



11261

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE MEDICINA**

**DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA**

15

**EFFECTO DE LA TAURINA SOBRE LAS ALTERACIONES DE  
MEMORIA Y EL INCREMENTO EN LA PEROXIDACIÓN DE  
LÍPIDOS CEREBRALES CAUSADOS POR LA EXPOSICIÓN A  
OZONO.**

**TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRA EN  
CIENCIAS BIOMÉDICAS**

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

**PATRICIA VERGARA ARAGÓN**

280628

**TUTOR: Dra. SELVA RIVAS ARANCIBIA**

**Coasesor: Dr. JUAN FERNÁNDEZ RUÍZ**

**México, D.F.**

**2000**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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

## INDICE

|  |    |
|--|----|
| Resumen.....   | 1  |
| 1. Antecedentes.....   | 2  |
| 1.1. Ozono.....  | 2  |
| 1.2. Radicales Libres.....   | 5  |
| 1.3. Estrés Oxidativo.....   | 8  |
| 1.4. Antioxidantes.....  | 9  |
| 1.5. Taurina.....  | 12 |
| 1.6. Memoria y Aprendizaje.....                                    | 17 |
| HIPÓTES Y OBJETIVOS  |    |
| 2. Hipótesis.....  | 20 |
| 2.1 Objetivos.....   | 21 |
| MATERIAL Y METODOS   |    |
| 3.1 Método General.....  | 22 |
| 3.2 Procedimiento General.....                                     | 24 |
| 3.2.1. Exposición a Ozono.....                                     | 24 |
| 3.2.2. Drogas.....   | 24 |
| 3.2.3. Registro de Conductas.....                                  | 24 |
| 3.2.4. Actividad Motora.....                                       | 25 |
| 3.2.5. Técnica para la Extracción de LCR.....                      | 27 |
| 3.2.6. Peroxidación de Lípidos.....                                | 27 |
| 3.2.7. Condicionamiento.....                                       | 28 |
| ANÁLISIS ESTADÍSTICO   |    |
| 4.1 Actividad Motora, Conducta de Exploración y Congelamiento..... | 30 |
| 4.2 Peroxidación de Lípidos.....                                   | 30 |
| 4.3 Memoria de Corto y de Largo Plazo.....                         | 30 |
| RESULTADOS   |    |
| 5.1 Registro de la Actividad Motora.....                           | 31 |
| Conducta de Exploración.....                                       | 34 |
| 5.2 Conducta de Congelamiento.....                                 | 37 |
| 5.3 Peroxidación de Lípidos.....                                   | 40 |
| 5.4 Memoria de Corto Plazo.....                                    | 43 |
| 5.5 Memoria de Largo Plazo.....                                    | 46 |
| DISCUSIÓN GENERAL.....   | 48 |
| CONCLUSIONES.....  | 58 |
| REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....                                    | 59 |

## RESUMEN

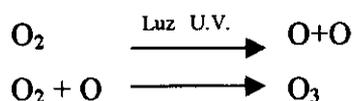
El Ozono ( $O_3$ ) es conocido como uno de los contaminantes ambientales más importantes. Dependiendo de la dosis, este gas aumenta la producción de radicales libres en el organismo, generando un estado de estrés oxidativo, cuando dichos radicales no alcanzan a ser neutralizados por las defensas antioxidantes. El propósito del presente trabajo fue estudiar el efecto de la exposición a ozono, sobre la actividad motora, exploración, conducta de congelamiento, niveles de peroxidación de lípidos, así como sus efectos sobre la memoria y el aprendizaje de las ratas. Para este fin se utilizaron 288 ratas macho de la cepa Wistar de 250-300 g. alojadas en cajas individuales, con libre acceso al agua y al alimento. Los animales se dividieron al azar en 2 bloques experimentales: Cada uno de los bloques se dividió a su vez en tres experimentos y cada experimento consistió en 6 subgrupos. El experimento 1 consistió en la exposición a 1 día de  $O_3$ ; experimento 2 en la exposición a 3 días de  $O_3$  y el experimento 3 en la exposición a 6 días de  $O_3$ . Los 6 grupos que conformaron cada experimento fueron: 1) exposición al aire corriente; 2) exposición a  $O_3$  0,8 ppm. durante 4 horas; 3) inyección i.p. de sol salina isotónica; 4) aplicación i.p. de 43 mg/kg. de taurina; 5) tratamiento de ozono + taurina (O+T) y 6) tratamiento de taurina + ozono (T+O). En el primer bloque experimental se midió la actividad motora, la conducta de exploración, congelamiento y se tomaron muestras de LCR a la altura de la articulación occipitoatloidea, para medir los niveles de peroxidación de lípidos. En el segundo bloque experimental los animales fueron sometidos a un condicionamiento de prevención pasiva donde se midió la memoria de corto plazo (MCP) a los 10 min. y la de largo plazo (MLP) a las 24 h. Los resultados mostraron; diferencias significativas entre el grupo control y los grupos tratados con  $O_3$  y T+O para todas las conductas probadas, en los niveles de peroxidación y en las pruebas de memoria y aprendizaje. Basados en estos resultados podemos concluir que: la exposición a  $O_3$  causa un estado de estrés oxidativo, que a su vez aumenta los niveles de peroxidación de lípidos. Cuando la taurina, es aplicada antes de la exposición a  $O_3$  aumenta el estado de estrés oxidativo y cuando se aplica después de la exposición a  $O_3$  ejerce un efecto antioxidante, capaz de evitar el aumento en la peroxidación de lípidos causados por  $O_3$ , así como también sus efectos sobre la actividad motora, exploración, congelamiento y deterioro en la MCP y MLP.

## 1. ANTECEDENTES

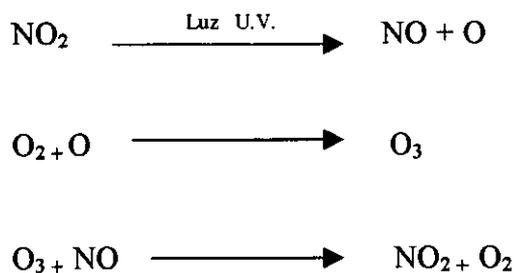
### 1.1. - Ozono

El ozono es una molécula altamente reactiva que actúa como un campo protector de la luz ultravioleta en la superficie terrestre. Sin embargo el ozono también es creado por la interacción con el oxígeno. Se genera a través de la disociación del bióxido de nitrógeno mediante la fotólisis por la luz solar, para producir óxido nítrico y un átomo de oxígeno. Este último se combina con el oxígeno (O<sub>2</sub>) del aire y así forma al ozono (O<sub>3</sub>), que es un oxidante secundario altamente potente y puede generar radicales libres. El ozono se forma cuando se unen tres átomos de oxígeno en lugar de los dos normales, el átomo extra de oxígeno hace que el O<sub>3</sub> sea un oxidante (Mustafa, 1990).

Generación de O<sub>3</sub> en la superficie de la tierra.



Generación de O<sub>3</sub> en "Smog" de las áreas urbanas.



Mecanismos de generación de ozono.

El  $O_3$  es uno de los gases contaminantes más importantes en las atmósferas urbanas y su grado de toxicidad depende de la concentración y duración de la exposición. La literatura reporta que la exposición crónica a  $O_3$  puede causar fatiga, cefalea irritación en mucosas, ojos, alteraciones del sueño (Huitron, 1994; Paz, 1997; Warner, 1993) y vías respiratorias altas (Kehrl, 1987; Koren, 1989; McGree, 1990; Ruznak, 1996; Schelegle, 1989). Los primeros estudios realizados sobre el  $O_3$  y su participación en el daño orgánico, se llevaron a cabo inicialmente en el sistema respiratorio. Se encontró que había una significativa disminución en el volumen espiratorio forzado y la capacidad vital de sujetos sanos no fumadores, durante el ejercicio muscular realizado en un ambiente de 0.02 a 0.12 ppm. de  $O_3$  (Spector, 1988). La exposición crónica a concentraciones ambientales de  $O_3$  también mostró una disminución en la función pulmonar de niños sanos (Spector, 1988). En deportistas se presentó broncoconstricción cuando la exposición a  $O_3$  fue a concentraciones menores de 0.08 ppm. (McDonnell, 1991). Otros autores han reportado efectos inflamatorios producidos por la exposición a 0.04 ppm. de ozono durante 2 h. tales como neutrofilia broncoalveolar e incremento en la inmunoglobulina G (Koren, 1989; Ruznak, 1996) acompañado por un incremento en el número de macrófagos alveolares inmaduros, incremento en la permeabilidad alveolar y en los niveles de prostaglandinas plasmáticas (Kehrl, 1987; McGree, 1990; Schelegle, 1989). A concentraciones de 0.1- 0.5 ppm. de  $O_3$ , produce cambios morfológicos en las células ciliadas del tracto respiratorio de ciertas especies animales, daños en la mucosa nasal de monos expuestos a 0.15 y 0.3 ppm. de ozono durante 6 días, metaplasia de células mucosas del epitelio nasal y en la tráquea de ratas expuestas a 0.5 ppm. de ozono durante 7 días (Harkema, 1987; Schwartz, 1976).

Se ha propuesto que el daño provocado por la peroxidación de las membranas de los epitelios del aparato respiratorio podría diseminarse hacia el torrente circulatorio, lo cual ocasionaría la dispersión de los radicales libres por vía sanguínea a otros sistemas (Paz, 1995).

ácidos grasos poliinsaturados, presentes en las membranas celulares, así como la oxidación de tioles, aminas, aldehídos, alcoholes y proteínas (Ciriolo, 1991; Cross, 1992).

El  $O_3$  reacciona preferentemente con los grupos sulfidrilo de las proteínas membranales; con los enlaces dobles de carbón de los ácidos grasos insaturados, dando como resultado la formación de aldehído e hidrohidroperóxido, este último al reaccionar con el agua en el citoplasma, forma otra molécula de aldehído y peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ). El  $H_2O_2$  contribuye de manera importante en la generación de radicales libres, debido a su gran afinidad con las moléculas de hierro al que se une y forman radicales hidroxilo que pueden iniciar el proceso de peroxidación de lípidos (Leikauf, 1995) ver Fig. 1.

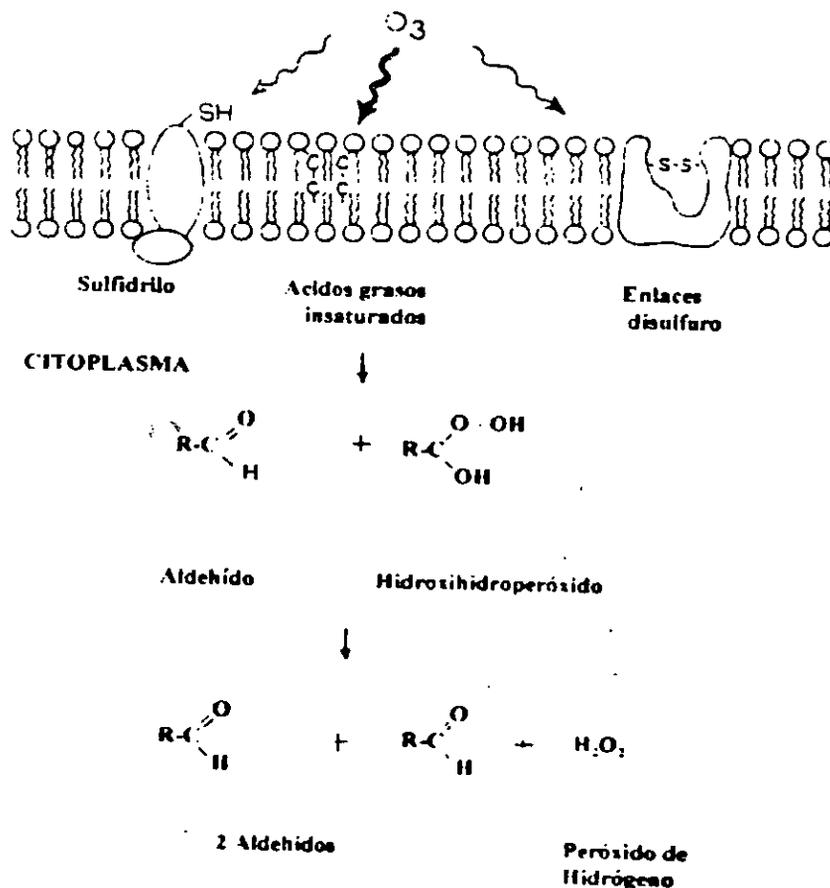


Fig. 1. Inicio del proceso de lipoperoxidación.

## **1.2.- Radicales Libres.**

Un radical libre es una especie química (orgánica o inorgánica), molécula ó átomo, portadora de uno o más electrones desapareados, en una de sus órbitas (Halliwell, 1984; 1985). Se llama electrón desapareado al electrón que se encuentra solo en un orbital. La presencia de un electrón desapareado hace que los radicales libres sean muy reactivos, pues buscan con avidez completar su par electrónico. No obstante, existen radicales libres relativamente estables, como las moléculas con estructuras resonantes o con múltiples enlaces dobles (Halliwell, 1984; 1985).

Los radicales libres son capaces de alterar compuestos bioquímicos de todo tipo, permitiendo que se modifique en forma importante su estructura y como consecuencia, se altera la capacidad funcional de las sustancias atacadas (Sinet, 1980). El principal blanco de los radicales libres son las insaturaciones de los lípidos en la membrana provocando su peroxidación. La presencia de lípidos peroxidados en las membranas biológicas disminuye su fluidez, lo que provoca alteraciones en su permeabilidad, en su integridad física, finalmente causa lisis celular ( McCord, 1985; Olanow, 1993 a). Los radicales libres también son capaces de inactivar o destruir enzimas, proteínas y atacar a los ácidos nucleicos (Halliwell, 1984; 1985). La acción sobre proteínas puede alterar su función como receptores (de hormonas o neurotransmisores). Los radicales libres influyen en actividades celulares en las membranas como en vías metabólicas y en la expresión genética (Diplock, 1994; Simonian, 1996; Richards, 1988). Una de las características más importantes de las reacciones de los radicales libres es que se realizan en cadena: esto significa que un radical libre puede dar lugar a la formación de otro, de manera que la actividad se propague y el daño se generalice (Jansen, 1993; Kruman, 1997).

Los radicales libres se generan en el organismo: En forma exógena o endógena.

Forma exógena:

La formación de radicales es consecuencia de la contaminación ambiental producida por radiaciones, herbicidas, plagas, humo de cigarro, emisión de automóviles, fabrica, etc.

### Forma endógena en el organismo

Durante el metabolismo celular, en las células del sistema inmune como neutrófilos, monocitos, macrófagos, eosinófilos, en la microglia del tejido nervioso (Halliwell, 1989; Rice-Evans, 1994) y como producto del metabolismo aeróbico celular.

### Radicales libres derivados del oxígeno

La mayor parte del oxígeno (90%) consumido por los eucariontes es utilizado por las mitocondrias en el proceso de fosforilación oxidativa y es reducido a agua en la cadena respiratoria. Una pequeña fracción de oxígeno (2-5%) es transformada en intermediarios del oxígeno como son el radical superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y el radical hidroxilo ( $\cdot OH$ ). El  $O_2^{\cdot-}$  y el  $\cdot OH$  son radicales libres por definición debido a que contienen un electrón no apareado en su estructura atómica. Colectivamente ellos son clasificados como especies reactivas de oxígeno (ROS) (Harman, 1986).

Se ha propuesto que la producción de radicales libres en pequeñas cantidades, ocurre en todos los procesos metabólicos inherentes al organismo en el retículo endoplásmico liso y rugoso, en los lisosomas, microsomas, peroxisomas y en las mitocondrias por alteraciones en la cadena respiratoria (Halliwell, 1984; Mc Cord, 1985).

### Mecanismos de Acción de los Radicales Libres

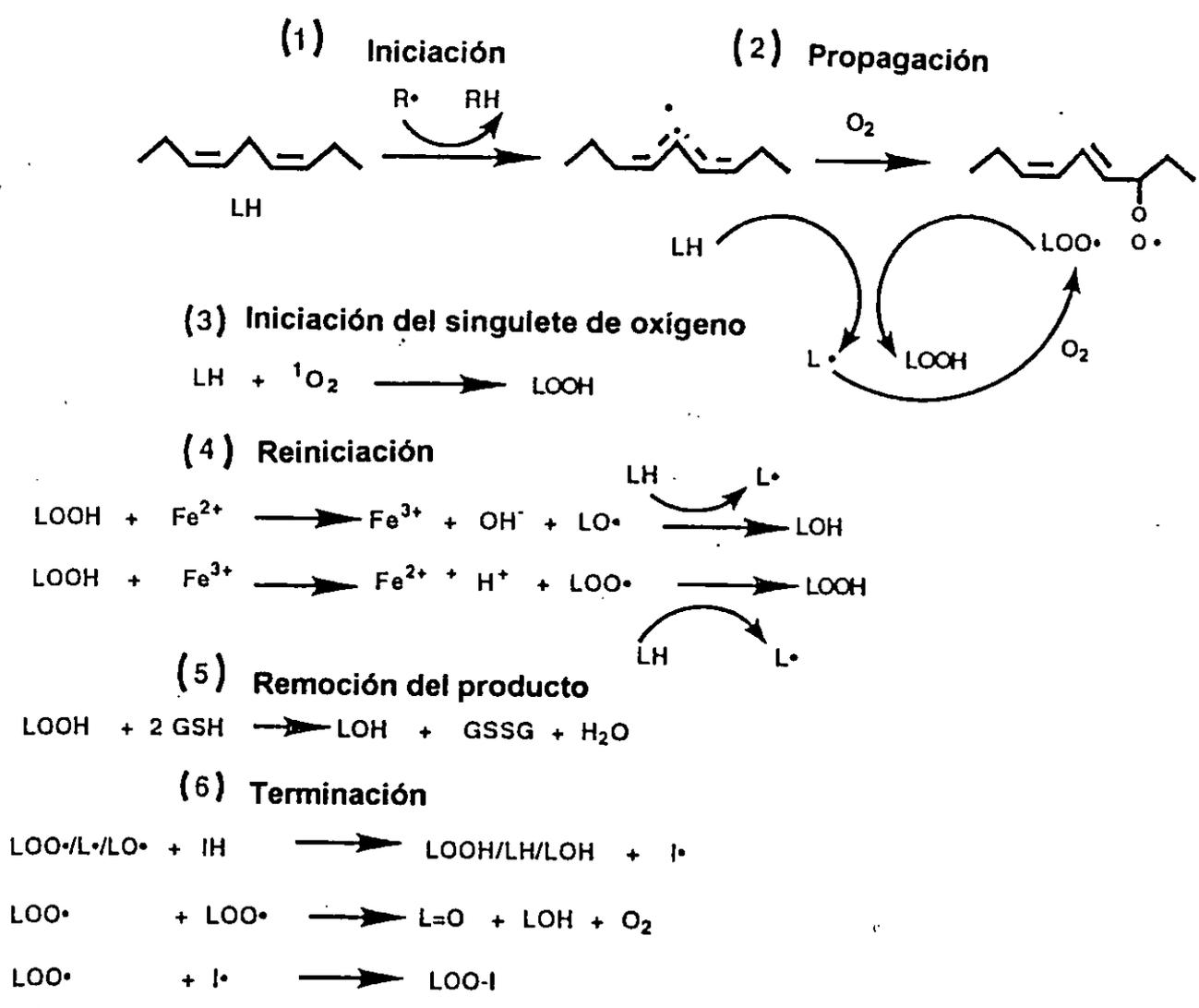
- 1.- **Iniciación:** los ácidos grasos poliinsaturados son atacados por radicales libres ( $R\cdot$ ) extrayendo una unión de la doble unión alílica. Una amplia variedad de especies de radicales como el radical ( $\cdot OH$ ), ( $\cdot LOO$ ), ( $\cdot LO$ ) o el ( $\cdot L$ ) pueden iniciar esta reacción.
- 2.- **Propagación:** el producto del radical ataca un ácido graso poliinsaturado ( $LH$ ) reacciona con  $O_2$  para formar al radical peroxilo ( $\cdot LOO$ ) que extrae un átomo de hidrógeno de los ácidos grasos insaturados para tomar otro radical libre y un peróxido.
- 3.- **Iniciación del singulete de oxígeno:** los ácidos grasos insaturados reaccionan con el singulete de oxígeno formando peróxidos.

4.- Reiniciación: para que se inicie la peroxidación lipídica se utiliza la vía catalizada por metales oxidados de peróxidos a alcóxilo, hidroxilo y alcilo que inician el proceso peroxidativo.

5.- Remoción del producto: el hidroperóxido más el glutatión reducido son catalizados por la glutatión peroxidasa dependiente de selenio para formar alcohol de ácidos grasos, agua y glutatión oxidado.

6.- Terminación: Los radicales peroxilo, alcóxilo y pentiadenilo que no son capaces de abstraer hidrógeno son considerados como antioxidantes rompedora (Halliwell, 1985) ver Fig. 2.

**Mecanismo de acción de los radicales libres**



### **1.3.- Estrés Oxidativo.**

La exposición a ozono forma parte importante de la contaminación ambiental a la que diariamente estamos expuestos y la consecuente generación de radicales libres dentro del organismo. Cuando estos no pueden ser inactivados por las defensas antioxidantes, se genera un estado de estrés oxidativo. El estrés oxidativo se refiere a un desequilibrio que existe entre prooxidantes y antioxidantes a favor de los prooxidantes. Puede ocurrir cuando la producción de radicales libres aumenta, cuando los barredores de radicales libres disminuyen o cuando las macromoléculas que reparan el daño oxidativo disminuyen.

El estrés oxidativo puede iniciarse por numerosos factores como: alteraciones nutricionales, carencia de minerales y vitaminas, lesiones, trastornos hereditarios, exposición a agentes físicos y químicos ambientales (Olanow, 1993 a,b; Wilson, 1997).

El aumento de radicales libres causa alteraciones celulares, que se traducen en cambios en los neurotransmisores y receptores, lo que a su vez produce alteraciones en las funciones cerebrales superiores y pueden valorarse conductualmente (Olanow, 1993a; Rivas, 1998; 2000). Estos factores determinan una mayor sensibilidad del tejido cerebral a los efectos citotóxicos, y en especial de algunos receptores de membrana, como los D2 y muscarínicos, los cuales juegan un papel muy importante en los procesos de plasticidad cerebral como en los de memoria y aprendizaje (Joseph and Cutler, 1995).

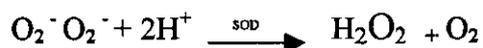
#### 1.4.- Antioxidantes.

Un antioxidante es un compuesto químico o sustancia que inhibe una reacción de oxidación, estos compuestos protegen a los sistemas biológicos contra los efectos dañinos de las reacciones que causa la oxidación.

Para controlar los efectos de un incremento en los radicales libres existen mecanismos protectores. Estos mecanismos tienen la función de inactivar a los radicales libres o de evitar su aparición.

El nivel primario de defensa esta constituido de la siguiente manera:

1.- Superóxido dismutasa. Presente en las mitocondrias (SOD / Mn<sup>++</sup>) y en el citosol (SOD Cu<sup>++</sup> / Zn<sup>++</sup>) cataliza la dismutación de O<sub>2</sub><sup>-</sup> a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>



2.- Glutati6n peroxidasa (GSH-Px). Convierte los per6xidos producidos por la dismutaci6n de los radicales libres en agua y ox6geno molecular, existe en el citosol y contiene selenio (Se GSH-Px).

3.- Catalasas. Existen en los peroxisomas y su funci6n es destruir los per6xidos por dismutaci6n.

4.- Vitaminas A, C y E.

5.- Minerales: el selenio, el zinc, el cobre y el manganeso

6.- Prote6nas, p6ptidos y amino6cidos como la taurina

Los sistemas biol6gicos utilizan diversas formas de defensa en contra de los radicales libres para contrarrestar el da6o y se han clasificado a los sistemas antioxidantes biol6gicos en dos grupos: Antioxidantes Biol6gicos de los Sistemas enzim6ticos y no Enzim6ticos. (Chan, 1980; Sies, 1991).

##### A) Antioxidantes Biol6gicos Enzim6ticos

La enzima super6xido dismutasa (SOD) genera per6xido de hidr6geno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) y ox6geno (O<sub>2</sub>) a partir de dos radicales super6xido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) y 2 mol6culas de Hidr6geno. A su vez esta 6ltima mol6cula genera dos mol6culas de agua y ox6geno por la participaci6n de una enzima antioxidante que es la catalasa. Pero si en lugar de estas enzimas se encontraran metales como el fierro (Fe<sup>++</sup>) entonces se generar6an

radicales hidroxilo (OH) cuando reaccionan con  $(O_2^-)$  y  $(H_2O_2)$  en una reacción llamada de tipo Fenton. Además, existen otras dos enzimas, la Se-GSH-Px que reduce los hidroperóxidos de ácidos grasos en la membrana celular, y su sustrato fosfolipasa A2 cataliza la reacción para que los hidroperóxidos de fosfolípidos se conviertan a hidroperóxidos de ácidos grasos libres y fosfolípidos. Mientras que la Se-GSH-Px cataliza la reacción donde se convierte a los hidroperóxidos de ácidos grasos libres con 2 moléculas de glutatión reducidos a alcoholes de ácidos grasos libres, glutatión oxidado y agua. La glutatión peroxidasa de hidroperóxidos de fosfolípidos (PLOOH.GSH-Px) actúa con los hidroperóxidos de fosfolípidos al igual que la enzima anterior, pero esta no tiene que hidrolizar los hidroperóxidos de ácidos grasos de los fosfolípidos, sino que actúa directamente generando los mismos productos que la Se-GSH-Px.

B).- Antioxidantes No Enzimáticos: Previenen la peroxidación lipídica y están divididos en dos grandes grupos:

- 1).- Solubles en Lípidos
- 2).- Solubles en Agua.

#### Solubles en Lípidos

- a).  $\alpha$  Tocoferol: reacciona con los radicales peroxilo formando un radical centro oxigenado.
- b)  $\beta$  carotenos: reacciona con radicales peroxilo formando un radical centro carbonado.
- c) Quinonas (Coenzima Q): en su forma reducida (ubiquinona inhibe la peroxidación lipídica y reduce al radical  $\alpha$  Tocoferoxilo a  $\alpha$  Tocoferol
- d) Bilirrubina: inhibe la peroxidación lipídica.

Solubles en agua

- a) Acido ascórbico: se encuentra en plasma, líquido sinovial y líquido cefalorraquídeo, reduce al radical  $\alpha$  Tocoferoxilo a  $\alpha$  Tocoferol que es un barredor del  $O_2$ .
- b) Acido Úrico: se encuentra en el plasma y es un barredor de radicales libres.
- c) Albúmina: se une a iones de cobre y bilirrubina.
- d) Haptoglobina: se adhiere a la hemoglobina previniendo la reacción con  $H_2O_2$  por la aceleración de la peroxidación lipídica.
- e) Taurina: aminoácido sulfonado con diversas funciones entre otras es considerado un antioxidante.

### 1.5.- Taurina.

La Taurina (ácido 2-aminoethanesulfónico) es considerado como el segundo aminoácido libre más abundante después del glutamato en el sistema nervioso central (SNC). Estructuralmente la taurina se ha relacionado con algunos aminoácidos inhibitorios, GABA y glicina. Sin embargo, la taurina difiere del GABA y de la glicina por un aminoácido sulfónico en lugar de uno carboxílico y por ser un  $\beta$ -aminoácido en lugar de un  $\alpha$ -aminoácido como la glicina. (Fig.4).

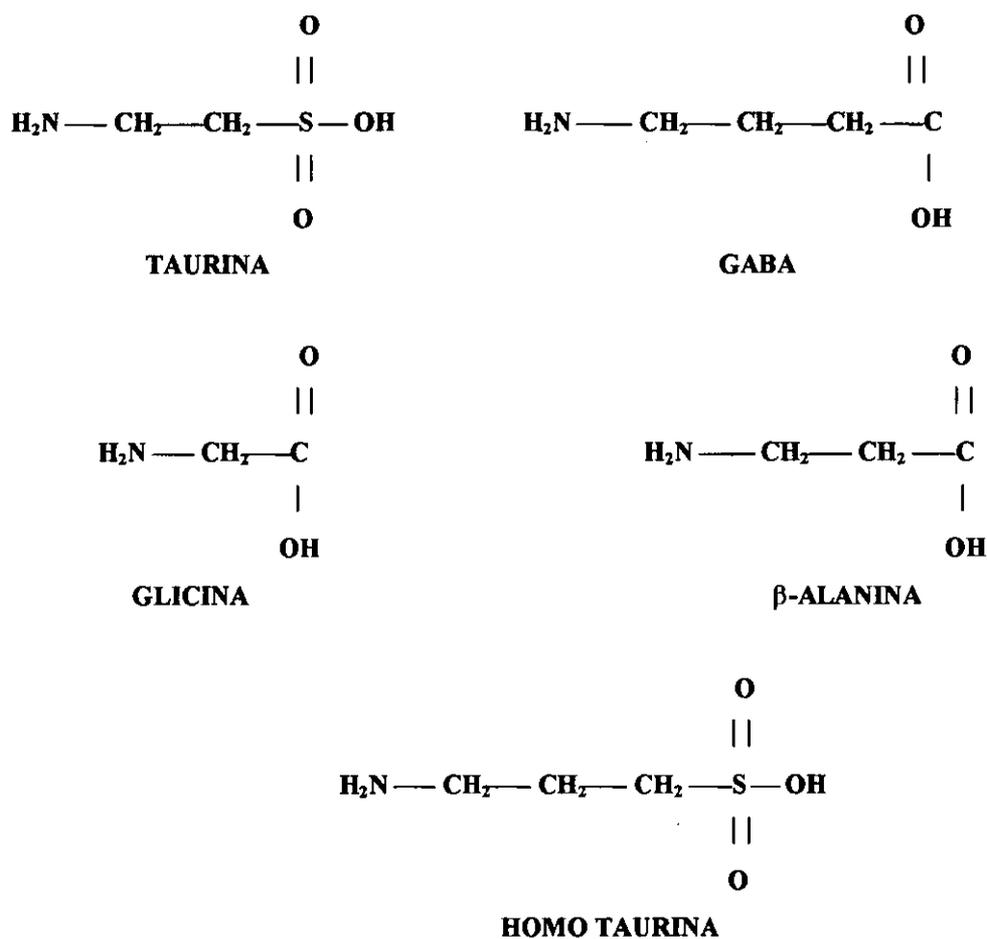


Fig. 4. Estructura química de la taurina y su relación estructural con otros aminoácidos.

La vía predominante para la síntesis de taurina en el sistema nervioso, es a partir de la oxidación por una dioxigenasa al ácido sulfinatocisteína (CSA), la cual sé

descarboxila a hipotaurina por la descarboxilasa sulfinatocisteína (CSD) y la subsecuente oxidación de hipotaurina a taurina (Huxtable, 1992; Routsalainem, 1996). Se atribuye un efecto citoprotector a la síntesis de taurina, al favorecer la conversión de cisteína en los antioxidantes hipotaurina y taurina (Eppler, 1998; Huxtable, 1992; Miller, 1990; Monks, 1992). La CSD es la enzima más importante para la biosíntesis de taurina *in vivo* se le encuentra en altas concentraciones en los ganglios basales (Spears, 1982). La taurina y CSD se han encontrado en las mismas terminales nerviosas que se proyectan hacia la sustancia nigra (Legay, 1987).

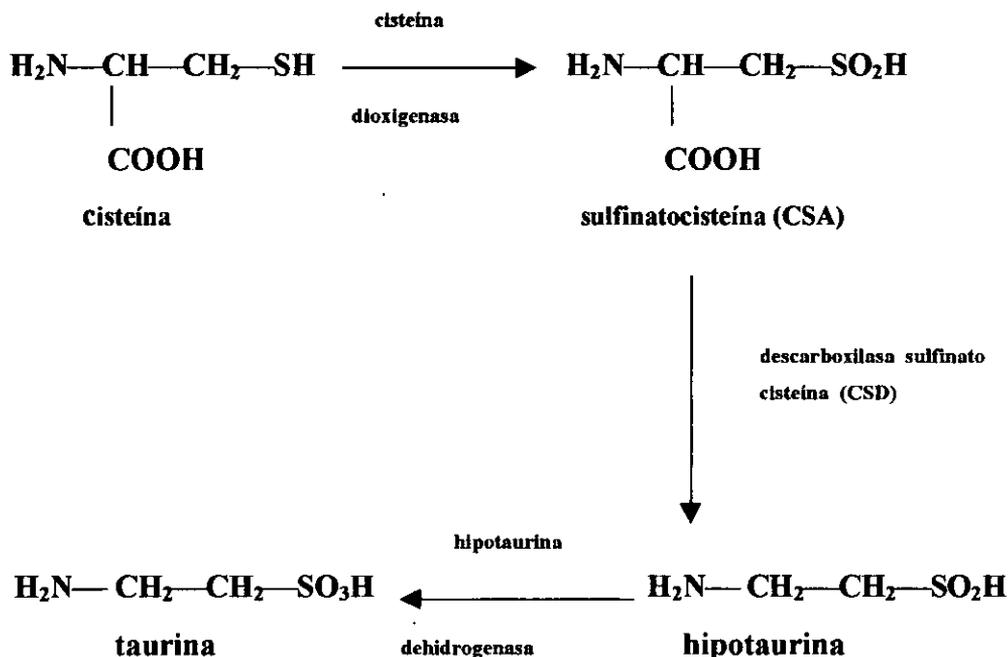


Fig. 5. Biosíntesis de taurina a partir de la cisteína (modificado por Huxtable, 1989).

La taurina tiene una naturaleza ácida y es suiteriónica, estas características le permiten a la taurina, poseer una gran solubilidad al agua y una baja lipofilicidad, la pobre liposolubilidad favorece un mayor gradiente de concentración en las células

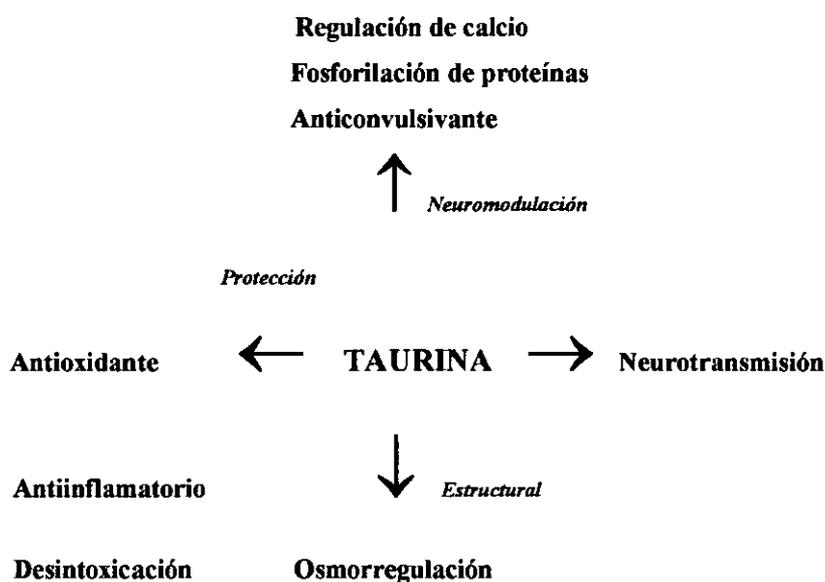
(Huxtable, 1986; 1992). Así el contenido de taurina intracelular en el tejido cerebral es mucho mayor que la concentración extracelular por ejemplo: en el cerebro de la rata de 1-10  $\mu\text{mol/g}$ . de peso húmedo, mientras que en el espacio extracelular la concentración es de 10-100  $\mu\text{M}$ . (Huxtable, 1992; Shain, 1990). Los niveles de taurina encontrados en el plasma humano son de 44  $\text{nmol/ml}$  valores muy cercanos a la concentración de taurina reportada en el plasma de ratas 60  $\text{nmol/ml}$ . (Fukuda, 1983; Paauw, 1990). Se ha mostrado que la taurina cuando es inyectada intraperitonealmente (20  $\mu\text{mol/g}$ ), logra su pico máximo de actividad específica a las 24 h en el cerebro fetal mientras, que en el cerebro materno aparece una cuarta parte de la concentración fetal (5 $\mu\text{mol/g}$ ) una semana después (Sturman, 1979).

La distribución de taurina en ciertos mamíferos es amplia, pero sobre todo las concentraciones más altas se han reportado en los tejidos excitables como el sistema cardiovascular, estructuras con funciones endocrinas como el hígado, el aparato reproductor, la glándula pituitaria (Huxtable, 1989), retina, sistema muscular, hipocampo, estriado (ST), sustancia nigra (SN), cerebelo, giro dentado, núcleo hipotalámico anterior, corteza visual (Bianchi, 1996; Decavel, 1995; Lombardini, 1976; Palkovits, 1990), bulbo olfatorio y la eminencia media. De acuerdo con estudios inmunocitoquímicos realizados por Madsen (1990) la taurina se localiza predominantemente en las células gliales del tálamo, hipotálamo y tallo cerebral (Bianchi, 1996; Palkovits, 1990).

Las concentraciones de taurina son significativamente más altas en el cerebro del recién nacido que durante la etapa adulta (Huxtable, 1992; Oja, 1978; Palkovits, 1990; Strolin, 1990). También se sabe que el metabolismo de la taurina es extremadamente lento en las neuronas y en la corteza cerebral de ratones, en contraste con el GABA que es transportado con gran eficiencia por neuronas y células gliales (Chung, 1994). El mecanismo de transporte de la taurina a través de la barrera hematoencefálica (Huxtable, 1992; Kamisaki, 1996; Routsalainen, 1996; Stummer, 1995; Sturman, 1988) es por acarreadores regulados directamente por gradientes de concentración de  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$  a través de la membrana luminal (Bianchi, 1996; Huxtable, 1992; Kamisaki, 1996; Tsuji, 1996).

---

A pesar de su amplia distribución, las funciones que desempeña la taurina han sido difíciles de establecer con certeza. Sin embargo, se le atribuyen funciones de neurotransmisor en los ganglios basales y el hipocampo (Bianchi, 1996; Dawson, 1998; Galarreta, 1996; Huxtable, 1992; Magnusson, 1996; Routsalainen, 1996; Sturman, 1989), neuromodulador y liberador de hormonas, desempeña funciones motoras, participa en la regulación de la termorregulación (Bianchi, 1996; Dawson, 1998; Galarreta, 1996; Huxtable, 1992; Sgaragli, 1996), disminuye la hipercolesterolemia, es estimulante de la glicólisis y la glicogénesis (Huxtable, 1992), desempeña funciones de osmorregulador (Huxtable, 1992; Pasantes, 1996) y se le ha propuesto un papel antioxidante (Dawson, 1996; Rivas, 1998; 2000; Saransaari, 1996; Huxtable, 1992).



**Fig 6. Posibles funciones de la taurina**

Los trabajos de Sgaragli y Bianchi (1996) mencionan que la taurina cumple muchos de los criterios de un neurotransmisor en los ganglios basales:

1).- Localización: la taurina y su maquinaria bioquímica han sido localizadas en el sistema estriatonigral.

2).- Liberación: La taurina es liberada en la sustancia nigra por estimulación farmacológica del estriado (Bianchi, 1996).

3).- Neuroefectividad o mimetismo sináptico: La aplicación de taurina en la sustancia nigra causa movimientos de giro contralateral, que pueden ser inhibidos por la aplicación de un antagonista de la taurina como el AMBD (Yarbrough, 1981).

4).- farmacología de los efectos sinápticos: los efectos farmacológicos en la sinápsis son producidos por drogas que aumentan o bloquean la respuesta postsináptica tanto para la liberación neural como para la administración de un probable neurotransmisor en estudio.

---

### **1.6.- Memoria y Aprendizaje.**

Aprendizaje es el proceso de adquirir nueva información, mientras que el término memoria se refiere a la persistencia de este aprendizaje o almacén de información en un estado que puede ser recuperado después de un tiempo. La memoria es la consecuencia habitual del aprendizaje y puede ser dividida en: memoria de corto y de largo plazo.

#### **Memoria de Corto Plazo**

Llamada también memoria de trabajo, es la información que mantenemos en la conciencia, en un sistema de almacenamiento temporal; dura mientras la estamos utilizando (Baddeley, 1983) citado en (Hall, 1989; Searleman, 1994). Una de las maneras de medir la memoria de corto plazo es la de examinar una lista de palabras las cuales tienden a recordarse en cualquier orden (Searleman, 1994).

#### **Memoria de Largo Plazo**

Cuando la información ha dejado de ocupar nuestra atención y dejamos de tener conciencia de ella, pasa a formar parte de la memoria secundaria o memoria de largo plazo. La memoria de largo plazo viene precedida de un periodo de consolidación entre 15 y 60 minutos (Corbella, 1994).

#### **Clasificación de la memoria de Largo plazo.**

La memoria de Largo plazo tiene otra subdivisión: Semántica, Episódica y de Procedimiento. La memoria semántica se refiere al conocimiento general que tenemos del mundo, así la memoria semántica abarca una cantidad asombrosa de información almacenada en la memoria de largo plazo. Por ejemplo, los significados de todas las palabras, símbolos, reglas y hechos son considerados como parte de la memoria semántica (Searleman, 1994; Squire, 1993). Existen diferentes tipos de modelos de memoria semántica. Un modelo es el de comparación de características, el cual asume que los conceptos son representados en la memoria en forma de listas de atributos o características (Searleman, 1994). El otro modelo se llama modelo de redes el cual propone que los conceptos están ligados juntos en un sistema amplio de

redes. Cada concepto es representado por nodos en la red. Los modelos de redes más poderosos son aquellos donde asumen que hay una activación en la propagación entre nodos (Searleman, 1994).

La memoria episódica se refiere a eventos específicos y experiencias de nuestra vida, es decir, esta unida a eventos autobiográficos. Es probablemente un subconjunto de la memoria semántica.

La memoria de procedimiento: implica aprender como realizar una tarea o adquirir una nueva habilidad, ej. aprender a andar en bicicleta, donde la mejor manera de enseñarlo es al demostrarlo y después practicarlo hasta dominar la técnica (Squire, 1993; Tulving, 1993; Zola-Morgan, 1993).

Algunos investigadores han preferido el término de memoria no declarativa en vez de memoria de procedimiento (Squire, 1993; Zola-Morgan, 1993) para poder entender mejor los tipos de tareas de aprendizaje que preservan los pacientes con amnesia. Dichas personas pueden aprender y recordar habilidades motoras y perceptuales, tareas cognoscitivas si su procedimiento es probado en la manera correcta (Searleman, 1994; Squire, 1993; Zola-Morgan, 1993).

Por otro lado la psicología experimental ha subdividido el aprendizaje en dos categorías principales: El aprendizaje asociativo y no asociativo (Ardila, 1989).

El aprendizaje asociativo, como el condicionamiento clásico o el operante involucran 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 reforzador, positivo (alimento) o negativo (choque). En el aprendizaje operante la presentación del reforzador, se asocia a la conducta del animal (presionar una palanca o evitar un choque) (Ardila, 1989). Tanto para el aprendizaje clásico como para el operante el estímulo condicionado, debe preceder al estímulo no condicionado para que ocurra el aprendizaje. De esta manera se pueden realizar las curvas de aprendizaje y memoria subsecuentes a un condicionamiento de prevención pasiva. En estas curvas es posible indicar si el sujeto cumplió con determinados criterios de aprendizaje. La duración de la memoria puede valorarse mediante la

medición de pruebas de memoria a intervalos dados. La formación de memoria en tareas de evitación pasiva sigue tres fases secuenciales: La más temprana (memoria de corto plazo), comienza a declinar a los 10 minutos después del entrenamiento. La segunda (memoria de trabajo), declina a los 30 minutos después del entrenamiento y la fase final (memoria de largo plazo) persiste por un mínimo de 24 horas después del entrenamiento. Los procedimientos de evitación pasiva se utilizan para medir alteraciones cognitivas subsecuentes a la administración de algún fármaco, lesiones ó manipulación conductual. El procedimiento asume que el animal recordará que cierta conducta terminó con un evento desagradable y entonces dudará de repetirla en el futuro, de esta manera el incremento en la latencia de respuesta refleja la fuerza de la memoria para el evento adverso (Ardila, 1989).

---

## **HIPOTESIS.**

1.- Si la exposición a ozono incrementa los niveles de peroxidación de lípidos en el líquido cefalorraquídeo, entonces dicho incremento puede ser bloqueado por el uso de un antioxidante como la taurina.

2.- Si las alteraciones en la actividad motora, exploración y congelamiento de las ratas, son causadas por un estado de estrés oxidativo, generado por la exposición a ozono, entonces la administración de un antioxidante como la taurina aplicado por vía i.p. después de la exposición reducirá tales alteraciones.

3.- Si la exposición a ozono produce deterioro en los procesos mnémicos, entonces la aplicación de un antioxidante como la taurina, después de la exposición a O<sub>3</sub> reducirá las alteraciones en la memoria y el aprendizaje.

---

## 2.1.- OBJETIVOS

1).- Relacionar el estado de estrés oxidativo generado por la exposición a ozono con las pruebas bioquímicas de peroxidación de lípidos en el Líquido Cefalorraquídeo de ratas.

2).- Estudiar el efecto de la exposición a ozono o la aplicación i.p. de taurina sobre la peroxidación de lípidos.

3).- Estudiar el efecto de la exposición a ozono o la aplicación de taurina, sobre las conductas de exploración, congelamiento y actividad motora de las ratas.

4).- Estudiar los efectos de la exposición a ozono en ratas tratadas con taurina sobre la memoria de corto y de largo plazo.

5).- Estudiar los efectos de la taurina aplicada antes y después de la exposición a ozono sobre la actividad motora, las conductas de exploración, congelamiento, así como las memorias de corto y largo plazo.

### **3.- Material y Método**

#### **3.1.- Método General**

Se utilizaron 288 ratas machos de la cepa Wistar de 250-300 g. Los animales fueron colocados individualmente en cajas de acrílico, con libre acceso al agua y al alimento ( Nutri-cubo, Purina , USA). Los animales se dividieron en dos bloques experimentales.

#### **Primer Bloque Experimental**

En este bloque de experimentos se estudiaron los efectos del ozono sobre las conductas de exploración, congelamiento y la actividad motora. Se estudio el efecto de la taurina sobre estas conductas y se tomaron las muestras de LCR para medir los niveles de peroxidación de lípidos.

#### **Experimentos**

Se utilizaron 144 ratas que se dividieron en tres protocolos de tratamiento.

Experimento 1 consistió en la exposición a 1 día de ozono.

Experimento 2 consistió en la exposición a 3 días de ozono.

Experimento 3 consistió en la exposición a 6 días de ozono.

Cada uno de estos 3 experimentos se conformo por cinco grupos que se eligieron al azar y cada grupo recibió los siguientes tratamientos.

Grupo 1 : exposición al aire corriente (n=8)

Grupo 2: exposición a 0.8 ppm. de ozono durante 4 horas (n=8)

Grupo 3: inyección i.p. de solución salina isotónica 0.2 ml (n=8)

Grupo 4: inyección i.p. de taurina 43 mg/kg. (n=8)

Grupo 5: exposición a ozono 0.8 ppm. durante 4 horas e inmediatamente después la inyección i.p. de taurina 43 mg/kg. (n=8)

Grupo 6: administración de taurina i.p. 43 mg/ kg e inmediatamente después la exposición a ozono 0.8 ppm. durante 4 horas. (n=8)

En todos los grupos del primer bloque experimental se midió la conducta de exploración, congelamiento y la actividad motora. Después de medir dichas conductas se les tomó una muestra de LCR (20 - 25  $\mu$ l) en la articulación occipitoatloidea.

La muestra sirvió para medir peroxidación de lípidos por medio de técnica de inmunquímica K-assay LPO-CC).

### **Segundo Bloque Experimental.**

En el segundo bloque experimental los animales fueron sometidos a un condicionamiento de evitación pasiva, donde se midió la memoria de corto plazo a los 10 minutos y la de largo plazo a las 24 horas.

### **Experimentos:**

Se utilizaron 144 ratas que se dividieron en tres experimentos:

Experimento 1 consistió en la exposición a 1 día de ozono.

Experimento 2 consistió en la exposición a 3 días de ozono.

Experimento 3 consistió en la exposición a 6 días de ozono.

Cada uno de estos 3 experimentos estaba formado por cinco grupos que se eligieron al azar y cada grupo recibió los siguientes tratamientos.

Grupo 1 : exposición al aire corriente (n=8)

Grupo 2: exposición a 0.8 ppm. de ozono durante 4 horas (n=8)

Grupo 3: inyección i.p. de solución salina isotónica 0.2 ml (n=8)

Grupo 4: inyección i.p. de taurina 43 mg/kg. (n=8)

Grupo 5: exposición a ozono 0.8 ppm. durante 4 horas e inmediatamente después la inyección i.p. de taurina 43 mg/kg. (n=8)

Grupo 6: administración de taurina i.p. 43 mg/ Kg e inmediatamente después la exposición a ozono 0.8 ppm. durante 4 horas. (n=8)

## PROCEDIMIENTO GENERAL

### 3.2.1. Exposición a ozono

Los animales fueron colocados en una cámara cerrada, con un difusor conectado a un generador de  $O_3$  que permite la administración de una dosis constante de gas. El  $O_3$  fue generado desde un tubo sellado. Para medir la concentración de ozono se conectó la cámara a un medidor de ozono marca PCI ozone Control Systems, Inc, modelo LC 400, aprobado por E.P.A. que se mantenía conectado durante la exposición de los animales a 0.8 ppm de  $O_3$  durante 4 horas (Fig. 7).

### SISTEMA DE EXPOSICIÓN A OZONO

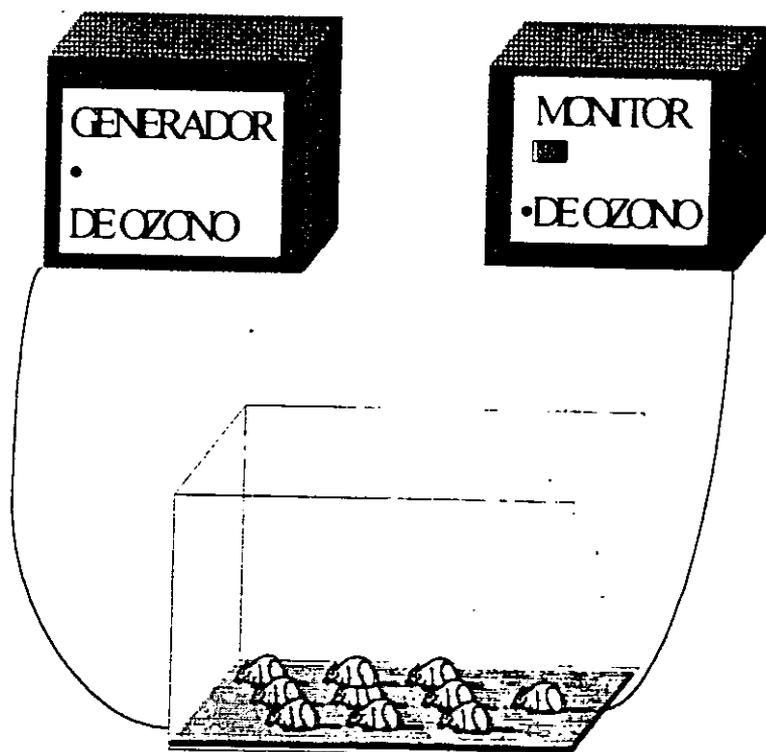


Fig. 7. La figura muestra el sistema de exposición a ozono, al que fueron sometidas las ratas durante un período de 4 horas a una concentración de 0.8 ppm.

**3.2.2. Drogas**

Se administró taurina sintética Sigma (2- ac. Aminoethansulfónico). Se aplicó por vía intraperitoneal (i.p.) 43 mg/ Kg, antes ó después de la exposición a ozono. Como tratamiento control se empleo solución salina isotónica (0.2 ml i.p.).

**3.2.3. Registro de Conductas**

Las conductas de exploración y congelamiento se midieron en cada uno de los animales expuestos crónicamente a ozono en sus cajas de alojamiento individual. Se observó la conducta que se presentó cada segundo durante 5 minutos, utilizando para este fin un metrónomo con audifono para marcar el tiempo al observador y un contador digital para registrar la frecuencia de cada una de las conductas en una hoja de registro previamente diseñada (Fig.8).

**REGISTRO CONDUCTUAL Y DE ACTIVIDAD MOTORA  
EN 300 SEGUNDOS**

Grupo Experimental \_\_\_\_\_ No de Rata \_\_\_\_\_  
 Edad \_\_\_\_\_ Peso \_\_\_\_\_  
 Fecha \_\_\_\_\_ Sexo \_\_\_\_\_

Conductas en seg  
 (-) Exploración \_\_\_\_\_ (/) Acicalarse \_\_\_\_\_  
 (.) Congelamiento \_\_\_\_\_ (0) Sueño \_\_\_\_\_

|       |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |  |
|-------|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|--|
|       | 1  | 2  | 3  | 4  | 5  | 6  | 7  | 8  | 9  | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 | 21 | 22 | 23 | 24 | 25 | 26 | 27 | 28 | 29 | 30 |  |
| Min 1 |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |  |
|       | 31 | 32 | 33 | 34 | 35 | 36 | 37 | 38 | 39 | 40 | 41 | 42 | 43 | 44 | 45 | 46 | 47 | 48 | 49 | 50 | 51 | 52 | 53 | 54 | 55 | 56 | 57 | 58 | 59 | 60 |  |
|       |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |  |
|       | 1  | 2  | 3  | 4  | 5  | 6  | 7  | 8  | 9  | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 | 21 | 22 | 23 | 24 | 25 | 26 | 27 | 28 | 29 | 30 |  |
| Min 2 |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |  |
|       | 31 | 32 | 33 | 34 | 35 | 36 | 37 | 38 | 39 | 40 | 41 | 42 | 43 | 44 | 45 | 46 | 47 | 48 | 49 | 50 | 51 | 52 | 53 | 54 | 55 | 56 | 57 | 58 | 59 | 60 |  |
|       |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |  |
|       | 1  | 2  | 3  | 4  | 5  | 6  | 7  | 8  | 9  | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 | 21 | 22 | 23 | 24 | 25 | 26 | 27 | 28 | 29 | 30 |  |
| Min 3 |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |  |
|       | 31 | 32 | 33 | 34 | 35 | 36 | 37 | 38 | 39 | 40 | 41 | 42 | 43 | 44 | 45 | 46 | 47 | 48 | 49 | 50 | 51 | 52 | 53 | 54 | 55 | 56 | 57 | 58 | 59 | 60 |  |
|       |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |  |
|       | 1  | 2  | 3  | 4  | 5  | 6  | 7  | 8  | 9  | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 | 21 | 22 | 23 | 24 | 25 | 26 | 27 | 28 | 29 | 30 |  |
| Min 4 |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |  |
|       | 31 | 32 | 33 | 34 | 35 | 36 | 37 | 38 | 39 | 40 | 41 | 42 | 43 | 44 | 45 | 46 | 47 | 48 | 49 | 50 | 51 | 52 | 53 | 54 | 55 | 56 | 57 | 58 | 59 | 60 |  |
|       |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |  |
|       | 1  | 2  | 3  | 4  | 5  | 6  | 7  | 8  | 9  | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 | 21 | 22 | 23 | 24 | 25 | 26 | 27 | 28 | 29 | 30 |  |
| Min 5 |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |  |
|       | 31 | 32 | 33 | 34 | 35 | 36 | 37 | 38 | 39 | 40 | 41 | 42 | 43 | 44 | 45 | 46 | 47 | 48 | 49 | 50 | 51 | 52 | 53 | 54 | 55 | 56 | 57 | 58 | 59 | 60 |  |
|       |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |  |

Fig.8. Muestra de una hoja de registro de conductas (-) Exploración, (.) congelamiento, (/) acicalamiento, (0) sueño.

### 3.2.4. Actividad Motora.

La actividad motora se midió durante un período de 3' minutos, utilizando un monitor de actividad electrónico (EAM Stoelting Co Wood Dale, Ill) que percibe el movimiento del animal a través de un sensor electrónico. Durante el monitoreo el animal se encontró libre en su caja de acrílico y de esta manera se determinó simultáneamente la actividad motora. La actividad motora de las ratas expuestas al aire corriente siempre fue considerada como el 100 % de actividad y más tarde fue comparada con los grupos experimentales.

#### REGISTRO ELECTRONICO DE ACTIVIDAD MOTORA

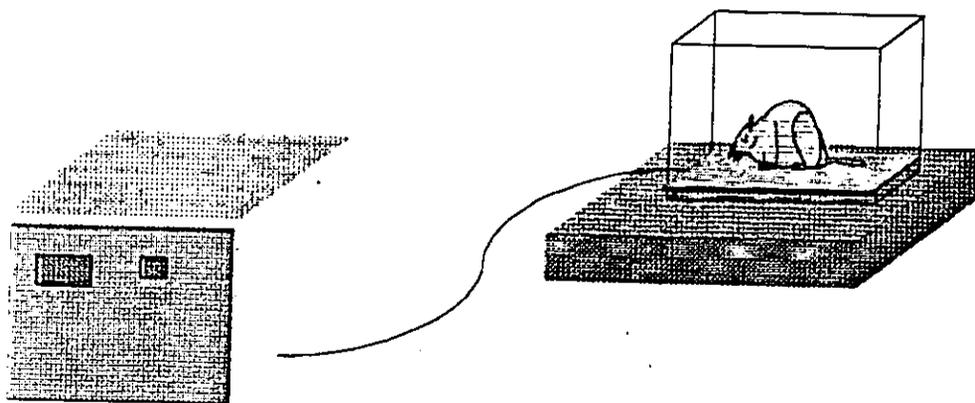


Fig. 9. El dibujo muestra como se realizó el registro de la actividad motora a través de un sensor electrónico. Este registro permite el libre movimiento de los animales en su caja y simultáneamente monitorear la actividad.

### **3.2.5. Técnica para Extracción de Líquido Cefalorraquídeo (LCR).**

Todos los animales fueron anestesiados con cloroformo y con la cabeza flexionada en un ángulo aproximado de 45 grados. Con ayuda del dedo índice se localizó la articulación occipitoatloidea y a través de la articulación se introdujo una aguja hipodérmica transparente del No. 10, se perforó la duramadre y se obtuvo por capilaridad un volumen aproximado de 20-25  $\mu$ l de LCR. Este fue congelado inmediatamente a  $-70$  grados para realizar más tarde la determinación de lípidos oxidados.

### **3.2.6. Peroxidación de Lípidos.**

Los niveles de peroxidación de lípidos fueron cuantificados usando el kit K-ASSAYLPO of Kamiya Biomedical Company. Este método consiste en reducir los lípidos hidroperoxidados a sus derivados hidroxilados (alcoholes) y el cromógeno 10 N - metilcarbamoil-3-7 dimetilamino-10 H fenotiazina (MCDP) es oxidado por la enzima oxidasa ascórbica para formar azul de metileno en una reacción equimolar; para determinar los niveles de peroxidación de lípidos: cada una de las muestras se homogeniza con PBS en una relación de 1:20 peso/vol. el homogenizado se centrifuga durante 10 minutos y se congela a  $-70$  °C. Se toma una muestra de 20 - 25  $\mu$ l del sobrenadante a la cual se agregan 80  $\mu$ l de enzima (R1) y se mezclan, dicha mezcla, se incuba a 30 °C durante 15 minutos, después se adicionan 160  $\mu$ l de cromógeno (R2), se incuban a 30 °C durante 15 minutos. Los lípidos peroxidados son cuantificados a través de la lectura de la absorbancia en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 675 nm. La curva de calibración se hace con un estándar que esta a una concentración de 50 nM/ml.

Los resultados serán calculados usando la siguiente ecuación:

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

Es = Muestra de absorbancia

Estd = Absorbancia de 50 nM/ml standard

Eb = Absorbancia del blanco

### **3.2.7. Condicionamiento.**

Fue realizado en una cámara de condicionamiento con dos compartimientos del mismo tamaño (30 cm de largo, 30 cm de ancho y 30 cm de altura) un compartimento considerado de castigo y otro considerado como de escape. Los compartimientos estaban separados por una puerta tipo guillotina. En el compartimento de escape, el piso consistió en barras de aluminio de 5 cm de diámetro separadas por una distancia de 1.5 cm. Una placa de acero inoxidable formó las paredes laterales y el piso del compartimento de castigo. La puerta fue conectada a una unidad de corriente constante (Grass, Mod. PSIU6), conectado a un estimulador Grass (Mod S48) se aplicaron 50 pulsos cuadrados por segundo a una intensidad de 3 mA. con una duración de 5 mseg. por pulso por 5 seg. El estimulador controló automáticamente la duración del estímulo, las latencias del escape fueron medidas manualmente.

### **Procedimiento.**

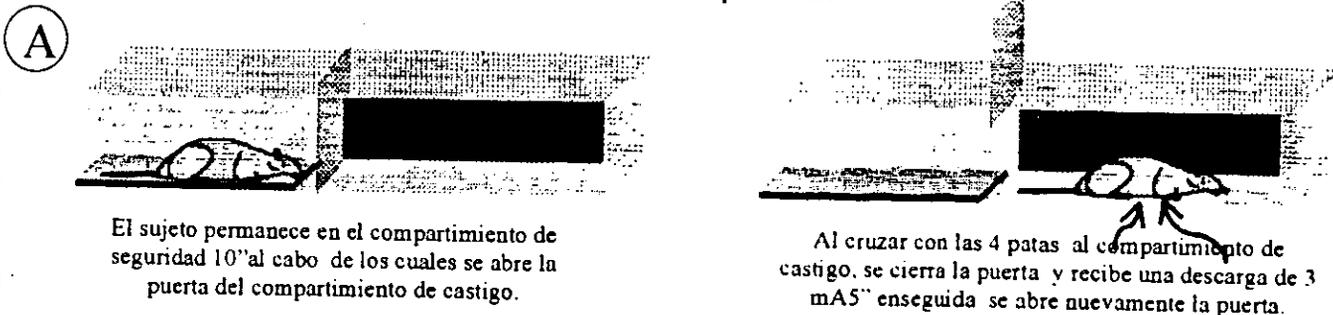
Se sacó al animal de su caja individual y se colocó en el compartimento de seguridad durante 10 segundos, al cabo de los cuales, se levantó la puerta deslizable y se midió el tiempo que tardó en pasar al otro compartimento, cuando el sujeto tardó más de 600 segundos en pasar se dio por terminado el experimento con ese animal. Cuando el sujeto colocó sus cuatro patas (latencia de adquisición), se cerró la puerta deslizable y se le administró un choque de 3 mA. durante 5 seg. al cabo de los cuales se abrió la puerta deslizable, se midió el tiempo que el sujeto tardó en escapar al compartimieto de seguridad (latencia de escape), y se dejó durante 30 seg. en este compartimento, regresándolo después a su caja de alojamiento.

A los 10 min. (memoria de corto plazo) y a las 24 horas (memoria de largo plazo) se realizó la prueba de retención, para lo cual el animal fue colocado en el compartimento de seguridad por 10 seg., se abrió la puerta deslizable y se midió la latencia de entrada al compartimento de castigo. En esta sesión el animal no recibió choque alguno. La sesión de prueba terminó cuando el sujeto entraba al

compartimiento de castigo ó permanecía en el de seguridad por 600 seg. (criterio de retención) 24 horas después se midió la memoria de largo plazo (figura 10).

## PREVENCION PASIVA

### Latencia de adquisición



### Latencia de retención

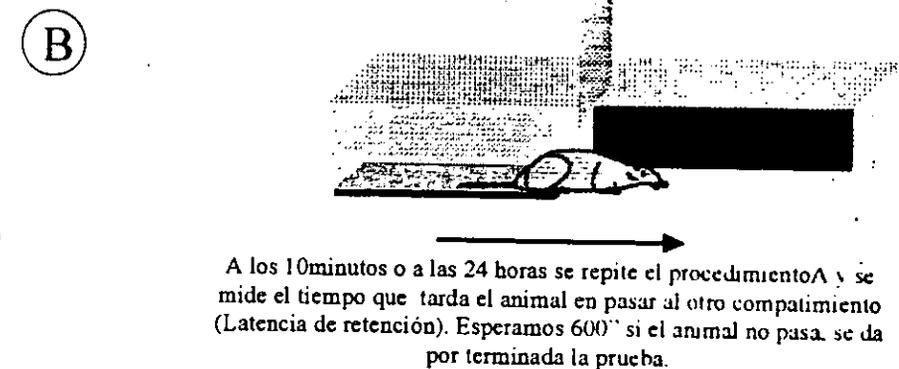


Fig. 10. Esquema de procedimiento de la tarea de prevención pasiva. El panel A muestra la fase de adquisición y el B la fase de retención.

#### 4.- ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Después de obtener todos los puntajes, en las hojas de monitoreo diseñadas para tal fin. Se utilizó una hoja de cálculo para analizar cada una de estas conductas con sus diferentes tratamientos y en cada uno de los días.

También se realizaron gráficos de cada día, con los diferentes tratamientos aplicados y se comparo el efecto de cada tratamiento en función del tiempo.

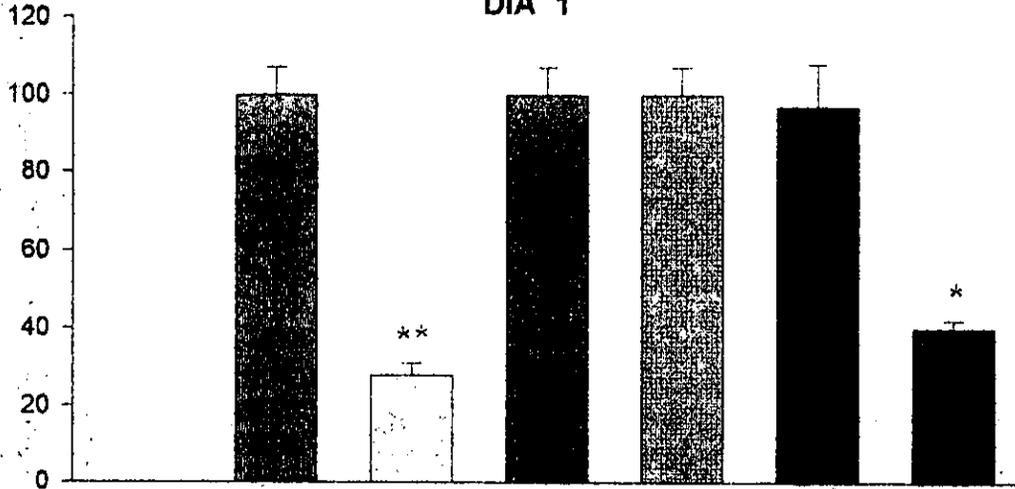
Se utilizó el análisis de varianza de Kruskal Wallis para muestras independientes para ver la homogeneidad de la población. La prueba de Kruskal Wallis (no paramétrica), requiere que los grupos analizados sean independientes entre sí. Esta prueba de análisis, nos permite analizar si existen diferencias entre grupos después de aplicado el tratamiento.

Para el estudio de las diferencias entre el grupo control y los grupos experimentales, se utilizó la prueba de U de Mann Whitney. Esta es una prueba para muestras independientes, la alternativa más útil ante la prueba paramétrica de t para muestras independientes cuando la medición se refiere a estudios de conducta.

# RESULTADOS

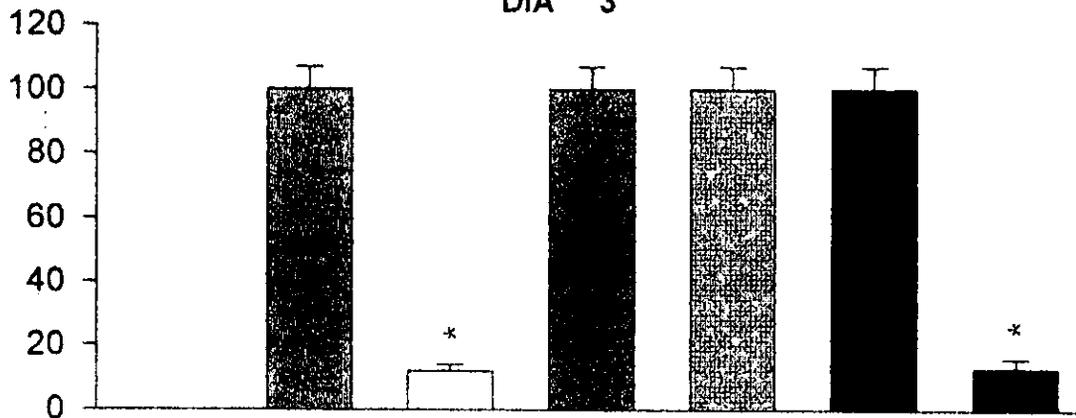
## REGISTRO DE ACTIVIDAD MOTORA

DIA 1



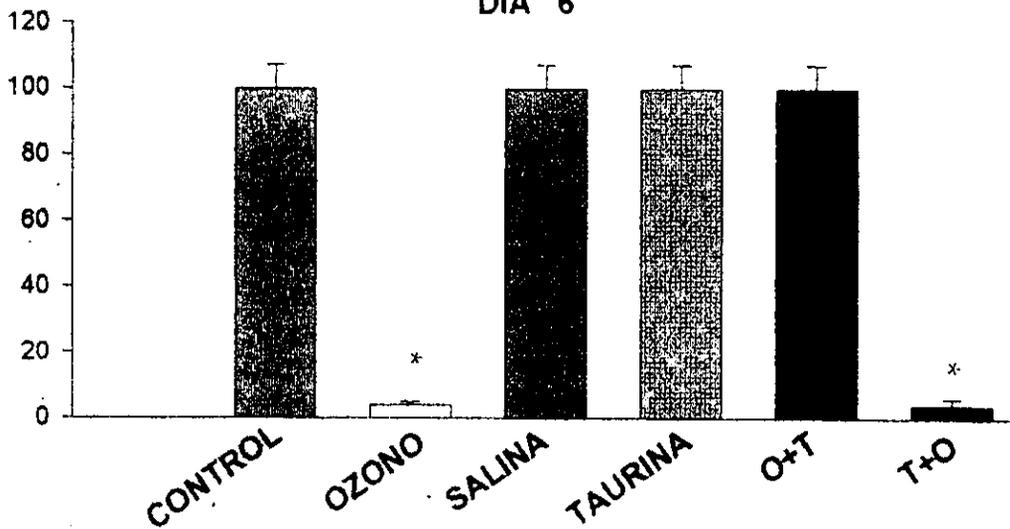
\*  $p < 0.001$   
\*\*  $p < 0.0001$

DIA 3



\*  $p < 0.0001$

DIA 6



% DE ACTIVIDAD

CONTROL

OZONO

SALINA

TAURINA

O+T

T+O

La gráfica 1 muestra que existe una disminución en la actividad motora de las ratas expuestas a ozono y al tratamiento de T+O. La actividad es expresada en porcentaje (el 100% es el promedio de la actividad motora del grupo control). Los grupos tratados con taurina y O+T no muestran diferencias estadísticas entre sí y con respecto al tratamiento control (Tabla 1).

**TABLA 1.**

| <b>Kruskal Wallis</b> |                           |
|-----------------------|---------------------------|
| DIA 1                 | F(5,47)=18.41; p<0.00001  |
| DIA 3                 | F(5,47)=29.28; p<0.00001  |
| DIA 6                 | F(5,47)=53.28; p<0.000001 |

La tabla 1. Muestra los resultados del análisis estadístico que consistió en comparar entre sí todos los tratamientos aplicados el día 1, 3 y 6 de prueba.

**TABLA 2**

| <b>U de Mann<br/>Whitney</b> |                         |                         |                         |
|------------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| <b>Grupo</b>                 | DIA 1                   | DIA 3                   | DIA 6                   |
| <b>Ozono</b>                 | F(1,15)=38.62; p<0.0001 | F(1,15)=62.94; p<0.0001 | F(1,15)=75.41; <0.0001  |
| <b>Salina</b>                | ns                      | ns                      | ns                      |
| <b>Taurina</b>               | ns                      | ns                      | ns                      |
| <b>O+T</b>                   | ns                      | ns                      | ns                      |
| <b>T+O</b>                   | F(1,15)=28.78; p<0.001  | F(1,15)=57.60; p<0.0001 | F(1,15)=72.93; p<0.0001 |

Tabla 2. Muestra el resultado estadístico de comparar cada uno de los diferentes tratamientos con respecto a su grupo control (expuesto solo al aire corriente ó la aplicación de solución salina i.p.).

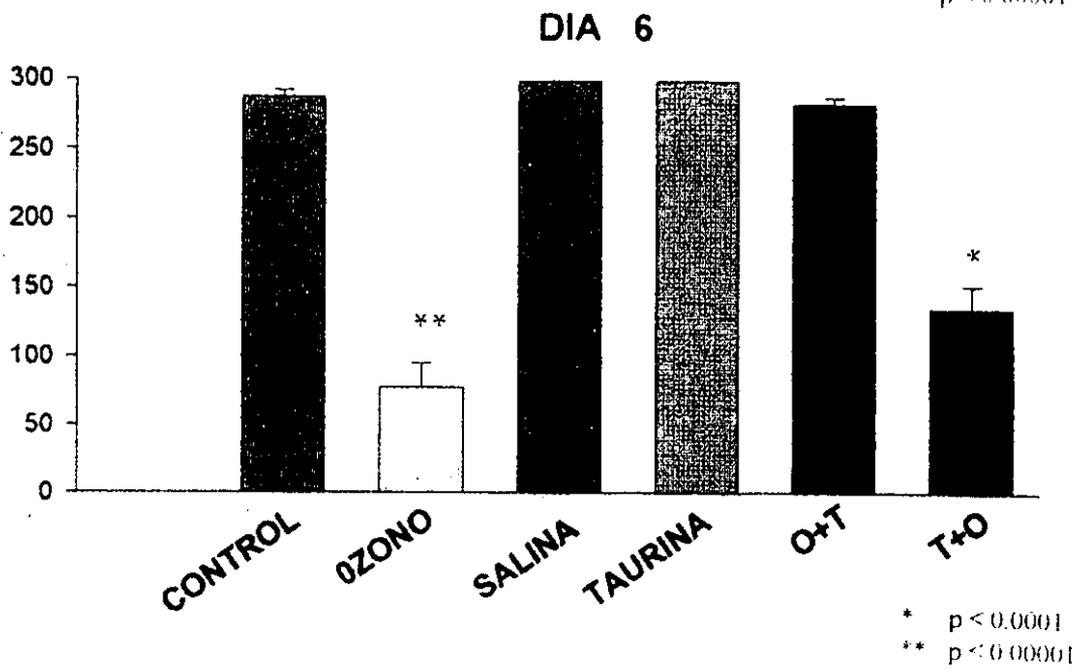
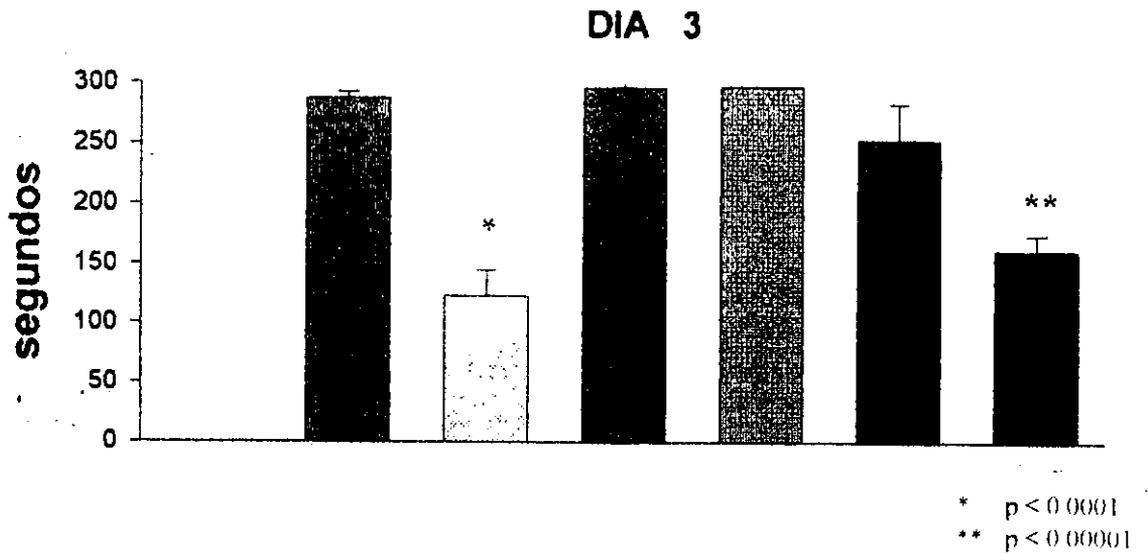
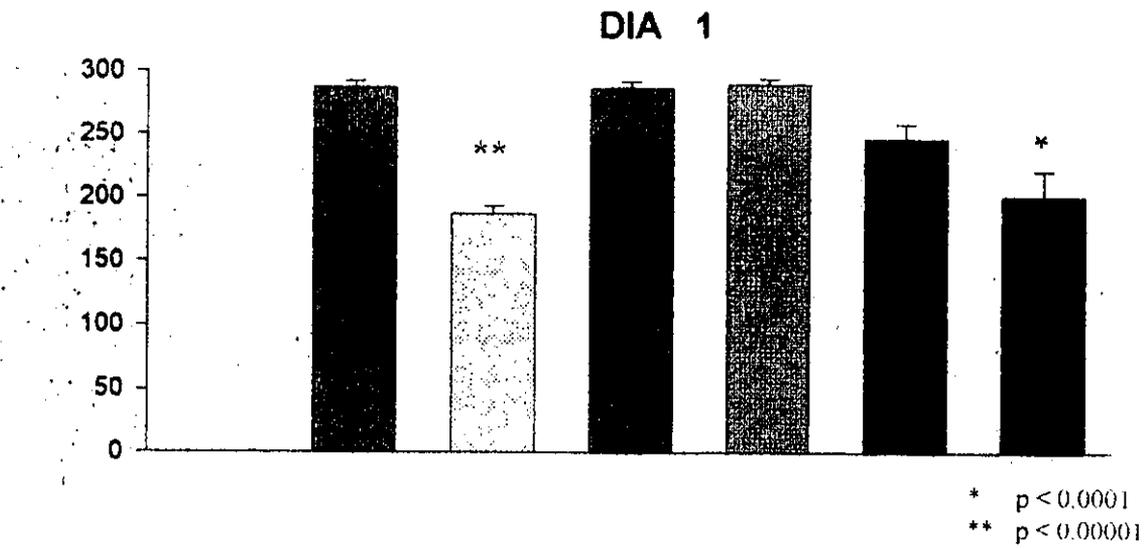
Primer día de tratamiento: Al comparar entre sí todos los tratamientos administrados, se encontró que había diferencias estadísticas entre ellos (Tabla 1).

Cuando se compararon cada uno de los tratamientos con respecto a su grupo control, el análisis mostró que el grupo tratado con ozono y T+O presentaban diferencias significativas desde el primer día. En tanto los tratamientos de taurina y O+T no mostraron diferencias ver (Tabla 2).

El tercer día de prueba nuevamente se observó, que al comparar todos los grupos que fueron tratados por tercer día consecutivo el análisis reporto diferencias significativas entre ellos (Tabla 1). La gráfica de actividad motora muestra que los grupos tratados con ozono y T+O presentaban deterioro en su actividad y diferencias con respecto a su control, en tanto los grupos tratados taurina y O+T no manifestaron diferencias (Tabla 2).

La comparación de todos los tratamientos administrados por sexto día consecutivo, indica que hay diferencias significativas entre ellos (Tabla 1). La gráfica muestra que la actividad motora disminuyó en los grupos de animales que recibieron el tratamiento con ozono y T+O. Estos resultados coinciden, con el análisis estadístico que reporta diferencias en estos dos grupos experimentales con respecto a su grupo control. Los tratamientos con taurina y O+T no mostraron diferencias (Tabla 2).

# CONDUCTA DE EXPLORACIÓN



La gráfica muestra que la conducta de exploración, presenta una importante disminución en la actividad de los animales tratados con ozono y T+O. Tal comportamiento se manifestó a partir del primer día de exposición y coincide con el informe estadístico, donde se reportan diferencias entre los tratamientos del día 1 (Tabla 3). Sin embargo, los grupos tratados con taurina y O+T no presentaron alteraciones en la conducta de exploración (ver gráfica).

Cuando cada uno de los tratamientos se comparó con respecto a su tratamiento control, la prueba mostró diferencias significativas en el grupo tratado con ozono y con T+O. Los tratamientos de taurina y O+T no mostraron diferencias significativas (Tabla 4).

**TABLA 3**

| Kruskal Wallis |                          |
|----------------|--------------------------|
| DIA 1          | F(5,47)=20.48; p<0.00001 |
| DIA 3          | F(5,47)=22.95; p<0.00001 |
| DIA 6          | F(5,47)=91.37; p<0.00001 |

La tabla 3 muestra los resultados del análisis estadístico que consistió en comparar entre sí todos los tratamientos aplicados el día 1, 3 y 6 de prueba.

**TABLA 4**

| U de Mann<br>Whitney |                            |                          |                           |
|----------------------|----------------------------|--------------------------|---------------------------|
| Grupo                | DIA 1                      | DIA 3                    | DIA 6                     |
| Ozono                | F(1,15)=191.959; p<0.00001 | F(1,15)=56.765; p<0.0001 | F(1,15)=131.70; p<0.00001 |
| Salina               | ns                         | ns                       | ns                        |
| Taurina              | ns                         | ns                       | ns                        |
| O+T                  | ns                         | ns                       | ns                        |
| T+O                  | F(1,15)=17.92; p<0.0001    | F(1,15)=85.34; p<0.00001 | F(1,15)=78.47; p<0.0001   |

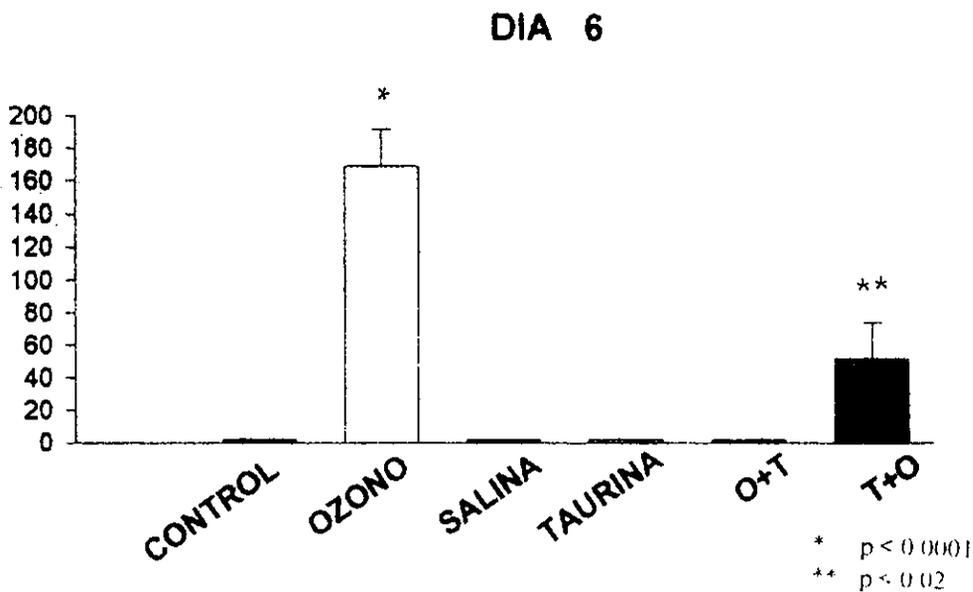
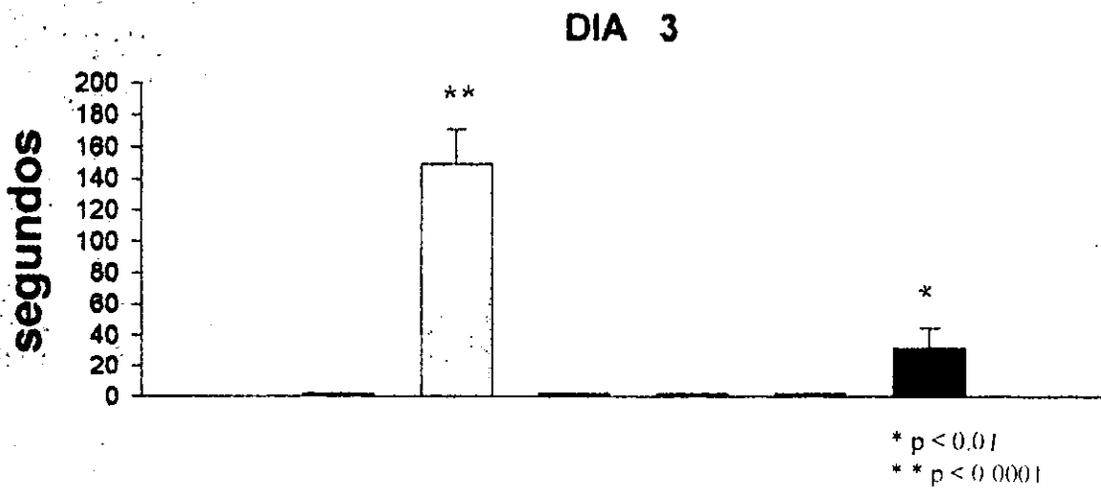
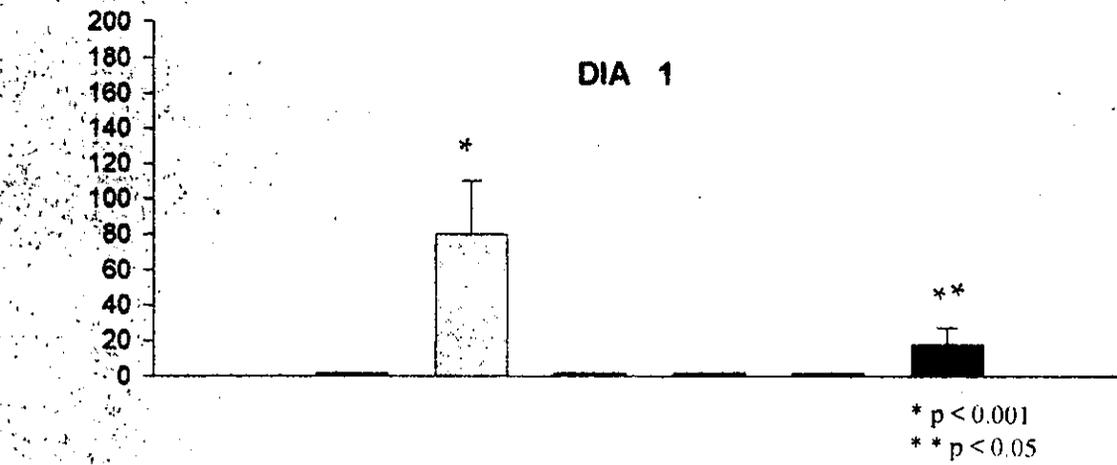
Tabla 4. Muestra el resultado estadístico de la prueba de U de Mann Whitney que consiste en comparar cada uno de los diferentes tratamientos con respecto a su grupo control (expuesto solo al aire corriente ó la aplicación de solución salina i.p.)

El tercer día consecutivo de tratamiento, se observó una situación similar a la que se presentó el primer día de observación. Las diferencias entre grupos fueron significativas (Tabla 3). Cuando comparamos cada uno de los tratamientos con su grupo control, encontramos diferencias en los tratamientos con ozono y T+O. Mientras que los grupos tratados con taurina y O+T no mostraron diferencias con su control (Tabla 4).

El deterioro progresivo que se venía observando en la conducta de exploración, fue más evidente el sexto día de tratamiento. Se presentaron diferencias entre grupos (Tabla 3). En el caso de la exposición a ozono y el tratamiento con O+T la conducta de exploración mostró un evidente deterioro (ver gráfica).

Al comparar cada uno de estos tratamientos con respecto a su tratamiento control, se encontró que solo los grupos tratados con ozono y T+O fueron diferentes (Tabla 4).

# CONDUCTA DE CONGELAMIENTO



En la gráfica se observa que los grupos de animales expuestos a ozono y T+O presentaron un importante aumento en la conducta de congelamiento, desde el primer día de exposición al gas (ver gráfica). Al comparar entre sí los diferentes tratamientos aplicados, el análisis reportó que había diferencias entre ellos (Tabla 5). Al comparar cada uno de los tratamientos con respecto a su grupo control, se encontró que los grupos tratados con ozono y T+O presentaron diferencias significativas. Mientras que los grupos de animales tratados con taurina y O+T no mostraron diferencias significativas (Tabla 6).

**TABLA 5**

| Kruskal Wallis |                           |
|----------------|---------------------------|
| DIA 1          | F(5,47)=12.71 ; p<0.00001 |
| DIA 3          | F(5,47)=38.13; p<0.00001  |
| DIA 6          | F(5,47)=32.08; p<0.000001 |

La tabla 5 muestra los resultados del análisis estadístico de la comparación de los grupos entre sí los días 1, 3 y 6 de prueba.

**TABLA 6**

| U de Mann<br>Whitney |                         |                         |                        |
|----------------------|-------------------------|-------------------------|------------------------|
| Grupo                | DIA 1                   | DIA 3                   | DIA 6                  |
| Ozono                | F(1,15)=34.192; p<0.001 | F(1,15)=52.92; p<0.0001 | F(1,15)=64.61;p<0.0001 |
| Salina               | ns                      | ns                      | ns                     |
| Taurina              | ns                      | ns                      | ns                     |
| O+T                  | ns                      | ns                      | ns                     |
| T+O                  | F(1,15)=4.27; p<0.05    | F(1,15)=7.51; p<0.01    | F(1,15)=6.385; p<0.02  |

Tabla 6. Muestra el resultado estadístico de la prueba de U de Mann Whitney que consiste en comparar cada uno de los diferentes tratamientos con respecto a su grupo control.

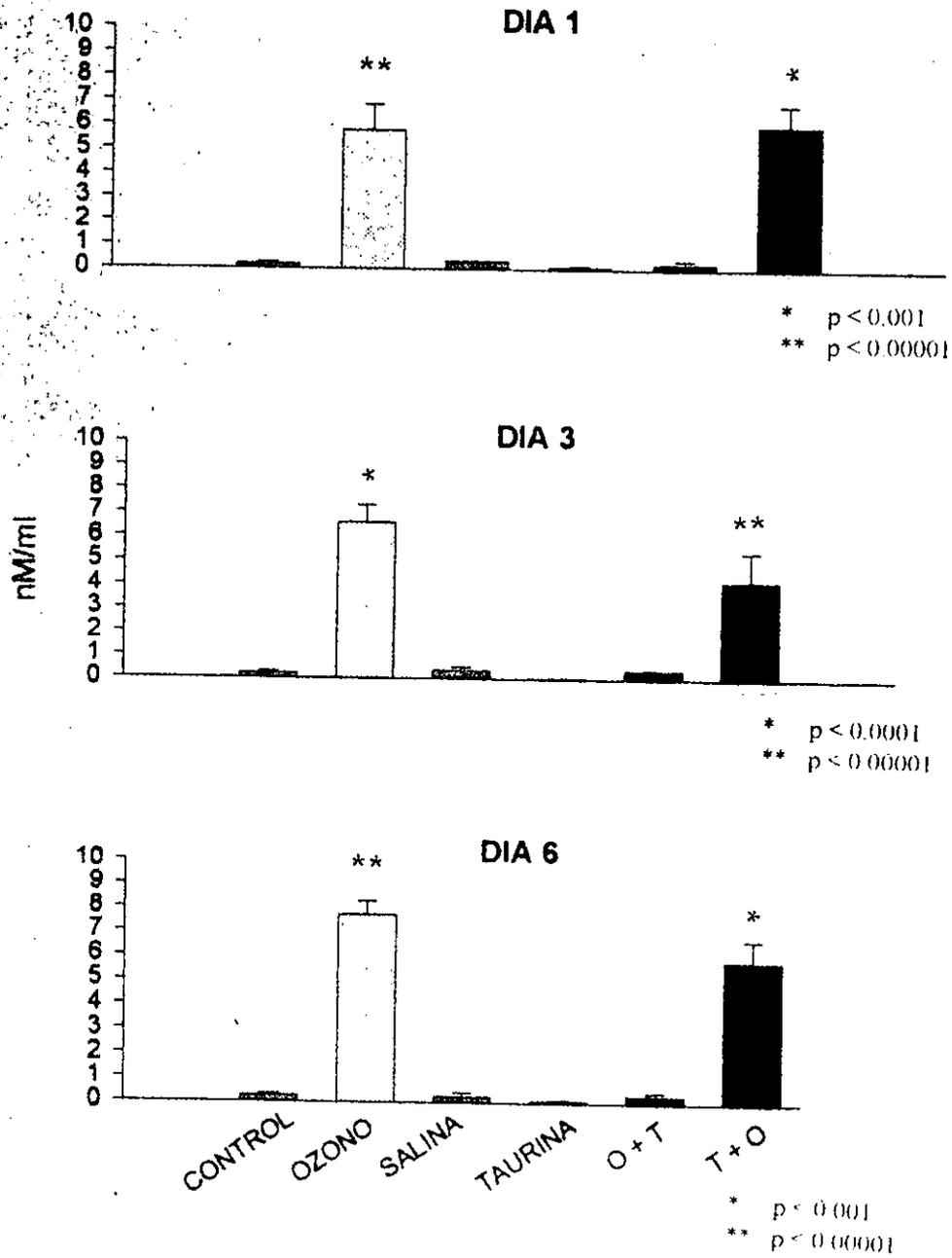
El tercer día de tratamiento, el grupo sometido a la exposición de ozono presentó un incremento en la conducta de congelamiento con respecto al primer día

de exposición, respuesta similar a la que se observó en el grupo de animales tratados con T+O. Los grupos tratados con taurina y O+T no manifestaron alteraciones de conducta (ver gráfica).

Al comparar todos los tratamientos administrados por tercer día consecutivo se encontraron diferencias significativas entre ellos (Tabla 5). Cuando se comparó cada uno de los tratamientos con su tratamiento control, se encontraron diferencias en los grupos tratados con ozono y T+O, en tanto los tratamientos de taurina y O+T no fueron diferentes (Tabla 6).

El incremento progresivo que se había observado en la conducta de congelamiento fue más evidente el sexto día de tratamiento, en los grupos tratados con ozono y T+O. De la misma forma que los días anteriores los grupos de taurina y O+T no mostraron cambios en su conducta habitual. La comparación entre grupos reportó diferencias significativas entre ellos (Tabla 5). Al comparar cada uno de los tratamientos con su grupo control encontramos que el grupo de ratas tratadas con ozono y T+O presentaban diferencias significativas. Al comparar los grupos de animales tratados con taurina y O+T no reportaron diferencias (Tabla 6).

# PEROXIDACIÓN DE LÍPIDOS



En la gráfica se observa que el primer día de exposición a ozono, se presentó un importante aumento en los niveles de peroxidación de lípidos, en el grupo de animales tratados con ozono y T+ O. Mientras que los grupos tratados con taurina y O+T no incrementaron sus niveles de peroxidación (ver gráfica). Al comparar entre sí todos los tratamientos aplicados el primer día de experimentación, se reportaron diferencias en el análisis de Kruskal Wallis (Tabla 7). Al comparar cada uno de los tratamientos con respecto a su grupo control se encontraron diferencias en los grupos tratados con ozono y T+O. Mientras los tratamientos de taurina y O+T no reportaron diferencias (Tabla 8).

**TABLA 7**

| <b>Kruskal Wallis</b> |                           |
|-----------------------|---------------------------|
| DIA 1                 | F(5,47)=32.156; p<0.00001 |
| DIA 3                 | F(5,47)=25.933; p<0.00001 |
| DIA 6                 | F(5,47)=70.257; p<0.00001 |

La tabla 7. Muestra los resultados del análisis estadístico que consistió en comparar entre sí todos los tratamientos aplicados el día 1, 3 y 6 de prueba.

**TABLA 8**

| <b>U de Mann<br/>Whitney</b> |                            |                          |                           |
|------------------------------|----------------------------|--------------------------|---------------------------|
| <b>Grupo</b>                 | DIA 1                      | DIA 3                    | DIA 6                     |
| <b>Ozono</b>                 | F(1,15)=191.959; p<0.00001 | F(1,15)=56.765; p<0.0001 | F(1,15)=131.70; p<0.00001 |
| <b>Salina</b>                | ns                         | ns                       | ns                        |
| <b>Taurina</b>               | ns                         | ns                       | ns                        |
| <b>O+T</b>                   | ns                         | ns                       | ns                        |
| <b>T+O</b>                   | F(1,15)=17.92; p<0.001     | F(1,15)=85.34; p<0.00001 | F(1,15)=78.47; p<0.0001   |

Tabla 8. Muestra el resultado estadístico de comparar cada uno de los diferentes tratamientos con respecto a su grupo control.

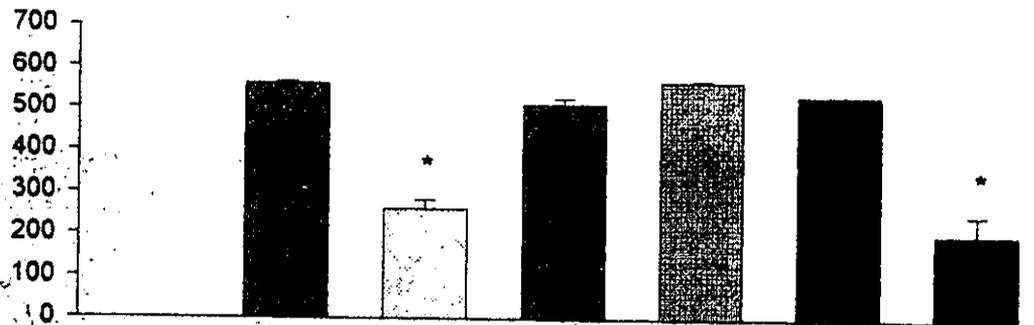
Los tratamientos administrados el tercer día consecutivo, mostraron que los grupos sometidos a la exposición de ozono y T+O, nuevamente presentaban un incremento en los niveles de peroxidación de lípidos. Los tratamientos con taurina y O+T no mostraron cambio (ver gráfica). Al comparar los diferentes grupos que recibieron tratamiento por tercer día consecutivo el análisis de Kruskal Wallis reportó diferencias estadísticas significativas entre ellos (Tabla 7).

Más tarde al comparar cada uno de los tratamientos con su grupo control se encontró que los grupos de ozono y T+O presentaban diferencias significativas. Los grupos de taurina y O+T no reportaron diferencias con su control (Tabla 8).

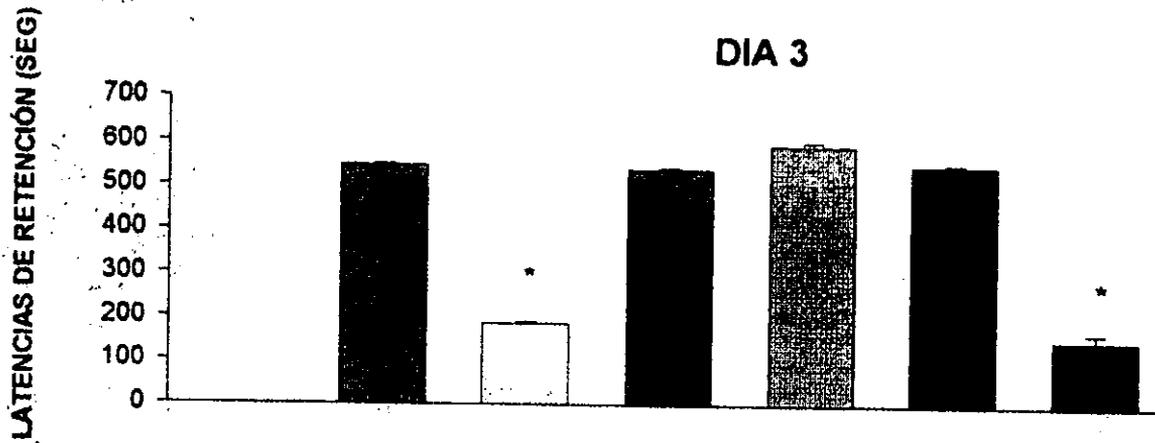
Los tratamientos aplicados por sexto día consecutivo, reportaron diferencias estadísticas entre ellos (Tabla 7). Al comparar cada tratamiento con el grupo control encontramos diferencias en los grupos tratados con ozono y T+O. Los grupos de animales tratados con taurina y O+T no presentaron cambios en sus niveles de peroxidación (Tabla 8).

# MEMORIA DE CORTO PLAZO

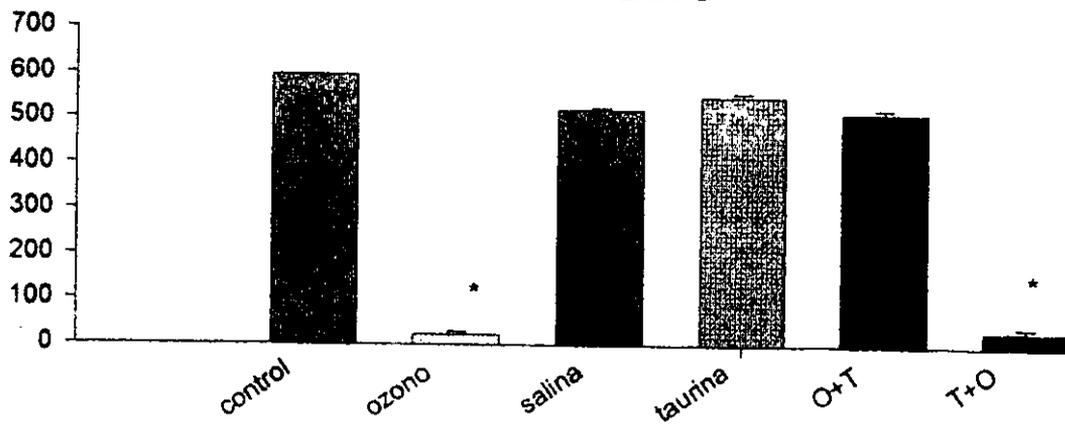
## DIA 1



## DIA 3



## DIA 6



\*  $p < 0.0001$

\* indica el nivel de significancia de los grupos experimentales con respecto al tratamiento control.

En la gráfica se observa que el primer día de estudio, el grupo sometido a la exposición a ozono, presentó una disminución en la memoria de corto plazo (MCP), mientras que los grupos tratados con taurina y O+T no presentaron deterioro en su memoria. Una vez más se observó que al aplicar el tratamiento de T+O la memoria se deteriora de manera similar al tratamiento con ozono (ver gráfica). La comparación entre los grupos que recibieron diferentes tratamientos el primer día de observación, reportó diferencias significativas entre ellos (Tabla 9). Más tarde cuando se hizo la comparación de cada tratamiento con su grupo control, se encontró que los grupos tratados con ozono y T+O presentaban diferencias significativas (Tabla 10).

**TABLA 9**

| <b>Kruskal-Wallis</b> |                           |
|-----------------------|---------------------------|
| <b>MCP día 1</b>      | F(5,47)=84.96; p<0.00001  |
| <b>MCP día 3</b>      | F(5,47)=185.99; p<0.00001 |
| <b>MCP día 6</b>      | F(5,47)=194.85; p<0.00001 |

La tabla 9 Muestra los resultados del análisis estadístico que consistió en comparar entre sí todos los tratamientos aplicados el día 1, 3 y 6 de prueba.

**TABLA 10**

| <b>U de Mann Whitney</b> | <b>MCP</b>                |
|--------------------------|---------------------------|
| <b>Grupo</b>             |                           |
| <b>Ozono</b>             | F(1,15)=68.22; p < 0.0001 |
| <b>T+O</b>               | F(1,15)=34.13; p < 0.0001 |

Tabla 10. Muestra el resultado estadístico de comparar cada tratamiento con su control.

La gráfica muestra que el tercer día de tratamiento los grupos de ozono y T+O presentaron deterioro importante en la MCP en tanto los tratamientos de taurina y O+T no presentaron alteraciones. El tercer día de tratamiento la comparación entre grupos, fue significativa (Tabla 9). Al comparar cada uno de los tratamientos con respecto a su tratamiento control, encontramos que los grupos tratados con ozono y

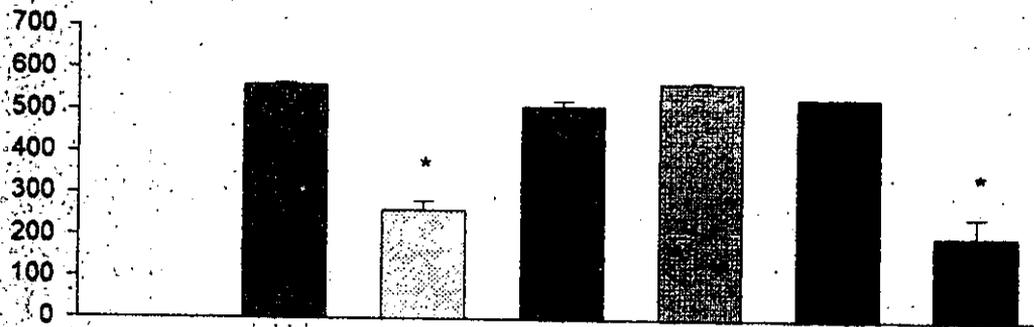
T+O presentaron diferencias significativas, en tanto los grupos tratados con taurina y O+T no mostraron diferencias (Tabla 10).

El sexto día de tratamiento las diferencias entre grupos fueron más evidentes que los días anteriores, en los animales que recibieron tanto el tratamiento con ozono como el de T+O. Mientras que los grupos tratados con taurina, solución salina y O+T no presentan deterioro alguno en su MCP (Tabla 9).

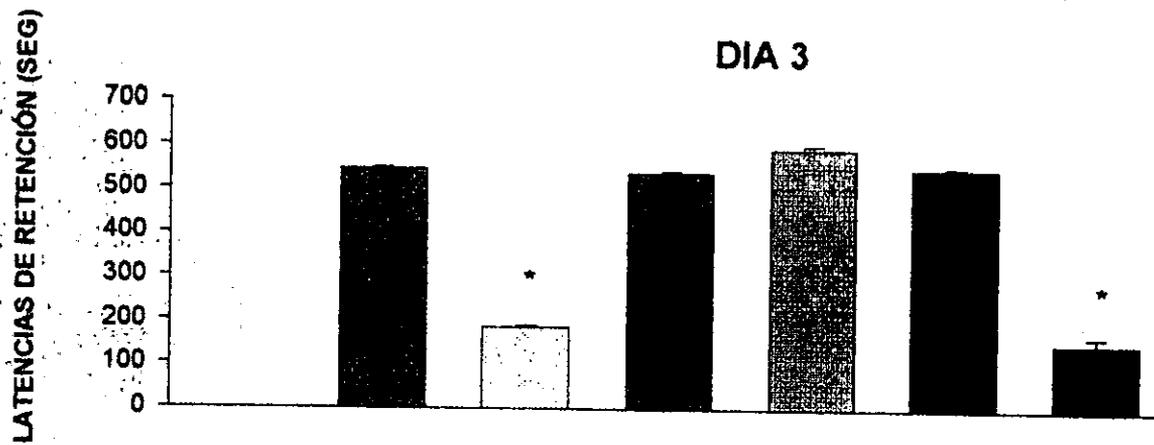
Al comparar cada uno de los tratamientos con su grupo control, encontramos nuevamente que el sexto día de exposición a ozono y al tratamiento con T+O los grupos mostraron diferencias significativas. Los grupos tratados con taurina y O+T no mostraron diferencias con el grupo control (Tabla 10).

# MEMORIA DE CORTO PLAZO

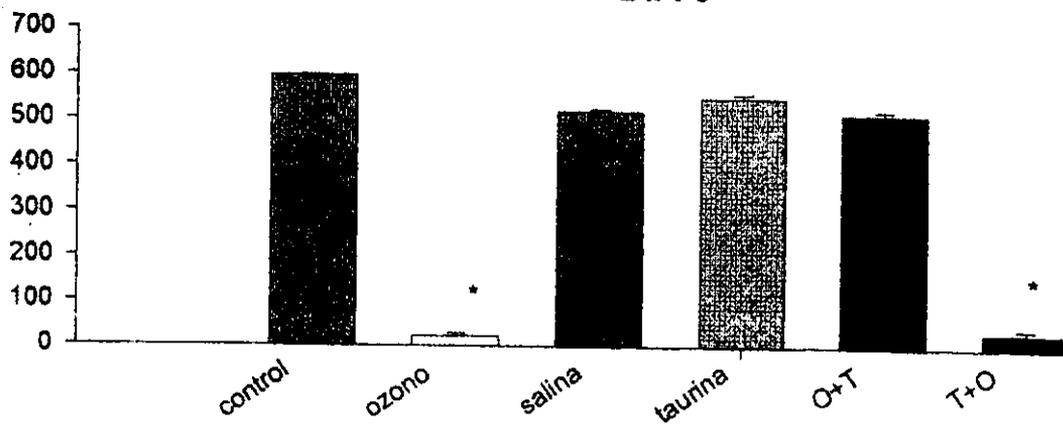
## DIA 1



## DIA 3



## DIA 6



\*  $p < 0.0001$

\* indica el nivel de significancia de los grupos experimentales con respecto al tratamiento control.

La gráfica muestra que el primer día de tratamiento la Memoria de Largo Plazo (MLP) disminuye en los grupos de ratas que recibieron el tratamiento con ozono y T+O. Mientras que la memoria de los animales tratados con taurina y O+T no se deteriora (ver gráfica). Al comparar todos los tratamientos en la memoria de largo plazo (MLP) el primer día de prueba, se encontraron diferencias significativas entre ellos (Tabla 11).

**TABLA 11**

|                  |                           |
|------------------|---------------------------|
| <b>MLP día 1</b> | F(5,47)=97.55; p<0.00001  |
| <b>MLP día 3</b> | F(5,47)=159.22; p<0.00001 |
| <b>MLP día 6</b> | F(5,47)=223.29; p<0.00001 |

La tabla 11 muestra los resultados del análisis estadístico que consistió en comparar entre sí todos los tratamientos aplicados el día 1, 3 y 6 de prueba.

La gráfica muestra deterioro en la MLP en los grupos de ratas tratadas con ozono y T+O por tercer día consecutivo. También se observa que los grupos de animales tratados con taurina y O+T no muestran alteraciones de memoria.

Cuando se observó la gráfica de los grupos tratados por sexto día consecutivo, encontramos diferencias significativas entre ellos (Tabla 11). Al aplicar el análisis estadístico observamos que el grupo control, es diferente de los grupos expuestos a ozono y a T+O. Los grupos tratados con taurina y O+T no mostraron diferencias estadísticas (Tabla 12).

**TABLA 12**

| <b>U de Mann Whitney</b> | <b>MLP</b>                 |
|--------------------------|----------------------------|
| <b>Grupo</b>             |                            |
| <b>Ozono</b>             | F(1,15)=89.40; p < 0.0001  |
| <b>T+O</b>               | F(1,15)=177.33; p < 0.0001 |

## DISCUSION GENERAL

Nuestros resultados muestran que los grupos expuestos a ozono, presentaron alteraciones en la actividad motora, conducta de exploración, congelamiento, peroxidación de lípidos y la memoria.

Estos datos son consistentes entre sí, cuando observamos que el efecto de los tratamientos con ozono y taurina aplicada antes de la exposición a ozono (T+O) presentaron diferencias significativas con respecto al grupo control. Las diferencias se manifestaron por alteraciones de conducta y de memoria que correlacionamos con un aumento en los niveles de peroxidación de lípidos en el líquido cefalorraquídeo (LCR). Sin embargo, estas alteraciones no se presentaron en los grupos de ratas tratados con la aplicación de taurina después de haber finalizado la exposición a ozono (O+T).

**Actividad Motora:** El método que empleamos para examinar la actividad motora, nos permitió medir todos los movimientos que el animal realizaba en condiciones normales. Las ratas presentan esta actividad en forma espontánea y depende de motivaciones innatas para satisfacer necesidades primarias tales como el hambre, la sed, el sexo, etc.

Los resultados del registro de actividad motora indicaron que el grupo de ratas sometido a la exposición de ozono y el grupo de ratas tratadas con T+O presentaron diferencias estadísticas con respecto al grupo control, desde el primer día de tratamiento. En ambos grupos fue evidente que las alteraciones motoras aumentaron conforme se incremento el tiempo de exposición al gas. El primer día de exposición a  $O_3$  la actividad motora disminuyó un 72 %, el tercer día consecutivo de tratamiento disminuyó un 88.1 % y el sexto día un 95.2 %. En los grupos tratados con T+O la actividad disminuyó un 60.79 % el primer día, un 85.72 % el tercer día y un 95.24 % el sexto día. (Ver gráfica 1).

Las alteraciones motoras se relacionaron con un aumento en la peroxidación de lípidos en el LCR en los grupos que fueron tratados con  $O_3$  y T+O. En cambio los

tratamientos con taurina y O+T no presentaron diferencias significativas entre sí y con respecto al grupo control. Esto podría estar indicando que la exposición a ozono produce un estado de estrés oxidativo, responsable de los cambios de conducta señalados.

Los efectos que presenta la taurina, cuando se aplica antes o después de la exposición a ozono, son difíciles de explicar. Sin embargo, los datos obtenidos cuando la taurina se aplica después de la exposición a ozono, mostraron un efecto citoprotector de este aminoácido, ante el aumento en la producción de radicales libres, durante el estrés oxidativo. El mecanismo de esta protección se desconoce, pero algunos autores lo han relacionado con funciones de neuromodulación, osmorregulación, efectos sobre la regulación del calcio y con un efecto antioxidante (Avila, 1999; Huxtable, 1992; Lechuga, 1999; Rivas, 2000; Routsalainen, 1996; Saransaari, 1996). En el caso de la exposición a ozono, también se presentó un aumento en la producción de radicales libres, lo cual proponemos que llevo a un aumento en la peroxidación de lípidos y una disminución en los niveles de taurina intracelular. Es entonces cuando la salida de taurina de la célula podría funcionar como un mecanismo protector (Saransaari, 1996) y es probable que la cantidad de taurina que sale al espacio extracelular (LEC) se encuentre en función de la intensidad del daño. También es posible que dependiendo de la dosis y del tiempo de exposición a O<sub>3</sub>, tanto la producción de defensas antioxidantes, como la liberación de taurina no sean suficientes para compensar la alteración del estrés oxidativo y se manifiesten los trastornos de conducta y memoria que observamos.

Se sabe que en condiciones normales, la mayor concentración de taurina se encuentra en el interior de la célula y por lo tanto la aplicación de taurina i.p. produce un aumento en las concentraciones de taurina extracelular (Korang, 1996). Es probable que tal aumento, pudiera estar causando alteraciones en el equilibrio osmótico de las células, como en el caso del grupo de ratas que recibió el tratamiento con T+O, donde suponemos que la aplicación de taurina, provocó alteraciones en las concentraciones celulares de este aminoácido y la exposición a ozono contribuyó a incrementarlas. Con este hecho, se podrían explicar las manifestaciones que

observamos en las conductas y pruebas bioquímicas, debido a la ausencia del efecto protector de la taurina, cuando se aplica antes de la exposición a ozono.

Por otro lado se reporto que la administración de taurina i.p. 0.8 g/kg pasa rápidamente al torrente sanguíneo, con una vida media cercana a los 40 minutos, a los 15 minutos de su aplicación se incrementan sus niveles plasmáticos, alcanzando un pico de aproximadamente 70 veces por arriba de los niveles basales, para declinar después de 4 horas hasta llegar a su concentración basal en plasma (Korang, 1996).

Cuando se aplica el tratamiento de taurina después de la exposición a ozono, suponemos que las células estaban liberando taurina como un mecanismo protector del daño. Por lo tanto, la inyección de taurina contribuyo a incrementar los niveles de taurina extracelular potenciando así su efecto. Este mecanismo puede explicar que su efecto protector solo se presente después de la exposición a O<sub>3</sub>.

**Conducta de Exploración:** Es una conducta innata y específica que depende de la maduración de sistema nervioso central (SNC) y de la integridad de las vías motoras que controlan el movimiento, ya que estos sistemas motores están organizados jerárquicamente en tres niveles y en paralelo de la siguiente manera: Las áreas motoras de la corteza cerebral pueden influir sobre la medula espinal directa e indirectamente a través de los sistemas motores descendentes. Las neuronas inhibitorias estriatonigrales y estriatoentopedunculares representan una vía "directa" sobre la cual converge información espacial que proviene de la corteza o por la vía "indirecta" globo palido-subtalamo-nigra-talamo-corteza (Albin, 1989; De Long, 1993; Sgaragli, 1996). El sistema motor recibe información sensorial y esta bajo la influencia de dos sistemas subcorticales independientes: los ganglios basales y el cerebelo, ambos actúan sobre la corteza a través de los núcleos de relevo talámicos (Albin, 1989; De Long, 1993). La observación de que la taurina posee características estructurales parecidas al GABA y que puede ser liberada desde las terminales de las neuronas estriatonigrales, por estimulación de receptores no-NMDA en el estriado fundamenta la hipótesis de que la taurina puede desempeñar un papel importante como neurotransmisor (Bianchi, 1996; Rotsalainen, 1996).

Algunos autores han reportado un doble efecto de la taurina, sobre las neuronas dopaminérgicas de la vía nigroestriatal. Por un lado; efectos inhibitorios y por otro lado un aumento en la actividad de estas neuronas dopaminérgicas. Tales efectos son semejantes a los que presentan otros aminoácidos inhibitorios, como GABA y GABA<sub>A</sub> este último, se ha propuesto como un receptor agonista para la taurina y la homotaurina cuando son aplicados en la sustancia nigra y en el estriado (Routsalainen, 1996).

A diferencia de la actividad motora, la conducta de exploración reporta el desplazamiento del animal, para que este lleve a cabo un registro de olores enfocados a reconocer el área que lo rodea. En esta conducta también participan sistemas neuroquímicos como el dopaminérgico, colinérgico y gabaérgico.

La gráfica 2 muestra que la conducta de exploración, se altera desde la primera exposición a ozono y con el tratamiento de T+O. El deterioro que manifestaron estos dos grupos experimentales fue progresivo y mientras la conducta de exploración estaba disminuyendo, la conducta de congelamiento iba en aumento. Sin embargo, la aplicación de los tratamientos con taurina y O+T no mostraron diferencias significativas entre sí y con respecto al grupo control.

La conducta de congelamiento: También es una conducta innata, se manifiesta muy poco en las ratas y se puede describir como la inmovilización o ausencia de actividad. En situaciones normales la frecuencia de aparición de esta conducta es muy baja pero, su presentación aumenta cuando el animal esta enfermo, cuando es sometido a estrés o se siente amenazado. La conducta de congelamiento es un indicador de alteraciones en las vías y sistemas neuroquímicos involucrados en la actividad motora y en la conducta de exploración. Los resultados mostraron un aumento progresivo de esta conducta causada por la exposición a ozono y por el tratamiento con T+O. El efecto del ozono no se presento cuando el grupo fue tratado con O+T, probablemente por los efectos antioxidantes que podrían estar protegiendo de la oxidación a los sistemas neuroquímicos responsables y por su participación como modulador o neurotransmisor en los sistemas antes mencionados. Probablemente el aumento de los radicales libres causa liberación de dopamina (DA) en estas vías, la cual puede ser la responsable de las alteraciones motoras en los

grupos tratados con ozono y T+O. La liberación de taurina por la célula y el tratamiento con O+T aumentan las concentraciones de taurina extracelular y esta a su vez inhibe la liberación excesiva de DA responsable de estas alteraciones, manifestándose el tono DA necesario para la correcta expresión de estas conductas (ver figura 11).

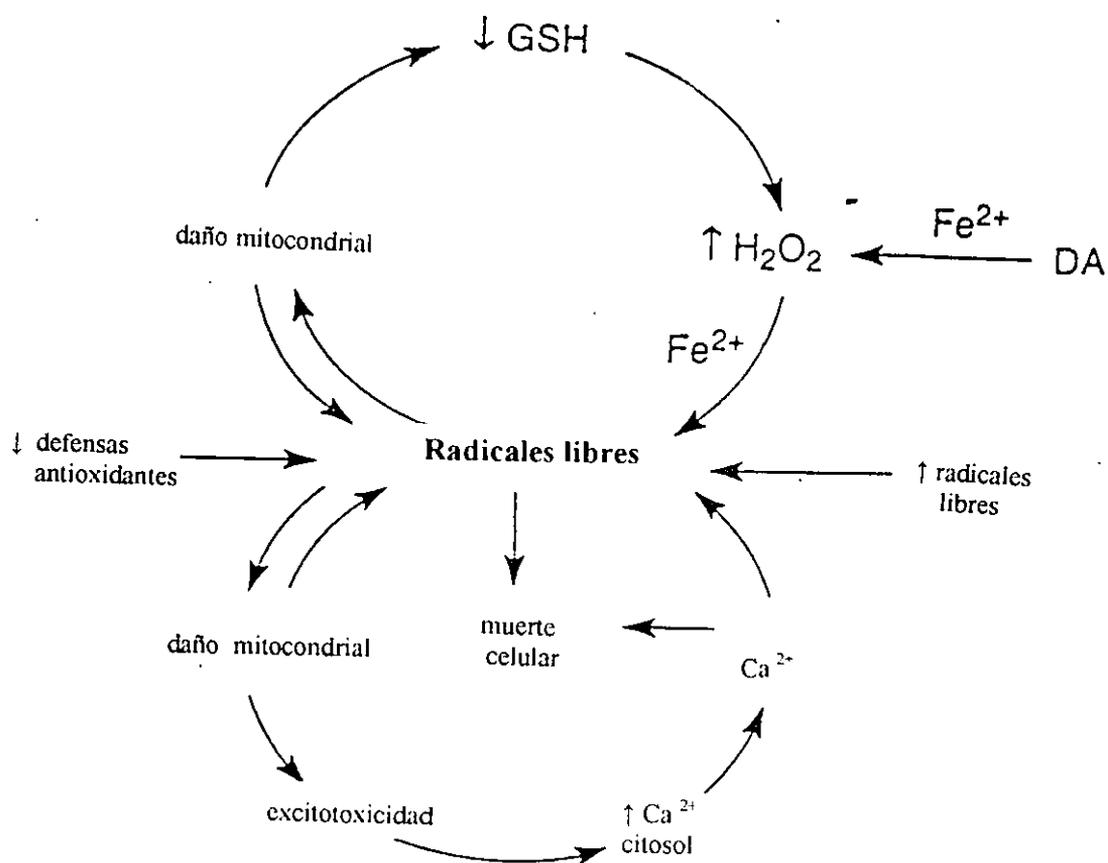


Fig. 11. Muestra un modelo teórico donde los radicales libres pueden inducir un ciclo de degeneración neuronal y continuar la producción de más radicales.

**Peroxidación de Lípidos:** Con respecto a las pruebas bioquímicas, encontramos que los niveles de peroxidación de lípidos se incrementaron en los animales expuestos a ozono y en el grupo de animales que fue tratado con T+O. Lo cual sugiere que las ratas son extremadamente susceptibles a la exposición de ozono. Pues el incremento en la peroxidación lipídica no se presentó en los grupos tratados con solución salina, taurina, O+T.

Con estos resultados podemos considerar a la peroxidación lipídica como un valioso indicador de las alteraciones que ocurren en las membranas biológicas, por un aumento en los radicales libres durante el estado de estrés oxidativo y que, además, se relaciona con la aparición de enfermedades de tipo neurodegenerativo (Avila, 1999; Dawson, 1999; Meccoci, 1994; Rivas, 1998; 2000).

**Memoria y Aprendizaje:** Recientemente algunos autores han relacionado ciertos procesos de deterioro en la memoria con el estrés oxidativo (Ames, 1993; Harman, 1986; Joseph, 1992; 1995; Olanow, 1993 a, b; Poot, 1991; Stadtman, 1992). Como sabemos la toxicidad del ozono y el daño a los tejidos causado por los radicales libres, inducen una cadena de reacciones bioquímicas que llevan a un deterioro en la plasticidad cerebral, mecanismo fundamental en los procesos de memoria y aprendizaje.

El estudio de la memoria y aprendizaje que se realizó, se refiere a las pruebas de evitación pasiva. Esta consiste en entrenar al animal para que sea capaz de prevenir un estímulo nocivo, a través de limitar sus movimientos, o no manifestar una conducta espontánea como es la exploración en el caso de las ratas y así aprender a evitar el daño. Esto involucra procesos mnémicos y de plasticidad cerebral, tanto en la memoria de corto (MCP) como de largo plazo (MLP) donde participan sistemas neuroquímicos como: el sistema colinérgico, dopaminérgico, gabaérgico así como estructuras entre las que contamos principalmente con el hipocampo, estriado, sustancia nigra, corteza frontal y cerebelo

Los resultados muestran que los animales expuestos al ozono y al tratamiento T+O presentaron disminución en la MCP y MLP desde el primer día de tratamiento, situación que fue en aumento conforme se transcurrieran los días de exposición. Los

grupos que recibieron tratamientos con taurina y O+T no presentaron diferencias significativas con el grupo control.

En este trabajo, resulta particularmente obvio que la taurina contribuye a la protección celular, causada por los efectos nocivos del ozono específicamente en el cerebro. Cuando la taurina se aplica en animales que se encuentran en estado de estrés oxidativo, este aminoácido evita que se presenten las alteraciones de memoria (Rivas, 1998), como es el caso de los grupos tratados con O+T. Los resultados obtenidos coinciden con los datos reportados por Paz (1997) donde muestra evidencias de que los animales expuestos a ozono presentan alteraciones neurológicas, acompañadas de letargo, trastornos del sueño y los correlaciona con el estrés oxidativo.

Las evidencias en modelos animales muestran que el aprendizaje y la memoria, requieren la participación de estructuras específicas como la corteza cerebral, núcleo caudado, amígdala e hipocampo. Sin embargo, la participación de neurotransmisores como los sistemas colinérgicos (ACh), DA y GABA contribuyen en los procesos de adquisición, transferencia, consolidación y almacén de la memoria (Vannucchi, 1995). También se sabe que ciertas hormonas como las sexuales, la hormona del crecimiento y ACTH juegan un papel importante en la modulación de los procesos anémicos (Schneider, 1995). Por otro lado se ha reportado que la taurina, también está presente en tejidos que contienen altas concentraciones de catecolaminas, las cuales son conocidas por sus efectos citotóxicos y su incremento durante el estrés oxidativo (Dunnet, 1991; Rivas, 1998; 2000). La oxidación de ACh es catalizada por metales como el hierro, que a su vez aumenta la producción de ROS como el  $H_2O_2$ , radicales hidroxilo y superóxido, favoreciendo la presentación de enfermedades de tipo neurodegenerativo (Dawson, 1999; Dunnet, 1991; Rivas, 1998; 2000).

La Taurina tiene la capacidad de inhibir la oxidación de catecolaminas estimulada por metales, en presencia de ROS esto podría explicar el efecto protector de la taurina sobre la memoria al inhibir la oxidación de los sistemas catecolaminérgicos que participan sobre los procesos anémicos. Esto podría tener implicaciones terapéuticas en enfermedades asociadas con la inducción de estrés

oxidativo y aumento de radicales libres por autooxidación de catecolaminas (Dawson, 1999). La memoria puede verse severamente disminuida durante algunos procesos fisiológicos como el envejecimiento y durante la evolución de enfermedades neurodegenerativas, probablemente por disminución en el contenido de taurina en los tejidos, lo que aumenta la susceptibilidad de los tejidos al daño causado por los radicales libres (Dawson, 1999; Rivas, 1998; 2000).

Como podemos darnos cuenta la taurina ha sido involucrada en una gran variedad de procesos fisiológicos y fisiopatológicos, por lo que es muy importante conocer con precisión los mecanismos que la regulan así como las funciones que desempeña. La taurina es un aminoácido que acompañado del agua y de sales inorgánicas, tiende a conservar la función y ayuda a mantener el equilibrio celular en respuesta a los continuos cambios al azar que ocurren alrededor de ella.

Es probable que la suma de todas las acciones mencionadas a diferentes niveles que presenta la taurina, sea la responsable del mecanismo protector encontrado en estos experimentos (ver Fig. 12).

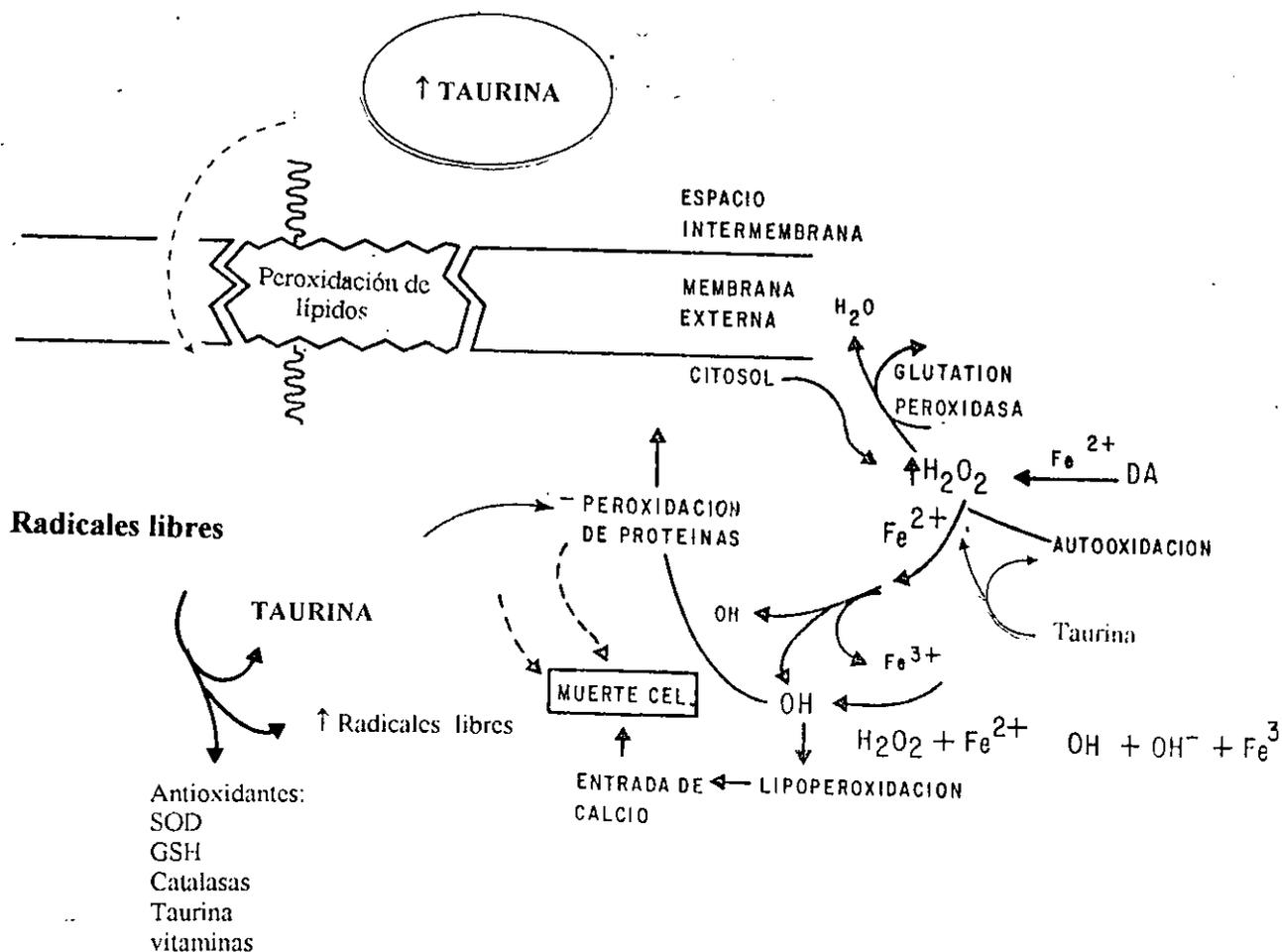


Fig 12. Muestra el efecto protector de la taurina ante un aumento en la producción de radicales libres. Se observa una cascada de reacciones, generadas por un estado de estrés oxidativo. Los efectos más importantes son: la liberación de antioxidantes, liberación de DA, la cual aumenta la producción de más radicales libres, salida de taurina al LEC, que a su vez inhibe la liberación de DA como mecanismo protector, activación de los canales de calcio, disminución en las concentraciones de calcio. DA-dopamina; LEC -líquido extracelular; GSH -glutacion peroxidasa.

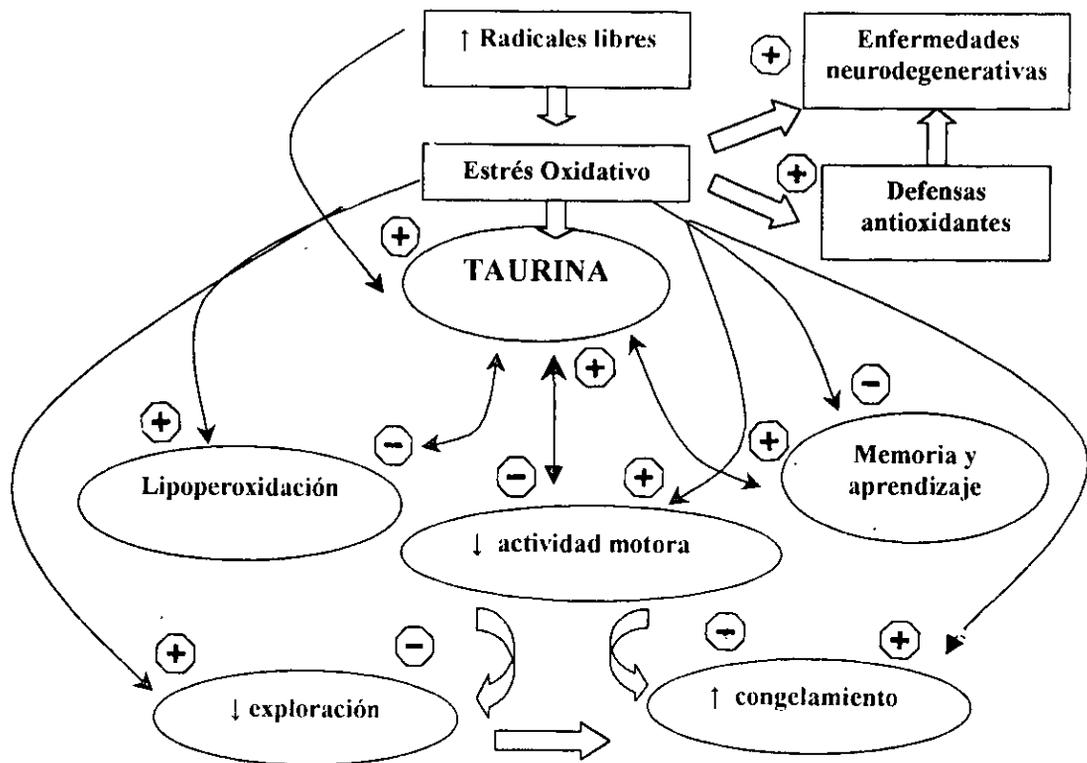


Fig. 13 Muestra un modelo teórico relacionado con el aumento en la producción de radicales libres y los efectos de la taurina sobre la actividad motora, conducta de exploración, congelamiento, lipoperoxidación y la memoria. (+) efecto positivo; (-) efecto inhibitor.

## CONCLUSIONES

De lo anterior podemos concluir que:

- 1).- La exposición a ozono causa estrés oxidativo, el cual se correlaciona con las alteraciones conductuales y de memoria en las ratas.
- 2).- El estrés oxidativo causado por la exposición a O<sub>3</sub> produce un aumento en los niveles de peroxidación de lípidos.
- 3).- La taurina ejerce un efecto antioxidante cuando se aplica después de la exposición a ozono
- 4).- La taurina es capaz de evitar los efectos causados por el ozono sobre la conducta de exploración, congelamiento, actividad motora, peroxidación de lípidos y memoria en las ratas, al aplicarla después de la exposición.

**REFERENCIAS**

1. Albin, R. L., Young, A. B. And Penney, J. B. (1989). The functional anatomy of basal ganglia disorders. *Trend Neurosci.* 12: 366-375.
2. Ames, B. N., Shigenaga M. K., Hagen, T. M. (1993). Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90: 7915-7922.
3. Ardila, R. *Psicología del aprendizaje.* Editores siglo XXI, 21ª. México, 1989.
4. Avila-Costa, M.R., Colín-Barrenque, L. Fortoul, t., Machado-Salas, J., Espinoza-Villanueva, J., Rugeiro- Vargas, C., Rivas-Arancibia, S. (1999). Memory deterioration in an oxidative stress model and its correlation with cytological changes on rat hippocampus CA1. *Neuroscience Ltters.* 270:107-109, 1999.
5. Bianchi, L., Bolam, J. P., Galeff, , Frosini, M., Palmi, M., Sgaragli, G., and Della Corte, L. (1996). In vivo release of taurine from rat neostriatum and substantia nigra. In "Taurine" (R. J. Huxtable et al., Eds), Vol.2: 435-444. Plenum, New York/ London.
6. 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.
7. Castleman, W.L; Dungworth, D. L. ; Schwartz, L.W. and Tyler, W S. (1980). Acute respiratory Bronchiolitis; an ultrastructural and autoradiographic study of epithelial cell injury and removal in rhesus monkey exposed to ozone. *Am J. Pathol.* 98: 811-40.
8. Chan, P.H. and Fiskman, R.A. (1980). Transient formation of superoxide radicals in polyunsaturated fatty acid-induced brain swelling. *J. Neurochem.* 35: 1004-1008.
9. Chung, S. J., Ramanathan, V, Giacomini, K.M., Brett, C.M. (1994). Characterization of a sodium-dependent taurine transporter in rabbit choroid plexus. *Biochem. Biophys. Acta.* 1193: 10-16.

10. Ciriolo, M. R., Fiskin, K., De Martino, A., Corasaniti, M. T., Nistico, G., Rolitio, G. (1991). Age-related changes in Cu/Zn superoxide dismutase, Se-dependent and-independent glutathione peroxidase and catalase activities in specific areas of rat brain. *Mech. Aging Dev.* 61: 287-297
11. Corbella, J. (1994). Descubrir la psicología, cuadernos sobre el comportamiento humano. Vol.1. Barcelona, Folio:28-30, 39-40.
12. Cozzi, R., Ricordy, R., Bartolini, Ramadory, L., Perticone, P., and De Salvia, R. (1995). Taurine and ellagic acid: two differently-acting natural antioxidants. *Environ. Mol. Mutagen.* 26: 248-254.
13. 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.
14. Dawson Jr., R., Eppler, B., Patterson, T.A., Shih, D., and Liu, S. (1996). The effects of taurine in a rodent model of aging. In *Taurine 2* (R.J. Huxtable et al. Eds), pp. 445-454. Plenum Press, New York/London.
15. Dawson Jr., R., Pleymounter, M.A., Cullen, M. J., Gollub, M., and Liu, S. (1998). An age related decline in striatal taurine is correlated with a loss of dopaminergic markers. *Brain Res.Bull.* 48, 319-324.
16. Decavel, C., and Hatton G.I., (1995). Taurine immunoreactivity in the rat supraoptic nucleus: Prominent localization in glia cells. *J. Comp. Neurol.* 354,13-26.
17. De Long, M. R., Wichmann, T. (1993). Basal ganglia-thalamocortical circuits in parkinsonian signs. *Clin. Neurosci.* 1:18-26.
18. Demopoulos HB, Flammes, Pietronigro D.D, Seligman M.L. (1980). The free radical pathology and microcirculation in the major nervous system disorders. *Acta Physiol Scand (Suppl)* 492: 91-119.
19. Diplock, A.T. (1994). Antioxidants and free radical scavengers. *Free Radical. Research. and its Control* (Rice-Evans C.A.and Burdon R. H., Eds.) pp113-130.
20. Dunnett, S. B., aqnd Barth, T.W. (1991). Animal models in psychopharmacology (Wilner, P., ed.).359-418. Cambridge University Press.

ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA

21. Eppler, B., and Dawson, R. (1998). The effects of aging on taurine content and biosynthesis in different strains of rats. Plenum Press, New York; 55-61.
22. Fukuda, K. And Usui, T. (1983). Characteristic patterns of free amino acid content in plasma, erythrocytes, lymphocytes, and granulocytes in man. Hiroshima J. Med. Sci. 32: 163-166.
23. Galarreta, M., Bustamante, J., Martín del Río, R., and Solís, J.M. (1996). A new neuromodulatory action of taurine: long-lasting increase of synaptic potentials. In Taurine 2 (R.J. Huxtable et al. Eds), pp. 463-471. Plenum Press, New York/London.
24. Hall, J.F. (1989). Learning and Memory. 2 ed. Allyn and Bacon, Boston. 347-377.
25. Halliwell, B., Gutteridge, J. M. (1984). Lipid peroxidation, oxygen radicals, cell damage, and antioxidant therapy. Lancet 1396-1398.
26. Halliwell, B., Gutteridge, J. M. (1985). Oxygen radicals and the nervous system. Trends Neurosci. 6: 22-26.
27. Halliwell B. (1989). Oxidants and the central nervous system: some fundamental questions. Acta Neurol. Scand. 126: 23-33.
28. Harkema J.R., Plopper C.G., Hyde D.M., St George J., Wilson D.W. and Dungworth. D.L. (1987). Response of the macaque nasal epithelium to ambient levels of ozone: A morphometric study of transitional and respiratory epithelium. Am. J. Pathol. 128: 29-43.
29. Harman, D. (1986). Free radical theory of aging: role of free radicals in the origination and evolution of life, aging, and disease processes. In "Free radicals, aging and degenerative diseases" (Liss, A. R., ed.) pp 3-49.
30. Huitron Resendiz S., Custodio-Ramírez V., Escalante-Membrillo C., González Piña y Paz C. (1994). Sep alterations and Brain regional changes of serotonin and its metabolite in rats exposed to ozone. Neuroscience Letters. 177:119-122.
31. Huxtable, R.J., and L. A. Sebring. (1986). Towards a unifying theory for the action of taurine. Trends Pharmacol. Sci. 7: 481-485.

32. Huxtable, R. J. (1989). Taurine in the central nervous system and the mammalian actions of taurine. *Prog. Neurobiol.* 32: 47-533.
33. Huxtable, R.J. (1992). Physiological actions of taurine. *Physiological Reviews* 72, pp. 101-162.
34. Jansen, Y.M., Van Houten, B., Borm. P.J. and Mossman. B.T. (1993). Cell and tissue responses to oxidative damage. *Lab. Invest.* 69 (3) 261-274.
35. Joseph, J. A., Cutler, R. C. (1992). The putative role of free radicals in the loss of neuronal functioning in senescence. *Integr Physiol Behav Sci* Jul-Sept; 27(3) : 216-27.
36. 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.
37. Kamisaki, Y., Wada, K., Nakamoto, K., and Itoh, T. (1966). Release of taurine and its effects on release of neurotransmitter amino acids in rat cerebral cortex. In *Taurine 2* (R.J. Huxtable et al. Eds), pp. 445-454. Plenum Press, New York/London.
38. Kavlock, R., Datson, G. And Grabowski, C.T. (1979). Studies on the developmental toxicity of ozone. I. Prenatal effects, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 48: 19-28.
39. Kehrl H. r., VicentL.W. and Kowalsky R.J. (19879). Ozone exposure increases respiratory epithelial permeability in humans . *Am. Rev. Respir. Dis* . 139: 407-415.
40. Kontos, H.A., and Wei, E.P. (1992). Endothelium-dependent responses after experimental brain injury. *J. Neurotrauma.* 9: 349-54.
41. Korang, K., Milakofsky, L., Theodor, A., Hare, J., Wolfgang, H. (1996). Taurine administration raises plasma taurine levels and affects certain plasma amino acids and related compounds in rat. *Taurine 2*, edited by Huxtable et al. Plenum Press, N.Y. 51-53
42. Koren, H. S., Devlin R.B. and Graham, D.E. (1989). Ozone-induced inflammation in the lower airways of human subjects. *Am. Rev. Respir. Dis.* 139: 407-415.

43. Krinsky, N.I. (1988). Membrana antioxidants. *Ann NY Acad. Sci.* 551:17-33.
44. Krinsky, N.I. (1992). Mechanism of action of biological antioxidants. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 200, 248 – 284.
45. Kruman I., Bruce-Keller A.J., Bredesen D., Waeg G. and Mattson M.P. (1997). Evidence that 4-hydroxynonenal mediates oxidative stress- induced neuronal apoptosis. *J. Neurosci.* 17 (13): 5089-5100.
46. Lechuga- Guerrero, A., Dorado-Martínez, C., Rodríguez, A., Pedroza-Rios, K., Borgonio-Perez, G., and Rivas-Arancibia, S. (1999). Effects of vitamin E on ozone-induced memory deficits and lipid peroxidation in rats. *Neuroreport*, 10, 1689-1692.
47. Legay, F., Lecestre, D., and Tappaz, M. (1987). Taurine biosynthesis in rat brain in vivo: lack of relationship with cysteinesulfinate decarboxylase glutamate decarboxylase-associated activity (GAD/CSDII). *J. Neurochem.* 48: 340-344.
48. Leikauf, G.D., Simpson L. G., Santrock J., Zhao Q., Abbinate-Nissen J., Zhou S., and Driscoll K.E. (1995). Airway epithelial cell responses to ozone injury. *Environ. Health. Perspect.* 103 (suppl 2):91-95.
49. Lombardini, J.B. (1976). Regional and subcellular studies on taurine in the rat central nervous system. In: *Taurine*, edited by R. Huxtable and A. Barbeau. New York: Raven. 1976: 311-326.
50. MacGree M., Devlin R., Saluta G. and Koren H.S. (1990). Tissue factor and factor II messenger RNAs in human alveolar macrophages: effects of breathing ozone. *Blood.* 75:122-127.
51. Madsen, S. (1990). Immunocytochemical visualisation of taurine-containing and taurine-synthesizing cell. In: *Taurine: Functional neurochemistry, physiology, and cardiology*, Pasantes-Morales, H, Shain, W., Martín, D.L., Martín del Rio, R. (eds) Wiley-Liss Inc, Neww York, pp 21-28.
52. McCord, J. M. (1985) Oxygen-derived free radicals in postischaemic tissue injury. *N. Engl. J. Med.* 312, 159-163.

53. Mc Donnell, W.F., Kehrl H.R. and Abdul-Salaam S. (1991). Respiratory response of humans exposed to lower levels of ozone for 6.6 hours. *Arch. Environ. Health.* 46: 145-150.
54. Meccocci, P., Mac Garvey, U. And Beal, M.F..(1994). Oxidative damage to mitochondrial DNA is increased in Alzheimer's disease. *Ann. Neurol.* 36: 747-751.
55. Miller, D. M., Buettner, G. R., and Aust, S. D. (1990). Transition metals as catalysts of "autoxidation" reactions. *Free Radical Biol. Med.* 8:95-108.
56. Monks, T. J., Hanzlik, R.P., Cohen, G.M., Ross, D., and Graham, D. G. (1992). Quinone chemistry and toxicity. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 112: 2-16.
57. Mustafa, M.G. (1990). Biochemical basis of ozone toxicity. *Free Radical Biol. Med.*, 9:254-265.
58. Oja S.S, Konto, P. (1978). Neurotransmitter action of taurine in the central nervous system. In: Barbeau A, Huxtable RJ (eds) *Taurine and neurological disorders*. Raven, New York, pp 181-200.
59. Olanow, C. (1993 a). A radical hypothesis for neurodegeneration. *TINS.* 16: 439-444.
60. Olanow, C. (1993 b). A scientific rational for protective therapy in Parkinson's disease. *J. Neural. Transm.* 91: 161-180.
61. Paauw, J. D. and Davis, T. A. (1990). Taurine supplementation at three different dosages and its effect on trauma patients. *Am. J. Nutr.* 60: 303-206.
62. Palkovits, M., Banay-Schwartz, M., and Lajtha, A. (1990). Taurine levels in brain nuclei of young adult and aging rats, in: "Taurine: Functional Neurochemistry, Physiology, and Cardiology", Pasantes-Morales, H., Martin, D.L., Shain, W. And del Rio, R. M. Eds., Wiley-Liss, N.Y. pp.45-51.
63. Pasantes-Morales, H., and Schousboe, A. (1988). Volume regulation in astrocytes: A role for taurine as an osmoeffector. *J. Neuroscie. Res.*20: 505-509.
64. Pasantes-Morales, H., Peña, C., García, O., Morales, M. M., Sanchez, R. y Morán, J. (1996). Characterization of the volume-activated taurine pathway in cultured cerebellar granule neurons. En: R. J. Huxtable (ed) *Taurine 2*. Plenum Press. N.Y. pp.393-400.

65. Paz, C. (1995). Alteraciones de la salud provocadas por la inhalación de ozono. Temas selectos de Neurociencias. Velásquez Moctezuma, J. 1<sup>a</sup>. Ed. Universidad Nacional Metropolitana pp. 385-398.
66. Paz, C. (1997). Some consequences of ozone exposure on health. Arch. Med. Res. 28 (2): 163-170.
67. Phelps, C. H. (1990). Neural plasticity in aging and Alzheimer's disease; Some selected comments. Prog. Brain Res. 86: 3-9.
68. Poot, M. (1991). Oxidants and antioxidants in proliferative senescence. Mut. Res. 256: 177-189.
69. Rice-Evans, C.A. (1994). Formation of free radicals and mechanisms of action in normal biochemical processes and pathological states: In free radical damage and its control (Rice-Evans and Burdon R.H. Eds.) 131-153.
70. Richards, D., Dean, R.T., and Jessup. (1988). Membrane Protein are critical target in free radical mediated cytolysis. Biochim. Biophys. Acta. 946: 241-288.
71. Rieder, 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.
72. Rivas-Arancibia, S., Vázquez-Sandoval, R., González-Kladiano, D., Schneider-Rivas, S., Lechuga-Guerrero, A. (1998). Effects of ozone exposure in rats on memory and levels of brain and pulmonary superoxide dismutase. Environmental Research, Section A 76: 33-39.
73. Rivas-Arancibia, S., Dorado-Martinez, C., Borgonio-Perez, G., Hiriart-Urdinavia, M., Verdugo-Díaz, L., Duran-Vazquez, A., Colín-Baranque, L., Avila-Acosta, 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 Section A 82, 7-17.
74. Routsalainen, M., Hekkila, M., Lillsunde, P., Seppala, T., and Ahtee, L. (1996). Taurine infused intrastrially elevates, but intranigally decreases striatal extracellular dopamine concentration in anaesthetised rats. J. Neural Transm. 103, 935-946.

75. Ruznak, C., Devalia, J.L., Sapsford R.J. and Davies R.J. (1996). Ozone-induced mediator release from human bronchial epithelial cells *in vitro* and the influence of nedocromil sodium. *Eur.Respir.9*: 2298-2305.
76. Saransaari, P. and Oja, S.S. (1996). Taurine and neural cell damage. Transport of taurine in adult and developing mice. In *Taurine 2* (R.J. Huxtable et al. Eds), pp. 481-489. Plenum Press, New York/London.
77. Schelegle, E. S., Adams, W.C., Giri S.N. and Sjeffkin A.D. (1989). Acute ozone exposure increase plasma PGF<sub>2α</sub> in ozone sensitive human subjects. *Am. Rev. Respir. Dis.140*: 211-216.
78. Schneider-Rivas, S., Rivas -Arancibia, S., Vazquez-Preyra, F., Borgonio-Perez, G. (1995). Moodulation of long-term memory and extinction responses induced by growth hormone and growth hormone releasing hormone in rats. *Lfe Sciences*, vol. 56 No. 22 pp.PL 433-441.
79. Schwartz L.W. Dungworth D.L. Mustafa M.G. (1976). Pulmonary responses of rats to ambient levels of ozone. Effects of day intermittent or continuous exposure. *Lab. Invest.34*: 565-578.
80. Searleman, A., Douglass, H. (1994). *Memory from a Broader Perspective*. McGraw-Hill, New York. 22-36, 51-74, 285-294.
81. Sgaragli, G., Frosini, M., Palmi, M., Dixon, H., Desmond, S., Bianchi, L., Della Corte. (1996). Role of taurine in thermoregulation and motor control. *Taurine 2*, edited by Huxtable et al. Plenum Press, N.Y. cap. 57: 527-535.
82. Shain, W., Martin D.L. (1990). Uptake and release of taurine- an overview. In: *Taurine: Functional neurochemistry, physiology, and cardiology*, Pasantes-Morales, H., Shain W, Martin, D.L. Martin del Rio, R. (eds), Wiley- Liss Inc, New York, pp 243-252.
83. Sies H., Murphy, M. E. (1991). Role of tocoferols in the protection of biological systems against oxidative damage. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol. 8*: 211-224.
84. Simonian, N. A., and Coyle J.T. (1996). Oxidative strees in neurodegenerative disease. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 36*: 83-106.

85. Sinet, P. M., Heikkila R. E., Cohen, G. (1980). Hydrogen peroxide production by rat brain in vivo. *J. Neurochem.* 34: 1421-1428.
86. 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.
87. Spears, R.M., and Martin J.P. (1982). Resolution and brain regional distribution of cysteine sulfinatase decarboxylase isoenzyme from hog brain. *J. Neurochem.* 38: 981-85.
88. Spector, D. M. Lippman, M. and Lioy, P.J. (1988). Effects of ambient ozone on respiratory function in active, normal children. *Am. Rev. Respir. Dis.* 137: 313-320.
89. Squire, L. R. (1993). Declarative and nondeclarative memory: Multiple brain systems supporting learning and memory. Elsevier Science, 3-25.
90. Stadman, E. (1992). Oxidation of free amino acids and amino acids residues in proteins by radiolysis and by metal catalyzed reactions. *Annu. Rev. Biochem.* 62: 707-821.
91. Strolin, B. M., Kettler, R., Marrari, P., Cini, M., Da Prada, M., Dostert, P. (1990). The effects of lifelong treatment with MAO inhibitors on amino acid levels in rat brain. *J. Neural Transm.* 2:239-248.
92. Stummer, W., Betz, L., Shakul, P., Keep, R.F. (1995). Blood-brain barrier taurine transport during osmotic stress and in focal cerebral ischemia. *J. Cereb Blood Flow Metab.* 15: 852-859.
93. Sturman, J.A. (1979). Taurine in developing rat brain: changes in blood-brain barrier. *J. Neurochem.* 32: 811-816.
94. Sturman, J.A. (1988). Taurine in development. *J. Nutr.* 118: 1169-1176.
95. Tsuji, A. and Tamai, I. (1996). Sodium- and chloride-dependent transport of taurine at the blood-brain barrier. In *Taurine 2* (R. J. Huxtable et al. Eds), pp. 385-391. Plenum Press, New York/London
96. Tulving, E. *Memory concepts.* (1993). Elsevier Science. 27-45.

97. Vannuchi, G., and Pepeu, G. (1995). Muscarinic receptor modulation of acetylcholine release from rat cerebral cortex and hippocampus. *Neuroscience Letters*. 190: 53-56.
98. Warner, H.R. (1993). Effects of atmospheric pollution on human health. *Experientia*. 49:754-758.
99. Wilson, J. X. (1997). Antioxidant defense of the brain: a role for astrocytes. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 75 (10-1): 1149-1163.
100. Yarbrough, G.G., Singh, D. K. And Taylor D.A. (1981). Neuropharmacological characterisation of taurine antagonist. *J. Pharmac. Exp.* 219: 604-615.
101. Zola-Morgan, S., and Squire, L.R. (1993). Neuroanatomy of memory. *Annu. Rev. From research to therapy. Ann. Med. Intern.* 140: 709-714.