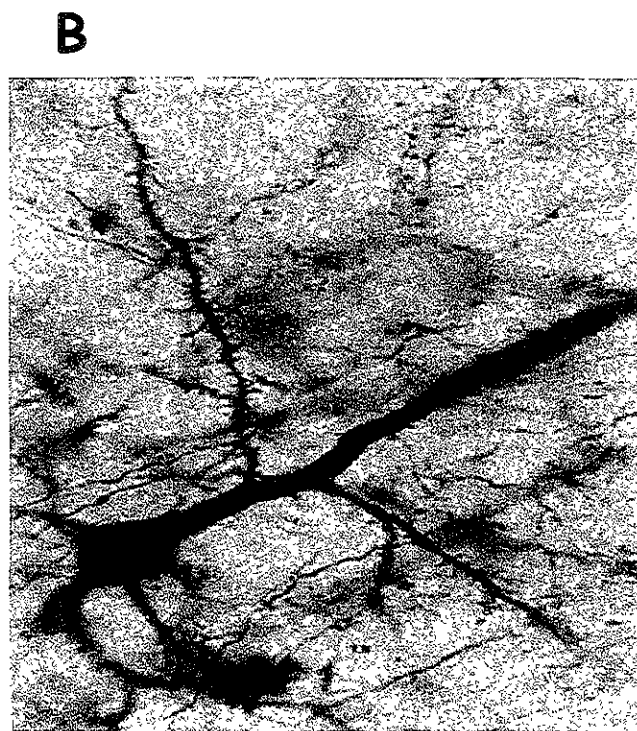
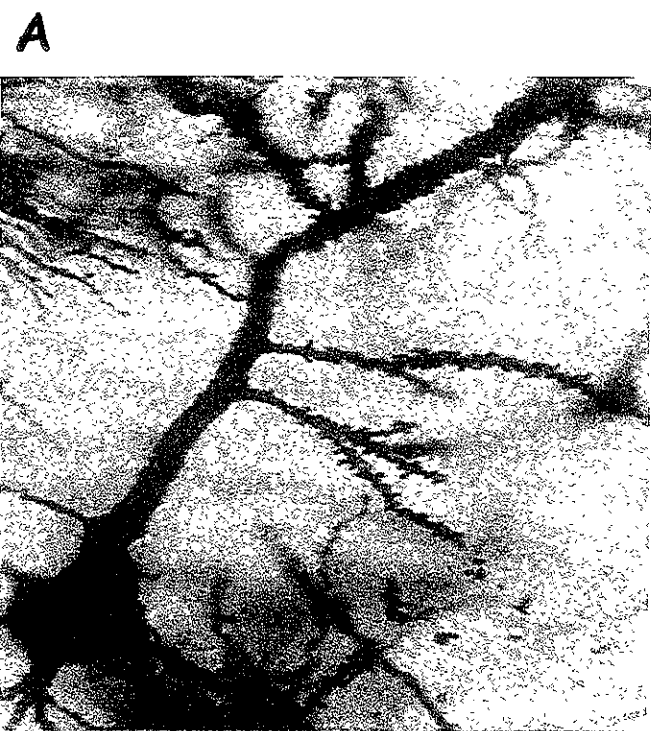
GRAF. 5 En esta gráfica se muestra la latencia de retención en la prueba de memoria de largo plazo en los grupos control y experimental con y sin la aplicación de taurina.

\*= P < 0.001

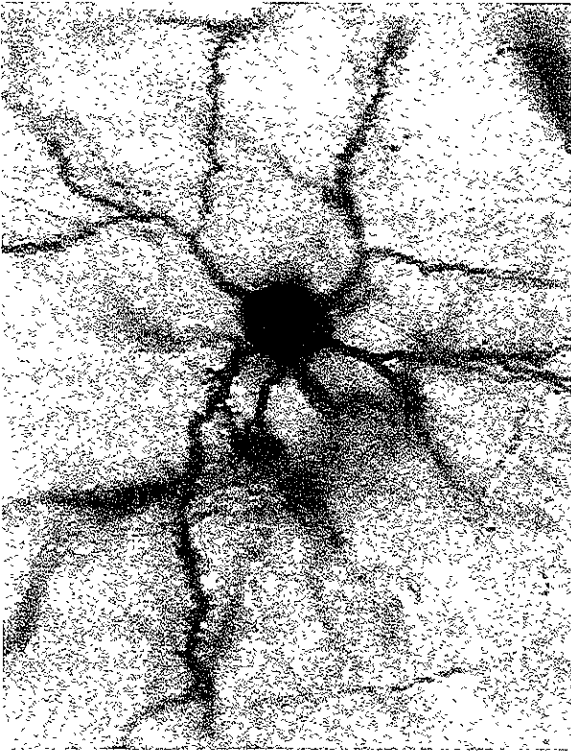
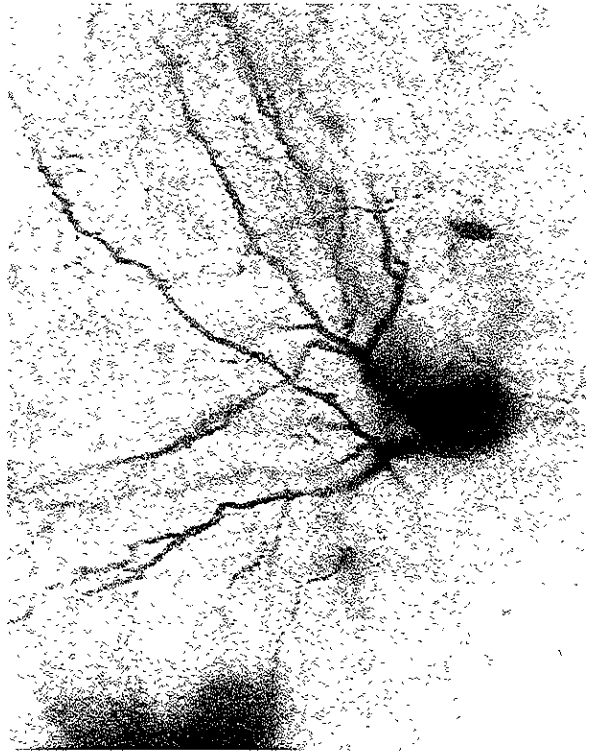
# PEROXIDACION DE LIPIDOS



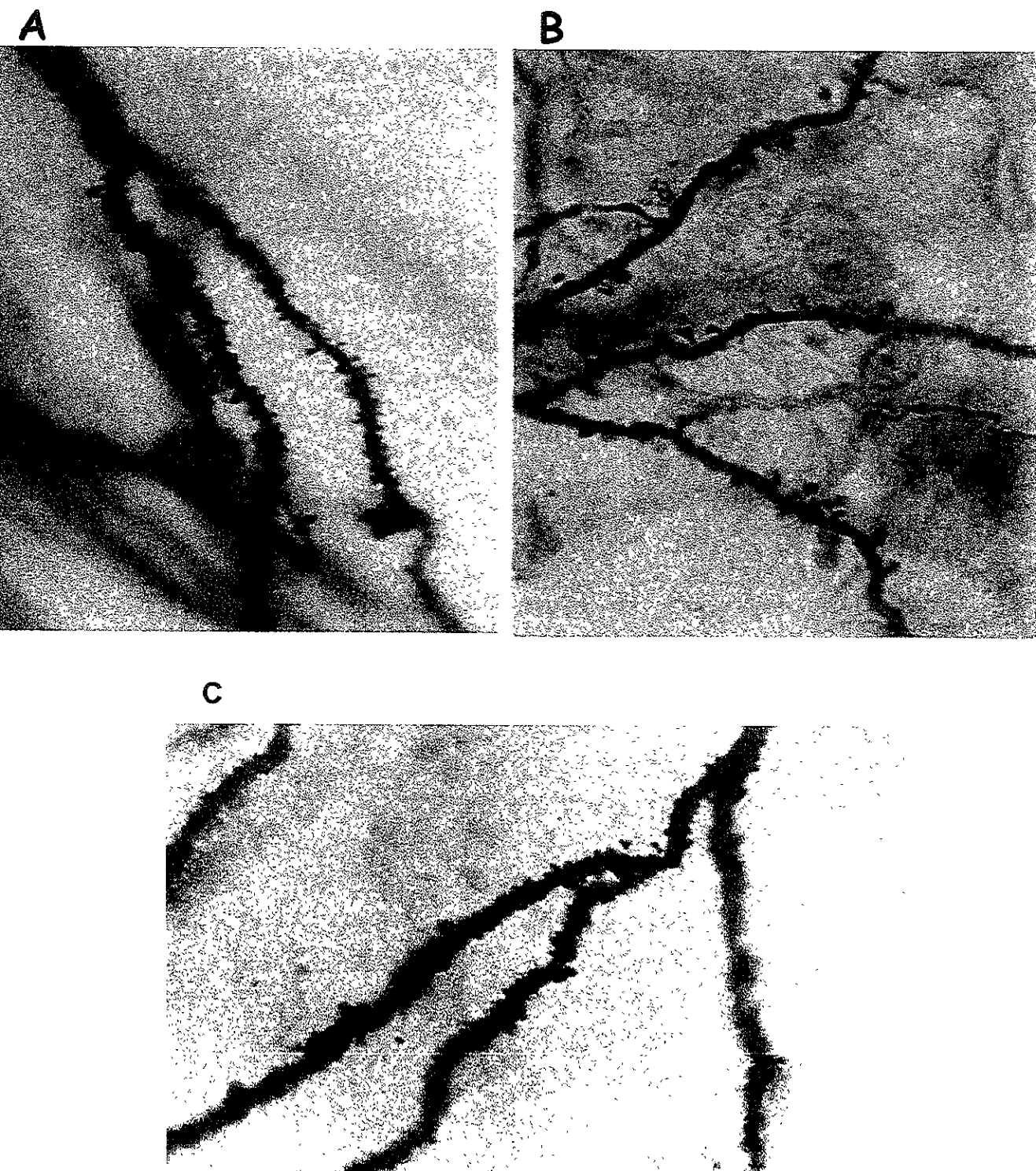
GRAF. 6 En esta gráfica se muestran los niveles de peroxidación de lípidos de los grupos control y experimental con y sin la aplicación de taurina. \*= P < 0.001



**FIGURA 13.** Microfotografías de neuronas piramidales de corteza prefrontal del grupo control (A) y del grupo expuesto a  $O_3$  (B) y del grupo expuesto y tratado con taurina (C); en las dendritas de los animales expuestos se notó una pérdida significativa de espinas con respecto al control, sin embargo en el grupo expuesto y tratado con taurina el número de espinas es similar al grupo control. Magnificación 400X

**A****B****C**

**URA 14.** Microfotografías de las neuronas espinosas medianas del estriado del grupo control (A) y del grupo expuesto a O<sub>3</sub> (B) y del grupo expuesto y tratado con taurina (C). En las dendritas de los animales expuestos se notó una pérdida significativa de espinas con respecto al control, sin embargo en el grupo expuesto y tratado con taurina el número de espinas es similar al grupo control. Magnificación 400X

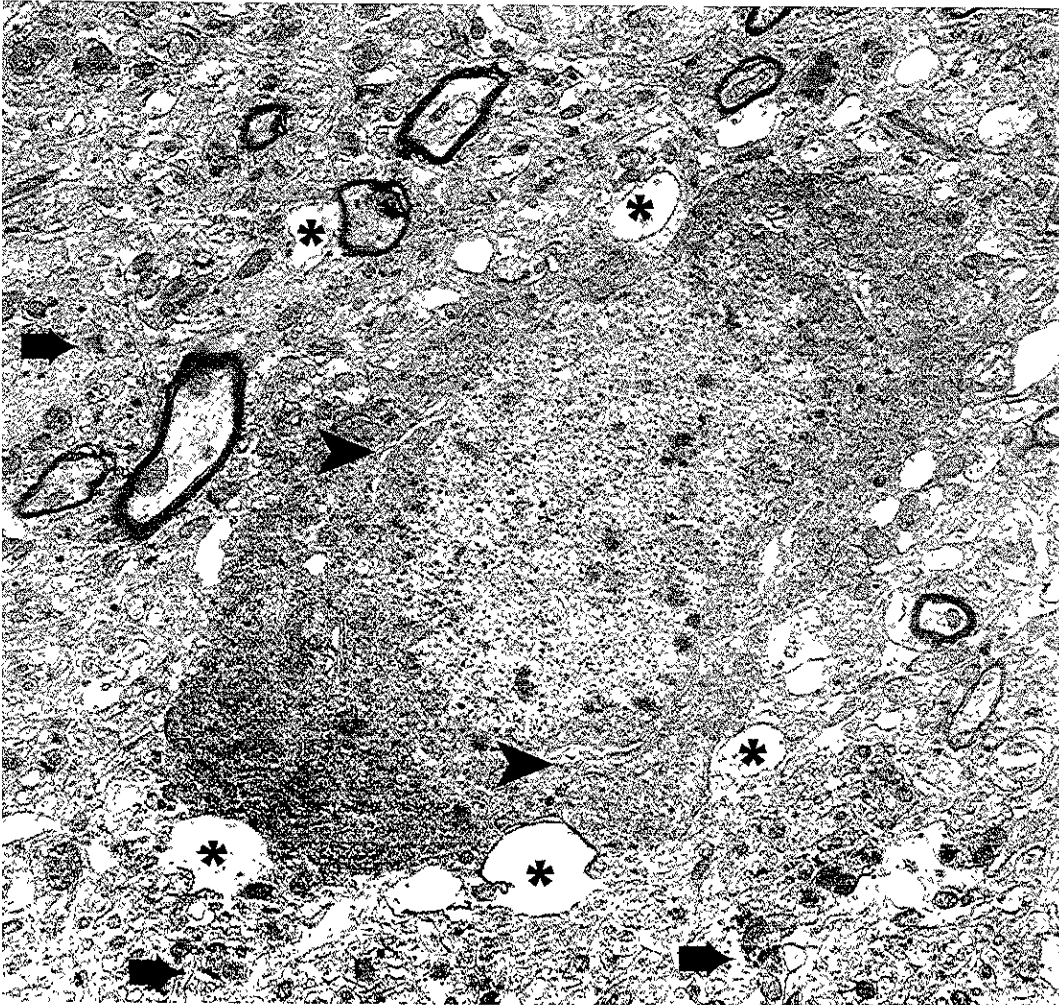


**FIGURA 15.** Microfotografías con la tinción de Golgi de las dendritas de las neuronas amigdalas de hipocampo CA1 del grupo control (A), del grupo expuesto a O<sub>3</sub> (B) y del grupo expuesto y tratado con taurina (C); en las dendritas de los animales expuestos se observó una pérdida significativa de espinas con respecto al control, sin embargo en el grupo expuesto y tratado con taurina el número de espinas es similar al grupo control. Magnificación 1000X

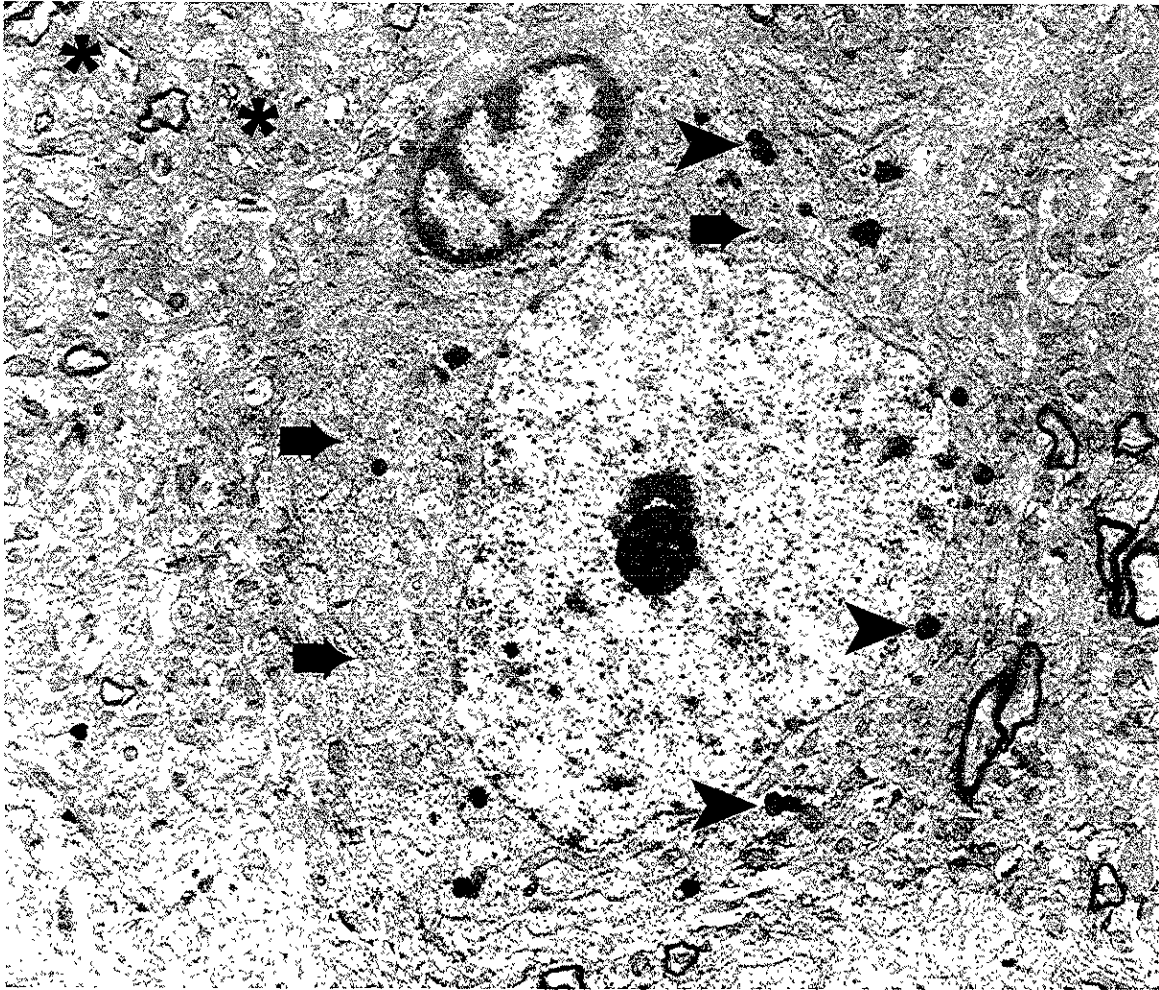


**FIGURA 16.** Ultraestructura de una neurona de la corteza prefrontal del grupo control, con citoplasma, núcleo y organelos de características normales; mitocondrias, retículo endoplásmico y aparato de Golgi (►). En el neuropilo se observan dendritas en buenas condiciones, en donde se pueden apreciar claramente el citoesqueleto y mitocondrias (\*). 8350 X



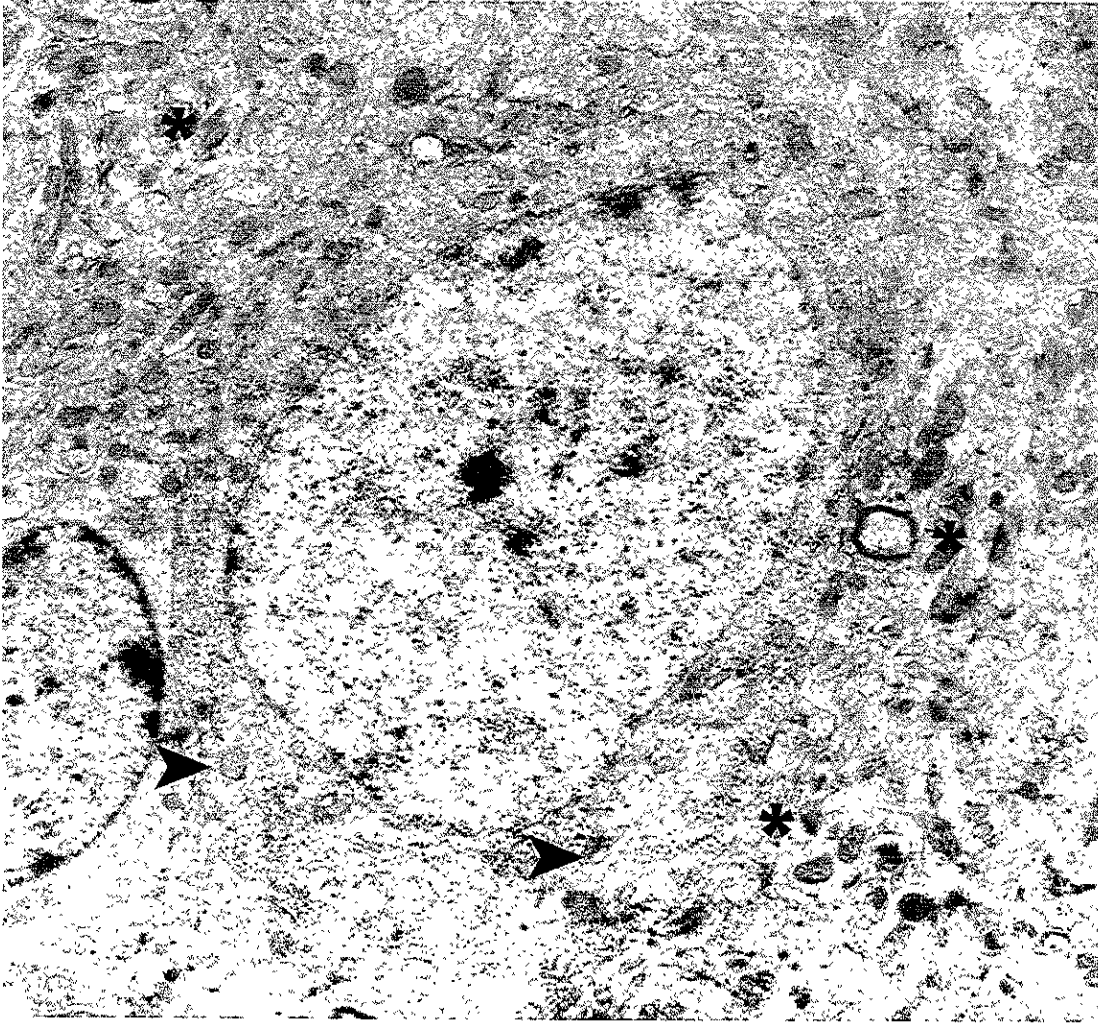


**FIGURA 17.** Ultraestructura de una neurona de la corteza prefrontal del grupo expuesto a  $O_3$  con signos evidentes de neurodegeneración. En esta fotografía se pueden apreciar las cisternas dilatadas del retículo endoplásmico y del aparato de Golgi (▶). En el neuropilo se observan neuritas vacuoladas rodeando al soma (\*) así como también se pueden apreciar algunos botones sinápticos ➤.  
Magnificación: 8350 X

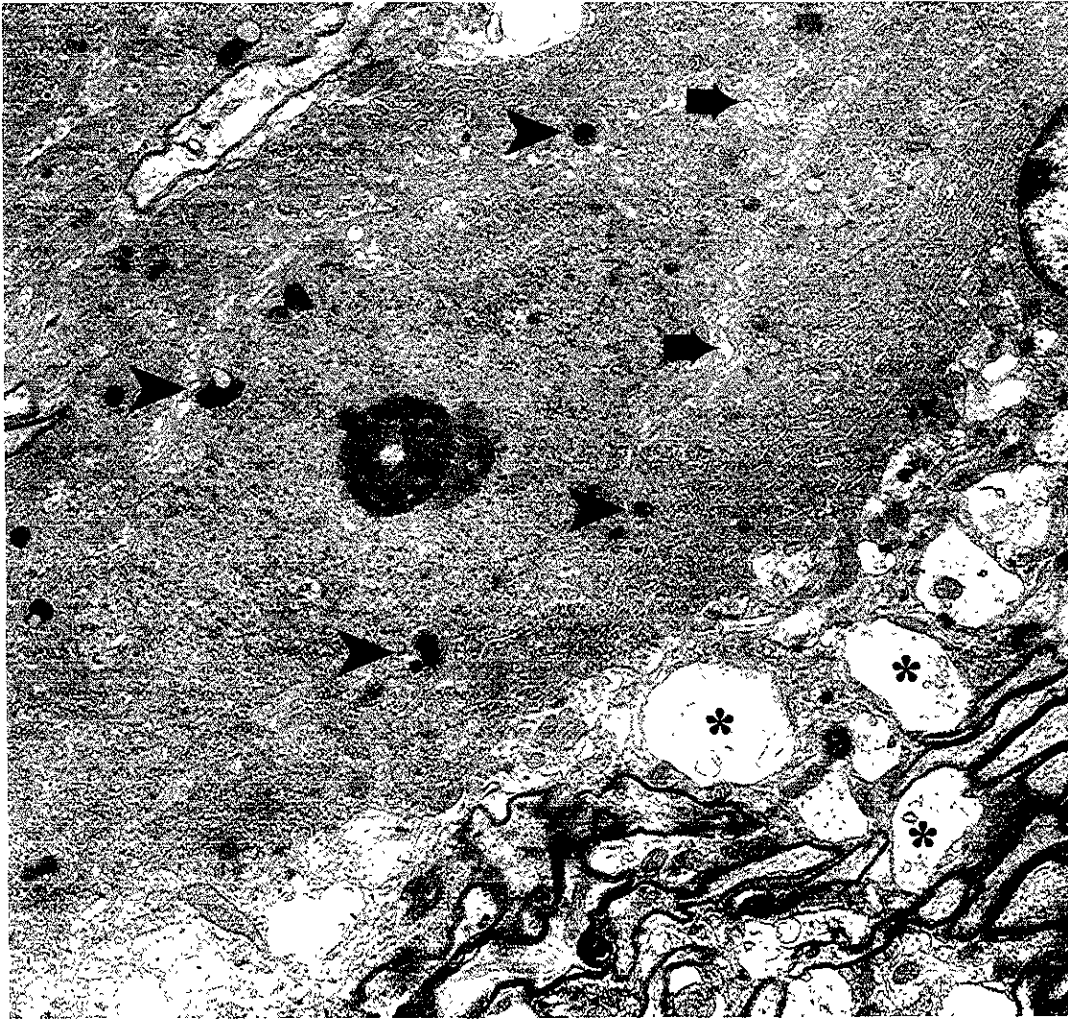


**FIGURA 18.** Ultraestructura de una neurona de la corteza prefrontal del grupo expuesto a  $O_3$  y tratado con taurina. Se aprecia en el citoplasma, que tanto el retículo endoplásmico como las mitocondrias son normales (➡), aunque se nota mayor número de gránulos de lipofuscina en comparación con el grupo control (➤); asimismo, se observa que el neuropilo está bien conservado, en donde se pueden apreciar algunos botones sinápticos (\*).

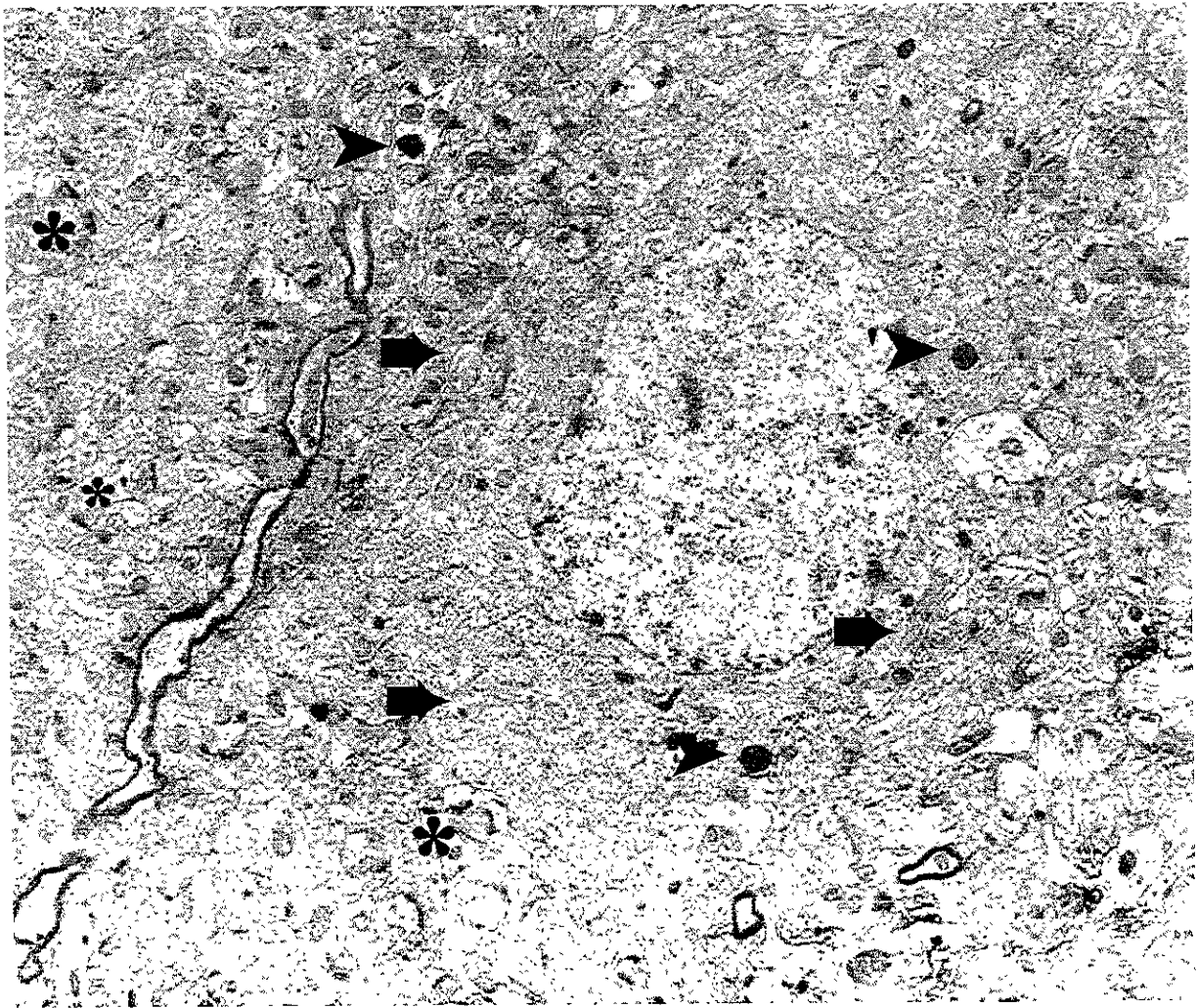
Magnificación: 8350 X



**FIGURA 19.** Ultraestructura de una neurona del estriado del grupo control, con citoplasma, núcleo y organelos de características normales; mitocondrias, retículo endoplásmico y aparato de Golgi (▶). El neuropilo se observa en buenas condiciones, y se pueden apreciar algunas sinapsis (\*).  
Magnificación: 13250 X

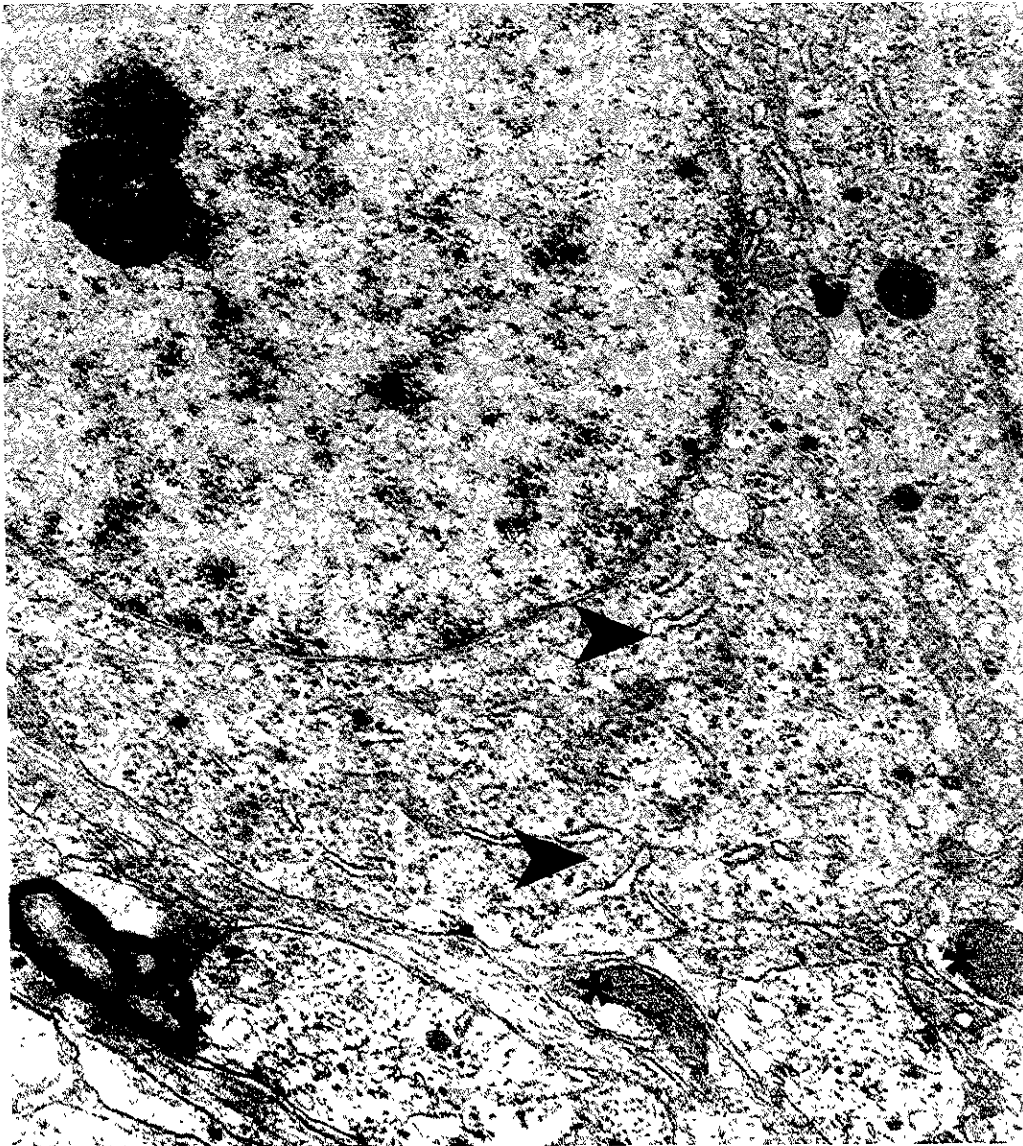


**FIGURA 20.** Ultraestructura de una neurona del estriado del grupo expuesto a O<sub>3</sub> con signos evidentes de neurodegeneración, caracterizados por citoplasma denso, cisternas dilatadas de retículo endoplásmico y aparato de Golgi (▣) y con gránulos de lipofuscina (▶). En el neuropilo se observan neuritas vacuoladas rodeando al soma (\*). 13250X



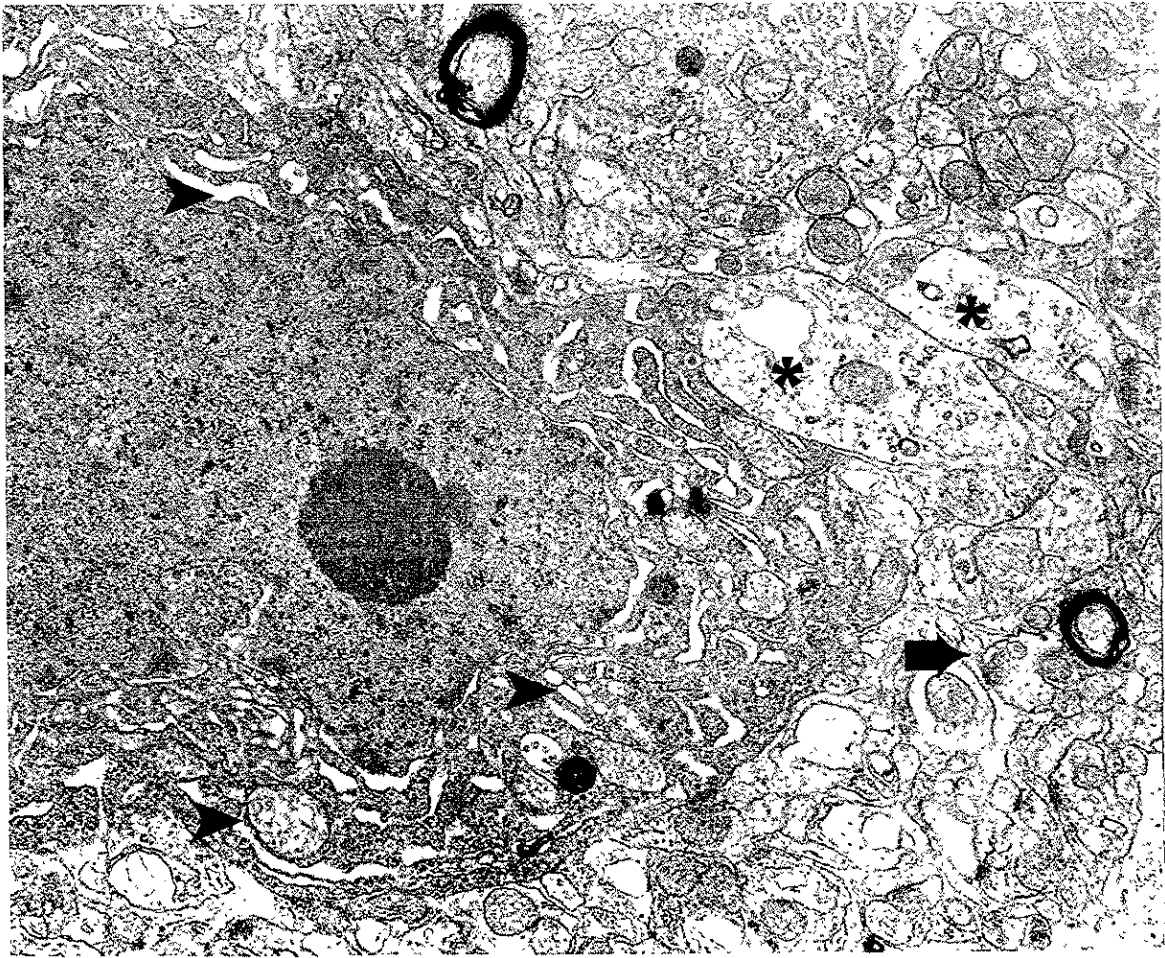
**FIGURA 21.** Ultraestructura de una neurona del estriado del grupo expuesto a  $O_3$  y tratado con taurina. Se aprecia que el citoplasma presenta características normales, notándose el retículo endoplásmico (➡), aunque se observa mayor número de gránulos de lipofuscina en comparación con el grupo control (➤); asimismo, se observa que el neuropilo está bien conservado, en donde se pueden apreciar algunos procesos sinápticos (\*).

Magnificación: 13250 X

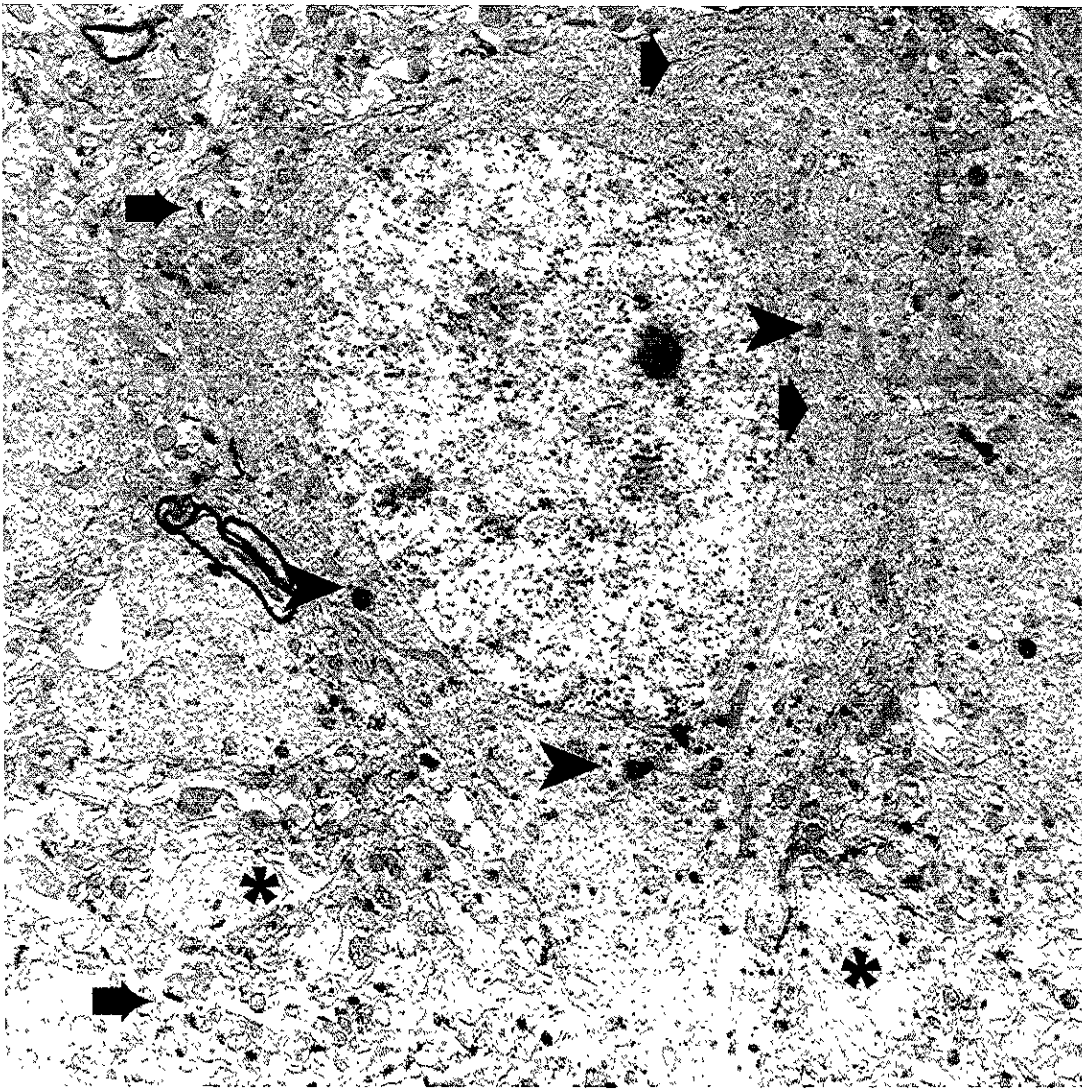


**FIGURA 22.** Ultraestructura de una neurona del hipocampo del grupo control, con citoplasma, núcleo y organelos de características normales; retículo endoplásmico y aparato de Golgi (▶), mitocondrias (\*).

13250 X



**FIGURA 23.** Ultraestructura de una neurona del hipocampo del grupo expuesto a  $O_3$  con signos evidentes de neurodegeneración, caracterizados por citoplasma denso, cisternas dilatadas de retículo endoplásmico y aparato de Golgi, así como también alteraciones en las mitocondrias (▶) En el neuropilo se observan neuritas con edema (\*) y algunos contactos sinápticos (▶).  
13250X



**FIGURA 24.** Ultraestructura de una neurona del hipocampo del grupo expuesto a  $O_3$  y tratado con taurina. Se aprecia que el citoplasma presenta características normales, notándose el retículo endoplásmico en buenas condiciones ( $\blacklozenge$ ), se observa mayor número de gránulos de lipofuscina en comparación con el grupo control ( $\blacktriangleright$ ); asimismo, se observa que el neuropilo está bien conservado, en donde se pueden apreciar algunos procesos sinápticos ( $\blackrightrightarrows$ ) así como también neuritas en donde se observa claramente el citoesqueleto (\*).

Magnificación: 13250 X



## PEROXIDACION DE LIPIDOS

En la gráfica 6 se observa que los niveles de peroxidación de lípidos de las tres estructuras analizadas aumentaron estadísticamente (0.01) en comparación con los niveles de los grupos control y los del grupo expuesto y tratado con taurina. Además, como se puede observar, la estructura que mayor peroxidación presentó fue el estriado, seguido por el hipocampo. Sin embargo, en los animales expuestos y tratados con taurina, dichos niveles disminuyeron acercándose a los niveles del grupo control.

## DISCUSION

Al analizar las estructuras cerebrales de los animales expuestos a  $O_3$  observamos que dicha exposición provocó cambios muy evidentes en la citología y bioquímica de las estructuras analizadas, siendo el hipocampo la estructura más afectada. Asimismo, encontramos cambios en la memoria de largo plazo. Sin embargo, con la aplicación de taurina, después de la exposición a  $O_3$ , en las tres estructuras, los cambios fueron menores, llegando incluso a ser similares a los valores control. A continuación se discutirá sobre cada uno de los hallazgos.

## ALTERACIONES MORFOLOGICAS

Nuestros resultados confirman que ante alguna agresión al sistema nervioso se observa pérdida de espinas dendríticas (Ferrer et al. 1986; Lescaudron et al. 1989; Ingham et al. 1989, 1991; Müller et al. 1993; Sunanda et al. 1995; Drakew et al. 1996; Shepherd, 1996; Jiang et al. 1998; Avila-Costa et al. 1999; Colín-Barenque et al. 1999; Harris, 1999; McEwen et al. 1999). Aquí observamos que ante la exposición a  $O_3$ , se originó una marcada disminución de espinas dendríticas en las tres estructuras, debido probablemente a: A) La pérdida de espinas actúa como un mecanismo celular compensatorio para evitar la muerte por excitotoxicidad (Kucukkaya et al. 1996; Shepherd, 1996), ya que al disminuir el número de espinas se reduce la posibilidad de contactos sinápticos, y con esto la posible hiperexcitabilidad (Cavazos et al. 1991). B) En presencia

## PEROXIDACION DE LIPIDOS

En la gráfica 6 se observa que los niveles de peroxidación de lípidos de las tres estructuras analizadas aumentaron estadísticamente (0.01) en comparación con los niveles de los grupos control y los del grupo expuesto y tratado con taurina. Además, como se puede observar, la estructura que mayor peroxidación presentó fue el estriado, seguido por el hipocampo. Sin embargo, en los animales expuestos y tratados con taurina, dichos niveles disminuyeron acercándose a los niveles del grupo control.

## DISCUSION

Al analizar las estructuras cerebrales de los animales expuestos a  $O_3$  observamos que dicha exposición provocó cambios muy evidentes en la citología y bioquímica de las estructuras analizadas, siendo el hipocampo la estructura más afectada. Asimismo, encontramos cambios en la memoria de largo plazo. Sin embargo, con la aplicación de taurina, después de la exposición a  $O_3$ , en las tres estructuras, los cambios fueron menores, llegando incluso a ser similares a los valores control. A continuación se discutirá sobre cada uno de los hallazgos.

## ALTERACIONES MORFOLOGICAS

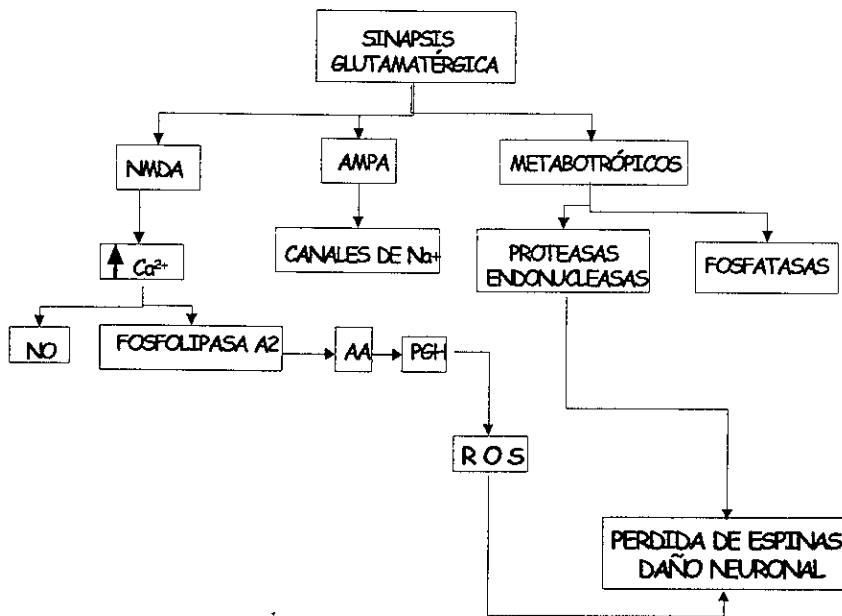
Nuestros resultados confirman que ante alguna agresión al sistema nervioso se observa pérdida de espinas dendríticas (Ferrer et al. 1986; Lescaudron et al. 1989; Ingham et al. 1989, 1991; Müller et al. 1993; Sunanda et al. 1995 ; Drakew et al. 1996; Shepherd, 1996; Jiang et al. 1998; Avila-Costa et al. 1999; Colín-Barenque et al. 1999; Harris, 1999; McEwen et al. 1999). Aquí observamos que ante la exposición a  $O_3$ , se originó una marcada disminución de espinas dendríticas en las tres estructuras, debido probablemente a: A) La pérdida de espinas actúa como un mecanismo celular compensatorio para evitar la muerte por excitotoxicidad (Kucukkaya et al. 1996; Shepherd, 1996), ya que al disminuir el número de espinas se reduce la posibilidad de contactos sinápticos, y con esto la posible hiperexcitabilidad (Cavazos et al. 1991). B) En presencia

de estrés oxidativo se produce aumento de las concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, lo cual ocasiona daño y muerte neuronal (Trump y Berezesky, 1995; Oyama et al. 1996; Shepherd, 1996; Dykens, 1999; Leist y Nicotera, 1999). Se ha demostrado que las espinas son compartimentos individuales de  $\text{Ca}^{2+}$  (Müller y Connor, 1991; Segal, 1995b; Harris, 1999; van Rossum y Hanisch, 1999; Yuste et al. 1999), entonces, al perderse las espinas, disminuirían las concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular y se protegería la célula (Segal, 1995a); o bien C) la pérdida de espinas probablemente se deba a la falta de capacidad de la célula para mantener la homeostasis (Dykens, 1999); como en el caso de la deafferentación de la vía visual (Globus y Scheibel, 1967), o el de las neuronas espinosas medianas del estriado en la enfermedad de Parkinson (Ingham et al. 1989, 1991 y 1997), en el caso de alcoholismo crónico (Ferrer et al. 1986; Lescaudron et al. 1989) o en el estrés crónico (Watanabe et al. 1992; Sunanda et al. 1995; Magariños et al. 1996 y 1997), en donde además de la pérdida de homeostasis se menciona la posibilidad de que la espina se pierda por falta o por exceso de contactos sinápticos (Shepherd, 1996). Y finalmente D) la pérdida de espinas reduce las posibilidades plásticas de la célula en un intento de controlar su homeostasis, ya que las espinas son consideradas como unidades funcionales en la plasticidad cerebral. Existen varios estudios que indican que los cambios en la morfología y en el número de las espinas producen variaciones en los potenciales sinápticos, por ejemplo en la LTP que implica procesos de aprendizaje y memoria (Moser et al. 1994; Hosokawa et al. 1995; Engert y Bonhoeffer, 1999; Smythies, 1999; Goldin et al. 2001).

Ahora bien, Smythies (1997) propone la teoría del balance redox (óxido-reducción) de la sinapsis glutamatérgica para explicar la pérdida de las espinas dendríticas. En la sinapsis glutamatérgica intervienen tres tipos de receptores en esta sinapsis: 1) los AMPA, que abren los canales de  $\text{Na}^+$  y median la depolarización de la membrana post-sináptica, 2) los receptores NMDA que abren los canales de  $\text{Ca}^{2+}$ , y 3) los receptores metabotrópicos que hay de tres tipos: (a) los tipo I que activan las proteasas y las nucleasas y que por lo tanto son neurodestructores, y (b) los tipos 2 y 3, que activan a las fosfatasas y promueven el crecimiento del citoesqueleto de las espinas. Señala que

existen dos cascadas post-sinápticas después de la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  mediada por la activación de los receptores NMDA: 1) la activación de la fosfolipasa A2, la cual provoca la liberación del ácido araquidónico (aa) de la membrana y con esto se produce la activación de la prostaglandina H sintasa (PGH); y 2) la activación del óxido nítrico sintasa (NO). La activación de estas dos enzimas, particularmente la PGH, conduce a la liberación de grandes cantidades de ROS, particularmente de peróxido de hidrógeno (ver figura 25).

## HIPÓTESIS DEL REDOX



**FIGURA 25.** Teoría del redox de la sinapsis glutamatergica en la pérdida de espinas y el daño neuronal. NO- óxido nítrico; aa- ácido araquidónico; PGH- prostaglandina H.

El destino de la sinapsis glutamatergica depende entonces de su balance redox. Si este balance es prooxidante, las ROS tenderían a suprimir a la espina dendrítica y a

producir daño neuronal. Si el balance es antioxidante, el efecto de las ROS sería neutralizado y las estructuras pre y post sinápticas se conservarían.

Con respecto a la ultraestructura se observó degeneración caracterizada por células oscuras con citoplasma denso, gránulos de lipofuscina, cisternas dilatadas de retículo endoplásmico y de aparato de Golgi, con grandes vacuolas en el citoplasma y edema mitocondrial. Todo esto corresponde a un proceso de necrosis (Clarke, 1999). Este tipo de muerte celular generalmente ocurre inmediatamente después de una agresión excitotóxica a la neurona (Ingvar et al. 1988). En experimentos de neuronas en cultivo se ha mostrado que la exposición intensa a glutamato es seguida de edema en cuestión de horas y en ocasiones de minutos debido al influjo de  $\text{Na}^+$ , el cual produce la entrada de  $\text{Cl}^-$  seguida de la entrada de agua (Rothman, 1985). Si el estímulo es suficientemente intenso, el edema excesivo da lugar a la muerte neuronal. Ahora bien, *in vivo* la muerte celular además de lo anterior presenta la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  (Trump y Berezesky, 1995; Oyama et al. 1996; Shepherd, 1996; Dykens, 1999; Leist y Nicotera, 1999). Al parecer, las células que sobreviven a los efectos inmediatos de la agresión excitotóxica mueren después de 48 horas por apoptosis (Sloviter et al. 1996; Afford y Randhawa, 2000; Kirkland y Franklin, 2001), y ya que en nuestro caso los animales fueron sacrificados a las 24 horas, después de ser sometidos a daño oxidativo, los cambios que observamos corresponden a la muerte celular por necrosis. Los excesivos niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  producen daño celular, al activar enzimas hidrolíticas que propician un gasto exagerado de energía, mayor producción de radicales libres, degradación del citoesqueleto y finalmente muerte celular (Leist y Nicotera, 1999). Otro aspecto importante en la degeneración celular es el papel que juegan las mitocondrias en este proceso. Las mitocondrias tienen un doble papel en la toxicidad producida por el  $\text{Ca}^{2+}$  (Dykens, 1999). Por un lado parece que reducen la sobrecarga del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular atrapando al ión; y por otro lado, después de que la célula recibe una agresión, se forma un poro de transición a través del cual el  $\text{Ca}^{2+}$  es liberado de este depósito, con la consecuente disminución del ATP y la pérdida del control membranar, generando especies reactivas de oxígeno (ROS) (Leist y Nicotera,

1999), por lo que se considera que la mitocondria puede intervenir en la recuperación de las células o acelerando su degeneración cuando sus propios mecanismos se alteran (Zamzami et al. 1996). La liberación mitocondrial de  $\text{Ca}^{2+}$  es estimulada por el estrés oxidativo (Leist y Nicotera, 1999), así, se ha reportado que los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular aumentan significativamente con NMDA (Garthwaite y Garthwaite, 1986; Kucukkaya et al. 1996) y en las neuronas del hipocampo después de un infarto cerebral (Simon et al. 1984).

Como se pudo observar, la estructura en la que las neuronas tuvieron mayor pérdida de espinas y mayor número de neuronas degeneradas fue el hipocampo, al parecer esta estructura es una de las más vulnerables al estrés oxidativo (van Gendler, 1992; Olanow, 1993a; Palmer et al. 1994; Stein-Behrens et al. 1994; Wilde et al. 1997; Johnston y Amaral, 1998; Rivas-Arancibia et al. 1998; Dykens, 1997 y 1999), por las siguientes razones:

1. La vulnerabilidad de las diferentes poblaciones neuronales podría tener relación con la variable concentración de proteínas amortiguadoras de  $\text{Ca}^2$  tales como la calbindina o la parvoalbúmina (Freund et al. 1991). Se ha demostrado que las neuronas de CA1 presentan muy baja inmunorreactividad a estas proteínas (Johnston y Amaral, 1998), por lo que se considera que probablemente esa sea una de las razones por las cuales las neuronas analizadas presentaron mayor degeneración (Wilde et al. 1997).
2. Se ha postulado la participación del hipocampo en procesos de aprendizaje (Moser et al. 1994; Hosokawa et al. 1995; Engert y Bonhoeffer, 1999; Smythies, 1999); una posible explicación para dicho proceso lo constituye el hecho de que ahí se encuentran gran cantidad de circuitos reverberantes (LTP), lo que implica que estas neuronas se autoestimulan continuamente. Ahora bien, aunado a lo anterior y en presencia de estrés oxidativo, se podría pensar que las excesivas descargas eléctricas inducen una liberación masiva de neurotransmisores excitatorios que activan a los receptores, por lo que se abren los canales iónicos y se produce un incremento excesivo de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular (Shin y Lee, 1999).

3. Los canales iónicos de los receptores NMDA son altamente permeables al  $\text{Ca}^{2+}$  (Bar-Peled y Rothstein, 1999). Se ha demostrado que las neuronas piramidales contienen gran cantidad de estos receptores (Shin y Lee, 1999), y son precisamente las neuronas que se analizaron en el presente trabajo, por lo que probablemente esta sea otra causa de su vulnerabilidad (Wilde et al. 1997).
4. Matsumoto y colaboradores (1991) demostraron mediante la técnica de microdiálisis para medir la liberación de neurotransmisores excitatorios (glutamato y aspartato) e inhibitorios (GABA y taurina) en el hipocampo de rata en un modelo de isquemia, encontraron que la liberación de los excitatorios se redujo y la liberación del GABA se mantuvo sin cambios y la de la taurina aumentó el 50%. La disminución en la liberación de glutamato y aspartato fue atribuida al daño de las neuronas piramidales de CA1 —que contienen esos neurotransmisores—, por lo que concluyeron que esas neuronas son más vulnerables a la isquemia que las neuronas que contienen GABA y taurina.

## ALTERACIONES EN LA MEMORIA

Los datos obtenidos muestran que los animales expuestos a  $\text{O}_3$  presentaron alteraciones en la memoria de largo plazo. Las tres estructuras analizadas juegan un importante papel en los procesos de memoria (Shepherd, 1998), siendo el hipocampo la estructura más involucrada con dicha función (Eichenbaum, 1994; Tranel y Damasio, 1995). Ahora bien, existen reportes en donde se señala una marcada correlación entre la pérdida de espinas en el hipocampo y las alteraciones de memoria durante el alcoholismo (Ferrer et al. 1986; Lescaudron et al. 1989), indicando que la disfunción en la memoria se deba a las alteraciones que han sufrido las neuronas del hipocampo por un lado, y por otro, probablemente se deba también a los daños que observamos en las células del estriado y la corteza, ya que son estructuras que juegan un papel importante en los procesos de memoria.

## PEROXIDACION DE LIPIDOS

Existen numerosos reportes donde se indica que la exposición a  $O_3$ , dependiendo de la dosis, produce un estado de estrés oxidativo durante el cual aumentan los niveles de peroxidación de lípidos (Wolff et al. 1986; Luah, 1992; Coyle y Puttfarcken, 1993; Segura-Aguilar, 1993; Paz, 1997; Rivas-Arancibia et al. 1998; Lechuga et al. 1999; Rivas-Arancibia et al. 2000). En el presente experimento se observó incremento en la peroxidación de lípidos en las tres estructuras analizadas. En este caso, la estructura que mostró mayor alteración fue el estriado. Una posible explicación de lo anterior es que los ganglios basales contienen dopamina y un alto contenido de lípidos y metales, (Burke, 1999); además la catalasa, la cual se encarga de la descomposición del peróxido de hidrógeno, está ausente o en muy bajos niveles en estas estructuras (Riederer et al. 1989; Olanow, 1993a). Más aún, se ha demostrado que ciertos receptores presentan una mayor vulnerabilidad al estrés oxidativo, tal es el caso de los receptores dopaminérgicos, especialmente los  $D_2$  y los receptores colinérgicos muscarínicos (Joseph y Cutler, 1995; Carney et al. 1995; Romero-Ramos et al. 1997). Dichos receptores se encuentran en grandes cantidades en las neuronas estriatales analizadas. Por otro lado, se ha demostrado que el número de sitios de unión de los receptores NMDA de las neuronas espinosas medianas es muy alto, por lo que se ha considerado que la excitotoxicidad en el estriado juega un importante papel en la enfermedad de Parkinson (Burke, 1999), enfermedad que ha sido fuertemente correlacionada con niveles altos de radicales libres (Calne, 1992). Se ha reportado que las neuronas dopaminérgicas son particularmente vulnerables porque generan ROS durante el metabolismo de la dopamina. El  $H_2O_2$  es generado en la síntesis de dopamina por la tirosina hidroxilasa en su catabolismo por la MAO y por la autooxidación no enzimática; estas neuronas contienen además neuromelanina, la cual se une a metales como el hierro y promueve la reacción del  $H_2O_2$  con metales reducidos para formar el  $OH^\cdot$  que es altamente reactivo (Riederer et al. 1989; Bartzokis et al. 1997), por lo que se cree que esa es la razón de las alteraciones en las moléculas pro y antioxidantes en pacientes con enfermedad de Parkinson. Además se encuentra aumento de hierro lo cual produce mayor estrés oxidativo (Olanow, 1993b;



Bartzokis et al. 1997; Burke, 1999).

## EFECTO DE LA TAURINA

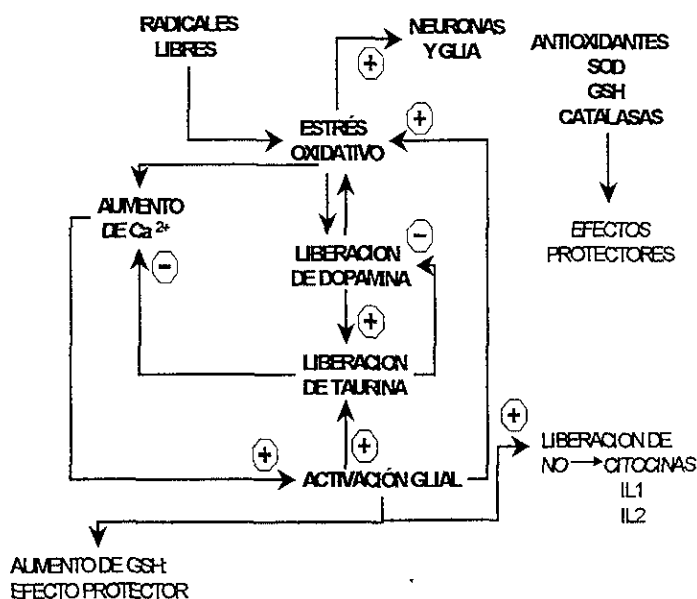
A pesar de las alteraciones que ocasionó la exposición a  $O_3$ , la aplicación i.p. de taurina produjo un efecto protector muy evidente. Lo anterior podría ser debido a sus propiedades antioxidantes (Auroma et al. 1988) o bien a la modulación que ejerce sobre el  $Ca^{2+}$ , ya que la taurina inhibe la recaptura de  $Ca^{2+}$ . Se considera que tiene un efecto protector en presencia de excitotoxicidad (Magnusson et al. 1990; Wu et al. 1994; Lidsky et al. 1995; Hada et al. 1996) además de que regula la osmolaridad de la célula (Lombardini, 1992b; Pasantes et al. 1996).

Los resultados muestran que la taurina aplicada después de la exposición a  $O_3$ , tuvo un efecto protector sobre la pérdida de espinas dendríticas en las neuronas espinosas medianas del estriado y en las neuronas piramidales de hipocampo, siendo este efecto menos pronunciado en las neuronas piramidales de la corteza.

En la corteza prefrontal, a pesar de que se presentó menor pérdida en el número de espinas después de la exposición a  $O_3$  y con el tratamiento de taurina, los valores son significativamente diferentes a los de los controles, en comparación con el estriado y el hipocampo. Una posible explicación de lo anterior es que el 85% de las sinapsis que llegan a las espinas de las dendritas piramidales son excitatorias (Ahmed et al. 1994; Anderson et al. 1994; Del Arco y Mora, 1999). Como ya se ha mencionado, el estrés oxidativo provoca la liberación de glutamato y el consecuente aumento de  $Ca^{2+}$  intracelular (Trump y Berezsky, 1995; Kucukkaya et al. 1996; Oyama et al. 1996; Shepherd, 1996; Dykens, 1999; Leist y Nicotera, 1999), lo anterior aunado a los contactos sinápticos excitatorios ya existentes, podría ser la razón por la que el tratamiento con taurina no previno del todo la pérdida de espinas en esa estructura.

Por otra parte se observó que en el estriado, el tratamiento con taurina después de la exposición a  $O_3$  si proporcionó protección a las neuronas espinosas medianas. Lo anterior podría deberse a que en el estriado la dopamina se libera ante la presencia de alguna agresión, esta liberación produce más radicales libres e incremento de las

concentraciones extracelulares de glutamato (Exposito et al. 1999). Sin embargo los astrocitos tienen receptores a dopamina y contienen taurina, por lo tanto cuando aumenta la liberación de dopamina, ésta estimula la liberación de taurina en los astrocitos (Mongin et al. 1999; Saransaari y Oja, 1999b), dicha taurina inhibe la liberación de dopamina de las neuronas, produciendo un efecto protector para la célula (Aschner, 1997; Ruotsalainen et al. 1998; Brand et al. 1999; Cardin et al. 1999) (ver figura 26). Consideramos que el efecto protector de la taurina aumenta si se aplica por vía exógena después de la agresión, como se ha demostrado por ejemplo en animales tratados con haloperidol, en donde se encontraron que los cambios en la neuroquímica del estriado se pueden prevenir con la aplicación de taurina (Lidsky et al. 1995).



**FIGURA 26.** Efecto protector de la taurina endógena en el estriado. En esta figura se muestra el efecto protector de la taurina ante el aumento de radicales libres. En donde se observa que el estrés oxidativo produce por un lado que la neurona y la glía activen sus mecanismos antioxidantes, y por otro la liberación neuronal de dopamina, la cual produce mayor número de radicales libres y activación de los canales de  $Ca^{2+}$ . La dopamina liberada produce liberación de taurina en los astrocitos, ésta a su vez produce que se inhiba la liberación de dopamina, proporcionando un efecto protector. Por otro lado, el estrés oxidativo provoca aumento de  $Ca^{2+}$ , dicho aumento produce activación glial, liberación de taurina y disminución de las concentraciones de  $Ca^{2+}$ , por lo tanto proporcionando otro efecto protector. La activación glial también provoca mayor número de radicales libres (ver texto). SOD- Superóxido dismutasa; GSH- glutation dismutasa; NO-óxido nítrico; IL- interleucinas

Ahora bien, en cuanto al hipocampo, observamos que el tratamiento con taurina después de la exposición a  $O_3$ , en general previno las alteraciones citológicas y bioquímicas. Se ha demostrado que en el hipocampo también hay liberación de taurina en presencia de daño neuronal y que ésta ejerce un efecto protector (Huxtable, 1992; Lombardini, 1992b; Wu et al. 1992), además se ha reportado que la taurina exógena protege a las neuronas del hipocampo en casos de hipoxia (Magnusson et al. 1990; Wu et al. 1994; Lidsky et al. 1995; Hada et al. 1996).

En cuanto a la peroxidación de lípidos, los resultados concuerdan con los obtenidos por diversos autores (Nakashima et al. 1985; Rivas-Arancibia et al. 1998; Rivas-Arancibia et al. 2000) en donde se demuestra el efecto protector de la taurina.

Finalmente consideramos que el efecto protector que tuvo la taurina en las tres estructuras analizadas se vió reflejado en la prueba de memoria de largo plazo, ya que los animales expuestos a  $O_3$  y tratados con taurina presentaron una ejecución muy similar a los animales control en esta prueba.

## CONCLUSION

Nuestros resultados muestran que:

1. La exposición aguda a  $O_3$ , dependiendo de la dosis, es un modelo no invasivo de estrés oxidativo que permite el estudio de la participación de los radicales libres en los procesos neurodegenerativos.
2. La degeneración neuronal provocada por la exposición a  $O_3$  se caracterizó por células oscuras con citoplasma denso, cisternas dilatadas de retículo endoplásmico y de aparato de Golgi, vacuolas en el citoplasma y edema mitocondrial, alteraciones muy similares a las observadas en las enfermedades neurodegenerativas.
3. Se observó pérdida de espinas dendríticas en las tres estructuras analizadas, aspecto que se correlaciona con las alteraciones de memoria, por lo que se podría considerar como un indicador de disminución en la plasticidad cerebral.

Ahora bien, en cuanto al hipocampo, observamos que el tratamiento con taurina después de la exposición a O<sub>3</sub>, en general previno las alteraciones citológicas y bioquímicas. Se ha demostrado que en el hipocampo también hay liberación de taurina en presencia de daño neuronal y que ésta ejerce un efecto protector (Huxtable, 1992; Lombardini, 1992b; Wu et al. 1992), además se ha reportado que la taurina exógena protege a las neuronas del hipocampo en casos de hipoxia (Magnusson et al. 1990; Wu et al. 1994; Lidsky et al. 1995; Hada et al. 1996).

En cuanto a la peroxidación de lípidos, los resultados concuerdan con los obtenidos por diversos autores (Nakashima et al. 1985; Rivas-Arancibia et al. 1998; Rivas-Arancibia et al. 2000) en donde se demuestra el efecto protector de la taurina.

Finalmente consideramos que el efecto protector que tuvo la taurina en las tres estructuras analizadas se vió reflejado en la prueba de memoria de largo plazo, ya que los animales expuestos a O<sub>3</sub> y tratados con taurina presentaron una ejecución muy similar a los animales control en esta prueba.

## CONCLUSION

Nuestros resultados muestran que:

1. La exposición aguda a O<sub>3</sub>, dependiendo de la dosis, es un modelo no invasivo de estrés oxidativo que permite el estudio de la participación de los radicales libres en los procesos neurodegenerativos.
2. La degeneración neuronal provocada por la exposición a O<sub>3</sub> se caracterizó por células oscuras con citoplasma denso, cisternas dilatadas de retículo endoplásmico y de aparato de Golgi, vacuolas en el citoplasma y edema mitocondrial, alteraciones muy similares a las observadas en las enfermedades neurodegenerativas.
3. Se observó pérdida de espinas dendríticas en las tres estructuras analizadas, aspecto que se correlaciona con las alteraciones de memoria, por lo que se podría considerar como un indicador de disminución en la plasticidad cerebral.

4. El estrés oxidativo causado por la exposición a  $O_3$  desempeña un papel importante en la degeneración neuronal.
5. La taurina exógena funciona como antioxidante, ya que reduce la peroxidación de lípidos. Presenta un efecto protector neuronal, ya que redujo la pérdida de espinas y evitó la degeneración neuronal. Más aún, las alteraciones de memoria que presentaron los animales expuestos a  $O_3$ , fueron prevenidas en los animales expuestos y tratados con taurina, debido probablemente al efecto protector que tuvo en las neuronas de las estructuras cerebrales analizadas, ya que son estructuras involucradas con procesos mnésicos.

## REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Adams, J.D., Mukherjee, S.K., Klaidman, L., Morales, M., Williams, L.R., Inouye, G. y Cummins, V. (2000) Ischemic and metabolic stress-induced apoptosis. En, Giuseppe, P., Enrique C. y Lester P. (Eds) *Free Radicals in Brain Pathophysiology*. Marcel Dekker, N.Y. pp: 55-76.
- Afford, S. y Randhawa, S. (2000) Desmystified apoptosis. *Molecular Pathology*, 53(2) 55-63.
- Ahmed, B., Anderson, J., Douglas, R., Martin, K. y Nelson, C. (1994) Polyneuronal innervation of spiny neurons in cat visual cortex. *J. Comp. Neurol.* 341: 39-49.
- Aikawa R; Komuro I; Yamazaki T; Zou Y; Kudoh S; Tanaka M; Shiojima I; Hiroi Y; Yazaki Y. (1997) Oxidative stress activates extracellular signal-regulated kinases through Src and Ras in cultured cardiac myocytes of neonatal rats. *J Clin Invest.* 100 (7): 1813-21.
- Alexander, G. y Crutcher, M.D. (1990) Functional architecture of basal ganglia circuits: Neural substrates of parallel processing. *TINS.* 13,7, 266-271.
- Alger, B.E. y Nicoll, R. (1982) Feed-forward dendritic inhibition in rat hippocampal pyramidal cells studied in vitro. *J. Physiol.* 328: 105-123.
- Ames, B.N., Shigenaga, M.K., Hagen, T.M. (1993) Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 90: 7915-7922.
- Anderson, J.C., Douglas, R., Martin, K.A.C., Nelson, C. y Whitteridge, D. (1994) Synaptic output of physiologically identified spiny neurons in cat visual cortex. *J. Comp. Neurol.* 341: 16-24.
- Arbuthnott, G.W. e Ingham, C.A. (1993) The thorny problem of what dopamine does in psychiatric disease. En: Arbuthnott, G.W. y Emson, P.C. (Eds.) *Progress in Brain Research*, Vol. 99 Elsevier Science Publishers B.V. p. 341-350.
- Arito, H., Uchyama, I., Yokoyama, E. (1990) Acute effects of ozone EEG activity, sleep-wakefulness and heart rate in rats. *Industrial Health.* 30: 23-34.
- Aschner, M. (1997) Astrocyte metallothioneins (Mts) and their neuroprotective role. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 825: 334-347.
- Auroma, O.I., Halliwell, B.M., Hoey and Butler. (1988) The antioxidant action of taurine, hypotaurine and they metabolic precursors. *Biochem. J.* 256: 251-255.

Avila-Costa, M.R., Colín-Barenque, L., Fortoul, T.I., Machado-Salas, J.P., Espinosa-Villanueva, J, Rugerio-Vargas, C. y Rivas-Arancibia, S. (1999) Memory deterioration in an oxidative stress model and its correlation with cytological changes on rat hippocampus CA1. *Neurosci. Lett.* 270: 107-109.

Baddeley, A. (1995) Working Memory. En: M.S. Gazzaniga (ed.) *The Cognitive Neuroscience*. The MIT Press, Cambridge, Massachusetts, London, England.

Bailey, C.H. and Kandel, E.R. (1993) Structural changes accompanying memory storage. *Annu. Rev. Physiol.* 55: 397-426.

Banks, M.A., Porter, D.W., Martin, W.G. y Castranova, V. (1992) Taurine protects against oxidant injury to rat alveolar pneumocytes. En B. Lombardini, S.W. Schaffer y J. Azuma (eds) *Taurine Nutritional Value and Mechanisms of Action*. Plenum Press, N.Y. pp. 341-355.

Bannister, N.J. y Larkman, A.U. (1995) Dendritic morphology of CA1 pyramidal neurones from rat hippocampus: II. Spine distributions. *J. Comp. Neurol.* 360: 161-171.

Bar-Peled, O., y Rothstein, J.D. (1999) Antiglutamate therapies for neurodegenerative disease. En: E.V. Koliastos y R.R. Ratan (eds) *Cell Death and Diseases of the Nervous System*. Humana Press, New Jersey pp. 633-647.

Bartzokis G; Beckson M; Hance DB; Marx P; Foster JA; Marder SR. (1997) MR evaluation of age-related increase of brain iron in young adult and older normal males. *Magn Reson Imaging.* 15 (1): 29-35 .

Beal, M.F. (1992) Mechanisms of excitotoxicity in neurologic diseases. *FASEB J.* 6: 3338-3344.

Benuck, M., Banay-Schwartz, M. y Lajtha, A. (1993) Proteolytic activity is altered in brain tissue of rats upon chronic exposure to ozone. *Life Sciences.* 58: 877-881.

Bernander, O., Koch, C. y Douglas, R.J. (1994) Amplification and linearization of distal synaptic input to cortical pyramidal cells. *J. Neurophysiol.* 72: 2743-2753.

Bkaily, G., Haddad, G., Jaalouk, D., Gros-Louis, N., Bencherkroun, T.B., Naik, H., Pothier, P., D'Orleans-Juste, P, Bui, M, Wang, S. y Sperelakis, N. (1996) Modulation of  $Ca^{2+}$  and  $Na^{+}$  transport by taurine in heart and vascular smooth muscle. En R.J. Huxtable, J. Azuma, K. Kuriyama, M. Nakagawa y A. Baba (eds) *Taurine 2 Basic and Clinical Aspects*. Plenum Press, N.Y. pp. 263-273.

Borlongan, C.V., Kanning, K., Poulos, S.G., Freeman, T.B., Cahill, D.W. and Sanberg, P.R.

(1996) Free radical damage and oxidative stress in Huntington's disease. *J. Fla. Med. Assoc.* 83(5): 335-41.

Brand, A., Leibfritz, D. y Richter-Landsberg, C. (1999) Oxidative stress-induced metabolic alterations in rat brain astrocytes studied by multinuclear NMR spectroscopy. *J. Neurosci. Res.* 58(4): 576-585.

Brown, T.H. y Zador, A.M. (1990) Hippocampus. En: Shepherd, G.M. (Ed.) *The synaptic organization of the brain.* Oxford University Press, N.Y. pp 346-388.

Burgess, J.W. y Coss, R.G. (1983) Rapid effect of biologically relevant stimulation on tectal neurons: changes in dendritic spine morphology after nine minutes are retained for twenty-four hours. *Brain Res.* 266: 217-223.

Burke, R.E. (1999) Parkinson's disease. En: E.V. Koliastos y R.R. Ratan (eds) *Cell Death and Diseases of the Nervous System.* Humana Press, New Jersey pp. 459-475.

Calderón Garcidueñas, L. y Roy Ocotla, G. (1993) Nasal cytology in southwest metropolitan Mexico city inhabitants: a pilot study. *Environ. Health Perspectives.* 101: 138-144.

Calne, D.B. (1992) The free radical hypothesis in idiopathic parkinsonism: Evidence against it. *Ann. Neurol.* 32: 799-803.

Cardin, V., Peña-Segura, C. y Pasantes-Morales, H. (1999) Activation and inactivation of taurine efflux in hyposmotic and isosmotic swelling in cortical astrocytes: role of ionic strength and cell volume decrease. *J. Neurosci. Res.* 56(6): 659-667.

Carney, J.M., Smith, C.D., Carney, A.M., Butterfield, D.A. (1995) Aging- and oxygen-induced modifications in brain biochemistry and behavior. *Ann New York Acad. Sci.* 738: 44-53.

Carpenter, M.B. (1981) *Anatomy of the corpus striatum and brain stem integrating systems.* En: Brooks, V. (ed.) *Handbook of Physiology: The nervous system, motor control.* American Physiological Society, Bethesda, MD.

Carpenter, M.B. (1991) *Core text of neuroanatomy* 4<sup>th</sup> edition Williams and Wilkins, Baltimore USA.

Castellani, R., Smith, M.A., Richey, P.L. and Perry, G. (1996) Glycoxidation and oxidative stress in Parkinson disease and diffuse Lewy body disease. *Brain Res.* 737(1-2): 195-200.

Castleman, W.L., Dungworth, D.L., Schwartz, L.W., Tyler, W.S. (1980) Acute respiratory



bronchiolitis: an ultrastructural and autoradiographic study of epithelial cell injury and renewal in rhesus monkeys exposed to ozone. *Am. J. Pathol.* 98:811-840.

Cavazos, J.E., Golarai, G. y Sutula, T.P. (1991) Mossy fiber synaptic reorganization induced by kindling: time course of development, progression and permanence. *J. Neurosci.* 11: 2795-2803.

Chagnac-Amitai, Y., Luhmann, H. y Prince, D. (1990) Burst-generating and regular spiking layer 5 pyramidal neurons of rat neocortex have different morphological features. *J. Comp. Neurol.* 296: 598-613.

Chan, P.H., Fiskman, R.A. (1980) Transient formation of superoxide radicals in polyunsaturated fat acid-induced brain swelling. *J. Neurochem.* 35:1004-1007.

Choi, D.W. (1988) Glutamate neurotoxicity and diseases of the nervous system. *Neuron* 1: 623-634.

Ciriolo, M.R., Fiskin, K., De Martino, A., Corasaniti, M.T., Nistico, G., Rolitio, G. (1991) Age-related changes in CuZn superoxide dismutase, Se-dependent and -independent glutathione peroxidase and catalase activities in specific areas of rat brain. *Mech. Ageing. Dev.* 61:287-297.

Clarke, P.G.H. (1999) Apoptosis versus necrosis. How valid a dichotomy for neurons? En: E.V. Koliastos y R.R. Ratan (eds) *Cell Death and Diseases of the Nervous System*. Humana Press, New Jersey pp. 3-29.

Colín-Barenque, L., Avila-Costa, M.R., Fortoul, T., Rugerio-Vargas, C., Machado-Salas, J.P., Espinosa-Villanueva, J. y Rivas-Arancibia, S. (1999) Morphologic alterations of the olfactory bulb after acute ozone exposure in rats. *Neurosci. Lett.* 274: 1-4.

Coté, L. y Crutcher, M.D. (1991) The basal ganglia. En: Kandel, E.R., Schwartz, J.H. y Jessell, T.M. (Eds.) *Principles of neural science*. Elsevier, USA. pp. 647-659.

Cotman, C.W., and Nadler, J.V. (1978) Neuronal plasticity. C.W. Cotman (ed.) Raven Press, New York, pp. 227-271.

Cottet-Emard, J.M., Dalmaz, Y., Pequignot, J., Peyrin, L., Pequignot, J.M. (1997). Long-term exposure to ozone alters peripheral and central catecholamine activity in rats. *Pflugers Arch.* 433(6): 744-749.

Coyle, J.T. y Puttfarcken, P. (1993) Oxidative stress, glutamate and neurodegenerative disorders. *Science* 262: 698-695.

Cramer, K.S. y Sur, M. (1995) Activation-dependent remodeling of connections in the mammalian visual system. *Curr. Opin. Neurobiol.* 5: 106-111.

Cross, C.E., Reznick, A.Z., Packer, L., Davis, P.A., Susuki, Y.J., Halliwell, B. (1992) Oxidative damage to human plasma proteins by ozone. *Free Rad. Res. Comms.* 15:347-352.

Del Arco, A. y Mora F. (1999) Effects of endogenous glutamate on extracellular concentrations of GABA, dopamine, and dopamine metabolites in the prefrontal cortex of freely moving rat: involvement of NMDA and AMPA/KA receptor. *Neurochem. Res.* 24(8): 1027-1035.

Devlin, R.B., Raub, J.A. y Folinsbee, L.J. (1997) Health effects of ozone. *Science and Medicine.* May-Jun: 8-17.

Díaz-Cintra, S., García-Ruiz, M., Corkidi, G. y Cintra, L. (1994) Effects of prenatal malnutrition and postnatal nutritional rehabilitation on CA3 hippocampal pyramidal cells in rats of four ages. *Brain Res.* 662: 117-126.

Douglas, R. y Martin, K. (1998) Neocortex. En: Shepherd, G.M. (Ed.) *The synaptic organization of the brain.* Oxford University Press, N.Y. pp 459-509.

Drakew, A., Müller, M., Gähwiler, B.H., Thompson, S.M. y Frostecher, M. (1996) Spine loss in experimental epilepsy: quantitative light and electron microscopic analysis of intracellularly stained CA3 pyramidal cells in hippocampal slice cultures. *Neuroscience.* 70(1): 31-45.

Dubinsky, J.M., Kristal, B.S. y Elizondo-Fournier, M. (1995) An obligate role for oxygen in the early stages of glutamate-induced, delayed neuronal death. *J. Neurosci.* 15: 7071-7078.

Dunnet et al. Passive avoidance training. (1981) *Brain Research,* 215 147-161.

Dykens, J.A. (1997) Mitochondrial free radical production and oxidative pathophysiology: implications for neurodegenerative disease. En F. Beal, N. Howell, I. Bódis-Wollner (Eds.) *Mitochondria and free radicals in Neurodegenerative diseases.* Wiley-Liss, N.Y. pp. 29-55.

Dykens, J.A. (1999) Free radicals and mitochondria dysfunction in excitotoxicity and neurodegenerative disease. En: E.V. Koliastos y R.R. Ratan (eds) *Cell Death and Diseases of the Nervous System.* Humana Press, New Jersey pp. 45-69.

Eichenbaum, H. (1994) The hippocampal system and the declarative memory in humans and animals: Experimental analysis and historical origins. En *Memory Systems* (Schacter,

D.L. and Tylving, E. eds.) Cambridge, M.A. MIT Press, pp 147-201.

Engert, F. y Bonhoeffer, T. (1999) Dendritic spine changes associated with hippocampal long-term synaptic plasticity. *Nature* 399: 66-70.

Englard, S. y Seifter, S. (1986) The biochemical functions of ascorbic acid. *Ann. Res. Nutr.* 6: 365-406.

Evans, P.H. (1993) Free radicals in brain metabolism and pathology. *British Med. Bull.* 49: 577-587.

Exposito, I., Del Arco, A., Segovia, G. y Mora, F. (1999) Endogenous dopamine increases extracellular concentrations of glutamate and GABA in striatum of the freely moving rat: involvement of D1 and D2 dopamine receptors. *Neurochem. Res.* 24(7): 849-856.

Farber, J.L. (1990) The role of calcium ions in toxic cell injury. *Environ. Health Persp.* 84: 107-111.

Ferrer, I., Fábregues, I., Rairiz, J. y Galofré, E. (1986) Decreased numbers of dendritic spines on cortical pyramidal neurons in human chronic alcoholism. *Neuroscience Letters* 69: 115-119.

Foster T., Sharrow K., Masse J., Norris C., y Kumar, A. (2001) Calcineurin Links  $Ca^{2+}$  Dysregulation with Brain Aging. *The Journal of Neuroscience*, 21(11):4066-4073.

Freeman, B.A. y Crapo, J.D. (1982) Biology of disease: free radicals and tissue injury. *Lab. Investigation.* 47: 412-426.

Freund, T.F., Powell, J.F. y Smith, A.D. (1984) Tyrosine hydroxylase-immunoreactive boutons in synaptic contact with identified striatonigral neurons, with particular reference to dendritic spines. *Neurosci.* 13(4): 1189-1215.

Freund, T.F., Martin, K.A.C., Somogyi, P. y Whitteridge, D. (1985) Innervation of cat visual areas 17 and 18 by physiologically identified x-and y-type thalamic afferents. II. Identification of postsynaptic targets by GABA immunocytochemistry and Golgi impregnation. *J. Comp. Neurol.* 242: 275-291.

Freund, T.F., Ylinen, A., Miettinen, R., Pitkanen, A., Lahtinen, H., Baimbridge, K.G., Riekkinen, P.J. (1991) Pattern of neuronal death in the rat hippocampus after status epilepticus: Relationship to calcium binding protein content and ischemic vulnerability. *Brain Res. Bull.* 28: 27-38.

Freund, T.F. y Buzsaki, G. (1996) Interneurons of the hippocampus. *Hippocampus* 6:345-

470.

Fu, Y.K., Arkins, S., Li, M.Y., Dantzer, R., Kelley, K.W. (1994) Reduction in superoxide anion secretion and bactericidal activity of neutrophils from aged rats: reversal by combination of gamma interferon and growth hormone. *Infection and Immunity*. 62 (1): 1-8.

Garthwaite, G. y Garthwaite, J. (1986) Aminoacid neurotoxicity: intracellular sites of calcium accumulation associated with the onset of irreversible damage to rat cerebellar neurones in vitro. *Neurosci. Lett.* 71: 53-58.

Gerlach, M., Desser, H., Youdim, M.B. and Reider, P. (1996) New horizons in molecular mechanisms underlying Parkinson's disease and in our understanding of the neuroprotective effects of selegiline. *J. Neural Transm. Suppl.* 48: 7-21.

Globus, A. y Scheibel, A.B. (1967) The effect of visual deprivation on cortical neurons: a Golgi study. *Exp. Neurol.* 19: 331-345.

Goldin, M., Segal, M. y Avignone, E. (2001) Functional Plasticity Triggers Formation and Pruning of Dendritic Spines in Cultured Hippocampal Networks. *The Journal of Neuroscience*, 21(1):186-193.

Goldman-Rakic, P.S. y Selemon, D.L. (1990) Basal ganglia research. *TINS* 13: 241-307.

González-Piña, R. and Paz, C. (1997) Brain monoamine changes after short periods of ozone exposure. *Neurochem. Res.* 22(1): 63-66.

Graham, D.E. y Koren, H.S. (1990) Biomarkers of inflammation in ozone-exposed humans. Comparison of the nasal and bronchoalveolar lavage. *Am. Rev. Respir. Dis.* 142: 152-156.

Gravenland, G., Williams, R.S. y DiFiglia, M. (1985) A Golgi study of the human neostriatum neurons and afferent fibers. *J. Comp. Neurol.* 234: 317-333.

Grünewald, R.A. (1993) Ascorbic acid in the brain. *Brain Res. Rev.* 18: 123-133.

Hada, J., Kaku, T., Morimoto, K., Hayashi, Y. y Nagai, K. (1996) Adenosine transport enhance high  $K^+$ -evoked taurine release from rat hippocampus. *Eur. J. Pharmacol.* 305: 101-107.

Halliwell, B. and Gutteridge, J.M. (1984) Lipid peroxidation, oxygen radicals, cell damage, and antioxidant therapy. *Lancet.* 1396-1398.

Hansen, A.J. (1985) Effect of anoxia on ion distribution in the brain. *Physiol. Rev.* 65: 101-

148.

Harkema, J.R., Catalano, P.J. and Hotchkiss, J.A. (1997) Consequences of prolonged inhalation of ozone on F344/N rats: collaborative studies Part XII: Atrophy of bone nasal. *Res. Rep. Health Eff. Inst.* 65: 1-19; 21-26.

Harman, D. (1986) Free radicals theory of aging: role of free radicals in the origination and evolution of life, aging and disease processes. In: *Free radicals, Aging, and Degenerative Disease*. Alan R. Inc. Ed. Pp. 3-49.

Haro, R. and Paz, C. (1993) Effects of ozone exposure during pregnancy on ontogeny of sleep in rats. *Neurosci. Lett.* 164(1-2): 67-70.

Harris, K.M. and Kater, S.B. (1994) Dendritic spines: cellular specializations imparting both stability and flexibility to synaptic function. *Annu. Rev. Neurosci.* 17: 341-371.

Harris, K.M. (1999) Structure, development, and plasticity of dendritic spines. *Curr. Opinion in Neurobiol.* 9: 343-348.

Herrero A. y Barja G. (1997) ADP-regulation of mitochondrial free radical production is different with complex I- or complex II-linked substrates: implications for the exercise paradox and brain hypermetabolism. *J Bioenerg Biomembr.* 29 (3): 241-9.

Hinton, VJ., Brown, WT., Wisniewsky, K. y Rudelli, RD. (1991) Analysis of neocortex in three males with the fragile X syndrome. *Am. J. Med. Genet.* 41: 289-294.

Hockenbery, D.M., Oltvai, Z.N., Yin, X-M., Milman, C.L. y Korsmeyer, S.J. (1993) Bcl-2 functions in an antioxidant pathway to prevent apoptosis. *Cell.* 75: 241-251.

Horner, C.H. (1993) Plasticity of the dendritic spine. *Prog. Neurobiol.* 41: 281-321.

Horwitz, B. (1981) Neuronal plasticity: how changes in dendritic architecture can affect the spread of postsynaptic potentials. *Brain Research.* 224: 412-418.

Hosokawa, T., Rusakov, D.A., Bliss, T.V.P. y Fine, A. (1995) Repeated confocal imaging of individual dendritic spines in the living hippocampal slice: evidence for changes in length and orientation associated with chemically induced LTP. *J. Neurosci.* 15(8): 5560-5573.

Hsiang, J.N., Wang, J.Y., Ip, S.M., Ng, H.K., Stadlin, A., Yu, A.L. and Poon, W.S. (1997) The time course and regional variations of lipid peroxidation after diffuse brain injury in rats. *Acta Neurochir (Wien)* 139(5). 464-468.

- Huitrón-Resendiz, S., Custodio-Ramírez, V., Escalante-Membrillo, C., González-Piña, R. and Paz, C. (1994) Sleep alterations and brain regional changes of serotonin and its metabolite in rats exposed to ozone. *Neurosci. Lett.* 177(1-2): 119-122.
- Huttenlocher, P.R. (1975) Synaptic and dendritic development and mental defect. En: N. Buchwald (ed) *Brain Mechanisms in Mental Retardation*. Academic Press, N.Y. pp. 123-140.
- Huxtable, R.J. (1992) Physiological actions of taurine. *Physiological Rev.* 72(1): 101-160.
- Ingham, C.A., Hood, C.H. y Arbuthnott, G.W. (1989) Spine density on neostriatal neurons change with 6-hydroxydopamine lesions and with age. *Brain Res.* 503: 334-338.
- Ingham, C.A., Hood, S.H. y Arbuthnott, G.W. (1991) A light and electron microscopical study of enkephalin-immunoreactive structures in the rat neostriatum after removal of the nigrostriatal dopaminergic pathway. *Neurosci.* 42(3): 715-730.
- Ingham, C.A., Hood, S.H., Taggart, P. y Arbuthnott, G.W. (1997) Plasticity of synapses in the rat neostriatum after unilateral lesion of the nigrostriatal dopaminergic pathway. *J. Neurosci.* 18 (12): 4732-4743.
- Ingvar, M., Morgan, P.F. y Auer, R.N. (1988) The nature and timing of excitotoxic neuronal necrosis in the cerebral cortex, hippocampus and thalamus due to fluorothyl-induced status epilepticus. *Acta Neuropathologica*, 75: 362-369.
- Irving EA; Yatsushiro K; McCulloch J; Dewar D. (1997) Rapid alteration of tau in oligodendrocytes after focal ischemic injury in the rat: involvement of free radicals. *J Cereb Blood Flow Metab.* 17 (6): 612-22.
- Isokawa, M. (1998) Remodeling dendritic spines in the rat pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. *Neuroscience Letters*, 258: 73-76.
- Jacobs, B., Driscoll, L. y Schall, M. (1997) Life-span dendritic and spine changes in areas 10 and 18 of human cortex: A quantitative Golgi study. *J. Comp. Neurol.* 386: 661-680.
- Janssen, Y.M., Van Houten, B., Borm, P.J. y Mossman, B.T. (1993) Cell and tissue responses to oxidative damage. *Lab. Invest.* 69(3) 261-274.
- Jenner, P. and Olanow, C.W. (1996) Oxidative stress and the pathogenesis of Parkinson's disease. *Neurology. Suppl 3 S*:161-70.
- Jiang, M., Lee, C.L., Smith, K.L. y Swann, J. (1998) Spine loss and other persistent alterations of hippocampal pyramidal cell dendrites in a model of early-onset epilepsy. *J. Neurosci.* 18 (20): 8356-8368.

Johnston, D. y Amaral, D. (1998) Hippocampus. En: Shepherd, G.M (Ed.) The synaptic organization of the brain. Oxford University Press, N.Y. pp 417-458.

Joseph, J.A., Cutler, R.C. (1995) The role of oxidative stress in signal transduction changes and cell loss in senescence. Ann. New York Acad. Sci. 738: 37-43.

Juraska, J.M., Fitch, J.M. y Washburne, D.L. (1989) The dendritic spine morphology of pyramidal neurons in the rat hippocampal CA3 area. II. Effects of gender and the environment. Brain Res. 479: 115-119.

Kelly, J.P. y Dodd, J. (1991) Anatomical organization of the nervous system. En, Kandel, E.R., Schwartz, J.H. y Jessell, T.M. (Eds.) Principles of neural science. Elsevier, USA. pp.273-282.

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

Kerr, J.F.R. Gobé, G.C., Winterford, C.M. y Harmon, B.V. (1995) Anatomical methods in cell death. En, Lawrence M. Schwartz y Barbara A. Osborne (Eds) Cell Death. Academic Press, vol. 46 pp. 1-27.

Kiebler, M.A., López-García, J.C. y Leopold, O.L. (1999) Purification and characterization of rat hippocampal CA3-dendritic spines associated with mossy fiber terminals. FEBS Letters 445: 80-86.

Kibe, A., Wake, C., Kuramoto, T. y Hoshita, T. (1980) Effect of dietary taurine on bile acid metabolism in guinea pigs. Lipids 15: 224-229.

Kim, H.W., Shim, M.J., Kim, W.B. y Kim, B.K. (1996) Dexamethasone recovers phorbol-ester induced reduction of taurine transportation in mouse macrophage cell line, raw 264.7. En R.J. Huxtable, J. Azuma, K. Kuriyama, M. Nakagawa y A. Baba (eds) Taurine 2 Basic and Clinical Aspects. Plenum Press, N.Y. pp. 59-66.

Kirkland, R. y Franklin, J. (2001) Evidence for Redox Regulation of Cytochrome c Release during Programmed Neuronal Death: Antioxidant Effects of Protein Synthesis and Caspase Inhibition. The Journal of Neuroscience, 21(6):1949-1963.

Koch, C. y Zador, A. (1993) The function of dendritic spines: devices subserving biochemical rather than electrical compartmentalization. J. Neurosci. 13: 413-422.

Koren, H.S., Devlin, R.B., Graham, D.E., Mann, R., McGee, M.P., Horstman, D.H., Kozumbo, W.J., Becker, S., House, D.E., McDonnell, W.F. y Bromberg, P.A. (1989)

Ozone-induced inflammation in the lower airways of human subjects. *Am. Rev. Respir. Dis.* 139: 407-415.

Kucukkaya B; Haklar G; Yalcin AS. (1996) NMDA excitotoxicity and free radical generation in rat brain homogenates: application of a chemiluminescence assay. *Neurochem Res* 21 (12):1535-8.

Kuo JH; Chen HW; Chou RG; Lii CK. (1997) Vitamin E protection of cell morphology under oxidative stress is related to cytoskeletal proteins in rat hepatocytes. *Arch Toxicol.* 71 (4): 231-7.

Kupfermann, I. (1991) Learning and memory. En, Kandel, E.R., Schwartz, J.H. y Jessell, T.M. (Eds.) *Principles of neural science*. Elsevier, USA. pp. 997-1008.

Lafon-Cazal, M., Pietri, S., Culcasi, M. y Bockaert, J. (1993) NMDA-dependent superoxide production and neurotoxicity. *Nature London* 364: 535-537.

Laszczyca, P., Kawka-Serwecinska, E., Witas, I., Dole-zych, B., Falkus, B., Mekail, A., Ziokowska, B., Madej, P. and Migula, P. (1996) Lipid peroxidation and activity of antioxidative enzymes in the rat model of ozone therapy. *Mater Med. Pol.* 28(4): 155-160.

Lechuga, A., Dorado-Martínez, C., Rodríguez, A., Pedroza-Ríos, K., Borgonio-Pérez, G. y Rivas-Arancibia, S. (1999) Effects of vitamin E on ozone-induced memory deficits and lipid peroxidation in rats. *Neuroreport* 10 (8): 1689-1692.

Leikauf, G.D., Simpson, L.G., Santrock, J., Zhao, Q., Abbinante-Nissen, J., Zhou, S. y Driscoll, K.E. (1995) Airway epithelial cell responses to ozone injury. *Environ. Health Perspect.* 103 (suppl. 2): 91-95.

Leist, M. y Nicotera, P. (1999) Calcium and cell death. En: E.V. Koliastos y R.R. Ratan (eds) *Cell Death and Diseases of the Nervous System*. Humana Press, New Jersey pp. 69-91.

Lescaudron, L., Jaffard, R. and Verna A. (1989) Modifications in number and morphology of dendritic spines resulting from chronic ethanol consumption and withdrawal: A Golgi study in the mouse anterior and posterior hippocampus. *Exp. Neurol.* 106 156-163.

Lidsky, T.I., Schneider, J.S., Yablonsky-Alter, E., Zuck, L.J. y Banerjee, S.P. (1995) Taurine prevents haloperidol-induced changes in striatal neurochemistry and behavior. *Brain Res.* 686: 104-106.

Lombardini, J.B. (1992a) Review: recent studies on taurine in the central nervous system.



En B. Lombardini, S.W. Schaffer y J. Azuma (eds) *Taurine Nutritional Value and Mechanisms of Action*. Plenum Press, N.Y. pp. 245-251.

Lombardini, J.B. (1992b) Effects of taurine on protein phosphorylation in mammalian tissues. En B. Lombardini, S.W. Schaffer y J. Azuma (eds) *Taurine Nutritional Value and Mechanisms of Action*. Plenum Press, N.Y. pp. 309-318.

Luah, J.P. (1992) Toxicology of ozone. In *Toxicology*. Ed. Mosby. New York. pp. 112-117.

Luo, Y., Umegaki, H., Wang, X., Abe, R. y Roth, G.S. (1998) Dopamine induces apoptosis through an oxidation-involved SAPK/JNK activation pathway. *J. Biol. Chem.* 273 (6): 3756-3764.

Machado-Salas, J., Ibarra, O., Martínez-Fong, D., Cornejo, A., Aceves, J. y Kuri, J. (1990) Degenerative ultrastructural changes observed in the neuropil of the caudate nuclei from Parkinson's disease patients. *Stereotact. Func. Neurosurg.* 54+55, 297-305.

Magariños, A.M., McEwen, B., Flügge, G. y Fuchs, E. (1996) Chronic psychosocial stress causes apical dendritic atrophy of hippocampal CA3 pyramidal neurons in subordinate tree shrews. *J. Neurosci.* 16(10): 3534-3540.

Magariños, A.N., García, J.M. y McEwen, B.S. (1997) Chronic stress alters synaptic terminal structure in hippocampus. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 94:14002-14008.

Magnusson, K.R., Koerner, J.F., Larson, A.A., Smullin, D.H., Skilling, S.R. y Beitz, A.J. (1990) NMDA-, kainate and quisqualate-stimulated release of taurine from electrophysiologically monitored rat hippocampal slices. *Brain Res.* 549: 1-8.

Magnusson, K.R. (1994) Changes in the localization of taurine-like immunoreactivity during development and regeneration in the rat brain. En R.J. Huxtable y D. Michalk (eds) *Taurine in Health and Disease*. Plenum Press, N.Y. pp. 235-243.

Mainen, Z.F., Carnevale, N.T., Zador, A.M., Claiborne, B.J. y Brown, T.H. (1996) Electrotonic architecture of hippocampal CA1 pyramidal neurons based on three-dimensional reconstructions. *J. Neurophysiol.* 76: 1904-1923.

Malsburg, C.V. (1985) Synaptic plasticity as basis of brain organization. En: *The neural and molecular basis of learning*. Ed. John Wiley and Sons. Toronto. pp. 411-420.

Marín-Padilla, M. (1974) Structural organization of the cerebral cortex (motor area) in human chromosomal aberrations. A Golgi study. *Brain Res.* 66: 375-391.

Markesbery, W.R. (1997) Oxidative stress hypothesis in Alzheimer's disease. *Free Radic.*

Biol. Med. 23 (1): 134-47.

Masako, I. (1998) Remodeling dendritic spines in the rat pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. *Neuroscience Letters* 258: 73-76.

Mason, A. y Larkman, A. (1990) Synaptogenesis in the retina of the cat. *Brain Res.* 373: 35-48.

Matsumoto, K., Ueda, S., Hashimoto, T. y Kuriyama, K. (1991) Ischemic neuronal injury in the rat hippocampus following transient forebrain ischemia: evaluation using *in vivo* microdialysis. *Brain Res.* 532: 236-242.

McCord, J.M. (1985) Oxygen-derived free radicals in postischaemic tissue injury. *N. Engl. J. Med.* 312:159-163.

McEwen, B., Tanapat, P. y Weiland, N. (1999) Inhibition of dendritic spine induction on hippocampal CA1 pyramidal neurons by a nonsteroidal estrogen antagonist in female rats. *Endocrinology*, 140 (3): 1044-1047.

McHugh, T.J., Blum, K.I. Tsien, J.Z., Tonegawa, S. y Wilson, M.A. (1996) Impaired hippocampal representation of space in CA1-specific NMDAR1 knockout mice. *Cell.* 87: 1339-1349.

McLaughlin, B., Pal, S., Tran, M., Parsons, A., Barone, F., Erhardt, J. y Aizenman, E. (2001) p38 Activation Is Required Upstream of Potassium Current Enhancement and Caspase Cleavage in Thiol Oxidant-Induced Neuronal Apoptosis. *The Journal of Neuroscience*, May 15, 2001, 21(10):3303-3311.

Menzel, D.B. (1994) The toxicity of air pollution in experimental animals and humans: the role of oxidative stress. *Toxicol. Lett.* 72: 269-277.

Menzel, D.B. y Meacher, D. (1999) Ozone and nitrogen dioxide. En: Gilbert y Colton (eds.) *Reactive Oxygen Species in Biological Systems*. Academic/Plenum, N.Y. pp. 335-365.

Mongin AA; Cai Z; Kimelberg HK. (1999) Volume-dependent taurine release from cultured astrocytes requires permissive  $[Ca^{2+}]_i$  and calmodulin. *Am J Physiol.* 277(4 Pt 1):C823-32.

Mooradian, A.D. (1993) Antioxidant properties of steroids. *J. Steroids Biochem. Mol. Bio.* 45 (6): 509-511.

Moran J; Hernandez-Pech X; Merchant-Larios H; Pasantés-Morales H. (2000) Release of taurine in apoptotic cerebellar granule neurons in culture. *Pflugers Arch.* 439(3):271-7.

- Moser, M.B., Trommald, M. y Andersen, P. (1994) An increase in dendritic spine density on hippocampal CA1 pyramidal cells following spatial learning in adult rats suggest the formation of new synapses. *Proc. Nat. Acad. Of Sci.* 91: 12673-12675
- Mukai, K., Daifuku, K., Yokoyama, S. and Nakano, M. (1990) Stopped-flow investigation of antioxidant activity of estrogens in solution. *Bioch. Bioph. Act.* 1035: 348-352.
- Müller, W. y Connor, J.A. (1991) Dendritic spines as individual neuronal compartments for synaptic  $Ca^{2+}$  responses. *Nature* 354:73-76.
- Müller, M., Gähwiler, B.H., Rirtschin, L. and Thompson, S.M. (1993) Reversible loss of dendritic spines and altered excitability after chronic epilepsy in hippocampal slice cultures. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 90: 257-261.
- Nakashima, T., Takino, T. y Kuriyama, K. (1985) Therapeutic and prophylactic effects of taurine administration on experimental liver injury. En: *Sulfur Amino Acids: Biochemical and Clinical Aspects*. K. Kuriyama, R.J. Huxtable and H. Iwata (eds) Alan R. Liss Inc. N.Y. pp. 449-459.
- Newsholme, E.A. and Lee, A.R. (1987) *Biochemistry for medical Sciences*. Ed. John Wiley and Sons, pp 256-288.
- Nicotera P; Ankarcona M; Bonfoco E; Orrenius S; Lipton SA. (1997) Neuronal necrosis and apoptosis: two distinct events induced by exposure to glutamate or oxidative stress. *Adv Neurol.* 72: 95-101.
- Nilsson, U.A., Haraldsson, G., Bratell, S., Sorensen, V., Akerlund, S., Petterson, S., Schersten, T. Jonsson, O. (1993) ESR-measurement of oxygen radicals in vivo after renal ischaemia in the rabbit. Effects of pretreatment with superoxide dismutase and heparin. *Acta. Physiol. Scand.* 147:263-270.
- Nittynen L; Nurminen ML; Korpela R; Vapaatalo H. (1999) Role of arginine, taurine and homocysteine in cardiovascular diseases. *Ann Med.* 31(5):318-26.
- Numagami Y; Zubrow AB; Mishra OP; Delivoria-Papadopoulos M. (1997) Lipid free radical generation and brain cell membrane alteration following nitric oxide synthase inhibition during cerebral hypoxia in the newborn piglet. *J Neurochem.* 69 (4): 1542-7.
- O'Keefe, (1979) A review of the hippocampal place cells. *Prog Neurobiol.* 13: 419-439.
- Olanow, C.A. (1993a) A radical hypothesis for neurodegeneration. *TINS* 16:439-444.
- Olanow, C.A. (1993b) A scientific rationale for protective therapy in Parkinson's disease.

J. Neural. Transm. 91: 161-180.

Oyama, Y., Okasaki, E., Chikahisa, L., Nagano, T. y Sadakata, C. (1996) Oxidative stress-induced increase in intracellular  $Ca^{2+}$  and  $Ca^{2+}$ -induced increase in oxidative stress: An experimental model using dissociated rat brain neurons. *Jpn. J. Pharmacol.* 72: 381-385.

Palay, S.L. (1956) Synapses in the central nervous system. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 2: 193-201.

Palmer, A.M., Robichaud, J. y Reiter, C.T. (1994) The release and uptake of excitatory amino acids in rat brain: Effect of aging and oxidative stress. *Neurobiol. Of Aging* 15(1): 103-111.

Palmi, M., Fusi, F., Yonumbi, G., Frosini, M., Bianchi, L., Della Corte, L., Sagaragli, G.P. y Tipton, K.F. (1996) Effects of taurine and structurally related analogues on  $Ca^{2+}$  uptake and respiration rate in rat liver mitochondria. En R.J. Huxtable, J. Azuma, K. Kuriyama, M. Nakagawa y A. Baba (eds) *Taurine 2 Basic and Clinical Aspects*. Plenum Press, N.Y. pp. 117-124.

Papa, M., Bundman, M.C., Greenberger, V. y Segal, M. (1995) Morphological analysis of dendritic spine development in primary cultures of hippocampal neurons *J Neurosci* 15 (1): 1-11.

Parent, A. y Hazrati, L.N. (1993) Anatomical aspects of information processing in primate basal ganglia. *TINS.* 16,3, 111-116.

Pasantes-Morales, H., Peña, C., García, O., Morales, M.M., Sánchez, R. y Morán, J. (1996) Characterization of the volume-activated taurine pathway in cultured cerebellar granule neurons. En R.J. Huxtable, J. Azuma, K. Kuriyama, M. Nakagawa y A. Baba (eds) *Taurine 2 Basic and Clinical Aspects*. Plenum Press, N.Y. pp. 393-400.

Patel, M., Day, B.J., Crapo, J.D., Fridovich, I. y McNamara, J.O. (1996) Requirement for superoxide in excitotoxic cell death. *Neuron* 16: 345-355.

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

Paz, C. (1995) Alteraciones de la salud provocadas por la inhalación de ozono. En: *Temas Selectos de Neurociencias*. Velazquez Moctezuma, J. (Coordinador). 1a. Ed. Universidad Nacional Metropolitana pp 385-398.

Paz, C. (1997) Some consequences of ozone exposure on health. *Arch. Med. Res.* 28 (2): 163-170.

Perkel, D. y Perkel, D.J. (1985) Dendritic spines: role of active membrane in modulating synaptic efficacy. *Brain Res.* 325: 331-335.

Peters, A. (1987) Number of neurons and synapses in the primary visual cortex. En: *Cerebral Cortex Vol. 6 Further aspects of Cortical Functions Including Hippocampus* (Jones, E. and Peters A. eds.) Plenum Press, N.Y., pp.267-294.

Phillis, J.W., Song, D. y O'Regan, M.H. (1999) Effects of hyperosmolarity and ion substitutions on amino acid efflux from the ischemic rat cerebral cortex. *Brain Res.* 828: 1-11.

Powell, T. (1981) Certain aspects of the intrinsic organisation of the cerebral cortex. En: *Brain Mechanisms and Perceptual Awareness* (Pompeiano, O. and Marsan, C.A. eds.) Raven Press, New York, pp. 1-19.

Pryor, W.C., y Church, D.F. (1991) The reaction of ozone with unsaturated fatty acids: aldehydes and hydrogen peroxide as mediators of ozone toxicity. En: K.J.A. Davis (ed.), *Oxidative Damage and Repair: Chemical, Biological and Medical Aspects*, Pergamon Press, 142-212.

Pryor, W.C., Miki, M., Das, B. Y Church, D.F. (1991) The mixture of aldehydes and hydrogen peroxide produced in the ozonation of dioleoyl phosphatidylcholine causes hemolysis of human red blood cells. *Chem. Biol. Interactions.* 79: 41-52.

Pryor, W.A. (1992) How far does ozone penetrate into the pulmonary air/tissue boundary before it reacts? *Free Rad. Biol. Med.* 12:83-88

Purpura, D.P. (1974) Dendritic spines "dysgenesis" and mental retardation *Science Wash.* 186: 1126-1128.

Putman, E., Liese, W., Voorhout, W.F., van Bree, L., van Golde, L.M. and Haagsman, H.P. (1997) Short term exposure affects the surface activity of pulmonary surfactant. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 142(2): 288-296.

Quartz, S.R. y Sejenowski, T.J. (1997) The neural basis of cognitive development: a constructivist manifesto. *Behav. Brain Sci.* 20: 537-556.

Raf, M.C., Barres, B.A., Burne, J.S., Ishizaki, Y. Y Jacobson, M.D. (1993) Programmed cell death and the control of cell survival: lessons from the nervous system. *Science* 262: 695-700.

Rahmann, H. and Rahmann, M. (1992) Behavioral-Physiological basis of memory. En: *The neurobiological basis of memory and behavior.* Ed. Springer-Verlag. New York. pp.

229.

Reynoso-Erazo, L.(1990): "Cuide su corazón", Ed. Promexa (Ed. Patria), México. ISBN 968-39-0246-4.

Riederer, P., Sofic, E.W., Rausch, D., Schmidt, B., Reynolds, G.P., Jellinger, K., Youdim, M.B.H. (1989) Transition metals, ferritin, glutathione, and ascorbic acid in Parkinsonian brains. *J. Neurochem.* 52:515-520.

Rivas-Arancibia, S., Vazquez-Sandoval, R., González-Kladiano, D., Schneider-Rivas, S. and Lechuga-Guerrero, A. (1998) Effects of ozone exposure in rats on memory and levels of brain and pulmonary superoxide dismutase. *Environmental Res.* 76: 33-39.

Rivas-Arancibia, S., Dorado-Martínez, C., Borgonio-Pérez, G., Hiriart-Urdanivia, M., Verdugo-Díaz, L., Durán-Vázquez, A., Colín-Barenque, L. y Avila-Costa, M.R. (2000) Effects of taurine on ozone-induced memory deficits and lipid peroxidation levels in brains of Young, mature and old rats. *Environmental Research* 82: (1) 7-17.

Roche, E. and Romero-Alvira, D. (1993) Oxidative stress in some dementia types. *Med. Hypotheses.* 40(6): 342-50.

Romero-Ramos, M., Rodríguez-Gómez, J.A., Venero, J.L., Cano, J. and Machado, A. (1997) Chronic inhibition of the high-affinity dopamine uptake system increases oxidative damage to proteins in the aged rat substantia nigra. *Free Radical Biol. Med.* 23(1): 1-7.

Rose, GJ. y Call, SJ. (1992) Evidence for the role of dendritic spines in the temporal filtering properties of neurons: The decoding problem and beyond. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 89: 9662-9665.

Rothman, S.M. (1985) The neurotoxicity of excitatory aminoacids is produced by passive chloride influx. *J. Neurosci.* 5: 1483-1489.

Rothman, S.M. y Olney, J.W. (1995) Excitotoxicity and the NMDA receptor-still lethal after eight years. *TINS* 18: 57-58.

Ruotsalainen, M., Majasaari, M., Salimaki, J. y Ahtee, L. (1998) Locally infused taurine, GABA and homotaurine alter differently the striatal extracellular concentrations of dopamine and its metabolites in rats. *Amino Acids* 15(1-2): 117-134.

Salmon, M., Koto, H., Lynch, O.T., Haddad, E., Lamb, N., Quinlan, G J., Barnes, P. y Chung, K.F. (1998) Proliferation of airway epithelium after ozone exposure. Effect of apocyn and dexamethasone. *Am. Respir. Crit. Care Med.* 157: 970-977.

- Saransaari, P. and Oja, S.S. (1996) Taurine and neural cell damage. Transport of taurine in adult and developing mice. *Adv. Exp. Med. Biol.* 403: 481-490.
- Saransaari, P. and Oja, S.S. (1999a) Involvement of metabotropic glutamate receptors in taurine release in adult and developing mouse hippocampus. *Amino Acids* 16: 165-179.
- Saransaari, P. and Oja, S.S. (1999b) Title Taurine release is enhanced in cell-damaging conditions in cultured cerebral cortical astrocytes. *Neurochem Res.* 24(12):1523-9.
- Satoh, H. (1996) Electrophysiological and electropharmacological actions of taurine on cardiac cells. En R.J. Huxtable, J. Azuma, K. Kuriyama, M. Nakagawa y A. Baba (eds) *Taurine 2 Basic and Clinical Aspects*. Plenum Press, N.Y. pp. 285-295.
- Scandilios, J.G. (1992) Molecular biology of free radical scavenging system. Cold Spring Harbor Lab. Press.
- Scheibel, ME. y Scheibel, AB. (1968) On the nature of dendritic spines. Report of a workshop. *Communications in Behavioral Biology, Part 1 A*, 1(4): 231-265.
- Schiller, J., Schiller, Y. y Clapham, D.E. (1998) NMDA receptors amplify calcium influx into dendritic spines during associative pre- and postsynaptic activation. *Nat. Neurosci* 1: 114-118.
- Schuller-Levis, G., Quinn, M.R., Wright, C. y Park, E. (1994) Taurine protects against oxidant-induced lung injury: Possible mechanism(s) of action. En R.J. Huxtable y D. Michalk (eds) *Taurine in Health and Disease*. Plenum Press, N.Y. pp. 31-39.
- Schulz, J.B., Henshaw, D.R., MacGarvey, U. and Beal, M.F. (1996) Involvement of oxidative stress in 3-nitropropionic acid neurotoxicity. *Neurochem. Int.* 29(2): 167-171.
- Segal, M. (1995a) Dendritic spines for neuroprotection: a hypothesis. *TINS* 18(11): 468-471.
- Segal, M. (1995b) Imaging of calcium inside dendrites and spines: goals, issues and perspectives. *J. Neurosci. Meth.* 59: 25-29.
- Segev, I. y Rall, W. (1998) Excitable dendrites and spines: earlier theoretical insights elucidate recent direct observations. *TINS*, 21(11): 453-460.
- Segura-Aguilar, J. (1993) A new direct method for determining superoxide dismutase activity by measuring hydrogen superoxide formation. *Chem. Biol. Interactions.* 86:69-78.
- Selye, H.(1981): *The stress of life*. En: Selye, H.(ed): *Stress and stress research*. New

York, Van Norstrom.

Sendtner, M. y Thoenen, H. (1994) Neurodegenerative disease. Oxidative stress and motoneuron disease. *Curr. Biol.* 4: 1036-9.

Shepherd, G.M. (1990) *The synaptic organization of the brain* (3<sup>th</sup> ed). Oxford Univ. Press N.Y.

Shepherd, G.M. (1996) The dendritic spine: A multifunctional integrative unit. *J. Neurophysiol.* 75 (6): 2197-2210.

Shepherd, G.M. (1998) *The synaptic organization of the brain* (4<sup>th</sup> ed). Oxford Univ. Press N.Y.

Shin, C. y Lee, K. (1999) Epilepsy and cell death. En: E.V. Koliastos y R.R. Ratan (eds) *Cell Death and Diseases of the Nervous System*. Humana Press, New Jersey pp. 361-378.

Simon, R.P., Griffiths, T., Evan, M.C., Swaan, J.H. y Meldrum, B.S. (1984) Calcium overload in selectively vulnerable neurons of the hippocampus during and after ischemia: an electron microscopic study in the rat. *J. Cereb. Blood Flow Metabol.* 4: 350-361.

Simonian, N.A. y Coyle, J.T. (1996) Oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 36: 83-106.

Sinet, P.M., Heikkila, R.E., Cohen, G. (1980) Hydrogen peroxide production by rat brain *in vivo*. *J. Neurochem.* 34:1421-1428.

Sloviter, R.S., Dean, E., Sollas, A.L., Goodman, J.H. (1996) Apoptosis and necrosis induced in different hippocampal neuron populations by repetitive perforant path stimulation in the rat. *J. Comp. Neurol.* 366: 516-533.

Smiley, J. y Goldman-Rakic, P. (1993) Heterogenous targets of dopamine synapses in monkey prefrontal cortex demonstrated by serial electron microscopy: A laminar analysis using the silver enhanced diaminobenzidine sulfide (SEDS) immunolabeling technique. *Cereb. Cortex* 3: 223-228.

Smythies, J. (1997) The biochemical basis of synaptic plasticity and neurocomputation: a new theory. *Proc. R. Soc. London B.* 264: 575-579.

Smythies, J. (1999) The neurochemical basis of learning and neurocomputation: the redox theory. *Bahav. Brain Res.* 99: 1-6.

Smythies, J. (2000) Role of free radicals in the brain in health and disease in relation to



synaptic plasticity. En, Giuseppe, P., Enrique C. y Lester P. (Eds) Free Radicals in Brain Pathophysiology. Marcel Dekker, N.Y. pp: 1-16.

Socci, D.J., Crandall, B.M. and Arendash, G.W. (1995) Chronic Antioxidant Treatment Improves the Cognitive Performance of Aged Rats. *Brain Res.* 693:88-94.

Sohal, R.S. (1997) Role of mitochondria and oxidative stress in the aging process. En F. Beal, N. Howell, I. Bódis-Wollner (Eds.) Mitochondria and free radicals in Neurodegenerative diseases. Wiley-Liss, N.Y. pp. 91-107.

Spacek, J. y Harris, K.M. (1997) Three-dimensional organization of smooth endoplasmic reticulum in hippocampal CA1 dendrites and dendrite spines of the immature and mature rat. *J. Neurosci.* 17:190-203.

Spektor, D.A., Lippman, M., Thurston, G.D., Lioy, P.J., Stecko, J., O'Connor, G., Gaeshik, E., Speizer, E. y Hayes, C. (1988) Effects of ambient ozone on respiratory function in healthy adults exercising outdoors. *Am. Rev. Resp. Dis.* 138:821-828.

Squire, L.R. (1992) Declarative and nondeclarative memory: multiple brain systems supporting learning and memory. *J. Cognitive Neurosci.* 99: 195-231).

Squire, L.R. y Zola-Morgan, S. (1991) The medial temporal lobe memory system *Science* 253: 1380-1386.

Stadman, E., Starke-Reed, C., Oliver, J. (1992) Protein modification in aging. *Free radicals and Aging. Suppl. Exp. Exs.* 62: 64-72.

Stahelin (1991) Plasma antioxidant vitamins and subsequent cancer mortality in the 12 year follow-up of prespective basel study. *Am. J. Epidemiol.* 133: 766-775.

Stein-Behrens, B., Mattson, M.P., Chang, I., Yeh, M. y Sapolsky, R. (1994) Stress exacerbates neuron loss and cytoskeletal pathology in the hippocampus. *J. Neurosci.* 14(9): 5373-5380.

Steller, H. (1995) Mechanisms of genes and cellular suicide. *Science* 267: 1445-49.

Sturman, J.A. (1988) Taurine in development. *J. Nutr.* 118: 1169-1176.

Sunanda, M., Rao, S. y Raju, T.R. (1995) Effect of chronic restraint stress on dendritic spines and excrescences of hippocampal CA3 pyramidal neurons- a quantitative study. *Brain Res.* 694:312-317

Svoboda, K., Tank, D.W. y Denk, W. (1996) Direct measurment of coupling between

dendritic spines and shafts. *Science* 272: 716-719.

Tepper, M.T., Weiss, B., Wood, R.W. (1985) Alterations in behavior produced by inhaled ozone or ammonia. *Fundam. Appl. Toxicol.* 5:1110-1118.

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

Thomas MJ; Chen Q; Franklin C; Rudel LL. (1997) A comparison of the kinetics of low-density lipoprotein oxidation initiated by copper or by azobis (2-amidinopropane) *Free Radic Biol Med.* 23 (6): 927-35.

Trams, E.G., Lauter, C.J., Brandenburger, E.A. y Young, O. (1972) Cerebral cortical metabolism after chronic exposure to ozone. *Arch. Environ. Health.* 24: 153-159.

Tranel, D. y Damasio, A.R. (1995) Neurobiological foundations of human memory. En: *Handbook of Memory Disorders* ( Baddley, A.D., Wilson, B.A. and Watts, F.N. eds) John Wiley and Sons, Great Britain. Pp 27-54.

Timbrell, J.A. y Waterfield, C.J. (1996) Changes in taurine as an indicator of hepatic dysfunction and biochemical perturbations. (1996) En R.J. Huxtable, J. Azuma, K. Kuriyama, M. Nakagawa y A. Baba (eds) *Taurine 2 Basic and Clinical Aspects*. Plenum Press, N.Y. pp. 125-134.

Trommald, M., Jensen, V. y Andersen, P. (1995) Analysis of dendritic spines in rat CA1 pyramidal cells intracellularly filled with a fluorescent dye. *J. Comp. Neurol.* 353:260-274.

Trump, B.F., Berezesky, I.K. y Osornio-Vargas, A.R. (1981) Cell death and the disease process. The role of calcium. En, I.D. Bowen y R.A. Lockshin (eds) *Cell Death in Biology and Pathology*. Pp. 209-242. Chapman and Hall, London.

Trump, B.F. y Berezesky, I.K. (1995) Calcium-mediated cell injury and cell death. *FASEB J.* 9: 219-228.

Tulving, E. y Schacter, D.L. (1990) Priming and human memory systems. *Science* 247: 301-306.

Umez, T., Suzuki, A.K., Miura, T. y Koizumi, A. (1993) Effects of ozone and nitrogen dioxide on drinking and eating behaviors in mice. *Environ. Res.* 61: 51-67.

Urano, S., Sato, Y., Otonari, T., Makabe, S., Suzuki, S., Ogata, M. and Endo, T. (1998) Aging and oxidative stress in neurodegeneration. *Biofactors* 7(1-2) 103-12.

- Valverde, F. (1967) Dendritic spines of the visual cortex and light deprivation in the mouse. *Exp. Brain. Res.* 3: 337-352.
- Van Gendler, N.M. (1992) Pathologies of the CNS and associated taurine changes. En B. Lombardini, S.W. Schaffer y J. Azuma (eds) *Taurine Nutritional Value and Mechanisms of Action*. Plenum Press, N.Y. pp. 253-261.
- Van Rossum, D. y Hanish, U. (1999) Cytoeskeletal dynamics in dendritic spines: direct modulation by glutamate receptors? *Trends in Neurosci.* 22: 290-295.
- Vazquez Sandoval, R., Rivas Arancibia, S., Prieto Gómez, B., Schneider Rivas, S. (1994) Efecto del ozono sobre la memoria y los niveles de superóxido-dismutasa cerebral. XVIII Congreso Latinoamericano de Ciencias Fisiológicas. Montevideo, Uruguay. Abril 1994.
- Verney, C., Alvarez, C., Geffard, M. y Berger, B. (1990) Ultra-structural double-labelling study of dopamine terminals and GABA-containing neurons in rat anteromedial cerebral cortex. *Eur. J. Neurosci.* 2: 960.
- Victorin, K. (1992) Review of genotoxicity of ozone. *Mutation Res.* 277: 221-238.
- Vincenza, M., Aronica, E., Yankaya B. y Troost, D. (2001) Increased Expression of Neuronal Nitric Oxide Synthase Spliced Variants in Reactive Astrocytes of Amyotrophic Lateral Sclerosis Human Spinal Cord. *The Journal of Neuroscience*, 21:RC148:1-5.
- Volterra, A., Trotti, C., Tromba, C., Floridi, S. y Racagni, G. (1994) Glutamate uptake inhibition by oxygen free radicals in rat brain cortical astrocytes. *J. Neurochem.* 14: 2924-2932.
- Watanabe, Y., Gould, E. y McEwen, S. (1992) Stress induces atrophy of apical dendrites of hippocampal CA3 pyramidal neurons. *Brain Res.* 588: 341-345.
- Wei, Y.H. (1998) Oxidative stress and mitochondrial DNA mutations in human aging. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 217(1): 53-63.
- Weiss, B., Ferin, J., Merigan, W., Stern, S. y Cox, C. (1981) Modification of rat operant behavior by ozone exposure. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 58: 244-251.
- Wichmann, T. y DeLong, M.R. (1993) Pathophysiology of Parkinsonian motor abnormalities. En: Narabayashi, H., Nagatsu, T., Yanagisawa, N. y Mizuno, Y. (Eds.) *Advances in Neurology*, Vol. 60. Raven Press, Ltd. New York.
- Wilson, C.J. (1998) Basal Ganglia. En, Shepherd, G. (Ed.) *The synaptic organization of the brain*. Oxford Press, N.Y. 329-352.

Wilde GJ; Pringle AK; Wright P; Iannotti F. (1997) Differential vulnerability of the CA1 and CA3 subfields of the hippocampus to superoxide and hydroxyl radicals in vitro. *J Neurochem.* 69 (2): 883-6.

Wisniewski, KE., Segan, SM., Mizejeski, CM., Sersen, EA. y Rudelli, RD. (1991) The fragile (X) syndrome: neurological, electrophysiological and neuropathological abnormalities. *Am. J. Med. Genet.* 38: 476-480.

Wolff, S.P., Garner, A., Dean, R.T. (1986) Free radicals, lipids and protein degradation. *TIBS* 11:27-31.

Wu, J.Y., Tang, X.W. and Tsai, W.H. (1992) Taurine receptor: Kinetic and pharmacological studies. En B. Lombardini, S.W. Schaffer y J. Azuma (eds) *Taurine Nutritional Value and Mechanisms of Action.* Plenum Press, N.Y. pp. 263-269.

Wu, J.Y., Lin, C.T., Johansen, F.F. (1994) Taurine neurons in rat hippocampal formation are relatively inert to cerebral ischemia. En R.J. Huxtable y D. Michalk (eds) *Taurine in Health and Disease.* Plenum Press, N.Y. pp. 289-298.

Wyllie, A.H., Kerr, J.F. and Currie, A.R. (1980) Cell death: the significance of apoptosis. *Int. Rev. Cytol.* 68:251-306.

Wyllie S. y Liehr JG. (1997) Release of iron from ferritin storage by redox cycling of stilbene and steroid estrogen metabolites: a mechanism of induction of free radical damage by estrogen. *Arch Biochem Biophys.* 346 (2): 180-6.

Yamori, Y., Nara, Y., Kihara, M., Horie, R., Oshima, A., Iritani, N. y Fukuda, E. (1980) Possible involvement of taurine in pathological cholesterol metabolism of arteriolipidosis-prone rats. *Sulfur-Containing Amino Acids* 3: 107-113.

Yamori, Y., Nara, Y., Ikeda, K. y Mizushima, S. (1996) Is taurine a preventive nutritional factor of cardiovascular diseases or just a biological marker of nutrition? En: R.J. Huxtable (ed) *Taurine* 2. Plenum Press. N.Y. pp.623-629.

Yoritaka, A., Hattori, N., Uchida, K., Tanaka, M., Stadtman, E.R. and Mizuno, Y. (1996) Immunohistochemical detection of 4-hydroxynonenal protein adducts in Parkinson disease. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93(7) :2696-701.

Yuste, R. y Denk, W. (1995) Dendritic spines as basic functional units of neuronal integration. *Nature* 375: 682-684.

Yuste, R., Majewska, A., Cash, S.S. y Denk, W. (1999) Mechanisms of calcium influx into hippocampal spines: heterogeneity among spines, coincidence detection by NMDA receptors, and optical quantal analysis. *J. Neurosci.* 19(6): 1976-1987.

Zamzami, N., Susin, S.A., Marchetti, P., Hirsch, T., Gómez-Monterrey, T., Castedo, M. y Kroemer, G. (1996) Mitochondrial control of nuclear apoptosis. *J. Exp. Med.* 183: 1533-1544.

Zwick, H., Popp, W., Wagner, C., Reiser, K., Schmöger, J., Böck, A., Herkner, K. y Radusky, K. (1991) Effects of ozone on the respiratory health, allergic sensitization, and cellular immune system in children. *Am. Rev. Respir. Dis.* 144: 1075-1079.