

13 00381



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

EFFECTO DE LA EXPOSICION AGUDA A OZONO SOBRE LA
MORFOLOGIA DE LA MUCOSA Y DEL BULBO
OLFATORIOS DE RATA

TESIS

Que para obtener el grado académico de
DOCTOR EN CIENCIAS
BIOLOGIA

presenta

LAURA COLIN BARENQUE



FACULTAD DE CIENCIAS
UNAM

DIRECTORA DE TESIS: DRA. SELVA L. RIVAS ARANCIBIA
COTUTORA: M. EN C. TERESA I. FORTOUL VAN DER GOES

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

2002



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.

ESTEBAN MONTEJO

El cerebro humano representa un mundo donde figuran algunos continentes explorados y vastas tierras ignotas

RAMON Y CAJAL

Investigar es como adentrarse poco a poco en aguas tranquilas, el conocimiento de las cosas viene día con día y quizás mañana se podrán descubrir las perlas que están más allá, mar adentro.

ESTEBAN MONTEJO

A mis PAPÁS que con su ejemplo le han dado sentido a mi vida y les debo todo lo que soy. GRACIAS POR TODO.

A ESTEBAN por su amor, apoyo y estímulo constante para seguir adelante.

A IVAN Y GRISELLE a quienes adoro y forman parte de mi vida y de mi existencia.

A LIZ Y MANOLO en quienes en todo tiempo encuentro amor y son grandes amigos en tiempos difíciles.

A NORITA, MONI, CARLITOS e IVO porque nunca duden en alcanzar lo que quieren de la vida.

A MAURA Y CHUCHO Gracias.

A TERE FORTOUL por su gran amistad y apoyo para pasar de lo ideal a lo posible y siempre está presente para levantarte. Gracias

A SELVA quien me brindo su amistad y confianza incondicional para la realización y culminación del presente trabajo.

A ROSE con quien he compartido días adversos y días de logros.

A TERE, IVONNE, IRMA, ALICE, LAURA, SILVIA, Y ANA por su invaluable amistad.

A mis compañeros y amigos CLAUDIA, GERALDINE, CHUCHO, SANDRA, PATY, VERO, RODRIGO, SILVIA e IRENE.

AGRADECIMIENTOS

A la DRA. SELVA RIVAS Y la M. en C. TERESA FORTOUL por su amistad, su conocimiento y por la dirección para realiza y concluir el presente trabajo.

Al comité de tesis:

DR. GERARDO HEBERT VÁZQUEZ NIN

DR. ALFREDO IGNACIO FERIA VELASCO

M.enC. TERESA IMELDA FORTOUL VAN DER GOES

DRA. ROSALINDA GUEVARA GUZMÁN

DRA. SELVA LUCÍA RIVAS ARANCIBIA

DR. ANDRÉS ELIU CASTELL RODRÍGUEZ

DRA. MARGARITA GONZÁLEZ DEL PLIEGO

Por la revisión de la tesis y sus valiosos comentarios.

Al DR. MACHADO por su amistad y apoyo académico.

A la Maestra CONCEPCIÓN RUGERIO VARGAS por compartir el gran mundo de las impregnaciones.

A FRANCISCO PASOS por su inapreciable ayuda para la elaboración del material fotográfico.

A GABINO BORGONIO por todo el apoyo para la realización de los experimentos.

El presente trabajo se realizó en Laboratorio de Fisiología y Biología Celular y Tisular de la Facultad de Medicina de la UNAM bajo la dirección de la Dra. Selva Rivas Arancibia y la cotutoría de la M. en C. Teresa I. Fortoul Van Der Goes.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
I ANTECEDENTES	
1.1 Ozono	2
1.2 Lesión y Muerte Celular	7
1.3 Estrés Oxidativo	11
1.4 Enfermedades Neurodegenerativas	13
1.5 Mucosa Olfatoria	14
1.6 Bulbo Olfatorio	17
1.6.1 Capa Nerviosa Superficial	17
1.6.2 Capa Glomerular	17
1.6.3 Capa Plexiforme Externa	17
1.6.4 Capa de Células Mitrals	18
1.6.5 Capa Plexiforme Interna	19
1.6.6 Capa de Células Granulosas	19
JUSTIFICACIÓN	21
HIPÓTESIS	21
OBJETIVOS	21
Objetivo General	21
Objetivos Específicos	21
MÉTODO	22
Exposición a ozono	22
Técnica de Golgi	23
Técnica de Microscopía Electrónica de Transmisión	24
RESULTADOS	25
Mucosa Olfatoria	25
Bulbo Olfatorio	29
DISCUSIÓN	50
CONCLUSION	59
REFERENCIAS	60

ÍNDICE DE FIGURAS

Introducción

Figura 1. Formación de ozono en la tropósfera -----	2
Figura 2. Acción del ozono -----	5
Figura 3. Patogénesis de daño celular -----	8
Figura 4. Digrama de Apoptosis y Necrosis -----	10
Figura 5. Mecanismos de daño celular por ROS -----	12
Figura 6. Esquema de la mucosa olfatoria -----	16
Figura 7. Relación de los receptores olfatorios -----	18
Figura 8. Organización sináptica del Bulbo Olfatorio -----	20

Resultados

Figura 9. Microfotografías de Mucosas Olfatorias -----	38
Figura 10. Microfotografía de neurona granulosa normal -----	39
Figura 11. Microfotografía de neuronas granulosas alteradas -----	39
Figura 12. Microfotografía de neurona granulosa normal -----	40
Figura 13. Microfotografía de neurona con pérdida de espinas -----	40
Figura 14. Microfotografía de una dendrita secundaria de una-----	41
neurona granulosa de una rata expuesta a ozono	
Figura 15. Microfotografía de una dendrita secundaria de una-----	41
neurona granulosa de una rata expuesta a ozono	
Figura 16. Micrografía de neuronas granulosas normales-----	42
Figura 17. Micrografía de la capa granulosa de un animal-----	43
expuesto a ozono.	
Figura 18. Neuropilo de la capa granulosa de una rata-----	44
expuesta a ozono.	
Figura 19. Micrografía del neuropilo de la capa granulosa-----	45
de un animal expuesto a ozono.	
Figura 20. Micrografía de una neurona granulosa de una-----	46
rata expuesta a ozono, con Ap. de Golgi dilatado.	
Figura 21. Micrografía de una neurona granulosa con-----	47
el pericarión vacuolado.	
Figura 22. Micrografía de granulos de lipofucsina en el -- -----	48
pericarión de una neurona granulosa de una rata expuesta a ozono.	
Figura 23. Micrografía de un capilar de la capa granulosa-----	49
de una rata expuesta a ozono.	

Discusión

Figura 24. Resumen de alteraciones morfológicas de la -----	57
mucosa y bulbo olfatorio de ratas expuestas a ozono.	

ÍNDICE DE GRÁFICAS

Gráfica 1 Pérdida de cilios del epitelio olfatorio -----	26
Gráfica 2 Daño del epitelio olfatorio -----	26
Gráfica 3 Daño de las glándulas de Bowman -----	27
Gráfica 4 Efecto del ozono sobre el espesor del epitelio olfatorio -----	28
Gráfica 5 Dimensiones del soma de las neuronas granulosas -----	30
Gráfica 6 Densidad espinosa en dendritas secundarias -----	31
Gráfica 7 Porcentaje de daño neuronal -----	33
Gráfica 8 Porcentaje de neuronas vacuoladas -----	34
Gráfica 9 Porcentaje de neuronas con mitocondrias alteradas -----	35
Gráfica 10 Porcentaje de neuronas con lipofucsina -----	36
Gráfica 11 Porcentaje de daño endotelial -----	37

ABREVIATURAS

ATP	Adenosina trifosfato
ADN	Acido desoxiribonucleico
Ca	Calcio
Cl	Cloro
d	Días
EP	Enfermedad de Parkinson
error est.	Error estandar
Fe	Fierro
g	Gramos
GSH	Glutación
GSSH	Glutación disulfuro
h	Horas
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrógeno
IL	Interleucina
K	Potasio
L	Alkil
LOO	Peroxil
LO	Alkoxil
µm	Micras
M	Molar
O ₃	Ozono
OH	Hidroxilo
O ₂	Oxígeno molecular
O ₂ ⁻	Superóxido
PgE ₂	Prostaglandinas E ₂
ppm	Partes por millón
ROS	Especies reactivas de oxígeno
SNC	Sistema Nervioso Central
TNF α	Factor de necrosis tumoral α
\bar{x}	Media

RESUMEN

La toxicidad del ozono se debe a la formación de radicales libres. En pacientes con enfermedades neurodegenerativas en las cuales está presente un estado de estrés oxidativo se ha reportado disfunción olfatoria. El objetivo del presente trabajo fué realizar un análisis morfológico de la mucosa y bulbo olfatorio de ratas expuestas a un modelo de estrés oxidativo producido por ozono. Se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar con un peso de 200-250 g. y libre acceso a comida y agua, en un cuarto limpio de contaminantes, expuestas a 1-1.5 ppm de ozono durante 4 horas en una sola ocasión. Los animales control fueron expuestos a un flujo de aire bajo las mismas condiciones que los animales experimentales. El grupo experimental se dividió en 5 subgrupos (n=5), sacrificándose a las 2 h, 24 h, 5, 10 y 15 días postexposición. El grupo control (n=5) se sacrificó en los mismos tiempos. Ambos grupos se perfundieron por vía aórtica con solución salina al 0.9 %, seguida del fijador (2% de paraformaldehído y 2% de glutaraldehído en amortiguador de fosfatos 0.1M). Posteriormente se extrajeron los bulbos olfatorios para ser procesados con la técnica de Golgi rápido y microscopía electrónica. Las mucosas olfatorias se mantuvieron 18 h en la solución fijadora y se procesaron con la técnica convencional de microscopía electrónica para realizar cortes semifinos. Las mucosas olfatorias de los animales expuestos a ozono mostraron daños citotóxicos evidentes como; vacuolización de las glándulas de Bowman, pérdida parcial de cilios del epitelio, células picnóticas en el estrato basal del epitelio, disminución y aumento del espesor del epitelio a las 24 hrs. y 5 días respectivamente. El análisis citológico de los bulbos olfatorios consistió en cuantificar el número de espinas en 20µm de 495 dendritas secundarias de 165 neuronas granulosas de los grupos control y expuestos a ozono. Los resultados mostraron decremento del número de espinas dendríticas en los animales sacrificados a las 2 y 24 hrs., 5 y 10 días postexposición a ozono, sin embargo a los 15 días postexposición, el número de espinas fué similar al grupo control.

Por otra parte se realizó un análisis ultraestructural de 100 células granulosas provenientes de los bulbos olfatorios de cada rata de los subgrupos para determinar el porcentaje de alteraciones tales como: vacuolización del citoplasma y de las dendritas, presencia de granulos de lipofucsina, edema mitocondrial y daño endotelial. Se observó que los subgrupos de 2 hrs. y 5 días presentaron mayor porcentaje de células granulosas con vacuolas en el pericarión y alteraciones mitocondriales, mientras que el mayor porcentaje de daño endotelial y presencia de granulos de lipofucsina se observó a los 5 días.

Los resultados sugieren que el estrés inducido por inhalación aguda de ozono, se debe al daño oxidativo producido por dicho gas sobre la citología y ultraestructura del bulbo olfatorio. Este daño es temporal, debido probablemente a la tendencia al equilibrio entre los radicales libres y los antioxidantes endógenos y a la posible regeneración de los receptores olfatorios que están en estrecha relación con las neuronas del bulbo olfatorio.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

ABSTRACT

Ozone toxicity is related with the induction of free radicals. In patients with neurodegenerative diseases in which oxidative stress has been detected, olfactory dysfunction has been reported. The objective of this report was to analyze the changes in the respiratory and in the olfactory epithelium modifications of rats by the induction of oxidative stress state after inhalation ozone. Male Wistar rats were exposed to a single inhalation during four hours to 1 -1.5 ppm. Control animals were exposed only to flowing air in the same experimental conditions. The experimental group was subdivided in groups of five animals sacrificed at 2h, 24h, and 5,10 and 15 days after the single exposure. Five animals were used as controls and sacrificed in the same conditions. All animals were perfused via aorta with saline 0.9% followed by 2% paraformaldehyde and 2% glutaraldehyde in 0.1M phosphate buffer. The olfactory bulbs were processed for Golgi technique and ultrastructural analysis. The olfactory mucosa showed cytotoxic changes such as Bowman's glands vacuolation, partial cilia lost, pycnotic changes in the basal stratum and decrease in the thickness at 24h and an increase at 5 days. The number of spines in the olfactory bulbs decreased at 2 and 24 h, 5 and 10 days postexposure, but at 15 days the number of spines increased to values similar to those found in controls.

The ultrastructural findings, was that granule cells exhibited cytoplasmic and dendrites vacuolation, lipofuscin granules, mitochondrial swollen and endothelial changes. In animals sacrificed after 2h and 5 days vacuolation and mitochondrial changes were prominent while endothelial damage and lipofuscin granules were more often seen at 5 days.

The results suggest that the oxidative state induced after ozone exposure are related to the cytological and ultrastructural alterations in the olfactory bulb. The changes seemed to be transient, maybe as a consequence of reaching an equilibrium between oxidant and endogenous antioxidants, and the possible regeneration of the olfactory receptors which are in very close relation with the olfactory bulb neurons.

INTRODUCCIÓN

La contaminación atmosférica fotoquímica, conocida comúnmente como smog, es una mezcla de varios compuestos químicos entre los cuales se encuentran; óxidos de nitrógeno, hidrocarburos reactivos y ozono (O_3). La formación de O_3 depende de la radiación solar en presencia de precursores como el dióxido de nitrógeno y los hidrocarburos, absorben eficientemente la energía ultravioleta solar que llega a la superficie de la Tierra, generándose una reacción fotolítica en donde la molécula de dióxido de nitrógeno se rompe en dos y se inicia el mecanismo de formación de ozono (Devlin y cols. 1997).

Los efectos nocivos del O_3 se han explicado por la formación de radicales libres, que se derivan de la reacción de dicho gas con los ácidos grasos insaturados de las membranas celulares provocando peroxidación. En la actividad metabólica celular los radicales libres endógenos son producidos en pequeñas cantidades en el retículo endoplásmico, los microsomas, los peroxisomas y en las mitocondrias durante la cadena respiratoria a través del transporte de electrones. Los radicales libres son inactivados por sistemas enzimáticos como la superóxido dismutasa, las catalasas y la glutatión peroxidasa, así como por los sistemas no enzimáticos como las vitaminas A, C y E.

El estrés oxidativo está en función del desbalance entre la cantidad de radicales libres y de los antioxidantes, y cuando existe una producción excesiva de sustancias oxidantes o bien una disminución de antioxidantes se produce daño oxidativo (Olanow, 1993).

El Sistema Nervioso Central (SNC) es altamente susceptible al estrés oxidativo, debido que las neuronas poseen un alto contenido de ácidos grasos insaturados, un alto consumo de oxígeno, un bajo nivel de sustancias antioxidantes tales como el glutatión, peroxidasa y catalasas, así como un elevado metabolismo celular que lleva a la producción endógena de radicales libres (Olanow y Arendash, 1994).

En las enfermedades neurodegenerativas, en las cuales existe un estado de estrés oxidativo, uno de los primeros síntomas antes de que aparezcan trastornos de memoria y conductuales es la pérdida del olfato (Burns, 2000), por lo que se supone que el bulbo olfatorio es una estructura vulnerable a los cambios bioquímicos ocasionados por el aumento de los radicales libres. Considerando que la exposición al ozono aumenta la producción de radicales libres, los cuales llegan a todo el organismo, incluyendo el SNC, y que las células del epitelio olfatorio se alteran por la exposición de O_3 además de que están en estrecha relación con las dendritas de los receptores olfatorios, y que estos últimos realizan contactos sinápticos con las dendritas de las células del bulbo olfatorio, reviste especial importancia el que esta estructura cerebral puede ser alterada en su citología y ultraestructura.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

I ANTECEDENTES

La situación geográfica de la Ciudad de México y las emisiones de contaminantes atmosféricos, conforman los elementos de un gran contenedor natural, en el que ocurren complejas reacciones fotoquímicas que dan lugar a la formación de compuestos oxidantes como el ozono (O_3) (Oehme y cols. 1996).

1.1 OZONO

El ozono se genera a través de la disociación del bióxido de nitrógeno mediante fotólisis por las radiaciones solares para producir óxido nítrico y un átomo de oxígeno, éste último se combina con el oxígeno molecular (O_2) del aire para producir ozono (Fig 1), que es un oxidante secundario muy potente, que puede interaccionar con distintas moléculas orgánicas y generar radicales libres. (Oehme y cols.1996)

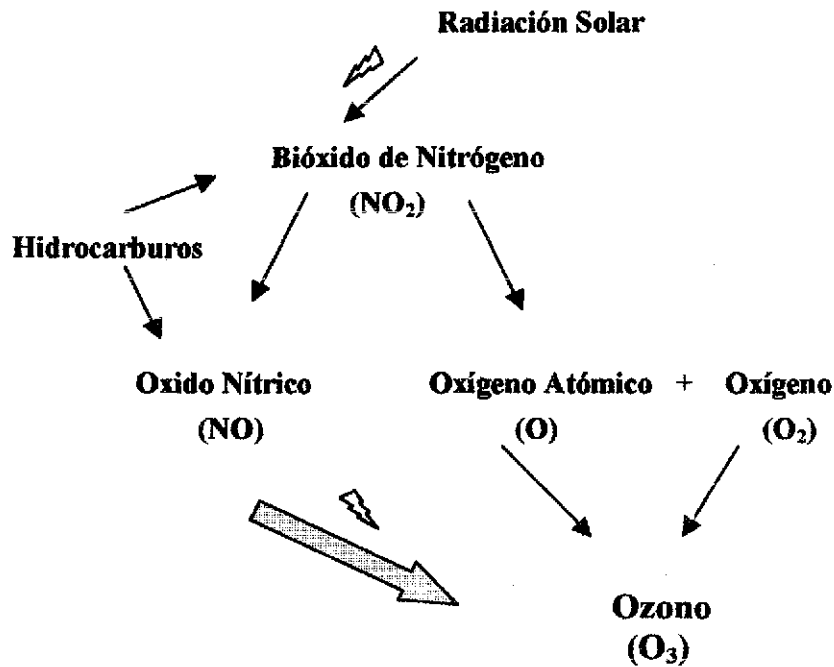


Fig. 1 Formación de ozono en la tropósfera a partir del oxido nítrico, en presencia de radiaciones solares (Modificado de Sánchez 1992).

El ozono es uno de los gases contaminantes más importantes en las atmósferas urbanas y la toxicología del O₃ depende de la concentración, duración de la exposición y la especie animal analizada. El ozono es un potente oxidante capaz de reaccionar con biomoléculas como grupos tioles, aminos o puentes de carbón, y con compuestos bioorgánicos en fluidos, células y tejidos (Devlin y cols., 1997).

Poblaciones expuestas crónicamente a O₃ pueden manifestar fatiga, cefalea, alteraciones del sueño, irritación de los ojos y alteraciones del tracto respiratorio (Wanner, 1993; Huitrón y cols., 1994; Paz C., 1997).

Dicho gas es altamente tóxico en diferentes sistemas y aparatos. En el aparato respiratorio se produce citotoxicidad epitelial, incremento de la permeabilidad celular (Koren y cols., 1989; Menzel y Meacher, 1999), respuesta inflamatoria pulmonar aguda con extravasación y activación de eosinófilos y neutrófilos en sujetos asmáticos (Newson y cols., 2000), así como activación de mastocitos e infiltración por polimorfonucleares del parénquima pulmonar (Noviski y cols., 1999)

Está descrito ampliamente el efecto del ozono sobre la función pulmonar en humanos, ya que se ha demostrado que concentraciones de ozono ambientales producen disminución de la función respiratoria en voluntarios no fumadores, en niños (Sandström, 1995; Spector y cols., 1988) y broncoconstricción en deportistas (McDonnell y cols., 1991). Folinsbee y cols. (1984) realizaron un estudio en 10 voluntarios que fueron expuestos a 0.12 ppm de ozono durante 6.6 h incluyendo 5 h de ejercicio y observaron decremento progresivo de la función pulmonar. Este decremento también se ha observado en exposiciones agudas a 0.2 ppm de ozono durante 2 h (Blomberg A. y cols., 1999).

También cuando se llevan a cabo exposiciones diarias a O₃ se han observado alteraciones en el tracto respiratorio de animales experimentales. Ratas expuestas a 0.35 ppm, 0.5 ppm ó 1.0 ppm de O₃ por 2.5 h durante 5 días, mostraron disminución en la función respiratoria con 0.35 y 0.50 ppm en los primeros días, pero al 5 día de exposición con 0.35 ppm la función respiratoria fue normal, sin embargo todos los animales tuvieron cambios patológicos en los pulmones (Lippmann, 1989). Por otro lado, se ha sugerido que la inflamación inducida por ozono de las vías aéreas de ratón está modulada por células cebadas localizadas en el epitelio respiratorio (Longphre y cols., 1996), y está acompañada por cambios en la estructura y función del surfactante pulmonar (Su y Gordon, 1996; Putman y cols., 1997).

Además, la exposición a ozono produce efectos inflamatorios en pulmón debido probablemente a la inactivación de las endopeptidasas, resultando un aumento de la actividad de la substancia P (Hazbun y cols., 1993). En dicho proceso inflamatorio se presenta neutrofilia en el lavado broncoalveolar y en la mucosa bronquial, aumento de inmunoglobulina G, fibronectina y elastasa (Koren y cols., 1989; Rusznak y cols., 1996; Krishna y cols., 1998), acompañado por aumento del número de macrófagos alveolares inmaduros, de la permeabilidad alveolar, y en los niveles de prostaglandinas E_2 (PGE_2) y $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$), de citocinas como las interleucinas (IL) IL-1, IL-6, IL-8 y del factor de necrosis tumoral- α ($TNF\alpha$), (McGee y cols., 1990; Kehrl y cols., 1987; Schelegle y cols., 1989; Pendimo y cols., 1994; Arsalane y cols., 1995; Jaspers y cols. 1997; Devlin y cols., 1997; Broeckaert y cols., 1999).

Estudios morfológicos revelaron necrosis epitelial pulmonar de bronquiolos terminales, como consecuencia de la exposición a 1.0 ppm de ozono durante 4 h (Pino y cols., 1992) y proliferación del epitelio de los bronquios y alveolos (Salmon y cols., 1998). A concentraciones de 0.1-0.5 ppm el O_3 produce cambios morfológicos en las células ciliadas del tracto respiratorio de ciertas especies animales, como los daños observados en la mucosa nasal de monos expuestos a 0.15 y 0.3 ppm de O_3 durante 6 días, y metaplasia de células mucosas del epitelio nasal de ratas expuestas 8 h en la tráquea de ratas expuestas a 0.5 ppm de O_3 durante 7 días (Harkema y cols., 1987; Schwartz y cols., 1976). Hotchkiss y cols., (1991) reportaron hiperplasia y metaplasia en el epitelio respiratorio de ratas expuestas a 0.8 ppm de ozono durante 6 h. Es de notarse que se observó displasia en la mucosa nasal de humanos originarios de ciudades no contaminadas que fueron expuestos durante 60 días a los niveles de ozono en la ciudad de México (Calderón y Ocotla, 1993)

Por otra parte, se ha propuesto que el daño en el aparato respiratorio producido por la acción de los radicales libres generados por ozono, se disemina hacia el torrente sanguíneo y a otros sistemas como el sistema nervioso, produciéndose alteraciones neurológicas como fatiga, letargia y dolor de cabeza en sujetos expuestos a ozono (Hackney y cols., 1975). Asimismo la exposición a ozono produce disminución de la actividad motora, alteración de la memoria a corto y largo plazo, aumento en el metabolismo proteico, en la peroxidación de lípidos y en la concentración de serotonina en el puente de ratas expuestas a ozono (Rivas y cols., 1998; Benuck y cols., 1993; Paz y Huitrón, 1996) y alteraciones citológicas y ultraestructurales en el SNC (Colín y cols., 1999; Avila y cols., 1999)

La toxicidad del ozono se debe a sus propiedades oxidativas generando radicales hidroxilo y superóxido como consecuencia de la exposición del epitelio respiratorio en cultivo a ozono (Chen y Qu, 1997). Estos radicales libres se generan a través de la peroxidación de los ácidos grasos insaturados y colesterol, así como de la oxidación de tioles, aminas, aldehídos, alcoholes y proteínas (Halliwell y Gutteridge, 1984, Pryor 1976). El ozono reacciona preferentemente con los grupos sulfhidrilo de las proteínas membranales; y con los enlaces dobles de carbón de los ácidos grasos insaturados, dando como resultado la formación de aldehído e hidroxihidroperóxido. Este último al reaccionar con agua en el citoplasma forma otra molécula de aldehído y peróxido de hidrógeno (H_2O_2) (Leikauf y cols., 1995) (Fig. 2). El H_2O_2 es un agente oxidante que contribuye de manera importante a la generación de radicales libres, debido a su gran afinidad con las moléculas de fierro al cual se une y se forma radicales hidroxilo altamente reactivos (reacción de Fenton) que pueden iniciar el proceso de peroxidación de lípidos.

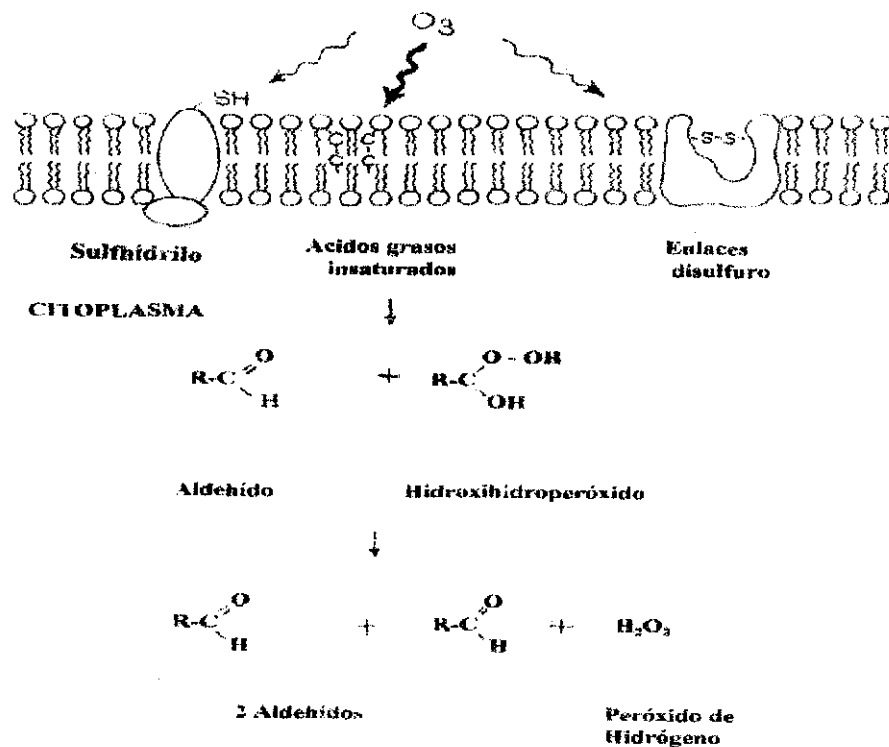


Fig. 2 Acción del ozono sobre los grupos sulfhidrilo y enlaces disulfuro de las proteínas y en los enlaces de carbón de los ácidos grasos insaturados membranales (Leikauf y cols. 1995).

Los radicales libres son moléculas que contienen un electrón no apareado en una órbita externa. En este estado el radical es altamente reactivo, y reacciona con moléculas inorgánicas u orgánicas como proteínas, lípidos, carbohidratos y ácidos nucleicos y son capaces de iniciar reacciones autocatalíticas, generando radicales libres a partir de las moléculas con las que reaccionaron y así propagar la formación de radicales.

Los radicales libres se generan de forma exógena en el ambiente como consecuencia de la contaminación ambiental producida por radiaciones, herbicidas, plaguicidas, humo de cigarro, emisiones de automóviles, fábricas etc. y de forma endógena en el organismo durante el metabolismo celular, en las células del sistema inmune como neutrófilos, monocitos, macrófagos y eosinófilos y en la microglía del tejido nervioso, durante su activación por la invasión de microorganismos ó por lesión (Rice-Evans C.A., 1994; Halliwell B., 1989). Además son producto del metabolismo aeróbico celular generados durante el transporte de electrones en la cadena respiratoria que se lleva a cabo en la membrana interna de las mitocondrias, en el retículo endoplásmico, el citoplasma, la membrana plasmática y los peroxisomas. Cuando los sistemas antioxidantes como la superóxido dismutasa, catalasa y selenio glutatión peroxidasa no son capaces de compensar la cantidad de prooxidantes producidos, los radicales libres formados producen alteración en diferentes componentes celulares como:

1) Peroxidación de lípidos de las membranas plasmáticas y de los organelos. Los dobles enlaces de los átomos de carbón de los ácidos grasos insaturados de la membrana son vulnerables al ataque de radicales libres derivados del oxígeno, en particular del hidroxilo. Las interacciones lípido-radical dan lugar a peróxidos, que constituyen especies reactivas, iniciando la subsiguiente reducción de otro ácido graso, produciéndose reacciones en cadena para formar radicales hidroxilo, peróxido de hidrógeno y radicales peroxil; los radicales hidroxilo y peroxil son altamente tóxicos e inician procesos autocatalíticos con la resultante lesión de las membranas.

2) La respiración aeróbica que afecta la fosforilación oxidativa y a la producción de ATP en las membranas mitocondriales internas.

3) Modificación oxidativa de las proteínas. Los radicales libres promueven la formación de enlaces cruzados mediada por los grupos sulfhidrilo de aminoácidos como la metionina, cistina, histidina y lisina, además de causar una fragmentación de las cadenas polipeptídicas. La modificación

oxidativa promueve la degradación enzimática produciéndose lesión en toda la célula.

4) Lesión en el ácido desoxirribonucleico (ADN). Las reacciones con timina en el ADN producen roturas de la hebra simple de ADN. Como resultado de estas alteraciones se manifiesta muerte celular como necrosis ó apoptosis. (Richards y cols., 1988; Diplock A., 1994; Simonian y Coyle, 1996; Janssen y cols., 1993; Kruman y cols., 1997)

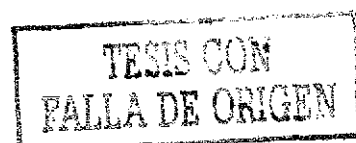
1.2 LESIÓN Y MUERTE CELULAR

Las causas de lesión celular reversible y de muerte celular, pueden ser endógenas como trastornos genéticos, reacciones inmunológicas y desequilibrios nutricionales y exógenas como agentes infecciosos, físicos y químicos que deterioran la estructura y función metabólica celular.

La lesión celular potencialmente reversible se caracteriza por pérdida de la homeostasis con el consecuente edema celular, como manifestación de la alteración del transporte activo, acumulación de sodio intracelular y este aumento de soluto se acompaña por una ganancia isosmótica de agua. Este tipo de lesión se denomina degeneración vacuolar reversible y los cambios ultraestructurales consisten en 1) alteraciones de la membrana plasmática como vesiculación y formación de figuras de mielina, 2) edema mitocondrial de poca amplitud y aparición de densidades amorfas pequeñas ricas en fosfolípidos, 3) dilatación del retículo endoplásmico con desprendimiento y disgregación de los polisomas y 4) alteraciones nucleolares con disgregación de los elementos granulares y fibrilares, con o sin cambios en la cromatina (Buja y cols., 1993).

En cuanto a la muerte celular ésta se manifiesta como, un proceso fisiológico durante la organogénesis embrionaria, en la renovación celular en el adulto, ó como proceso patológico que es el resultado final de la lesión celular aguda que conduce a la necrosis y/ o a la apoptosis.

En el SNC, durante el desarrollo, existe un exceso en el número de neuronas que se reduce mediante la acción de factores tróficos que permiten el establecimiento de sinapsis y la formación de vías, y aquellas células que no forman sinapsis son eliminadas fisiológicamente por medio de apoptosis. Sin embargo, en el adulto el aumento patológico en la apoptosis está asociada a desordenes neurodegenerativos (Rivas, y cols. 2001)



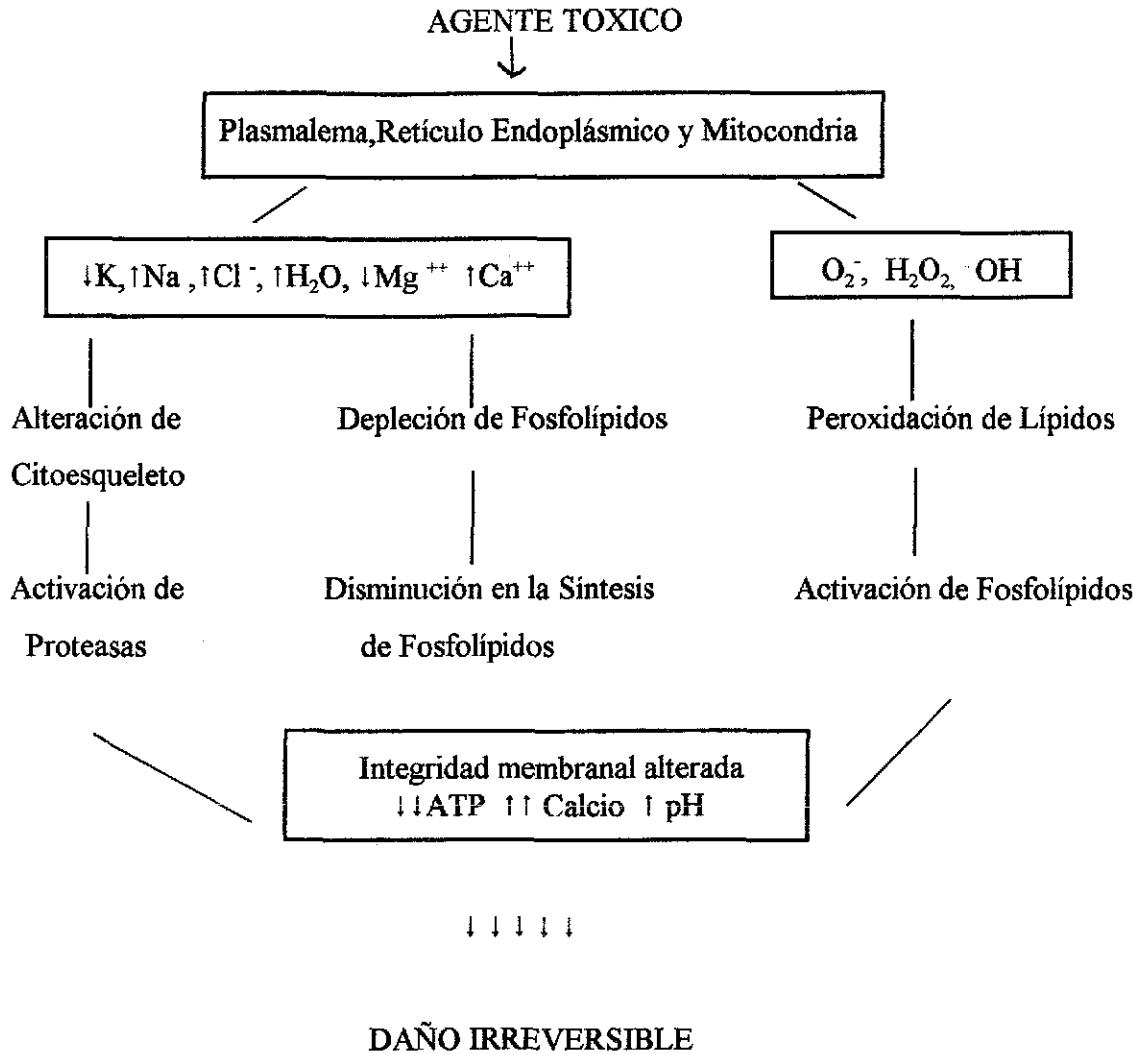


Fig 3 . Esquema de la patogénesis de daño celular irreversible (Modificado de Buja y cols., 1993).

La necrosis es una de las expresiones morfológicas de muerte celular, que va acompañada generalmente por una respuesta inflamatoria aguda con participación de la microglia, neutrófilos y monocitos y se caracteriza por una serie de cambios morfológicos irreversibles, derivados en gran parte a la acción enzimática progresiva y a la desnaturalización de las proteínas, que dependiendo de cual predomine se desarrollará necrosis licuefactiva o coagulativa.

La evolución de la necrosis involucra cambios metabólicos progresivos, principalmente en el metabolismo del fosfato y en la reducción progresiva del contenido celular de ATP y cambios morfológicos notables (Fig.4) como: 1) edema celular, atribuido a la pérdida selectiva de la permeabilidad, 2) ruptura de la membrana celular y de los organelos, 3) edema mitocondrial de gran amplitud con matriz amorfa y densidades osmofílicas de lípidos y proteínas y depósitos de calcio y de fosfatos, 4) dilatación de retículo endoplásmico (Fig.4), 5) liberación de hidrolasas en la matriz extracelular 6) ruptura lisosomal, 7) cambios en la cromatina que incluyen, degradación de histonas, RNA y DNA (Schwartzman y Cidlowski, 1993; Buja y cols., 1993).

Por otra parte, la apoptosis se presenta en numerosos procesos fisiológicos como la organogénesis, diferenciación, control en el número de las poblaciones celulares; y en procesos patológicos, como infecciones virales, tumores, muerte celular inducida por agentes tóxicos exógenos, deficiencias inmunológicas, enfermedades neurodegenerativas y autoinmunes (Granville y cols., 1998).

A diferencia de la necrosis, la apoptosis es un tipo de muerte celular activa en el que se requiere gasto de energía, se presenta en células aisladas, no se desarrolla inflamación y se caracteriza por cambios morfológicos que se manifiestan inicialmente en el núcleo como 1) condensación de la cromatina en la periferia por debajo de la envoltura nuclear, en agregados bien delimitados de diversas formas y tamaños, asociado a la fragmentación del ADN mediada por la activación de endonucleasas dependientes de calcio, aunados a cambios citoplásmicos como; 2) constricción celular, asociada a la reducción del volumen con citoplasma denso y los organelos agrupados, por la activación de la transglutaminasa la cual forma enlaces cruzados entre las proteínas citoplásmicas 3) desprendimiento de los ribosomas del retículo endoplásmico rugoso, 4) vesiculación superficial y fragmentación celular en numerosos cuerpos apoptóticos unidos a la membrana, compuestos de citoplasma y organelos agrupados (Fig. 4), y 5) fagocitosis de los cuerpos apoptóticos por células adyacentes tales como parenquimatosas, macrófagos, microglía etc. (Granville y cols., 1998)

Dichos procesos de muerte celular (Necrosis y Apoptosis) se manifiestan, según el grado de exposición a ciertos agentes exógenos generadores de radicales libres asociados a un estado de estrés oxidativo, debido a que las señales oxidativas generadas intracelularmente incluyen oxidación mitocondrial del citocromo P450 y la NAPH oxidasa. Por ejemplo el estrés oxidativo producido por

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

altas dosis de t-butilhidroperóxido que induce fragmentación del DNA y necrosis. Por el contrario, al aplicar bajas dosis, se presenta apoptosis, acompañada con activación de endonucleasas y desacoplamiento de la cadena de transporte de electrones.

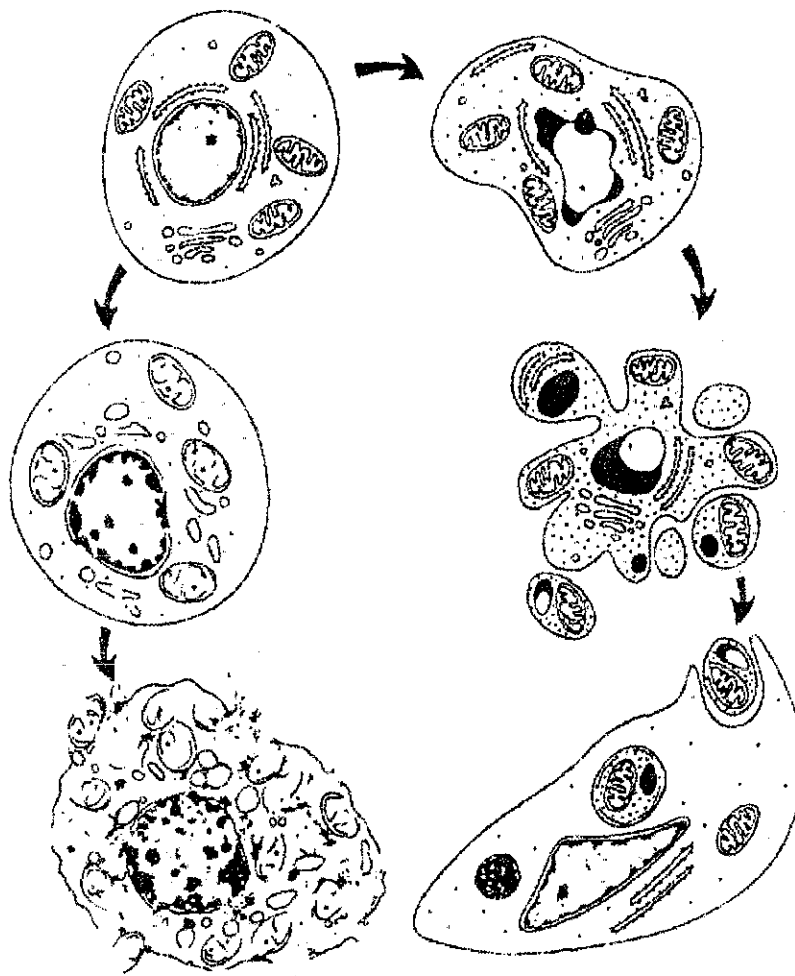


Fig 4. Diagrama que ilustra la secuencia de los cambios ultraestructurales de muerte celular. Necrosis (izquierda) con la evidente alteración de los organelos, edema celular y vacuolización. Apoptosis a la derecha, con la evidente alteración nuclear en los estadios tempranos, constricción celular y formación de cuerpos apoptóticos en estadios tardíos. (Kerr y Harmon, 1991).

1.3 ESTRÉS OXIDATIVO

El estrés oxidativo es el producto del desequilibrio entre la producción de radicales libres y su eliminación por los sistemas antioxidantes, el cual puede iniciarse por numerosos factores como: alteraciones nutricionales, carencia de minerales y vitaminas, lesiones, trastornos hereditarios, acidosis, exposición a agentes físicos y químicos ambientales, péptido β amiloide, neurotransmisores como la dopamina y el glutamato (Wilson J.X., 1997; Olanow, 1993).

En el estado de estrés oxidativo se presenta un incremento en la producción de radicales libres, incorporándose moléculas de oxígeno a los ácidos grasos insaturados de las membranas (Hsiang y cols., 1997) iniciándose reacciones en cadena para formar radicales libres. La peroxidación de lípidos produce pérdida progresiva de la fluidez membranal, reducción del potencial de membrana, y aumento en la permeabilidad a iones Ca^{2+} (Blanc y cols., 1998; Urano y cols., 1997; Oyama y cols., 1996; Simonian y Coyle, 1996). Por otra parte, los radicales libres pueden dañar a proteínas estructurales activándolas ó inhibiéndolas, a proteínas enzimáticas promoviendo la proteólisis, sobre el ADN, modificando nucleótidos que reaccionan con fosfatos (Janssen y cols., 1993; Kruman y cols., 1997), y como resultado puede manifestarse muerte celular por necrosis ó apoptosis dependiendo del grado oxidativo (Fig.5) (Wylie y cols., 1980, Simonian y Coyle, 1996).

Por otra parte, el SNC es altamente vulnerable al estrés oxidativo provocado por radicales libres, debido a su gran actividad metabólica oxidativa, a su alto contenido de ácidos grasos poliinsaturados, a sus bajos niveles de enzimas antioxidantes especialmente catalasas y glutatión peroxidasas y por la producción endógena de radicales libres durante el catabolismo de la dopamina. En el SNC se generan radicales libres como en el caso de la oxidación de catecolaminas, en el metabolismo de las prostaglandinas, en la reacción de Fenton, en los astrocitos, en la activación de la microglía, en la generación de óxido nítrico en neuronas y en el endotelio de los vasos sanguíneos. Los efectos tóxicos de los radicales libres generados sobre la función neuronal son: incremento en la permeabilidad de la barrera hematoencefálica, alteración en la formación de tubulina, inhibición de la respiración mitocondrial y alteración en el transporte iónico y en la transmisión sináptica (Evans, 1993)

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

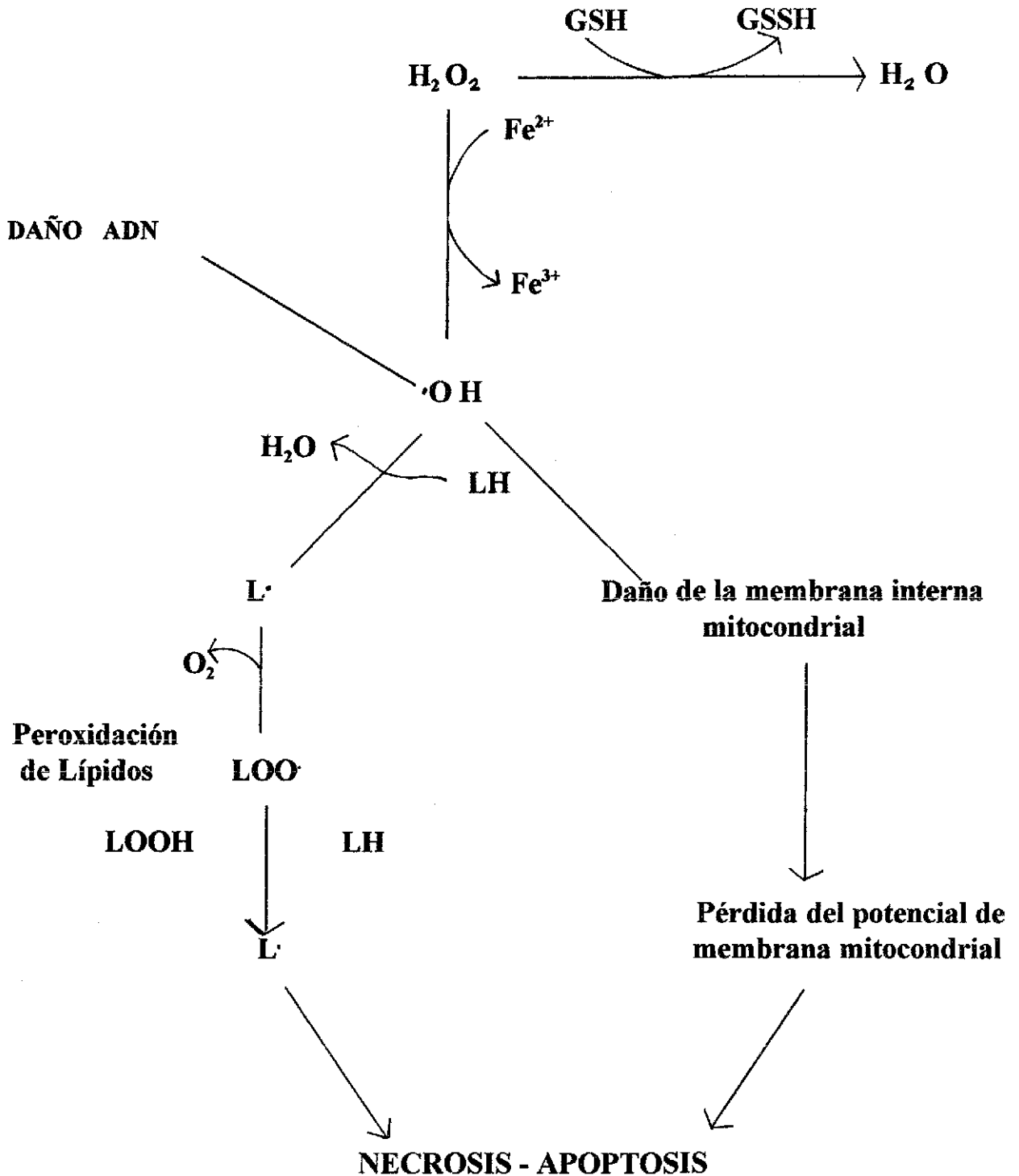


Fig. 5. Mecanismos de daño celular producido por especies reactivas de oxígeno. H_2O_2 peróxido de hidrógeno, ($\text{OH}\cdot$) hidroxil, ($\text{LOO}\cdot$) peroxil, ($\text{LO}\cdot$) alcoxil, ($\text{L}\cdot$) alquil (Modificado de Farber y cols., 1990).

1.4 ENFERMEDADES NEURODEGENERATIVAS

La degeneración neuronal progresiva es una de las características de las enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Parkinson y de Alzheimer y se ha propuesto que uno de los factores patogénicos responsables de dicha muerte neuronal es el estrés oxidativo producido por la generación de radicales libres (Practico y Delanty, 2000; Smith y cols., 1996); aunque aún no se ha determinado si el estrés oxidativo es parte de un proceso degenerativo primario o si es secundario a la degeneración celular producida por otros mecanismos (Rivas y cols. 2001)

La enfermedad de Alzheimer se caracteriza clínicamente por un deterioro gradual de las funciones intelectuales, que se correlaciona por la degeneración de neuronas piramidales de hipocampo, corteza entorrinal y neuronas colinérgicas del cerebro anterior, con la formación de placas seniles o neuríticas extracelulares constituidas por péptidos β -amiloides y marañas neurofibrilares formadas por acumulaciones anormales de filamentos helicoidales, en los somas de neuronas piramidales de hipocampo (Mena y Rivera 1993). Además se ha demostrado que el estrés oxidativo contribuye a la polimerización de la proteína tau, la cual es el componente principal de las marañas neurofibrilares, alteración en la mitocondrias con déficit de ATP (Hirai, y cols. 2001) y la agregación de péptidos β -amiloides solubles (Smith y cols. 2000) que son tóxicos en neuronas en cultivo de hipocampo y son los responsables de la degeneración neuronal (Yankner y cols., 1989), y esta agregación es inhibida por efecto de antioxidantes (Dryrks y cols., 1992).

En cuanto a los pacientes con enfermedad de Parkinson (EP) presentan pérdida de neuronas dopaminérgicas de la sustancia nigra pars compacta. Estas neuronas son vulnerables al estrés oxidativo debido a la formación de radicales libres generados en el metabolismo normal de la dopamina (Olanow y Arendash, 1994). El peróxido de hidrógeno se produce durante la síntesis de la dopamina, en su catabolismo por la monoamino oxidasa y por autooxidación no enzimática. Por otra parte la neuromelanina presente en las neuronas nigrales se une al hierro y promueve la reacción del peróxido de hidrógeno con metales reducidos para formar los radicales hidroxilo por la reacción de Fenton, produciendo un incremento de hierro en la sustancia nigra en EP y el consecuente aumento en el estrés oxidativo (Simonian y Coyle, 1996). Así la producción anormal de radicales

libres da como resultado alteración del complejo I mitocondrial (Schapira, 1994), déficit de energía, peroxidación de lípidos, oxidación de proteínas, DNA y muerte por apoptosis de neuronas dopaminérgicas de la sustancia nigra de pacientes con esta enfermedad (Anglade, y cols. 1995; Dexter, y cols. 1989; Floor y Wetzel, 1998).

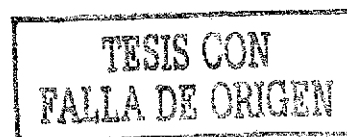
Además, pacientes con enfermedad de Parkinson y Alzheimer presentan disfunción olfatoria (Corwin y cols., 1985; Ward y cols., 1983, Doty y cols., 1987, 1991; Burns, 2000) caracterizada por disminución en la identificación y detección de olores (Doty y Snow, 1988), y severo daño en el bulbo olfatorio y en la corteza olfatoria de pacientes con enfermedad de Alzheimer en zonas como el núcleo olfatorio anterior y uncus los cuales reciben aferencias del bulbo olfatorio, en contraste con pequeñas alteraciones en áreas corticales sensorimotoras y visuales, por lo que se ha sugerido que el daño inicial en dicha enfermedad es en la vía olfatoria (Kovacs y cols., 1998; Struble y Clark, 1992; Pearson y cols., 1985)

Ahora bien, considerando que las células de la mucosa nasal se alteran por la exposición a O_3 consideramos que es probable que en un modelo de estrés oxidativo inducido por la exposición aguda a ozono existan alteraciones en la morfología de la mucosa olfatoria y del bulbo olfatorio debido a la estrecha relación que existe entre los axones de los receptores olfatorios y las dendritas de las células del bulbo olfatorio, que son las que reciben junto con la mucosa nasal, las concentraciones más altas de este gas.

1.5 MUCOSA OLFATORIA

La mucosa olfatoria es una placa de tejido especializado que se encuentra en la parte posterosuperior de la cavidad nasal, está formada por un epitelio pseudoestratificado y una lámina propia. El epitelio está formado por tres tipos de células: 1) de sustentación, 2) olfatorias ó sensoriales y 3) basales (Shipley y cols., 1995).

Las células de sustentación son células cilíndricas, proporcionan sostén físico a las células olfatorias y están dispuestas perpendiculares a la superficie. En la porción basal son más estrechas que en las partes superficiales las cuales se encuentran formando complejos de unión con las regiones en que se ubican las vesículas olfatorias y su superficie está cubierta de cilios, presentan núcleos ovales



y están inmediatamente por encima de la mitad de la membrana epitelial dispuestos paralelamente a la superficie. Profundamente a los núcleos, el citoplasma se estrecha y se extiende hasta la membrana basal, y en la porción apical presenta gránulos de secreción con un pigmento característico de la mucosa olfatoria. (Shibley y cols , 1995; Gartner e Hiatt, 1997).

Las células basales son de forma triangular, basófilas y están dispuestas irregularmente a lo largo de la capa más profunda del epitelio, su porción apical no alcanza la superficie del epitelio. Sus núcleos son más oscuros que los de las células sustentaculares, de ubicación central. Estas células tienen gran capacidad de proliferación.

Las células sensoriales ó receptores olfatorios, se encuentran perpendiculares a la superficie, con los somas dispuestos entre las células de sustentación, sus núcleos son esféricos y se encuentran por debajo de la zona de núcleos de las células de sustentación formando una zona de núcleos esféricos (Shibley y cols., 1995).

Los receptores olfatorios son neuronas bipolares, por lo tanto tienen dos prolongaciones , una periférica y gruesa que pasa a la superficie (dendrita), se modifica para formar la vesícula olfatoria, que se proyecta entre las células de sustentación. En la porción basal los receptores olfatorios proyectan la otra prolongación delgada que corresponde a su axón amielínico, el cual se proyecta a través de la lámina propia, esta prologacion converge para formar pequeños fascículos y forman el nervio olfatorio, dichas fibras pasan desde la cavidad nasal a través de los orificios de la lámina cribosa del etmoides y penetran en la cara ventral del bulbo olfatorio (Shibley y cols., 1995)(Fig. 6).

La lámina propia esta formada por tejido conectivo laxo irregular muy vascularizado y está adherido al periostio, presenta elementos linfoides axones de los receptores olfatorios y las glándulas de Bowman las cuales producen un material seroso (Fig 6).

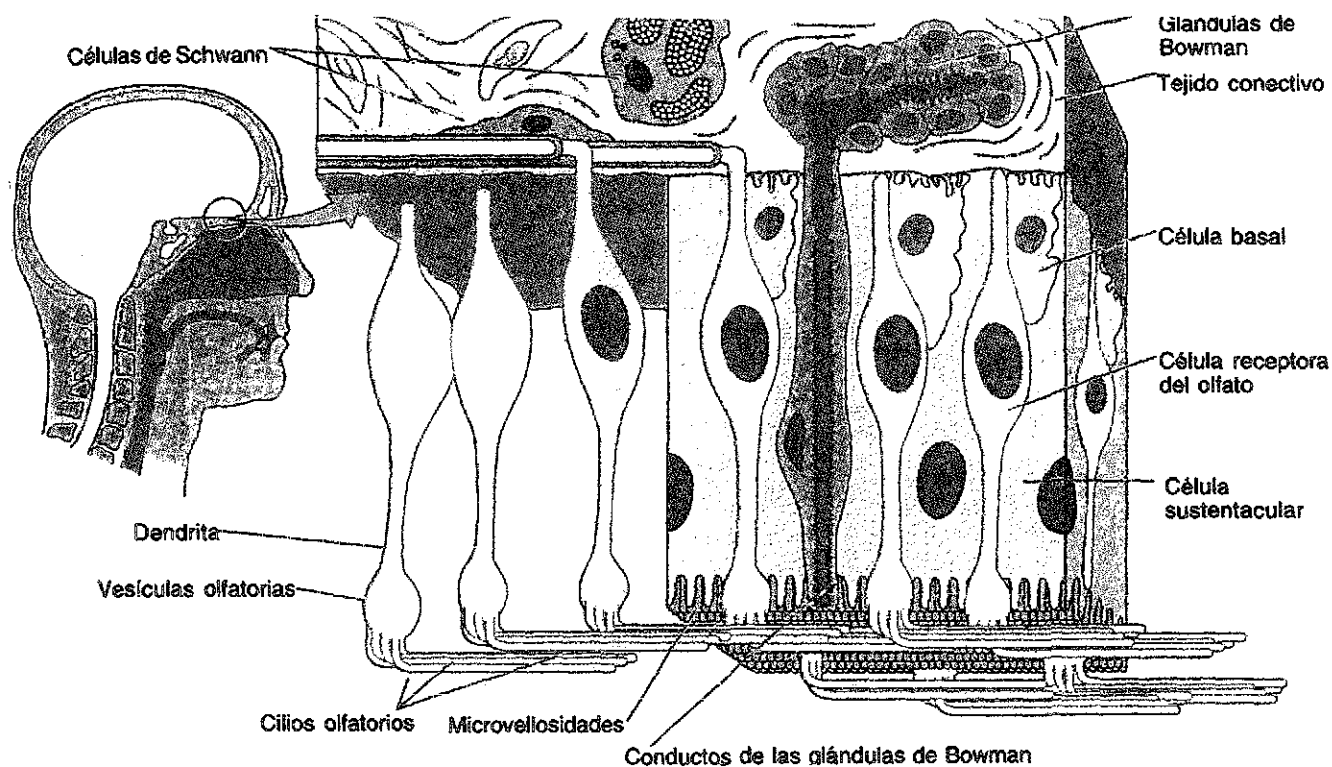


Fig. 6 Esquema de la mucosa olfatoria, en el que se aprecia la lámina propia constituida por tejido conectivo laxo irregular que aloja glándulas de Bowman y axones de los receptores olfatorios. El epitelio olfatorio está constituido por las cels. basales, olfatorias y sustentaculares (Gartner, 1997).

TEMAS CON
FALLA DE ORIGEN

1.6 BULBO OLFATORIO

Los bulbos olfatorios son los núcleos terminales del nervio olfatorio. Estos tienen una organización laminar la cual esta constituida por las siguientes capas: 1) nerviosa superficial, 2) glomerular, 3) plexiforme externa, 4) capa de células mitrales, 5) plexiforme interna y 6) granular (Shepherd, 1995).

1.6.1 Capa Nerviosa Superficial

Es la capa más superficial del bulbo olfatorio y contiene axones amielínicos extremadamente delgados (0.1-0.3 μm de diámetro) de las neuronas olfatorias primarias, que establecen sinapsis con las terminales en cepillo de las dendritas de las células mitrales que descienden verticalmente para formar los glomérulos olfatorios.

1.6.2 Capa Glomerular

Está constituida por los glomérulos, estructuras generalmente ovoides de 80-160 μm de diámetro, la parte interna de los glómerulos esta compuesta de neuropilo formado por axones olfatorios, dendritas de las células mitrales y neuritas de las neuronas yuxtglomerulares, rodeados de una delgada lámina glial. Las neuronas yuxtglomerulares se han clasificado en: células periglomerulares, células en penacho y células de axón corto.

Las células periglomerulares son pequeñas (5-8 μm) se localizan en la periferia de los glomerulos y proyectan sus dendritas espinosas y su axón hacia el interior de los glomerulos. Los somas de las células de axón corto miden de 8-12 μm y sus dendritas cursan a lo largo de las células periglomerulares, y las células en penacho miden 10-15 μm ; proyectan una dendrita apical que se ramifica a un glomerulo y dos o tres dendritas apicales se ramifican hacia varios glomerulos.

Estudios previos revelan que las dendritas primarias de las células mitrales y de las células en penacho realizan contactos asimétricos con las células receptoras olfatorias en el glomérulo y con las células periglomerulares y con las células granulosas (Pinching y cols., 1971).

1.6.3 Capa Plexiforme Externa

Esta capa presenta poca densidad celular y neuropilo denso, las neuronas principales son las de penacho externas, medias y profundas las cuales presentan incremento de tamaño a mayor profundidad, y presentan dos ó tres dendritas apicales que proyectan a diferentes glomérulos, las

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

dendritas secundarias se disponen tangencialmente a la capa plexiforme externa y realizan sinápsis recíprocas con las dendritas apicales de las neuronas granulosas.

Los axones de las células de penacho externas proyectan a diversos sitios del bulbo olfatorio, y las células en penacho de las capas media y profunda envían colaterales locales en el bulbo ipsilateral y algunos proyectan al bulbo olfatorio anterior. Las colaterales intrabulbares de las células en penacho superficiales están altamente organizadas formando el sistema de asociación intrabulbar, estos axones proyectan a través de la capa plexiforme externa, capa de las células mitrales y capa plexiforme interna formando un denso tracto que viaja por esta última capa hacia el lado opuesto del bulbo ipsilateral.

1.6.4 Capa de Células Mitrales

Por debajo de la capa plexiforme externa se encuentra la monocapa de células mitrales de 25-35 μm de diámetro, son las principales neuronas eferentes del bulbo olfatorio, presentan una dendrita apical que proyecta a un glomérulo donde se ramifica y realiza contacto sináptico con los axones del nervio olfatorio, las dendritas secundarias son paralelas a la superficie del bulbo olfatorio y realizan sinapsis dendrodendríticas con dendritas de las células granulosas (Fig 7).

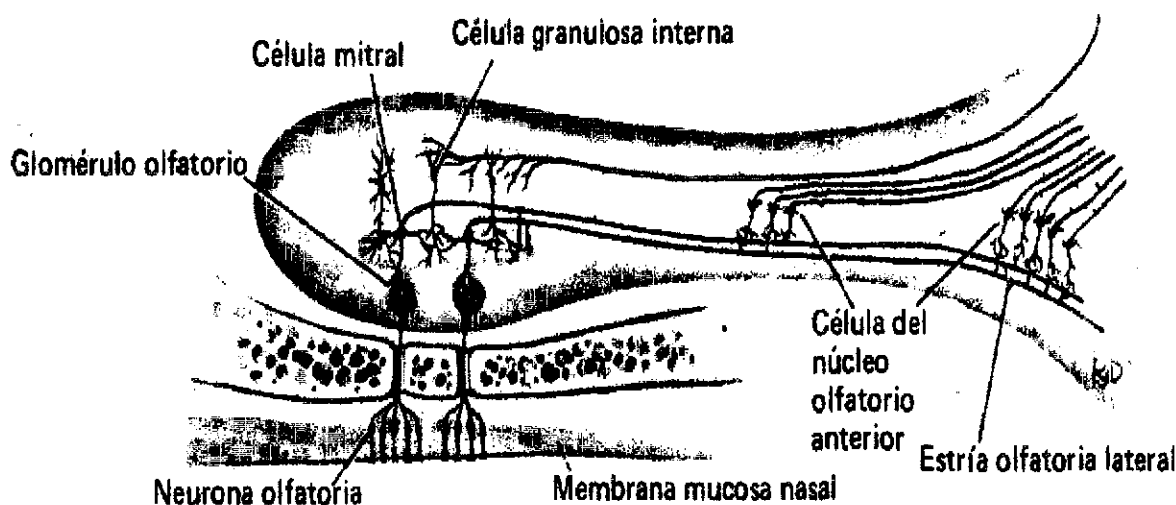


Fig. 7 Dibujo que muestra la relación de los receptores olfatorios con las neuronas del bulbo olfatorio (Modificado de Carpenter y Sutin, 1990).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

1.6.5 *Capa Plexiforme Interna*

Como la capa plexiforme externa, esta capa se caracteriza por presentar poca densidad celular y gran cantidad de axones y dendritas. Estudios realizados con la técnica de Golgi indican que la capa plexiforme interna presenta axones de células mitrales, en penacho y dendritas de células granulares, algunos axones se originan en el núcleo del rafe y del locus coeruleus (McLean y cols., 1989).

1.6.6 *Capa de Células Granulosas*

Esta capa es la más profunda del bulbo olfatorio, las células granulares se encuentran en todo el bulbo olfatorio, pero adquieren una mayor densidad en la parte central, donde forman la capa granular. Estas células son pequeñas (8-10 μ m de diámetro) las cuales pueden formar agregados celulares acoplados por uniones estrechas. No tienen axones y sus dendritas poseen espinas que establecen sinapsis dendrodendríticas con las células mitrales. El soma es esférico, con núcleo ovoide oscuro y puede tener pequeñas indentaciones y presenta cúmulos de cromatina en la periferia. El citoplasma escaso contiene ribosomas libres que forman rosetas, mitocondrias, aparato de Golgi, neurotubulos y retículo endoplásmico rugoso escaso. Las dendritas basales se ramifican en la capa granulosa y las dendritas apicales se ramifican y se proyectan a la capa plexiforme externa.

En cuanto a la organización sináptica las dendritas de las células granulosas realizan contactos inhibitorios con las dendritas secundarias de las células mitrales y con las células en penacho, a su vez estas últimas realizan contacto excitatorio con las células granulosas. Por otra parte, se ha descrito ampliamente un mecanismo de inhibición lateral recurrente dendrodendrítica, entre las células mitrales y las células granulosas (Shepherd G.M., 1995) (Fig. 8), se ha reportado la participación de estos circuitos de retroalimentación local, en la generación de ondas lentas durante la estimulación olfatoria, además estas ondas pueden sincronizarse por la estimulación del tracto olfatorio lateral (Scott y Aaron, 1977), lo cual indica que el grado de activación de dichos circuitos se incrementa cuando el estímulo olfatorio es mayor.

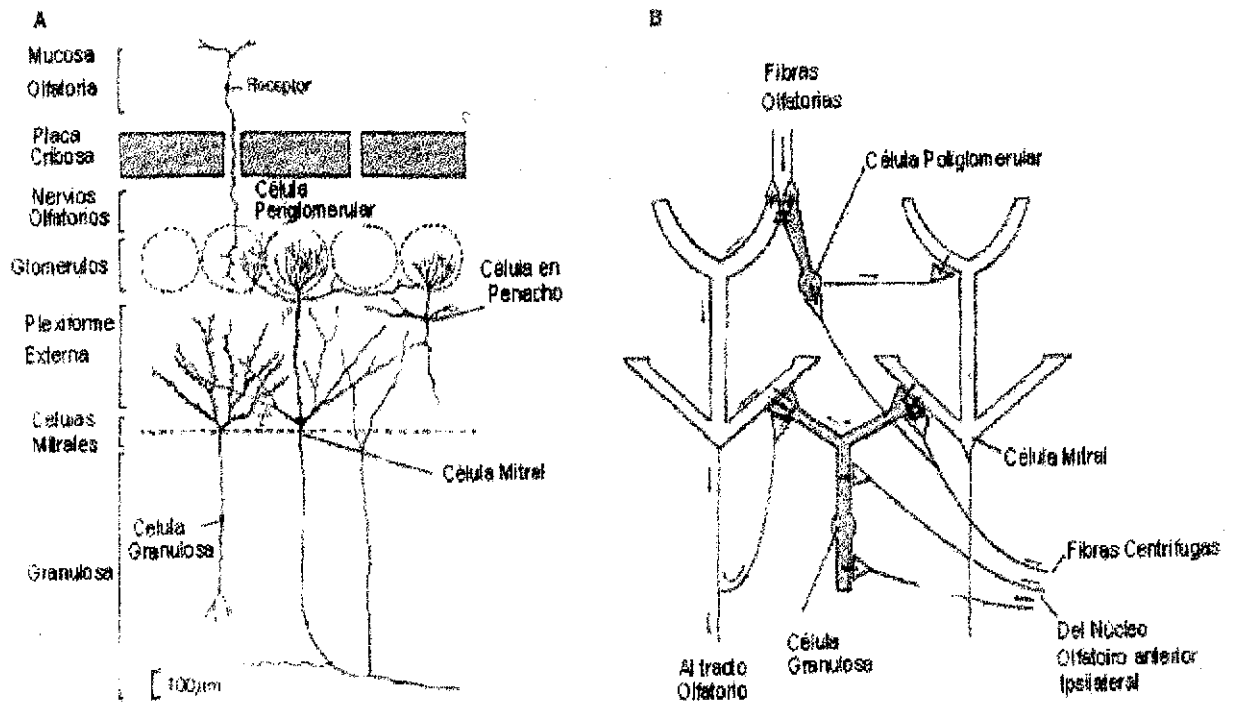


Fig. 8 A) Esquema de las capas del bulbo olfatorio: Capa-nervio olfatorio, glomerular, capa plexiforme externa, capa de células mitrales y capa granulosa. B Organización sináptica de las principales neuronas del bulbo olfatorio. Cél. periglomerular, Cél mitral y Cél granulosa. (Kandel y cols, 1995).

Con base en esta información y tomando en cuenta que la mucosa nasal es el primer sitio expuesto al ozono del cual se han reportado importantes cambios morfológicos en las células epiteliales de la mucosa respiratoria, como hiperplasia y metaplasia con un alto nivel de replicación de DNA (Hotchkiss y cols., 1991; Johnson y cols., 1990), nuestro interés radicó en estudiar el efecto de la exposición a dicho gas sobre la mucosa olfatoria y sobre las neuronas granulosas las cuales presentan una organización sináptica importante debido a los circuitos de retroalimentación local y a los contactos realizados con diferentes células del bulbo olfatorio, principalmente con las células mitrales que reciben aferencias directas del nervio olfatorio lo cual implica una zona importante de integración olfatoria.

JUSTIFICACIÓN

Con los antecedentes de estudios previos sobre las enfermedades neurodegenerativas que cursan con un estado de estrés oxidativo así como en modelos experimentales, en los cuales se presentan alteraciones funcionales y morfológicas en el sistema olfatorio, surge la necesidad de plantear si el estrés oxidativo generado por la exposición aguda a ozono se producen alteraciones en la mucosa y bulbo olfatorios de rata; afectados directamente por la vía directa en el proceso de inhalación de dicho gas, e indirectamente por los radicales libres que no fueron compensados por el pulmón y llegan por el torrente sanguíneo.

Con lo anteriormente expuesto se plantean la siguiente hipótesis y los objetivos:

HIPÓTESIS

Si el estado de estrés oxidativo generado por la exposición aguda a O₃ produce alteraciones en el SNC, en la mucosa respiratoria y en la vías aéreas superiores, la exposición a dicho gas podría inducir alteraciones del epitelio olfatorio y de las neuronas granulosas del bulbo olfatorio de ratas

OBJETIVO GENERAL

Estudiar el efecto del estrés oxidativo como consecuencia de la exposición aguda a ozono sobre la morfología de la mucosa olfatoria y de las neuronas granulosas del bulbo olfatorio de ratas

OBJETIVOS ESPECIFICOS

- 1.- Analizar las alteraciones morfológicas de la mucosa olfatoria y de las neuronas granulosas de bulbo olfatorio de ratas expuestas a ozono.
- 2.- Cuantificar la densidad espinosa de las dendritas de las células granulosas de bulbo olfatorio de ratas después de la exposición a ozono.
- 3.- Realizar un análisis de las alteraciones ultraestructurales de la capa granulosa de bulbo olfatorio de ratas expuestas a ozono.

JUSTIFICACIÓN

Con los antecedentes de estudios previos sobre las enfermedades neurodegenerativas que cursan con un estado de estrés oxidativo así como en modelos experimentales, en los cuales se presentan alteraciones funcionales y morfológicas en el sistema olfatorio, surge la necesidad de plantear si el estrés oxidativo generado por la exposición aguda a ozono se producen alteraciones en la mucosa y bulbo olfatorios de rata; afectados directamente por la vía directa en el proceso de inhalación de dicho gas, e indirectamente por los radicales libres que no fueron compensados por el pulmón y llegan por el torrente sanguíneo.

Con lo anteriormente expuesto se plantean la siguiente hipótesis y los objetivos:

HIPÓTESIS

Si el estado de estrés oxidativo generado por la exposición aguda a O₃ produce alteraciones en el SNC, en la mucosa respiratoria y en la vías aéreas superiores, la exposición a dicho gas podría inducir alteraciones del epitelio olfatorio y de las neuronas granulosas del bulbo olfatorio de ratas

OBJETIVO GENERAL

Estudiar el efecto del estrés oxidativo como consecuencia de la exposición aguda a ozono sobre la morfología de la mucosa olfatoria y de las neuronas granulosas del bulbo olfatorio de ratas

OBJETIVOS ESPECIFICOS

- 1.- Analizar las alteraciones morfológicas de la mucosa olfatoria y de las neuronas granulosas de bulbo olfatorio de ratas expuestas a ozono.
- 2.- Cuantificar la densidad espinosa de las dendritas de las células granulosas de bulbo olfatorio de ratas después de la exposición a ozono.
- 3.- Realizar un análisis de las alteraciones ultraestructurales de la capa granulosa de bulbo olfatorio de ratas expuestas a ozono.

JUSTIFICACIÓN

Con los antecedentes de estudios previos sobre las enfermedades neurodegenerativas que cursan con un estado de estrés oxidativo así como en modelos experimentales, en los cuales se presentan alteraciones funcionales y morfológicas en el sistema olfatorio, surge la necesidad de plantear si el estrés oxidativo generado por la exposición aguda a ozono se producen alteraciones en la mucosa y bulbo olfatorios de rata; afectados directamente por la vía directa en el proceso de inhalación de dicho gas, e indirectamente por los radicales libres que no fueron compensados por el pulmón y llegan por el torrente sanguíneo.

Con lo anteriormente expuesto se plantean la siguiente hipótesis y los objetivos:

HIPÓTESIS

Si el estado de estrés oxidativo generado por la exposición aguda a O₃ produce alteraciones en el SNC, en la mucosa respiratoria y en la vías aéreas superiores, la exposición a dicho gas podría inducir alteraciones del epitelio olfatorio y de las neuronas granulosas del bulbo olfatorio de ratas

OBJETIVO GENERAL

Estudiar el efecto del estrés oxidativo como consecuencia de la exposición aguda a ozono sobre la morfología de la mucosa olfatoria y de las neuronas granulosas del bulbo olfatorio de ratas

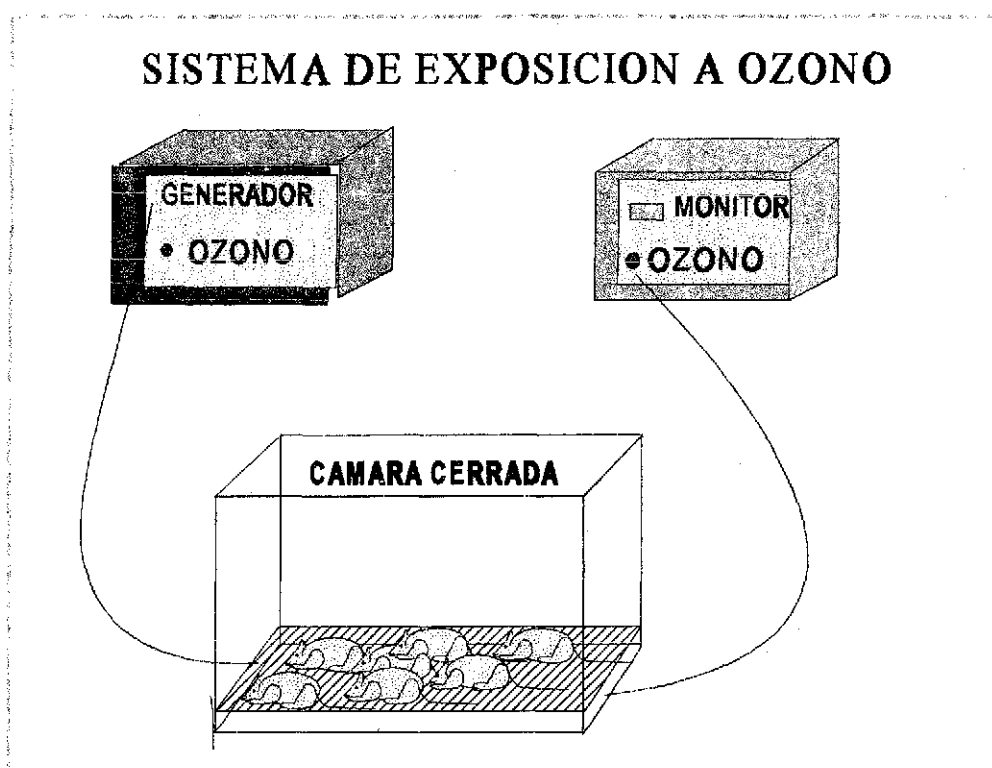
OBJETIVOS ESPECIFICOS

- 1.- Analizar las alteraciones morfológicas de la mucosa olfatoria y de las neuronas granulosas de bulbo olfatorio de ratas expuestas a ozono.
- 2.- Cuantificar la densidad espinosa de las dendritas de las células granulosas de bulbo olfatorio de ratas después de la exposición a ozono.
- 3.- Realizar un análisis de las alteraciones ultraestructurales de la capa granulosa de bulbo olfatorio de ratas expuestas a ozono.

MÉTODO

Se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar con un peso de 250 g con libre acceso a agua y comida en un cuarto limpio de contaminantes.

Exposición a ozono: Las ratas fueron expuestas a 1-1.5 ppm de O_3 durante 4 horas, (n=5 por cada grupo), en una cámara de acrílico con dimensiones de 56 cm. de ancho x 60 cm de largo y 35 cm. de alto herméticamente cerrada, conectada a un generador de ozono, el cual consistió de un tubo de vidrio con trozos de aluminio y dos electrodos a los que se les paso una corriente de oxígeno a un alto voltaje, y el oxígeno que circulo a través del tubo fué convertido a ozono. Los niveles de la producción de ozono fueron proporcionales a la intensidad de corriente y al flujo de aire. Durante la exposición se cuantificó la concentración de ozono en un monitor PCI & Control System Ozone Monitor aprobado por la EPA.



Diseño Experimental: Los animales para su estudio se dividieron en 2 grupos: 1) grupo expuesto a ozono, 2) grupo control expuesto a aire filtrado.

El grupo experimental se dividió en 5 subgrupos y fueron sacrificados a 2 h, 24 h, 5 días, 10 días y 15 días después de la exposición a ozono y el grupo control se sacrificó a las 2 h.

Para la obtención de los bulbos olfatorios, los animales se anestesiaron (dosis letal) con pentobarbital sódico y se perfundieron por vía aórtica con solución salina al 0.9 %, seguida del fijador (2% de paraformaldehído y 2% de glutaraldehído en solución amortiguadora de fosfatos 0.1M pH 7.4). Posteriormente se obtuvieron los bulbos olfatorios derecho e izquierdo alternadamente, y se procesaron con la técnica de Golgi y con la técnica de microscopía electrónica de transmisión.

Después de la extracción de los bulbos olfatorios, las muestras de la mucosa olfatoria adyacente a la placa cribosa se mantuvieron 12 h a 4° C en la solución fijadora, posteriormente se procedió a disecar las mucosas olfatorias desprendiéndolas de la superficie de la placa cribosa con una microespátula de madera, y se procesaron con la técnica de microscopía electrónica de transmisión, para realizar cortes semifinos.

Técnica de Golgi

La técnica de Golgi consistió en mantener los bulbos olfatorios durante 7 días postfijación, en la solución ósmico dicrómica (1g de tetraóxido de osmio y 8 g de dicromato de potasio disueltos en 300 ml de agua destilada), posteriormente los fragmentos se lavaron con agua destilada y se mantuvieron 24 h en una solución acuosa de nitrato de plata al 0.75 % y se realizaron cortes de 90 mm de espesor, los cuales se deshidrataron, aclararon con eugenol y xilol para finalmente montarlos con resina sintética para su observación.

El estudio citológico se realizó directamente en un microscopio óptico, utilizando una reglilla montada en el lente ocular. El análisis consistió en caracterizar la morfología de la población neuronal granulosa de los bulbos olfatorios de todos los grupos, se realizaron mediciones del eje menor y mayor del cuerpo neuronal y se cuantificó el número de espinas dendríticas en 20 mm de longitud, a partir de la bifurcación de las dendritas secundarias.

Técnica de Microscopía Electrónica de Transmisión

Las muestras de bulbo y mucosa olfatoria después de la fijación se lavaron con una solución amortiguadora de fosfatos 0.1M pH 7.4, y fueron postfijadas durante 1.30 h con tetraóxido de osmio al 1% preparado con cacodilato de sodio; posteriormente los fragmentos se lavaron con una solución amortiguadora de fosfatos en tres cambios de 10 minutos cada uno. Posteriormente se deshidrató el tejido con alcoholes en concentraciones crecientes (del 50% al 96%) durante 10 minutos cada uno y finalmente tres cambios de alcohol al 100% durante 10 minutos. Posteriormente el tejido fué colocado en tolueno durante dos períodos de 10 minutos cada uno. Los fragmentos se infiltraron en una mezcla de resina 1:1 araldita-tolueno a 60°C. Se mantuvieron por 12 horas en una mezcla 3:1 de araldita-tolueno a temperatura ambiente. Los fragmentos ya infiltrados se incluyeron en araldita pura a 60°C durante 24 horas.

Se realizaron los cortes semifinos de 300 nm de las mucosas y de los bulbos olfatorios, en un ultramicrotomo Reichert-Jung utilizando cuchillas de vidrio. Los cortes se montaron en portaobjetos y se tiñieron con una solución acuosa de azul de toluidina al 1 %.

Los cortes se observaron en un microscopio Zeiss y se llevó a cabo el análisis morfológico de las mucosas, el cual consistió por una parte, en medir el espesor del epitelio de la mucosa olfatoria y por otra, evaluar el daño del epitelio y de la porción glandular, realizando un análisis semicuantitativo tomando mayor daño con el valor de 3, regular 2, menor como 1 y 0 sin daño (n= 10 por rata). en las mucosas y bulbos olfatorios.

Para el estudio ultraestructural los cortes finos de 90 nm de los bulbos olfatorios, se realizaron en un ultramicrotomo Reichert-Jung, montándolos en rejillas de cobre y fueron contrastados con acetato de uranilo al 5 % durante 20 min y con citrato de plomo al 0.4 % por 5 min.

El estudio ultraestructural se realizó en un microscopio Zeiss EM 10 directamente en la pantalla del microscopio, el cual consistió en determinar el porcentaje de daño neuronal de una población de 100 neuronas granulosas de los bulbos olfatorios de cada rata (control y experimental). Los parámetros de daño neuronal, que se tomaron en cuenta fueron: la presencia de vacuolas, alteración mitocondrial (edema y/o pérdida de crestas) y/o presencia de gránulos de lipofucsina.

Para el análisis estadístico del estudio citológico se utilizó la prueba de t de Student para muestras apareadas y la prueba de Wilcoxon para el estudio ultraestructural.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

RESULTADOS

Los resultados del presente trabajo revelaron alteraciones morfológicas en la mucosa y en el bulbo olfatorio de ratas expuestas a ozono, y sacrificadas en los diferentes tiempos mencionados.

Mucosa Olfatoria

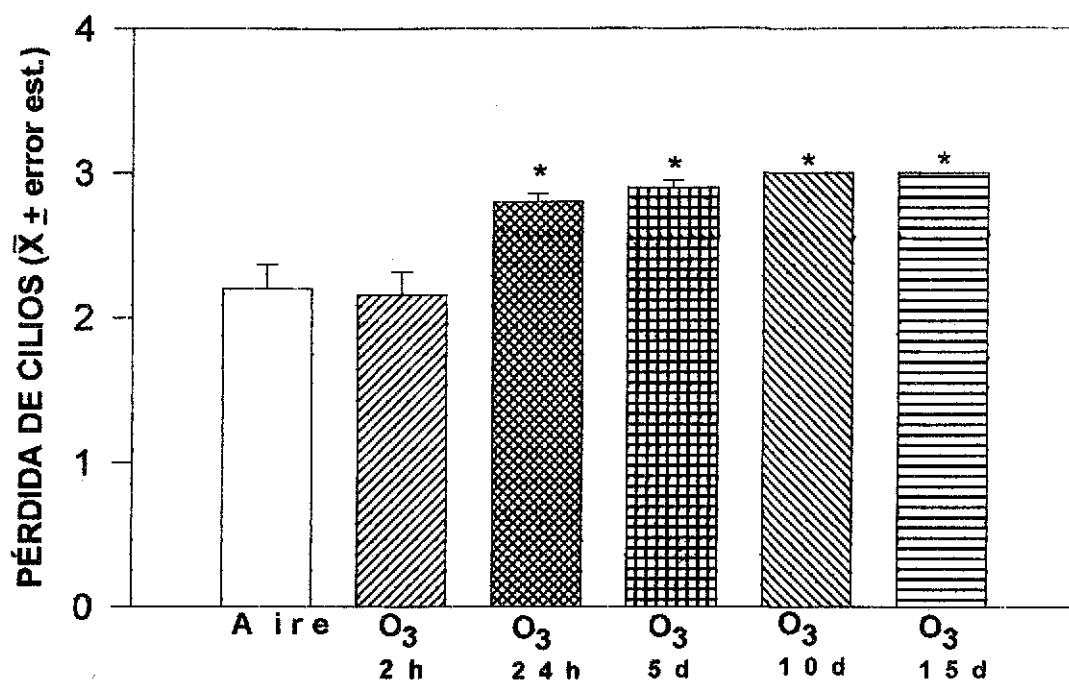
El análisis citológico de las mucosas de los animales control mostró características normales como lo descrito anteriormente, epitelio olfatorio pseudoestratificado con cilios, lámina propia de tejido conectivo fibroelástico con las porciones secretoras de las glándulas de Bowman.

En contraste con el grupo control, las mucosas de los grupos expuestos a ozono, mostraron evidentes daños citotóxicos, como vacuolización de las glándulas de Bowman, pérdida parcial de cilios del epitelio y células picnóticas en el estrato basal del epitelio olfatorio, alteraciones que se evaluaron realizando un análisis semicuantitativo tomando mayor daño con el valor de 3, regular 2, menor como 1 y 0 sin daño (n= 10 por rata).

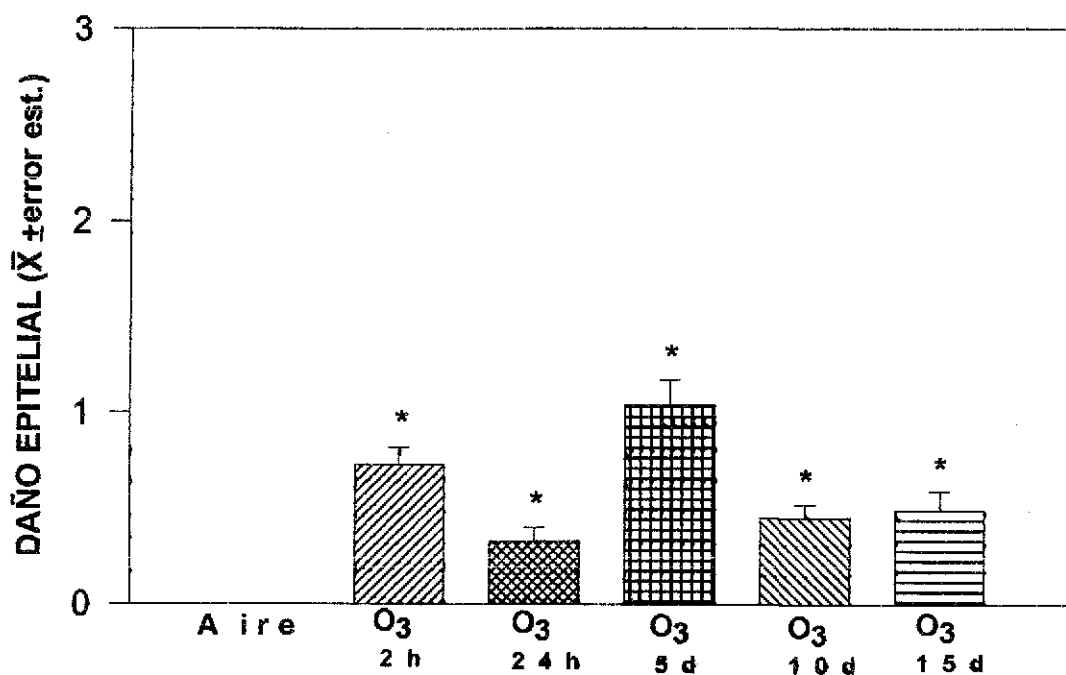
En cuanto a la presencia de cilios se observó que el grupo control (Fig 9 A) y el expuesto a ozono y sacrificado después de 2h presentaron valores similares que el grupo control, mientras que los grupos de 24 h, 5, 10 y 15 días mostrarán significativa pérdida de cilios comparada con los controles $p < 0.05$ (Gráfica 1).

El epitelio pseudoestratificado de las mucosas del grupo control se observó normal (Fig 9 A), mientras que los grupos de 2 h y 5 días mostraron mayor daño significativo (presencia de células picnóticas) comparado con los grupos de 24 h, 10 y 15 días (Fig 9 B), estos últimos grupos presentaron un daño menor, pero significativo comparado con el grupo control $p < 0.05$ (Gráfica 2).

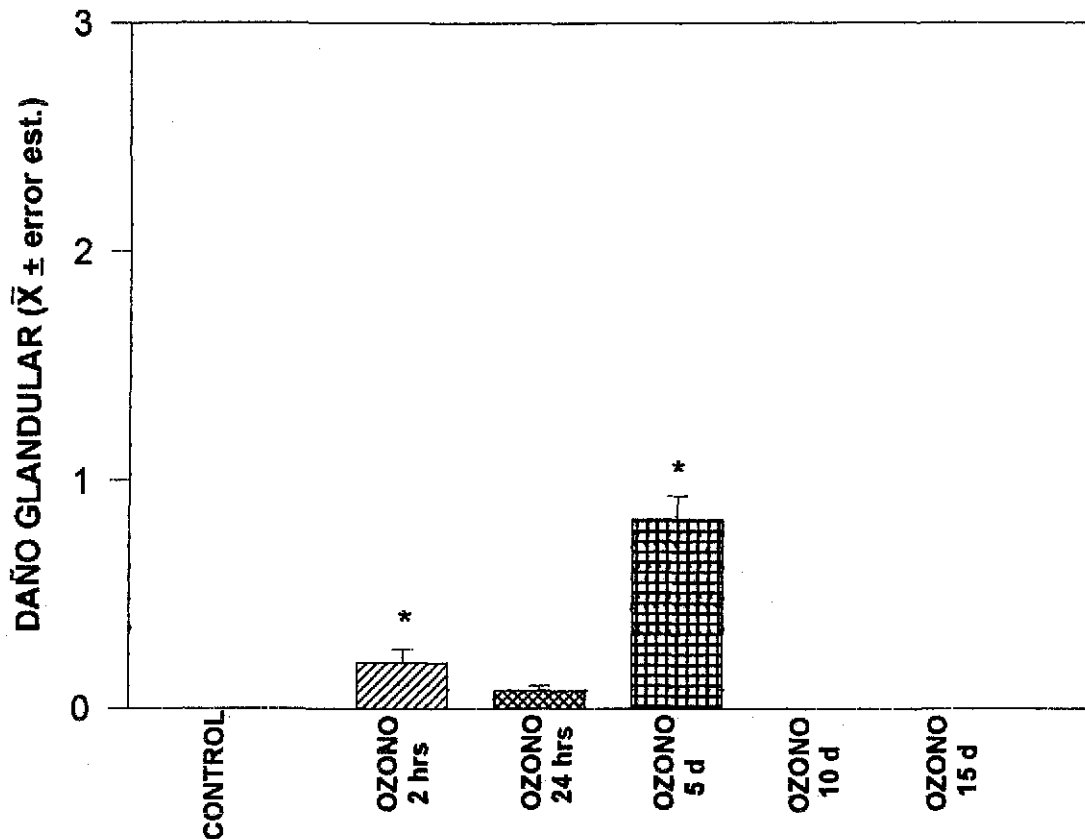
Las glándulas de Bowman del grupo control (Fig 9 C) y de los grupos expuestos y sacrificados a los 10 y 15 días no mostraron alteraciones, en contraste con los grupos de 2 h (Fig 9D) y 5 días los cuales presentaron daño significativo comparado con los controles $p < 0.05$ (Gráfica 3).



Gráfica 1. Pérdida de cilios del epitelio olfatorio de ratas control, expuestas a ozono y sacrificadas a diferentes tiempos * = $p < 0.05$. Los valores corresponden a las medias \pm error est. del grado de mayor (3) y menor pérdida (1) de cilios.



Gráfica 2. Daño del epitelio olfatorio de ratas expuestas a ozono y sacrificadas a diferentes tiempos * = $p < 0.05$. Los valores corresponden a las medias \pm error est. al grado de daño epitelial.



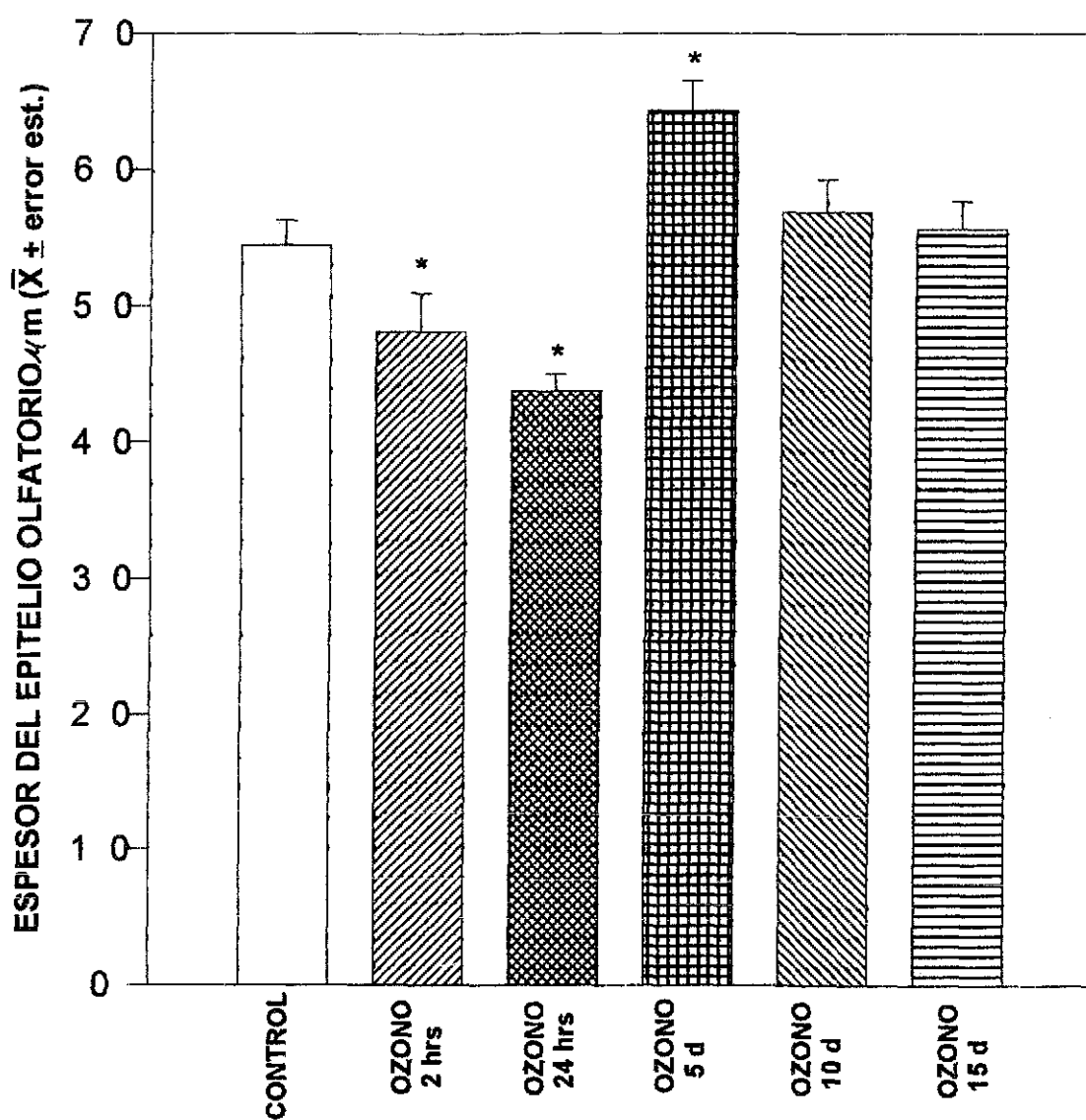
Gráfica 3. Daño en las glándulas de Bowman de ratas expuestas a ozono sacrificadas a diferentes tiempos y comparados con el grupo control (medias \pm error est. del grado de daño glandular).

* = $p < 0.05$.

Por otra parte se realizaron 10 mediciones del espesor del epitelio mencionado de cada rata de los grupos control y expuestos a ozono. Los grupos expuestos a ozono y sacrificados a las 2 h y 24 h presentaron disminución del espesor epitelial significativamente inferior que el grupo control ($p < 0.01$), mientras que el grupo de 5 días mostró aumento estadísticamente significativo comparado con el grupo control ($p < 0.01$) (Tabla 1 y Gráfica 4). En los grupos expuestos a ozono y sacrificados a 10 y 15 días después, se apreció también daño citotóxico como el descrito anteriormente, pero en menor grado y el espesor del epitelio fué muy similar al del grupo control $p = 0.36$ y $p = 0.67$ respectivamente (Tabla 1)

Tabla 1. Media del espesor del epitelio olfatorio (μm) \pm error est.

CONTROL	O ₃ 2 h	O ₃ 24 h	O ₃ 5 d	O ₃ 10 d	O ₃ 15 d
54.44 \pm 1.8	48.14 \pm 2.8	43.68 \pm 1.3	64.33 \pm 2.2	56.8 \pm 2.4	55.6 \pm 2.0



Gráfica 4. Efecto de la exposición aguda a ozono (a diferentes tiempos de sacrificio), sobre el espesor del epitelio olfatorio (μm), comparados con el grupo control. * $p < 0.02$. Los valores corresponden a las medias \pm error est.

Bulbo Olfatorio

Estudio Citológico

El análisis citológico del bulbo olfatorio consistió en realizar mediciones del eje menor y mayor de 165 neuronas granulosas de la capa interna del bulbo olfatorio por cada subgrupo (Fig.10 y 11), como se puede observar en la Tabla 2 y Gráfica 5, los valores de las dimensiones de dicha población neuronal son similares en los grupos control y experimentales (Fig 12 y 13) a excepción del subgrupo expuesto a ozono y sacrificado 5 días después de la exposición, el cual mostró aumento significativo del eje menor de las células granulosas.

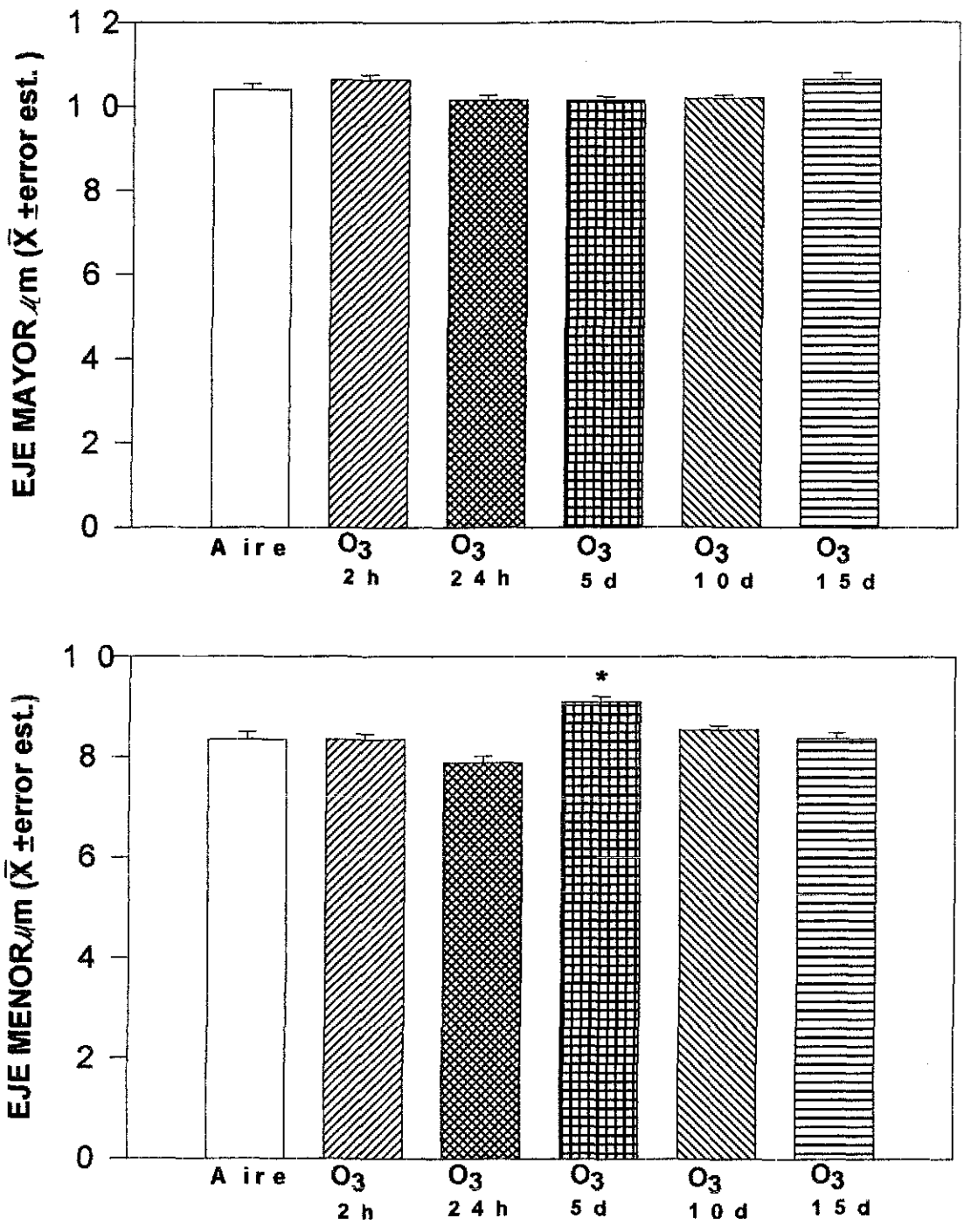
Tabla 2. Medias de las dimensiones del soma (μm) de las neuronas granulosas (\pm error est.)

Soma	Control	O ₃ 2 h	O ₃ 24 h	O ₃ 5 d	O ₃ 10 d	O ₃ 15 d
Eje mayor	10.4 \pm 0.15	10.6 \pm 0.12	10.2 \pm 0.12	10.4 \pm 0.10	10.2 \pm 0.08	10.6 \pm 0.14
Eje menor	8.4 \pm 0.15	8.4 \pm 0.11	7.9 \pm 0.13	9.1 \pm 0.11	8.5 \pm 0.09	8.4 \pm 0.12

Por otra parte se cuantificó el número de espinas dendríticas en 20 μm de 495 dendritas secundarias de 165 neuronas granulosas de los bulbos olfatorios, de 5 ratas de cada subgrupo. Se observó en los 5 subgrupos de animales expuestos a ozono un decremento en la densidad espinosa siendo más notable a los 5 días (Fig 14), sin embargo el subgrupo sacrificado a los 10 días (Fig 15) presentó mayor número de espinas dendríticas que los subgrupos de 2h, 24h y 5 días, y el subgrupo de 15 días mostró valores muy similares al del grupo control, aunque significamente diferentes ($p < 0.01$) (Tabla 3 y Gráfica 6).

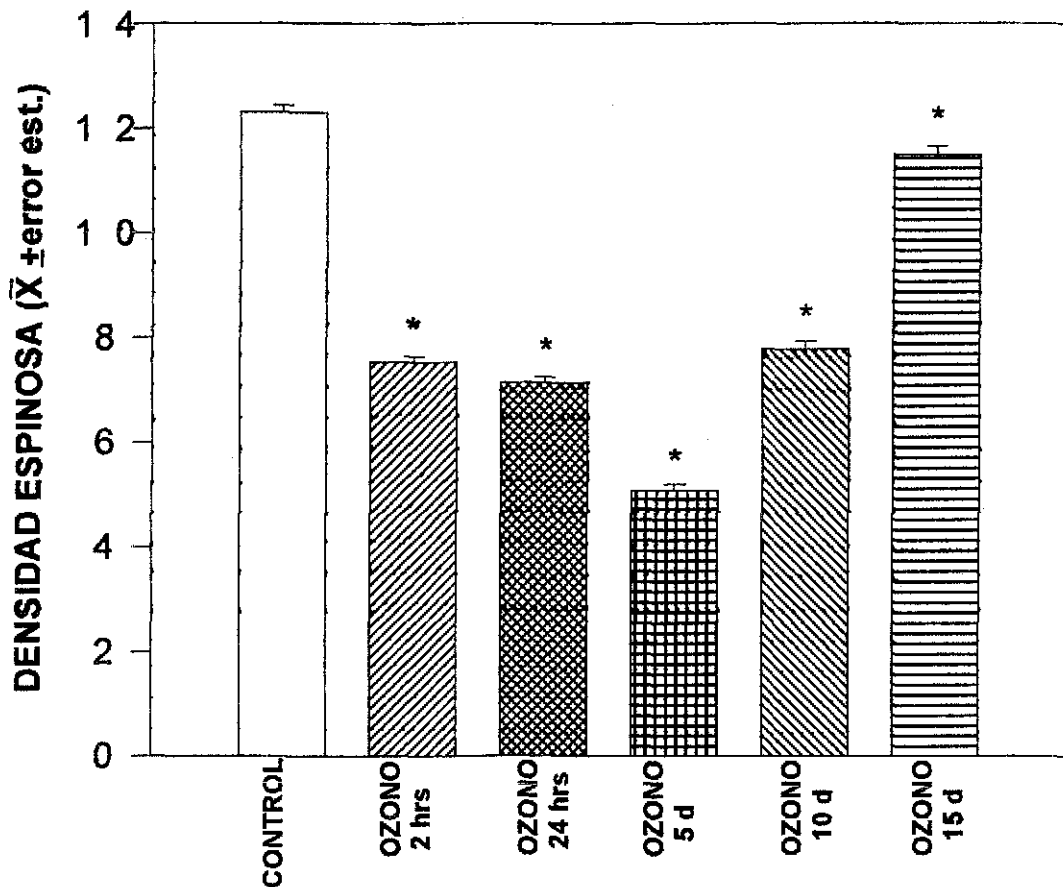
Tabla 3. Medias del número de espinas en 20 μm de dendritas secundarias (\pm error est.)

CONTROL	O ₃ 2h	O ₃ 24h	O ₃ 5 d	O ₃ 10 d	O ₃ 15 d
12.36 \pm 0.13	7.53 \pm 0.11	7.15 \pm 0.10	5.09 \pm 0.12	7.78 \pm 0.14	11.51 \pm 0.16



Gráfica 5. Dimensiones del soma de las neuronas granulosas del bulbo olfatorio de ratas control, expuestas a ozono y sacrificadas a diferentes tiempos, los valores están representados por las medias de los ejes mayor y menor (μm) ± error est. * = p < 0.001.

TESIS CON FALLA DE ORIGEN



Gráfica 6. Efecto de la exposición aguda a ozono sobre la densidad espinosa en dendritas secundarias de neuronas granulosas de ratas expuestas a ozono comparadas con los controles. Los valores corresponden a la media \pm error est. del número de espinas en 20 μm . * = $p < 0.05$

Estudio Ultraestructural

La ultraestructura de las células granulosas de los bulbos olfatorios de los animales control, (Fig. 16) mostraron características como presencia de un gran núcleo con cromatina densa, el citoplasma escaso presentó mitocondrias, retículo endoplásmico escaso, aparato de Golgi y ribosomas libres o dispuestos en rosetas.

A diferencia del grupo control, los animales expuestos a ozono de todos los subgrupos mostraron cambios ultraestructurales de la capa granulosa (Fig. 17); como discontinuidad de las vainas de mielina, presencia de vacuolas en el axoplasma de algunos axones y dendritas, presencia de gránulos de lipofucsina en el neuropilo y edema de algunas mitocondrias con alteración de la

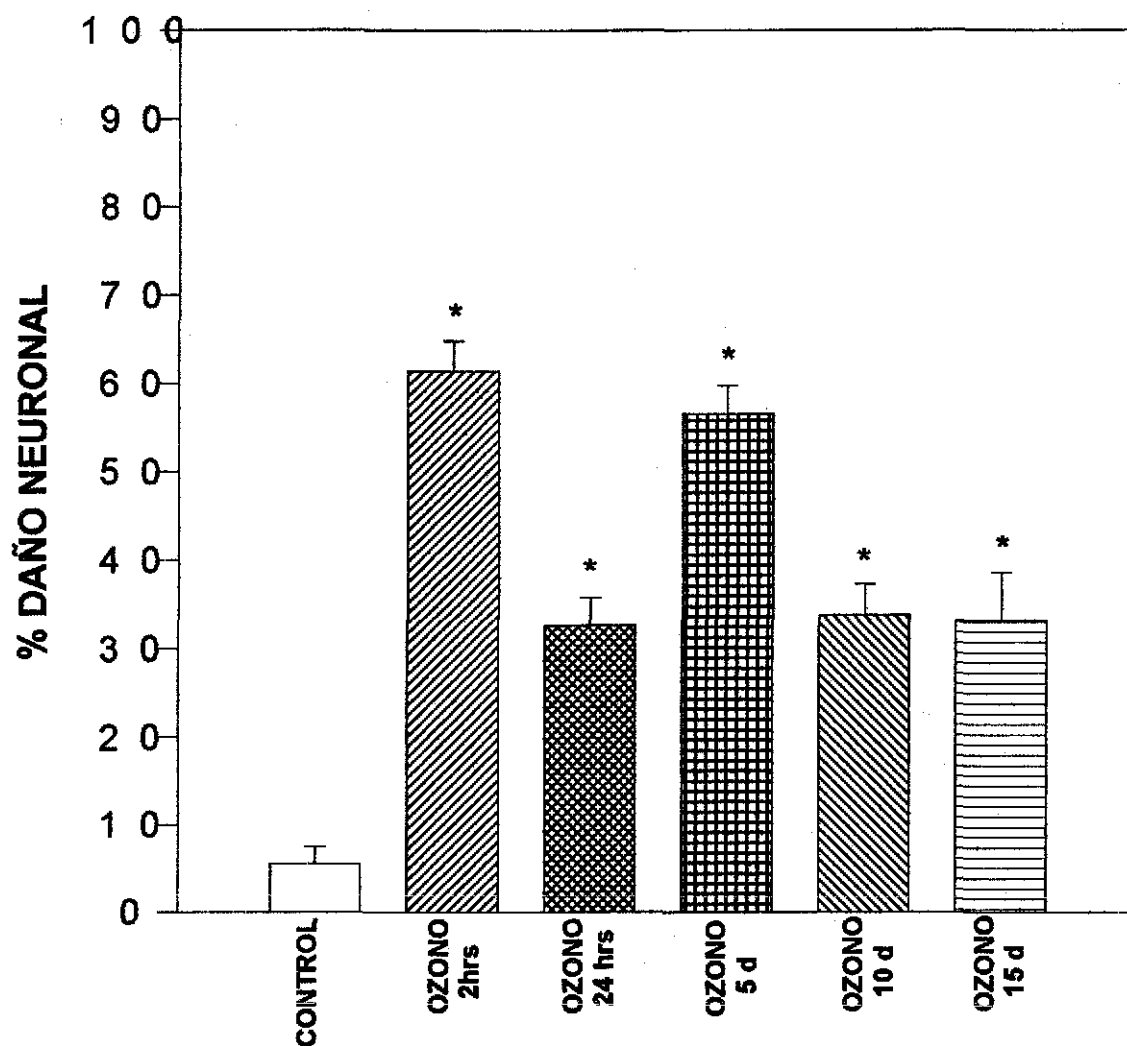
membrana interna.

Con respecto a las células granulosas, en todos los animales expuestos a ozono mostraron alteraciones como evidente vacuolización del citoplasma y de las dendritas (Fig.18), presencia de gránulos de lipofucsina (Fig.19), aparato de Golgi dilatado (Fig. 20), edema mitocondrial, cisternas de retículo endoplásmico liso dilatado y ribosomas libres y en roseta.

Se determinó el porcentaje de daño neuronal de 100 células granulosas de cada rata expuesta a ozono de los cinco subgrupos. Considerándose indicadores de daño neuronal a las neuronas que presentaron: vacuolas, y/o gránulos de lipofucsina, y/o edema mitocondrial y/o pérdida de crestas de las mitocondrias. El mayor daño neuronal se presentó en los subgrupos expuestos y sacrificados 2 h y 5 días después de la exposición a ozono, los grupos de 24 h, 10 y 15 días presentaron valores muy similares (Tabla 4 y Gráfica 7).

Tabla 4. Promedio del porcentaje de daño ultraestructural de neuronas granulosas del bulbo olfatorio.

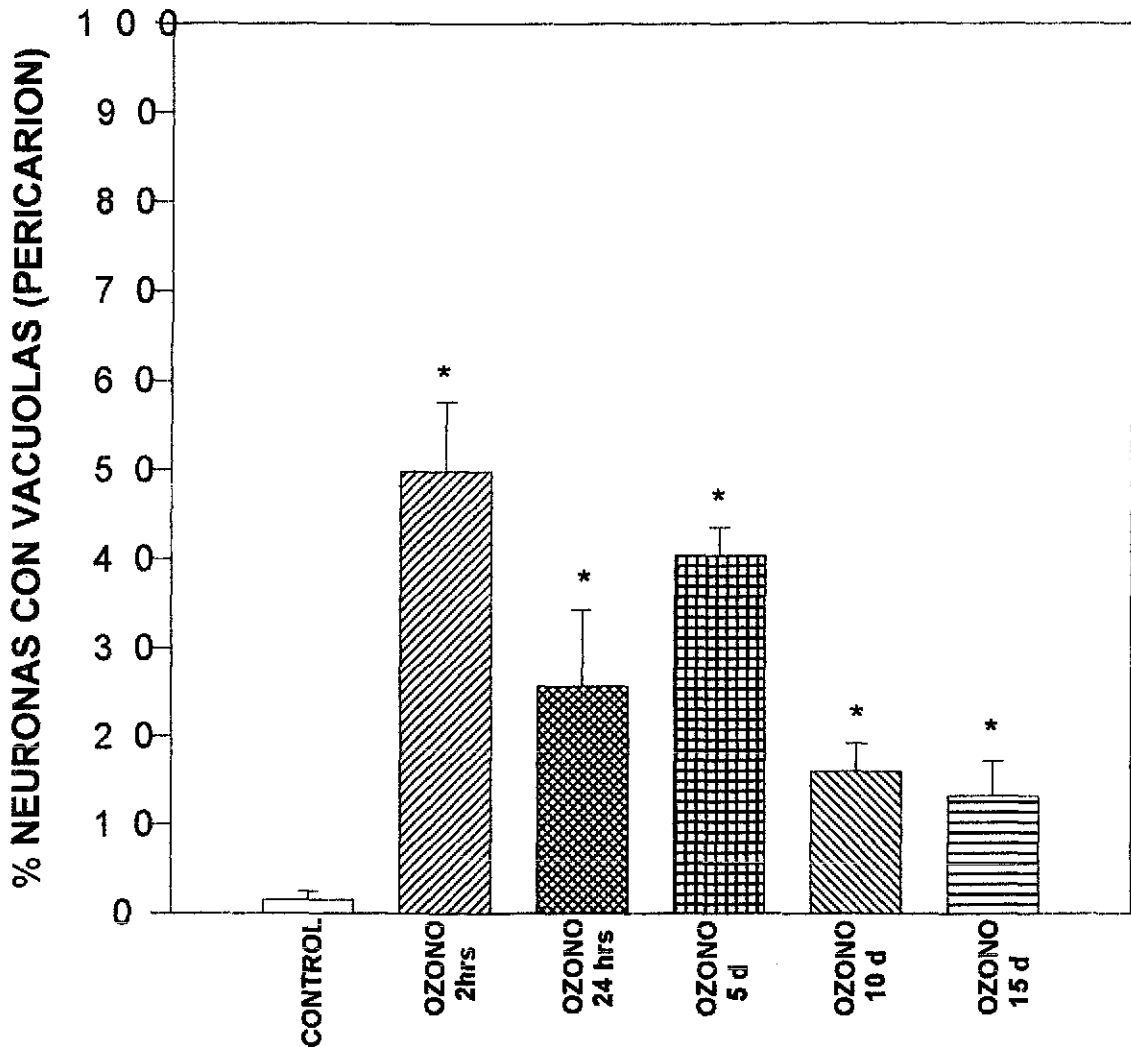
CONTROL	O₃ 2 h	O₃ 24 h	O₃ 5 d	O₃ 10 d	O₃ 15 d
5.5	61.4	32.6	56.6	33.8	33.7



Gráfica 7. Efecto de la exposición aguda de ozono sobre las neuronas granulosas. Los resultados (media \pm error est.) están representados como porcentaje de daño neuronal * = $p < 0.00001$.

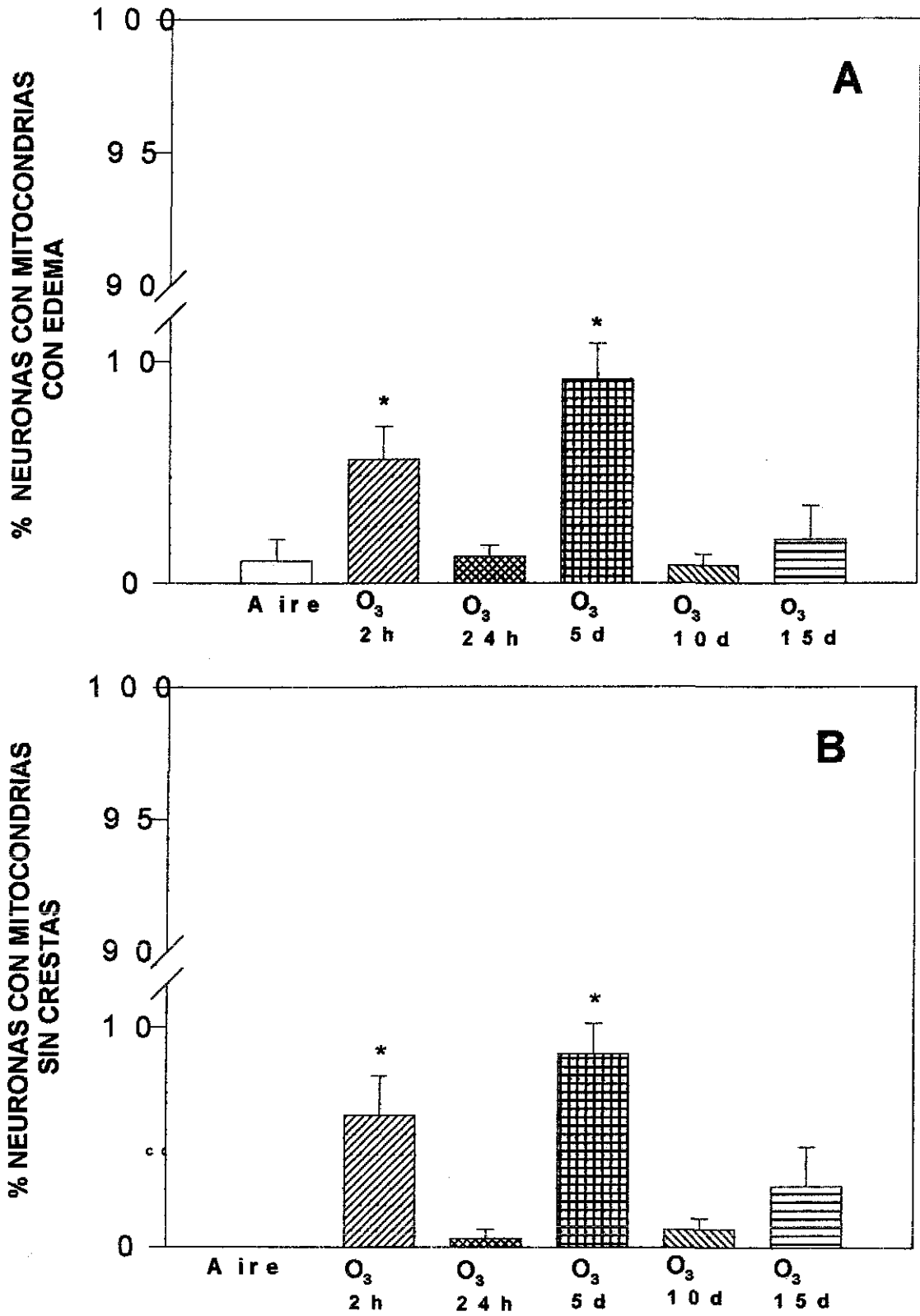
Por otra parte se realizó un análisis de las neuronas granulosas de todos los subgrupos para determinar el porcentaje de las alteraciones ultraestructurales como: presencia de vacuolas en las dendritas y en el pericarión, edema y pérdida de las crestas de las mitocondrias, presencia de gránulos de lipofuscina y daño del endotelio. También se analizó el grupo control para compararlo con los animales expuestos a ozono.

Del análisis del pericarión de las neuronas granulosas de los animales expuestos a ozono, los subgrupos de 2 h y 5 días mostraron mayor porcentaje de neuronas con vacuolas, el subgrupo de 24 h presentó valores menores que los subgrupos mencionados pero mayores que los subgrupos de 10 y 15 días (Gráfica 8 y Fig. 21).



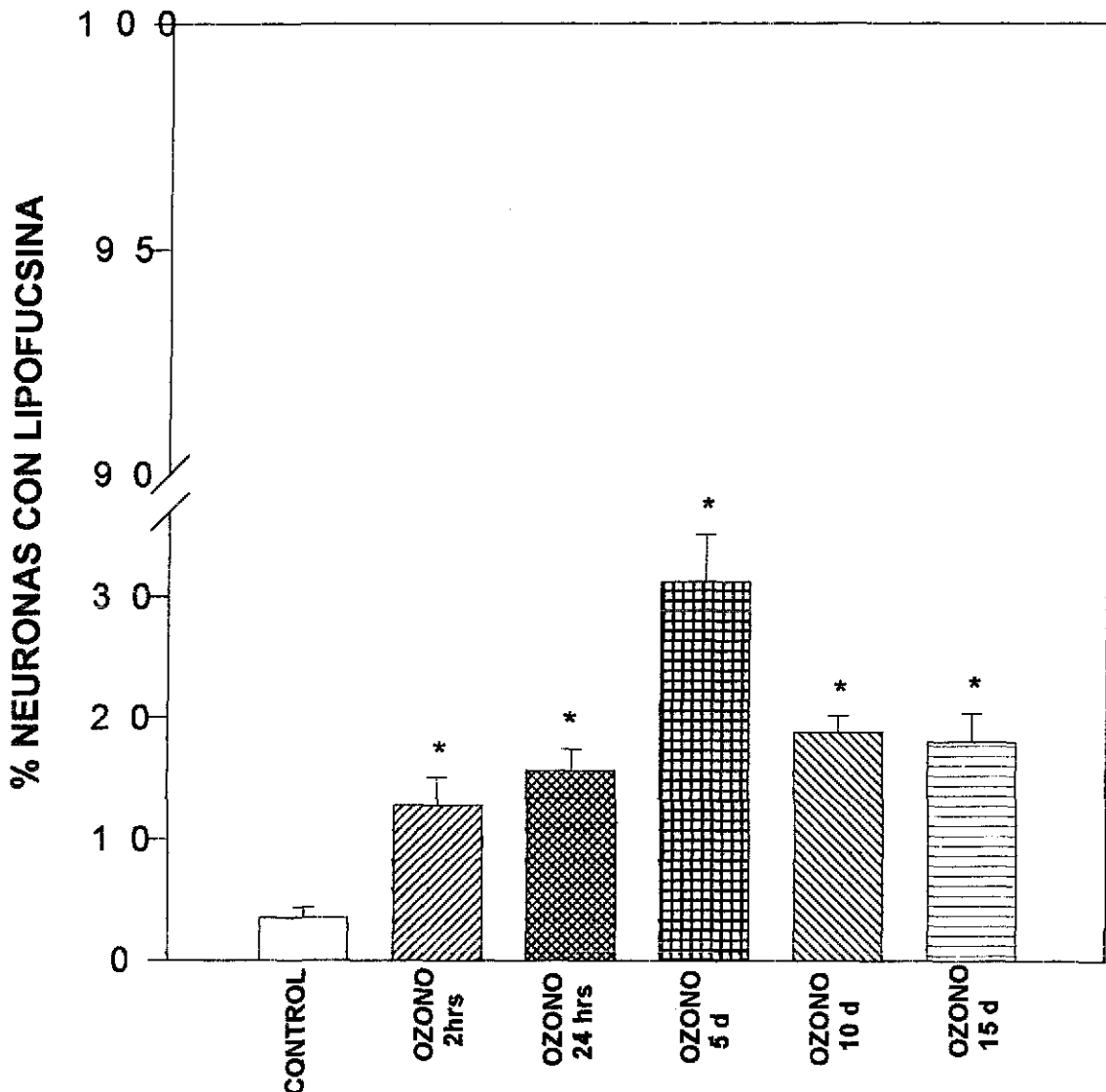
Gráfica 8. Efecto de la exposición aguda a ozono sobre las neuronas granulosas. Los resultados (media \pm error est) estan representados como porcentaje de neuronas con vacuolas en el pericario * = $p < 0.0001$

Para determinar las condiciones morfológicas de las mitocondrias en las neuronas granulosas se determinó el porcentaje de neuronas que mostraban mitocondrias con edema y/o pérdida de las crestas, como se puede observar en la Gráfica 9 la tendencia en ambas características es muy similar, los subgrupos de 2 h y 5 d presentaron mayor número de neuronas granulosas con daño mitocondrial.



Gráfica 9. Efecto de la exposición aguda a ozono sobre las mitocondrias de las neuronas granulosas. Los valores (media±error est.) están representados como porcentaje de neuronas que mostraron mitocondrias con edema(A) y con pérdida de crestas (B) * = $p < 0.01$.

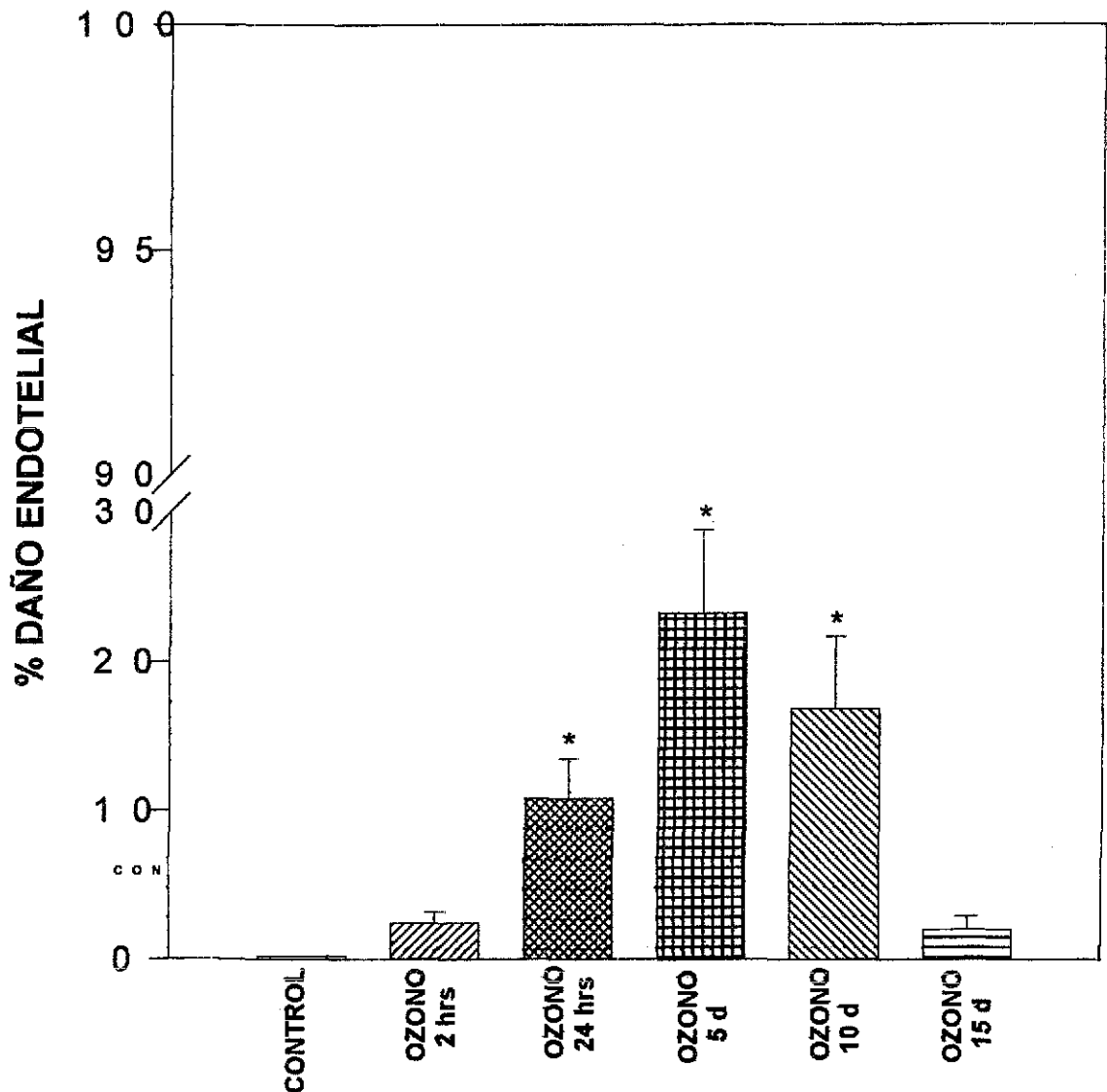
Como se mencionó anteriormente el ozono produce peroxidación de lípidos por lo que se determinó el porcentaje de neuronas granulosas con gránulos de lipofucsina (Fig.22), como se puede observar en la Gráfica 10 el grupo sacrificado a los 5 días después de la exposición a ozono mostró mayor porcentaje que los subgrupos de 2, 24 h, de 10 y 15 d, que comparados con el grupo control mostraron diferencias significativas $p < 0.001$.



Gráfica 10. Efecto de la exposición aguda a ozono sobre las neuronas granulosas. Los resultados (media \pm error est.) están representados como porcentaje de neuronas con gránulos de lipofucsina en el pericarian. * = $p < 0.015$.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Como se ha reportado previamente, ratas expuestas a 3 ppm de ozono durante 4 h presentan alteración del endotelio pulmonar (Hiroshima y cols. 1987), en el presente modelo, también se observó vacuolización de las células endoteliales de algunos capilares de la capa granulosa de los animales expuestos a ozono (Fig 23) y sacrificados a 2 y 24 h, 5 y 10 días, observándose mayor alteración a los 5 días (Gráfica 11).



Gráfica 11. Efecto de la exposición aguda a ozono sobre el daño endotelial en la capa granulosa. Los resultados (media \pm error est.) están representados como porcentaje de capilares con daño del endotelio * = $p < 0.02$.

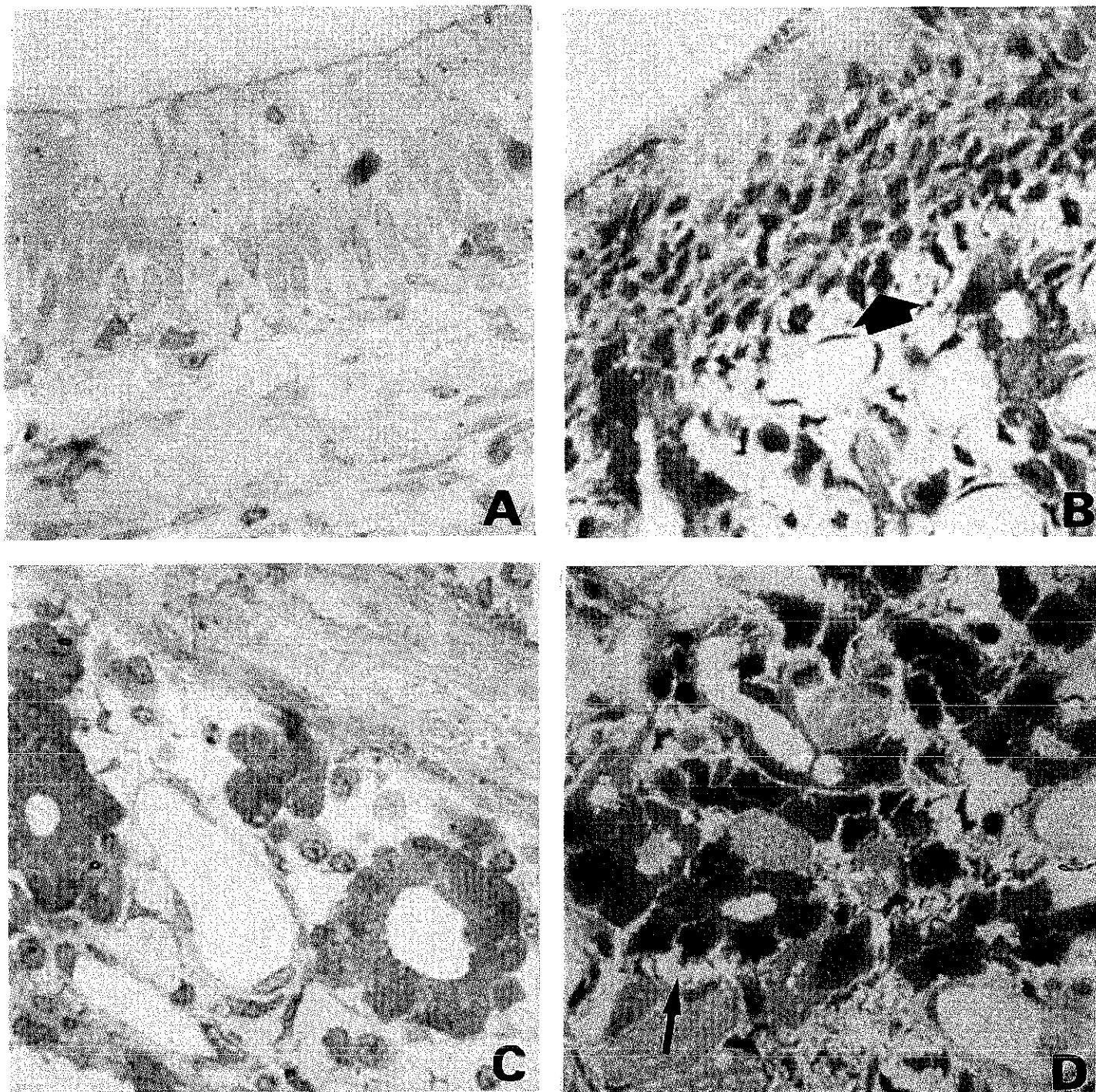


Fig. 9 Fotomicrografías de mucosa olfatoria de rata. (A) epitelio olfatorio de una rata control, (B) epitelio olfatorio de una rata expuesta a ozono y sacrificada a las 2 h después de la exposición, note la presencia de células basales picnóticas (\blacktriangledown), (C) lámina propia con glándulas de Bowman normales, y (D) lámina propia con glándulas de Bowman vacuoladas (\blacktriangledown) de una rata expuesta a ozono y sacrificada a los 5 días después de la exposición. 400 X

FALLA DE ORIGEN

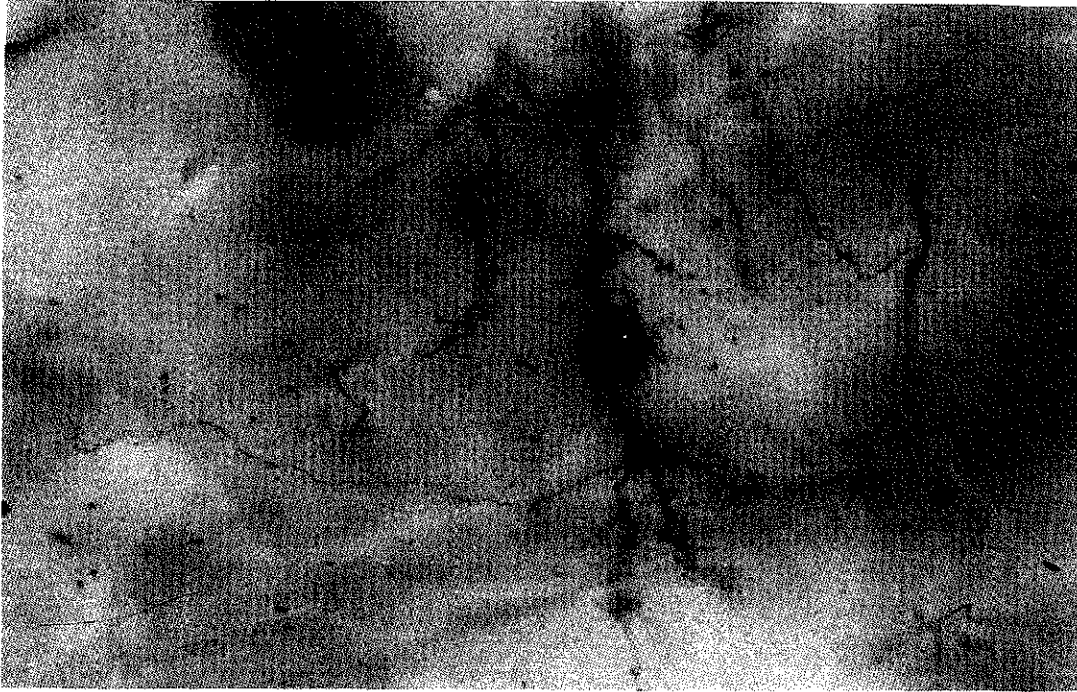


Fig. 10 Neurona granulosa esférica de bulbo olfatorio de una rata control. Note la presencia de espinas en el soma y en las dendritas primarias y secundarias. 400 X

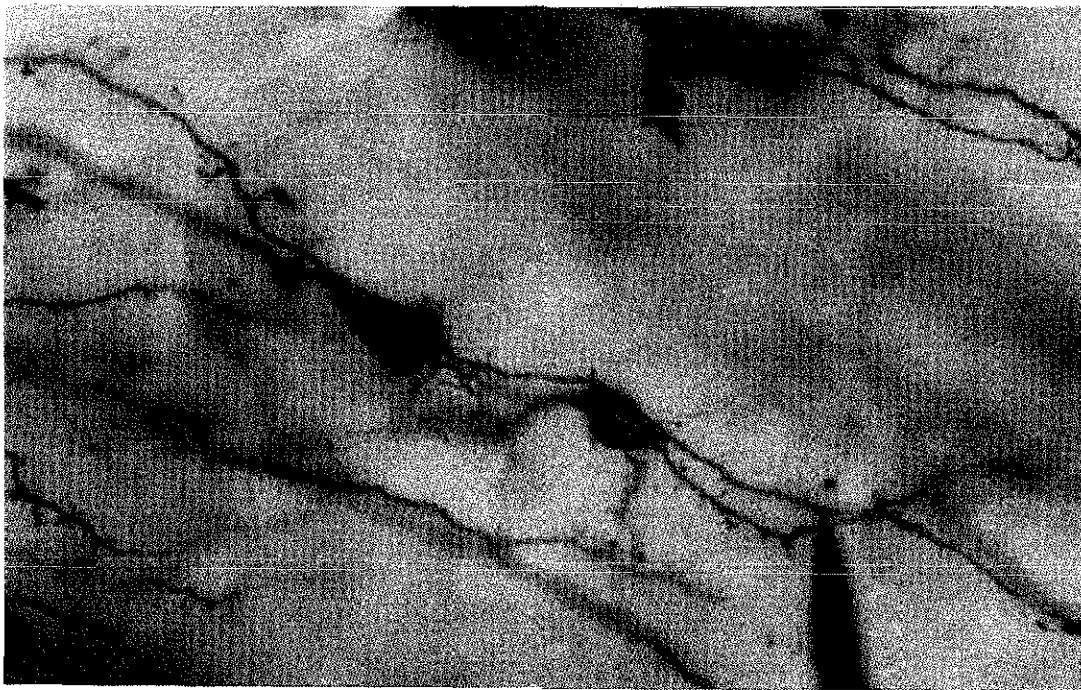


Fig. 11. Dos neuronas granulosas de bulbo olfatorio con notable pérdida de espinas dendríticas de un animal expuesto a ozono y sacrificado a los 10 días después de la exposición. 400 X

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

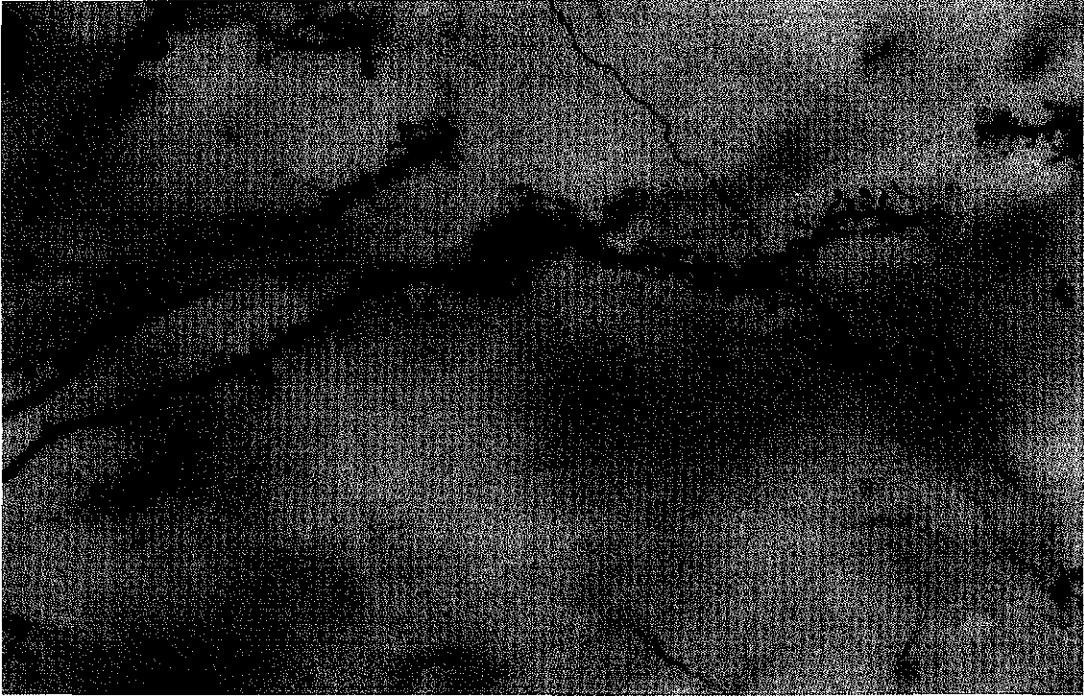


Fig.12 Fotomicrografía de una neurona granulosa de bulbo olfatorio, con dos dendritas secundarias y cuatro secundarias con gran densidad espinosa de un animal control. 400 X

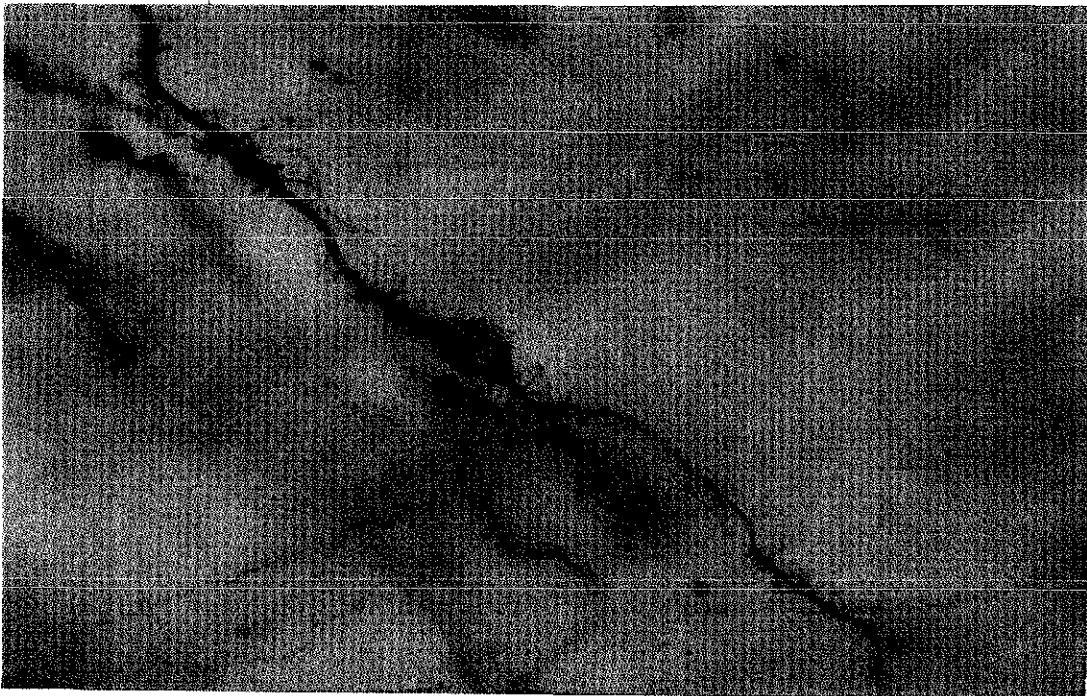


Fig. 13 Neurona granulosa de una rata expuesta a ozono y sacrificada a los 10 días después de la exposición. Nótese que las dimensiones de ambas neuronas son similares, en contraste con la diferencia en la densidad espinosa en el soma (◊) y en las dendritas(◊).400X

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Fig. 14 Dendrita secundaria de una neurona granulosa de bulbo olfatorio, con notable pérdida de espinas dendríticas, de una rata expuesta a ozono y sacrificada a los 5 días después de la exposición 1000 X.

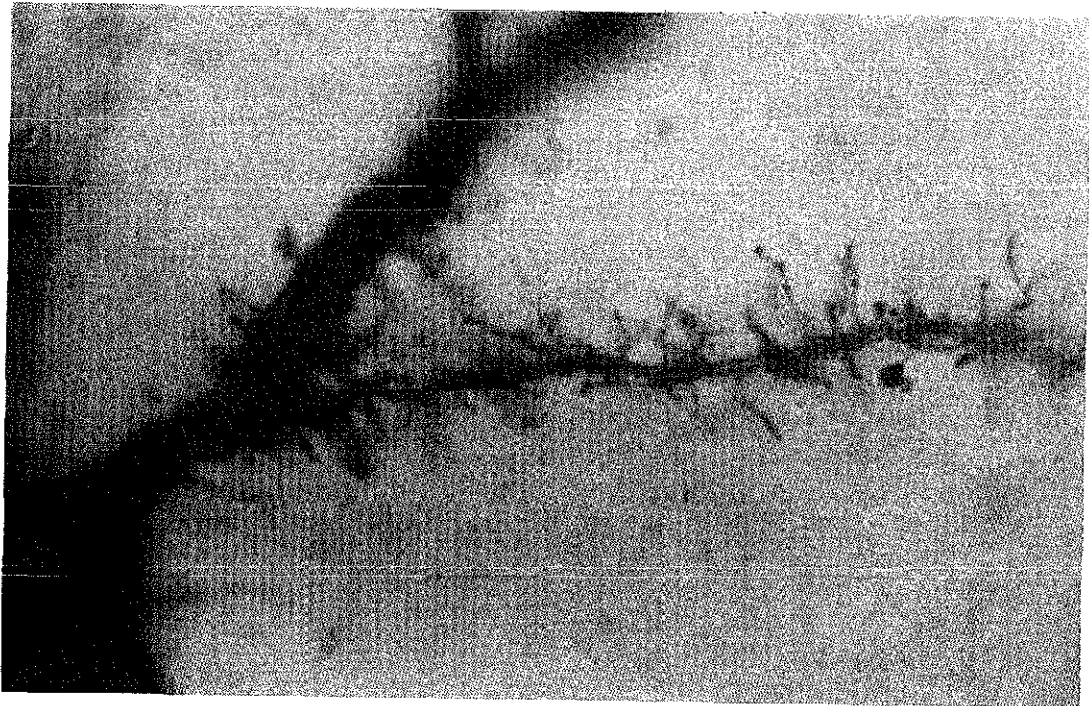


Fig. 15 Dendrita secundaria de una neurona granulosa de bulbo olfatorio de una rata expuesta a ozono, y sacrificada a 10 días después de la exposición. Note la gran densidad de espinas dendríticas. 1000 X.

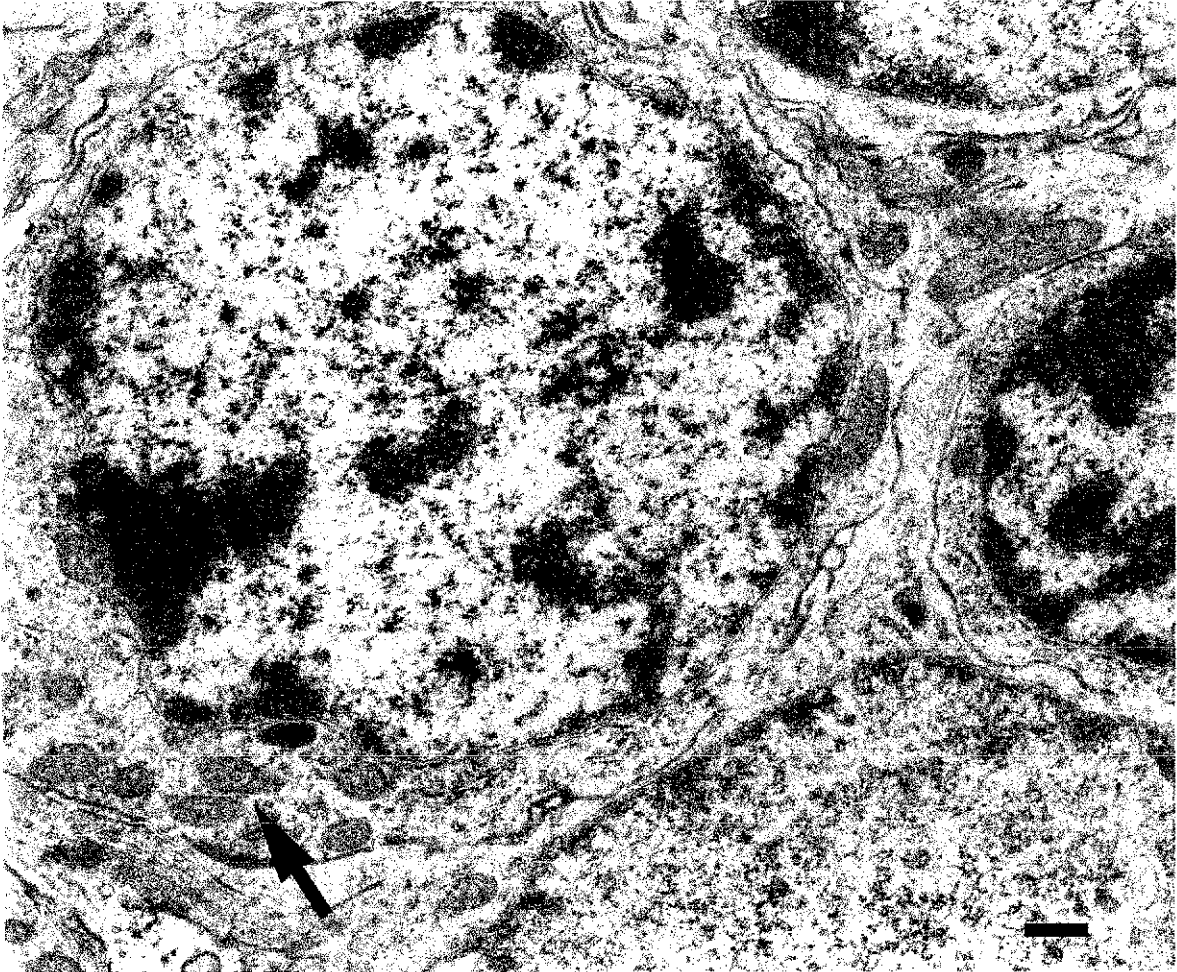


Fig. 16 Micrografía de cuatro neuronas granulosas de bulbo olfatorio de una rata control, con su escaso citoplasma característico, prominentes núcleos con cromatina condensada y mitocondrias normales (➡).16 000 X, Barra = 0.5 μ m

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

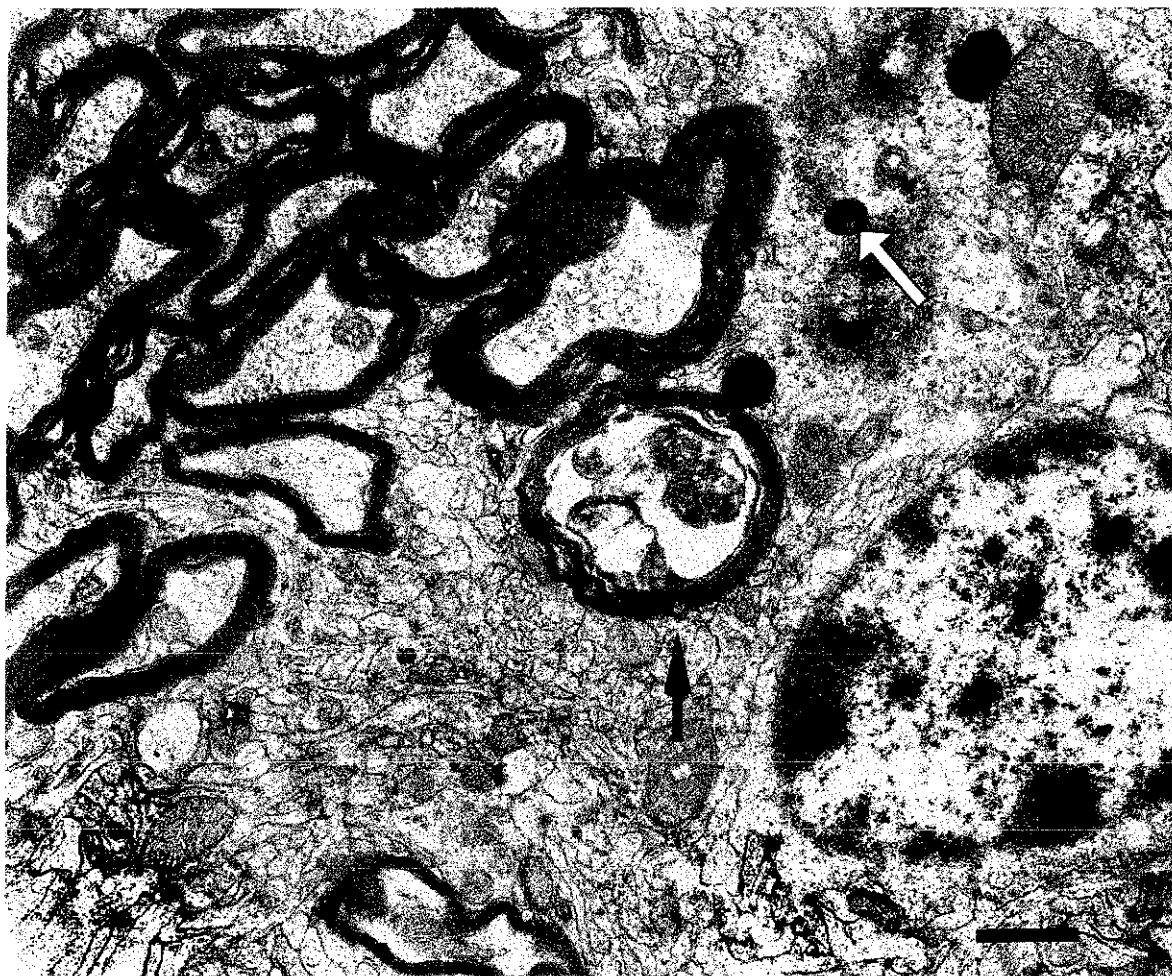


Fig. 17 Micrografía de la capa granulosa de bulbo olfatorio de una rata expuesta a ozono, sacrificada a 10 días después de la exposición. Se puede observar una neurona granulosa y axones con la mielina alterada y uno de ellos con axoplasma evidentemente vacuolado ➡ y la presencia de granulos de lipofucsina en el neuropilo ⇨ . 12 800 X, Barra = 1 μ m .

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

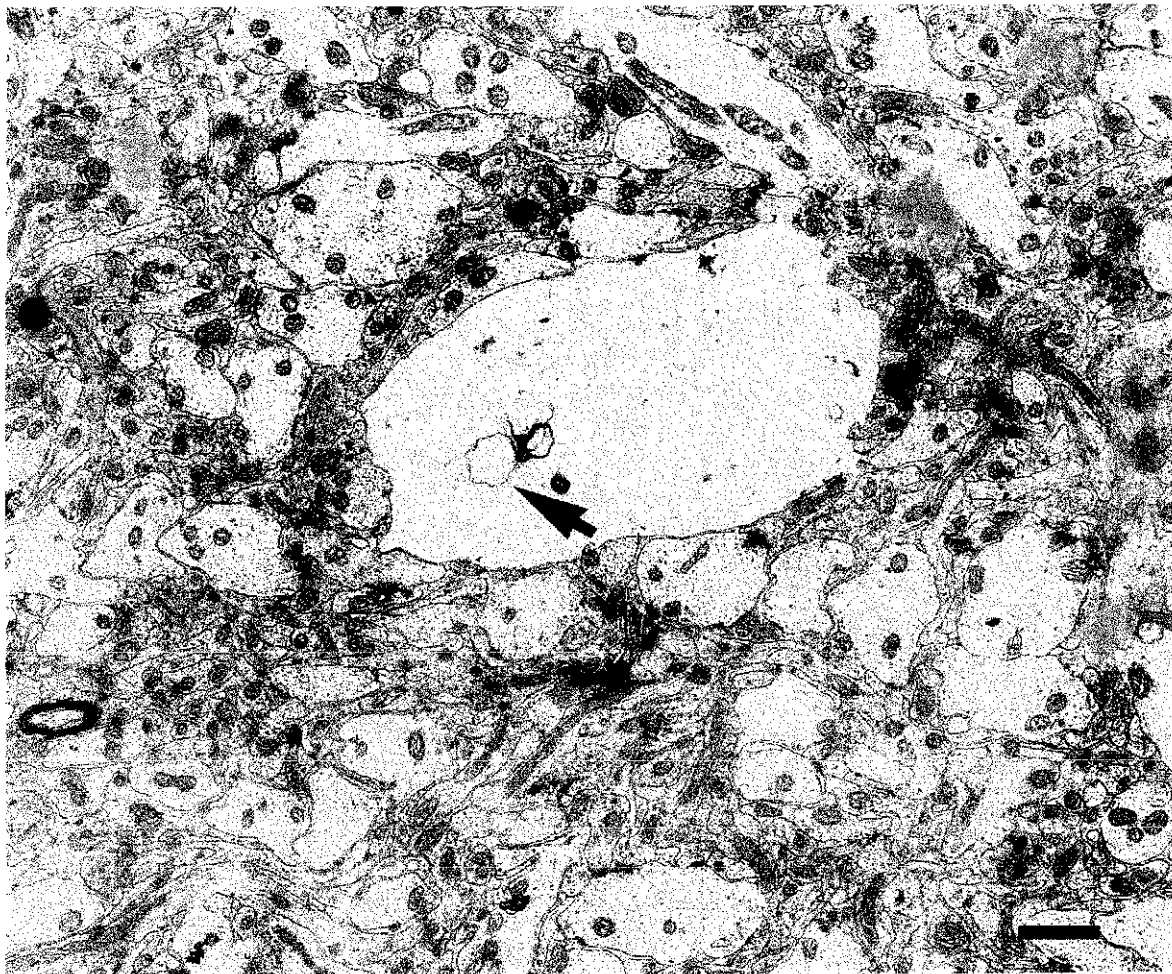


Fig. 18 Neuropilo de la capa granulosa de bulbo olfatorio de una rata sacrificada a los 15 días después de la exposición a ozono. Note en la porción central una gran dendrita con grandes vacuolas ➡ .6400X, Barra = 1.5 μ m .

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Fig. 19 Micrografía de la capa granulosa de una rata expuesta a ozono y sacrificada a los 10 d. después de la exposición. Se puede observar axones mielinizados. Nóte la presencia de gránulos de lipofuscina en el neuropilo ⇨ 16 000 X, Barra = 0.5 μm .

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

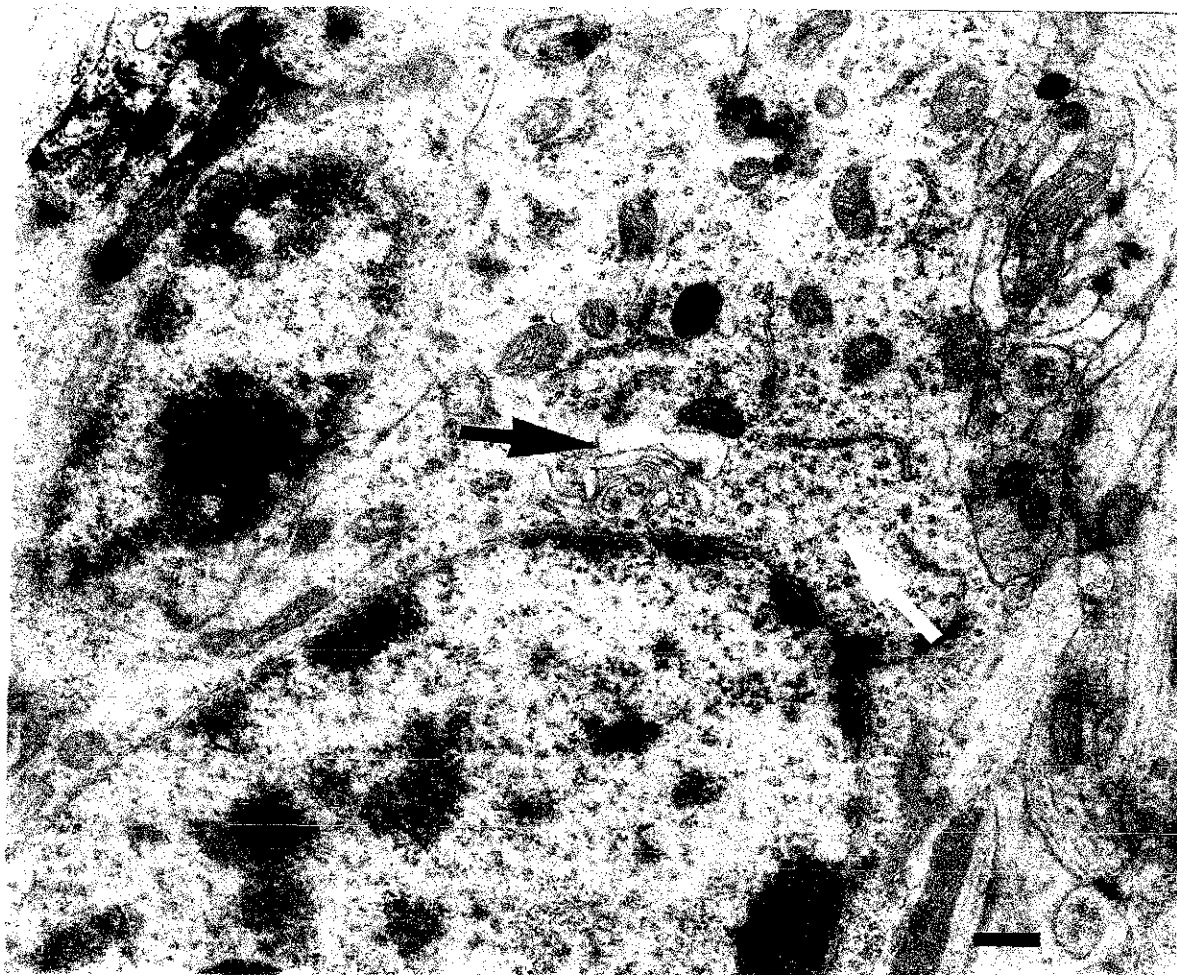


Fig. 20 Neurona granulosa de un animal expuesto a ozono, sacrificado 15 días después de la exposición a ozono, con el aparato de Golgi dilatado ➡, el citoplasma presenta gran cantidad de ribosomas libres y dispuestos en rosetas ⇨ característico. 16 000 X, Barra = 0.5 μm .

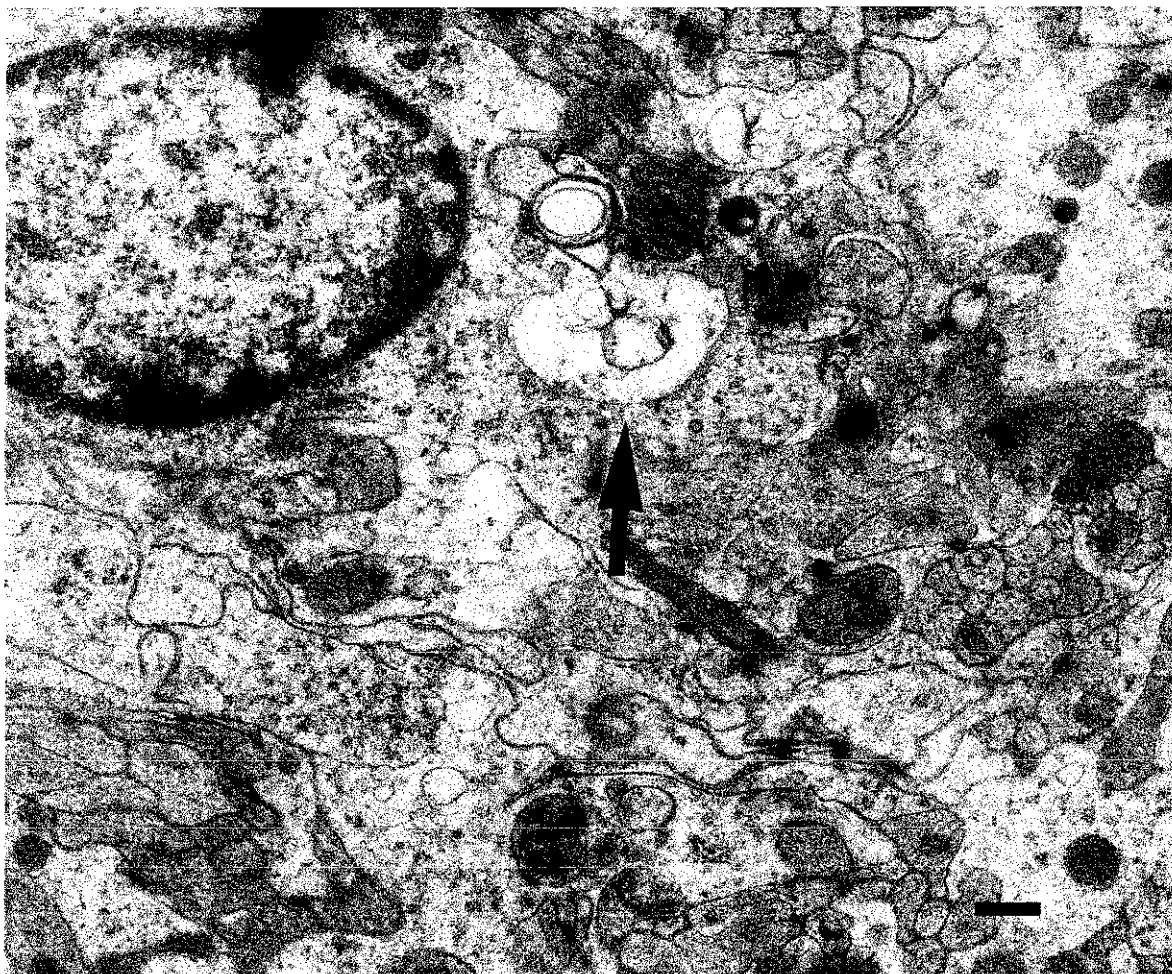


Fig. 21 Micrografía de bulbo olfatorio de un animal expuesto a ozono y sacrificado a los 15 d. después de la exposición a ozono. Se puede observar el neuropilo y una neurona granulosa con el pericarion vacuolados ➡ 16 000 X, Barra = 0.5 μm .

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

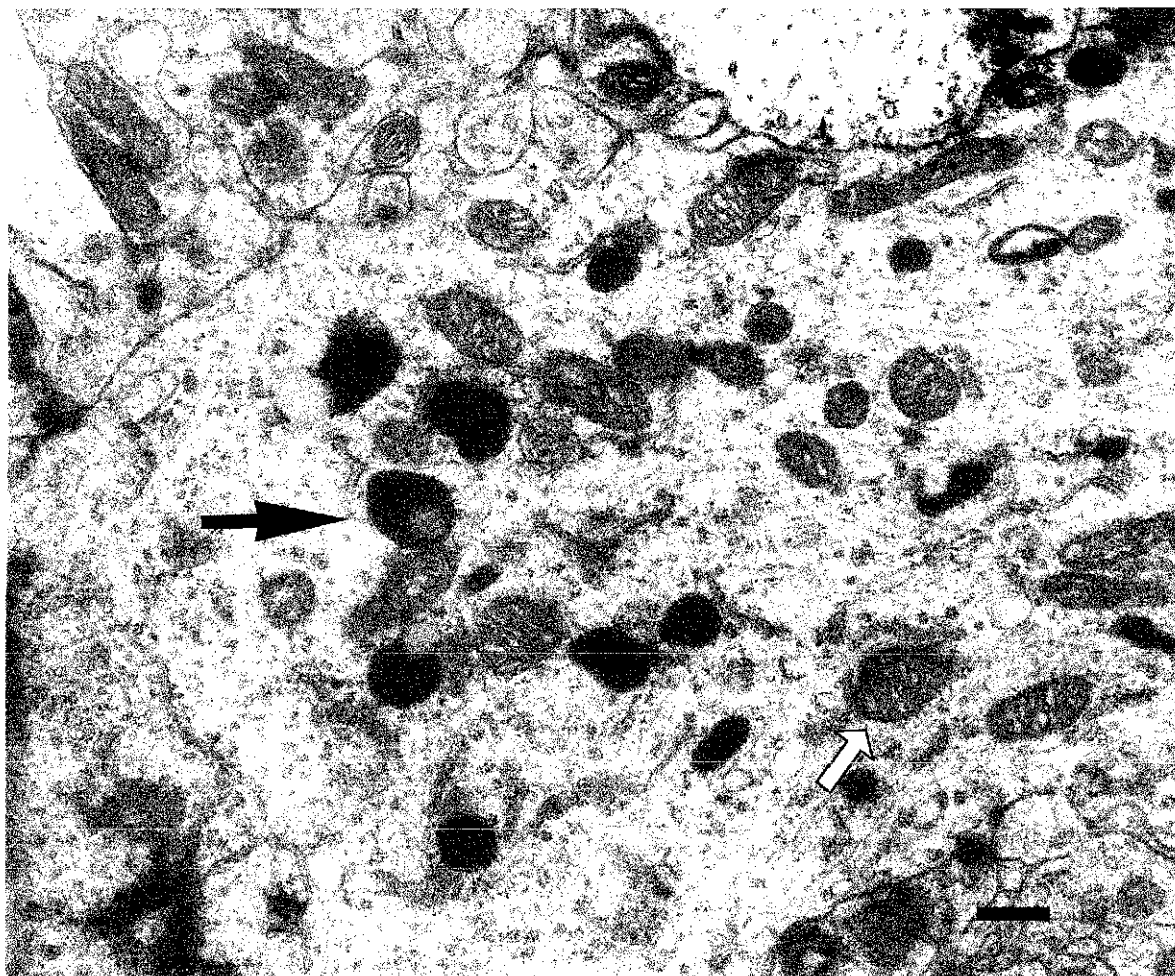


Fig. 22 Micrografía del citoplasma de una neurona granulosa de una rata expuesta a ozono y sacrificada a las 2 hrs. Note la presencia de gránulos de lipofucsina ➡ y la gran cantidad de mitocondrias electrodensas ⇨ 17000 X, Barra = 0.5 μm .

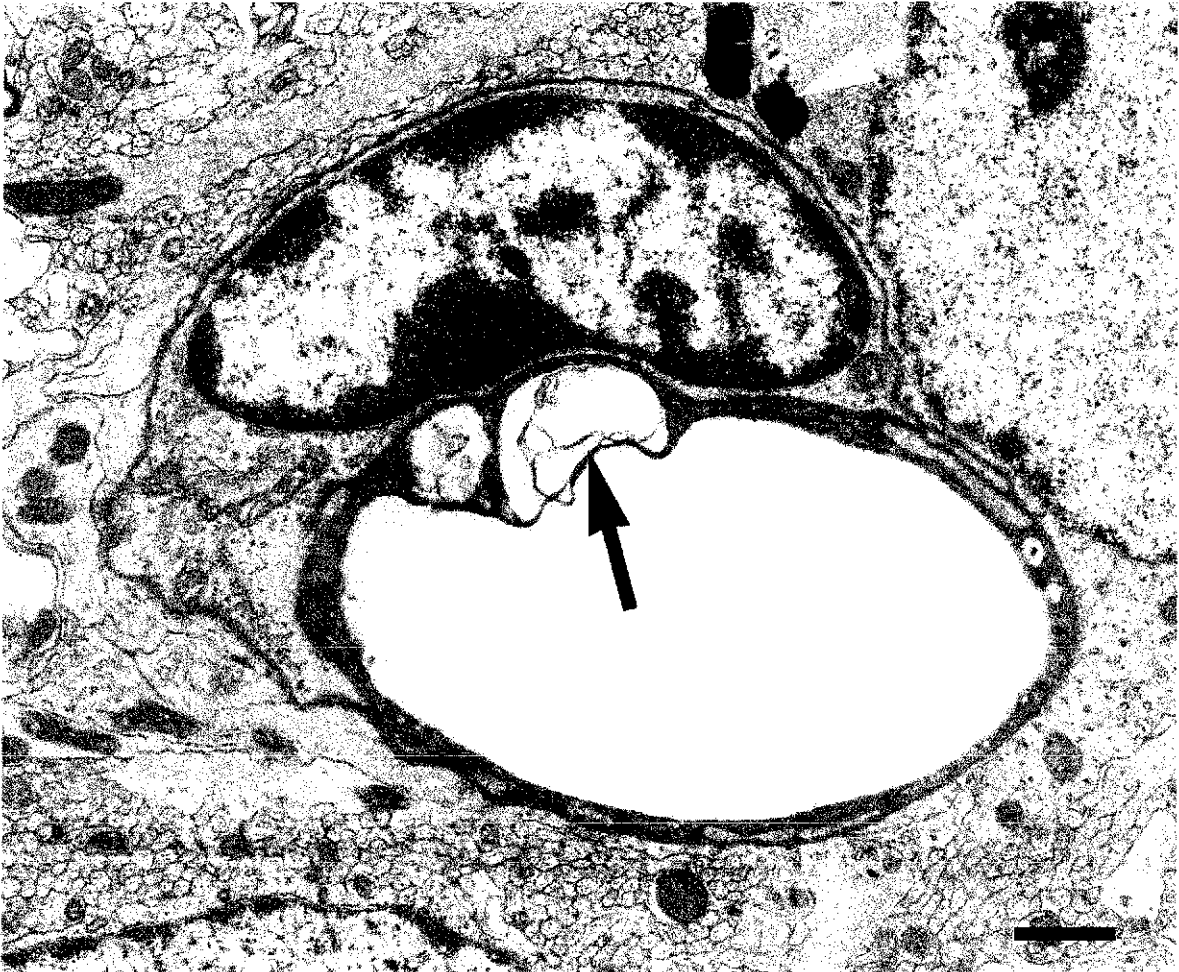


Fig. 23 Capilar de la capa granulosa de bulbo olfatorio de una rata expuesta a ozono y sacrificada a 10 días después de la exposición, se puede observar el endotelio notablemente vacuolado ➡ y con citoplasma denso. Note la presencia de granulos de lipofuscina ⇨ 11 970 X, Barra = 1 μm .

DISCUSION

Estudios previos sugieren que el primer sitio de reacción del ozono es sobre el fluido superficial epitelial presente en las vías respiratorias altas y bajas (Langford y cols., 1995). Este gas interactúa con biomoléculas como aminoácidos, grupos amino y ácidos grasos insaturados produciendo productos de oxidación secundarios (Mudway y Kelly 2000). Los productos de la peroxidación de lípidos son aldehídos, peróxido de hidrógeno y radicales libres que originan una cascada de cambios patológicos locales como el daño observado en la mucosa olfatoria en el presente estudio, debido probablemente a la alteración en la permeabilidad epitelial, asociada al incremento en el número de leucocitos polimorfonucleares del lavado broncoalveolar, y parénquima pulmonar (Bhalla, 1999; Postlethwait y cols., 1998; Miller y cols. 2001).

Cuando los sistemas antioxidantes no pueden contrarrestar los radicales libres del fluido superficial epitelial de pulmón (Langford y cols., 1995), estos pasan al torrente sanguíneo y se distribuyen por todo el organismo incluyendo al cerebro, como se sugiere en este trabajo en el se evidenciaron alteraciones morfológicas de las neuronas granulosas del bulbo olfatorio debido probablemente al efecto parcial de las ROS secundarias formadas por la exposición aguda a ozono

Mucosa Olfatoria

La mucosa olfatoria es un blanco importante de la acción de drogas o compuestos que inducen toxicidad tanto en el neuroepitelio olfatorio, como en las glándulas de Bowman en la lámina propia del epitelio respiratorio del ratón (Bahrami y cols., 2000). También se ha reportado que el neuroepitelio de la mucosa olfatoria y las vías olfatorias de pacientes con enfermedad de Alzheimer presentan neuritas distróficas inmunoreactivas a tau, neurofilamentos y presencia de depósitos de β -amiloides asociados con disfunción olfatoria (Arnold y cols., 1998). Los resultados del presente estudio mostraron, daños citotóxicos en el epitelio olfatorio provocados por la exposición a ozono, lo que se puede correlacionar a un aumento en la permeabilidad epitelial como lo reportan Kerl y cols. (1987), y a cambios histopatológicos como metaplasia y necrosis como se ha reportado en el epitelio

respiratorio (Harkema y cols,1987, Fanucchi M. y cols, 1998, Calderón y cols,1993). Además se observaron células epiteliales basales picnóticas en todos los grupos expuestos a ozono, esto podría corresponder a una respuesta degenerativa del epitelio olfatorio (Carr y Farbman, 1993).

En el presente estudio también se observó pérdida de cilios en el epitelio olfatorio en todos los grupos estudiados, consecuencia probablemente al efecto directo del ozono sobre la superficie epitelial. Sin embargo, en la lámina propia se observó, alteración de las glándulas de Bowman solamente en los grupos sacrificados a las 2 h y 5 días después de la exposición a ozono.

Se ha evidenciado que la exposición a ozono produce aumento en la liberación de interleucinas IL-4, IL-6, IL-8 y el TNF α presente en la mucosa nasal humana en cultivo y en epitelio de las vías respiratorias de mono correlacionado con infiltración de neutrófilos (Schierhorn y cols.,1999, Chang y cols., 1998, Suzuki y Farbman, 2000), esto indica que el daño producido está asociado a un proceso inflamatorio (Rusznak y cols. 1996), que se presenta en el tracto respiratorio de animales expuestos a ozono (Harkema y cols. 1987). También se ha reportado pérdida de cilios, necrosis de las células ciliadas y secretoras e hiperplasia de éstas últimas, en el epitelio nasal de monos, después de 6 días de exposición a 0.15 ppm de ozono durante 8 h diarias (Harkema y cols.,1987), y en ratas expuestas a 0.8 ppm a dicho gas, presentan hiperplasia del epitelio nasal y metaplasia de las células secretoras (Hotchkiss y cols., 1991; 1997, Fanucchi y cols., 1998, Harkema J.R. y cols., 1999), situación que observamos en este estudio.

Por otra parte, el grupo sacrificado 5 días después de la exposición a ozono mostró aumento significativo en el espesor del epitelio olfatorio comparado con el grupo control, lo cual podría explicarse como una respuesta proliferativa de dicho epitelio, (Salmon y cols., 1998; Longphre y cols., 1996) como fué observado en el epitelio bronquial y alveolar de ratones expuestos a ozono, probablemente como efecto del daño oxidativo secundario sobre el tejido inducido por las ROS producidas por el propio tejido afectado, como parte del proceso de deterioro celular. Otros autores reportaron aumento en la síntesis de DNA asociado con hiperplasia del epitelio respiratorio de ratas expuestas a 0.8 ppm de ozono (Johnson y cols., 1990; Salmon y cols., 1998). Sin embargo, la

alteración en el espesor del epitelio olfatorio, tiende a recuperarse, debido a que animales expuestos a ozono y estudiados a los 10 y 15 días después de la exposición, mostraron valores del espesor de la mucosa olfatoria muy similares al de los sujetos control. Este hallazgo podría deberse a la capacidad regenerativa del epitelio olfatorio, mediante la diferenciación de las células epiteliales progenitoras como lo han reportado Goldstein y Schwob (1996).

Ishii, y cols. (1998) mencionaron, que las alteraciones inducidas por estrés oxidativo, también pueden ser reversibles, estos autores encontraron que la exposición a 2 ppm de ozono produce inflamación pulmonar que es reversible a los 7 días.

Además se podría sugerir que a los 10 y 15 días, se presenta una compensación de los sistemas antioxidantes endógenos, manifiesta como un proceso de reparación de la mucosa olfatoria que podría reflejar un restablecimiento sináptico entre los receptores olfatorios con las células del bulbo olfatorio.

Bulbo Olfatorio

El estudio citológico de bulbo olfatorio reveló, que el tamaño de las neuronas granulosas de los animales expuestos a ozono y sacrificados a las 2 h y 24 h, 10 y 15 días después de finalizar la exposición, fué similar al tamaño de las células granulosas de los animales control. Sin embargo los estudios realizados en el subgrupo expuesto a ozono y sacrificado después de 5 días, mostró aumento del eje menor estadísticamente significativo comparado con el grupo control. Esta alteración puede explicarse; 1) por el daño oxidativo que afecta tanto al epitelio olfatorio cuyas neuronas proyectan al bulbo olfatorio (vía directa); 2) así como al efecto del aumento en las ROS secundarias a la exposición a ozono que llegan al bulbo olfatorio por vía sanguínea (vía indirecta) afectando a las neuronas granulosas. El aumento del eje menor puede explicarse por edema de dichas neuronas por la alteración de la homeostasis y deterioro en la regulación del flujo iónico por la membrana plasmática (Evans, 1993; Menzel y Meacher, 1999).

En el presente modelo de estrés oxidativo generado por ozono, se observó, pérdida de las espinas dendríticas de las neuronas granulosas de todos los grupos expuestos a ozono, debido probablemente al incremento en la producción de radicales libres que llegaron a esta estructura

mediante las dos vías descritas previamente y las cuales podrían inducir cambios en la morfología y distribución de las espinas dendríticas, como lo propone la teoría de óxido-reducción (Park J.S., 1996; Smythies, 1999), en la cual indica que señales oxidativas producen cambios en la organización sináptica y modificación en la expresión de espinas dendríticas.

Las espinas dendríticas, son sitios de contacto sináptico, unidades aferentes locales (como en las sinapsis dendrodendríticas del bulbo olfatorio) que modifican el potencial sináptico pasivo, donde se realiza síntesis de proteínas locales y compartimentalización dinámica de Ca^{2+} que al alterarse su cinética se produce retracción o elongación del cuello de las espinas (Shepherd G.M., 1996; Pongráscz F., 1985; Müller y Connor, 1991 Majewska, y cols. 2000). Además son estructuras postsinápticas dinámicas no permanentes (Quartz y Sejnowski, 1998), con capacidad de sufrir cambios en condiciones favorables ó adversas (Majewska y cols., 2000 Yuste y Bonhoeffer 2001), que aumentan en número durante los procesos de aprendizaje y memoria ó disminuyen en el alcoholismo crónico, en procesos como el envejecimiento y en enfermedades neurodegenerativas que cursan con un estado de estrés oxidativo como la EP y Alzheimer (Ferrer y cols, 1986, Jacobs B. y cols., 1997, Moser y cols , 1994; Catalá y cols., 1988), estos cambios producidos por estrés oxidativo son evidencias para explicar la pérdida de plasticidad que se presentan en las enfermedades neurodegenerativas.

Por otra parte, la mayor pérdida de las espinas dendríticas del grupo expuesto a ozono y sacrificado a los 5 días, podría ser una respuesta tardía inducida por la posible alteración de los receptores olfatorios (vía directa), que se manifestó como mayor daño del epitelio olfatorio a los 5 días por un posible aumento de los ROS producidos por los tejidos dañados; esto coincide con estudios previos en los cuales se presenta disminución en la densidad espinosa cuando se produce experimentalmente privación de estimulación olfatoria (Rehn y cols., 1988).

Además, la pérdida de espinas dendríticas podría deberse al aumento en la permeabilidad de la barrera hemato-encefálica inducida por los radicales libres y ROS (vía indirecta), y podrían dañar a las neuronas de diferentes regiones cerebrales como el bulbo olfatorio, manifestándose una alteración en el citoesqueleto de las espinas dendríticas, (por desestabilización producida por el

aumento de Ca^{2+} intracelular) constituido de microtubulos de actina, los cuales determinan la morfología de las espinas de las neuronas granulosas (Colin y cols., 1999; Avila y cols., 1999; Evans, 1993; Rossum y Hanisch, 1999, Matus A. 2000).

Sin embargo, la disminución en el número de espinas esta en función del tiempo, debido a que las neuronas granulosas de los grupos expuestos a ozono y sacrificados a los 10 y 15 días después de la exposición, mostraron un mayor número de espinas dendríticas que las neuronas de los grupos expuestos a ozono y sacrificados a las 2h, 24h y 5 días. Se podría sugerir que el aumento en la densidad espinosa se manifiesta como un restablecimiento de la integridad neuronal, como cuando se interrumpe el consumo crónico de alcohol en ratones (Lescuadron y cols., 1989), debido posiblemente a la capacidad plástica que presentan ciertas neuronas cuando el estrés oxidativo es compensado y se inducen señales antioxidantes endógenas, involucrando formación y plasticidad de las espinas dendríticas para aumentar el campo receptivo, como indicadores de recuperación celular, como se observa en condiciones fisiológicas como respuesta a hormonas, interacción microambiental, actividad neuronal etc. (Burgess y Coss, 1983, Sunanda y cols., 1995; Ramón, 1999; Harris, 1999; Yuste y Bonhoeffer, 2001).

En cuanto al análisis ultraestructural, las neuronas granulosas de los animales expuestos a ozono mostraron cambios que corresponden a alteraciones citoplásmicas que tienden a ser reversibles en los grupos sacrificados a los 10 y 15 días, como: vacuolización dendrítica y citoplásmica, aparato de Golgi y reticulo endoplásmico rugoso dilatado, aumento de los gránulos de lipofucsina y edema mitocondrial, el neuropilo también presentó vacuolización dendrítica y axoplásmica.

En los grupos expuestos a ozono de 2 h y 5 d se observó mayor daño neuronal, los cuales mostraron frecuentes neuronas granulosas con citoplasma vacuolado que corresponden a las evidencias morfológicas que el estrés oxidativo produce daño celular secundario a la exposición aguda a ozono. Esto puede explicarse porque los radicales libres producen peroxidación de lípidos, oxidación de proteínas estructurales y enzimáticas que pueden incrementar la proteólisis, aumentar la permeabilidad del calcio y la pérdida del control electrolítico debido al bloqueo del transporte

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

activo (Simonian y Coyle, 1996). Todos estos factores llevan a una pérdida de las de las funciones de membrana y estimulación de citocinas, lo que explica el edema (Mudway y Kelly, 2000).

En los grupos mencionados también se presentó un mayor porcentaje de neuronas con edema mitocondrial y pérdida de membrana interna, que podría asociarse a la alta susceptibilidad de las mitocondrias a las especies reactivas de oxígeno en condiciones de estrés oxidativo que se manifiesta como disfunción mitocondrial, generada por el aumento de Ca^{++} intracelular e intramitocondrial, reducción de la producción de ATP, alteración en los complejos de la cadena respiratoria, generación de radicales libres intramitocondriales, edema mitocondrial y alteración de la integridad de la membrana interna de las mitocondrias similar a lo reportado en la EP y Alzheimer (Dykens, 1999; Kowaltowski y Vercesi, 1998; Fernandez-Checa, 1998; Lenaz, 1998; Schapira, 1994; Donato, 2000, Hirai, y cols. 2001). Sin embargo a diferencia de los grupos de 2 h y 5 d, las neuronas granulosas de animales expuestos a ozono y sacrificados a las 24 h después de la exposición, no mostraron alteración mitocondrial significativa, esto podría deberse a la estimulación del sistema antioxidante endógeno por el aumento de ROS a las 24 h.

Con respecto a la presencia de gránulos de lipofucsina en las neuronas granulosas, se observó que todos los grupos expuestos a ozono mostraron, aumento significativo en el número de neuronas con lipofucsina. Este aumento podría deberse a las reacciones de peroxidación y autooxidación de lípidos insaturados y oxidación de proteínas, generando una mayor producción de radicales libres, con el consecuente aumento en la concentración de peróxido de hidrógeno, incremento en la difusión de este hacia el aparato ácido vacuolar, para la formación de gránulos de lipofucsina y producción de lipofucsina en los lisosomas de neuronas que cursan en un estado de estrés oxidativo, proceso que se ha descrito en neuronas del núcleo olfatorio anterior de pacientes con EP (Yin y Brunk, 1998; Hawkes y cols., 1998).

El grupo expuesto a ozono y sacrificado a los 5 días después de la exposición, mostró mayor porcentaje de neuronas granulosas con lipofucsina y mayor daño endotelial que los grupos sacrificados a las 2h, 24h, 10d y 15 d después de la exposición, hallazgo que podría explicarse como una consecuencia de el aumento en la cantidad de ROS secundarios al daño endotelial, lo que lleva



a una alta producción de H_2O_2 dando como resultado el incremento en el número de neuronas con gránulos de lipofucsina; al ser compensado dicho daño por mecanismos reparadores del daño oxidativo a los 10 y 15 días el porcentaje de neuronas con lipofucsina disminuye.

En el presente modelo de estrés oxidativo se observó daño endotelial, y se ha sugerido que los pequeños capilares son el principal blanco de acción del ozono (Bils, 1970; P'an y cols., 1972) Bils, (1970); P'an y cols., 1972), este daño tiende a ser reversible a los 15 días postexposición posiblemente por la estimulación del sistema antioxidante endógeno. En otros modelos se ha reportado daño endotelial en las regiones centro acinar de pulmón y en cultivo de células endoteliales de cerebro porcino bajo condiciones de hipoxia en ratas expuestas a 3ppm de ozono durante 4 h (Hiroshima y cols., 1987; Blasig y cols., 1994).

De los resultados del presente trabajo, podría sugerirse que la exposición aguda a ozono produce efectos a corto plazo a las 2 h, lo que se manifiesta por las alteraciones en el epitelio olfatorio, la pérdida de las espinas dendríticas y la presencia de vacuolización y alteración mitocondrial de las neuronas granulosas (Fig.24). Estos daños podrían explicarse por la producción de ROS secundarios inducidos por el ozono. Sin embargo, en el grupo de 24 h mostró menos alteraciones del epitelio olfatorio y de las neuronas granulosas (Fig.24), debido a que los ROS inducen una respuesta de los antioxidantes endógenos.

A diferencia de los grupos mencionados, el grupo de 5 días mostró mayor daño del epitelio olfatorio y en las glándulas de Bowman, aumento en las dimensiones de las neuronas granulosas con gran pérdida de espinas dendríticas, aumento en porcentaje de neuronas con gránulos de lipofucsina, y daño endotelial (Fig.24) que podrían corresponder a efectos a largo plazo de los ROS secundarios formados como consecuencia del daño celular observado a los 5 días y como respuesta al influjo de células inflamatorias en la mucosa nasal, como lo reportado previamente por Harkema y cols. (1987). Las ROS probablemente generan aumento en peroxinitritos (Torreilles, y cols. 1999) que se formarían como producto de la reacción del óxido nítrico y superóxido por acción de la óxido nítrico sintasa tipo-III expresada en el endotelio dañado como también se observa en EP (Torreilles, y cols. 1999). Dicho aumento en ROS podría inducir una activación tardía del sistema antioxidante que

explicaría la recuperación parcial a los 10 y 15 días del daño citológico de la mucosa olfatoria y ultraestructural de bulbo olfatorio (Fig. 24).

Finalmente, en el modelo utilizado de estrés oxidativo no invasivo, se observaron diferentes grados de daño celular del epitelio olfatorio y del bulbo olfatorio, durante los diferentes tiempos de estudio, que pueden interpretarse como un desequilibrio dinámico entre especies reactivas a oxígeno secundarias al daño tisular versus estimulación de antioxidantes endógenos que podrían correlacionarse con estadios iniciales de daño neuronal descrito en pacientes con enfermedades neurodegenerativas.

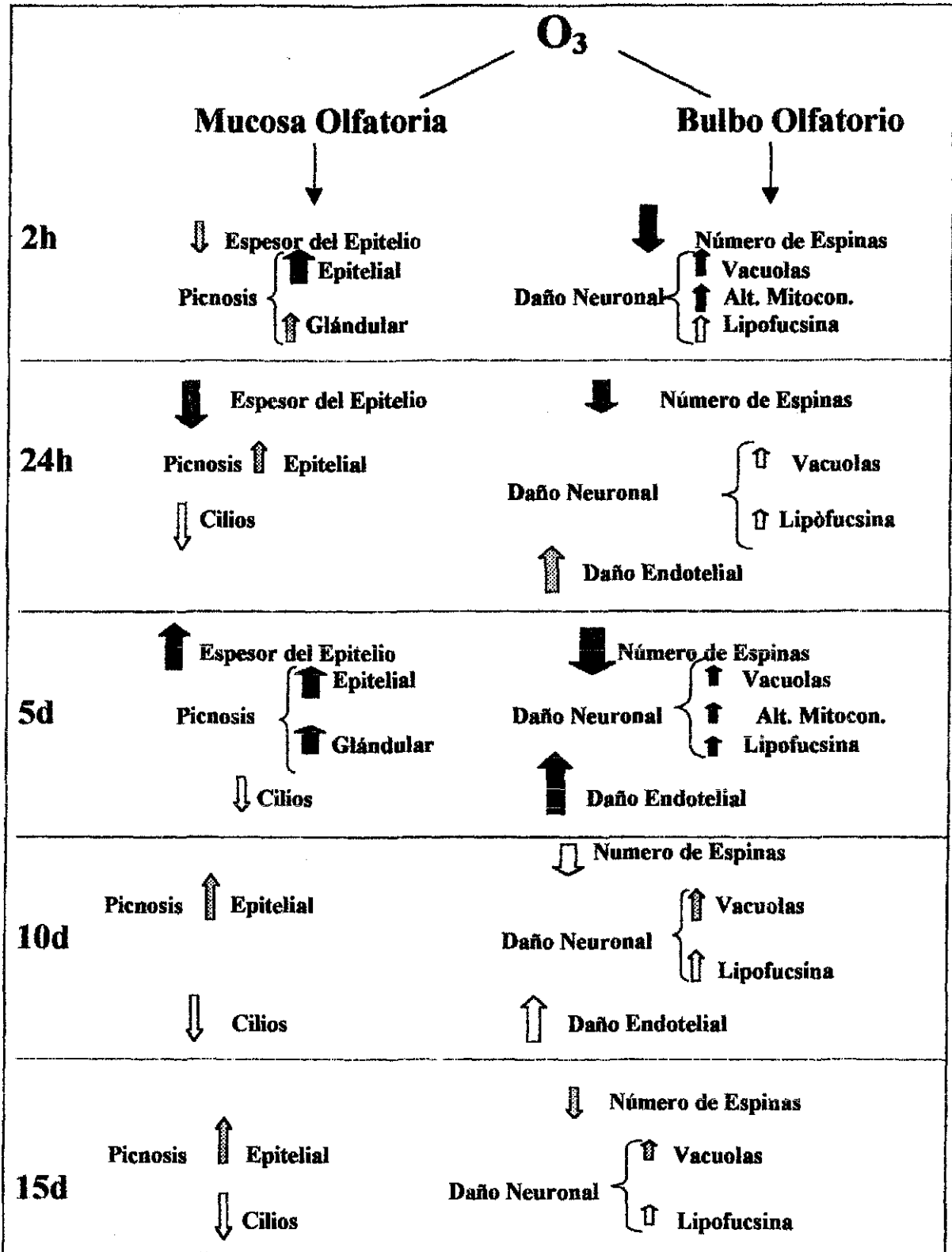


Fig 24 Alteraciones citológicas y ultraestructurales de la mucosa olfatoria y de las neuronas granulosas de bulbo olfatorio de ratas expuestas a O₃ y sacrificadas a diferentes tiempos después de la exposición.. Las flechas indican el grado de daño, mayor (↑), regular (⊕) y menor (↓)

CONCLUSION

De los resultados del presente estudio se concluye lo siguiente:

Que la exposición aguda a ozono produce alteraciones citológicas en la mucosa y el bulbo olfatorio inducidas probablemente por el estado de estrés oxidativo generado por la exposición aguda a dicho gas.

Por otra parte, las alteraciones citológicas y ultraestructurales podrían ser una manifestación del daño oxidativo generado directamente a través del neuroepitelio de la mucosa olfatoria e indirectamente por el paso de radicales libres hacia el torrente sanguíneo; además los cambios ultraestructurales se manifiestan a corto plazo como vacuolización del pericarión a las 2 h y a largo plazo por el aumento en el número de neuronas con granulos de lipofucsina que se hace más notorio a los 5 días.

De lo anterior se puede concluir que en el modelo de estrés oxidativo producido por la exposición aguda a ozono produce cambios citológicos y ultraestructurales en las neuronas granulosas del bulbo olfatorio, cambio que se ha encontrado previamente en enfermedades neurodegenerativas que cursan con un estado de estrés oxidativo, y que éstas alteraciones disminuyen con el tiempo tendiendo a la normalidad cuando los sistemas antioxidantes son eficaces, posiblemente por un proceso de plasticidad neuronal, por una posible compensación del daño oxidativo, generado por los sistemas antioxidantes endógenos.

REFERENCIAS

- Anglade P., Vyas S., Javoy-Agid F., Herrero M.T., Michel P.P., Marquez M., Mouatt-Prigent A., Ruberg M., Hirsch E.C. y Agid Y. 1995. Apoptotic degeneration of nigral dopaminergic neurons in Parkinson's disease. *Soc. Neurosci. Abstr.* 21:1250.
- Avila C. M.R., Colín B.L., Fortoul T., Machado S.J.P., Espinosa V.J. y Rugerio V.C. y Rivas A. S. 1999. Memory deterioration in an oxidative stress model and its correlation with cytological changes on rat hippocampus CA1. *Neurosci. Lett.* 270: 107-109.
- Arnold S.E., Smutzer G.S., Trojanowski J.Q. y Moberg P.J. 1998. Cellular and molecular neuropathology of the olfactory epithelium and central olfactory pathways in Alzheimer's disease and Schizophrenia. *Ann. New York Acad. Sci.* 855:762-775.
- Arsalane K., Gosset P., Vanhee D., Voisin C., Hamid Q., Tonnel A.B. y Wallaert B. 1995. Ozone stimulates synthesis of inflammatory cytokines by alveolar macrophages in vitro. *Am.J Respir. Cell. Mol. Biol.* 13: 60-68.
- Bahrami F., Bergman U., Brittebo E.B. y Brandt I. 2000 Persistent olfactory mucosal and increased olfactory bulb glial fibrillary acidic protein levels following a single dose of methylsulfonyl-dichlorobenzene in mice. Comparison of the 2,5- and 2,6-dichlorinated isomers. *Toxicol Appl. Pharmac.* 162:49-59.
- Benuck M., Banay-Schwartz M. y Lajtha A. 1993. Proteolytic activity is altered in brain tissue of rats upon chronic exposure to ozone. *Life Sci.* 52: 877-881.
- Bhalla D.K. 1999. Ozone-induced lung inflammation and mucosal barrier disruption: toxicology, mechanisms, and implications. *J. Toxicol. & Env. Health.* 2:31-36.
- Bils R.F. 1970. Ultrastructural alterations of alveolar tissue of mice. III. Ozone. *Arch. Environ. Health.* 20: 468-480.
- Blanc E.M., Bruce-Keller A.J. y Mattson M.P. 1998. Astrocytic gap junctional communication decreases neuronal vulnerability to oxidative stress-induced disruption of Ca²⁺ homeostasis and cell death. *J. Neurochem.* 70:958-970.
- Blasig I.E., Mertsch K., Ladhoff A. y Grune T. 1994. Lipid peroxidation and lipofuscin granula in brain endothelial cell cultures during reoxygenation. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 738:374-377.
- Blomberg A., Mudway I.S., Nordenhall C., Hedenstrom H., Kelly F.J., Frew A.J., Holgate S.T. y Sandstrom T. 1999. Ozone induced lung function decrements do not correlate with early airway inflammatory or antioxidant responses. *Eur. Respir.* 13(6): 18-28.

- Boorman G.A., Schwartz L.W. y Dungworth D.L. 1980. Pulmonary effects of prolonged ozone insult in rats: Morphometric evaluation of the central acinus. *Lab. Invest.* 43: 108-115.
- Bravo H.A., Sosa R.E. y Torres R.J. 1991. Ozono y lluvia ácida en la Ciudad de México. *Ciencias* 22: 33-40.
- Broeckaert F., Arsalane K., Hermans C., Bergamaschi E., Brustolin A., Mutti A y Bernard A. 1999 Lung epithelial damage at low concentrations of ambient ozone. *Lancet.* 353: 900-901.
- Buja L.M., Eigenbrodt M.L., Eigenbrodt E.H. 1993. Apoptosis and Necrosis. *Arch. Pathol. Lab Med.* 117: 1208-1213.
- Burgess J.W. y Coss R.G. 1983. Rapid effect of biologically relevant stimulation on tectal neurons: Changes in dendritic spine morphology after nine minutes are retained for twenty-four hours. *Brain Res* 266: 217-223.
- Burns A. 2000 Might olfactory dysfunction be a marker of early Alzheimer's disease?. *Lancet* 355: 84-85.
- Calderón G.L., y Ocotla G.R. 1993. Nasal cytology in southwest metropolitan México city inhabitants: a pilot intervention study. *Environ. Health. Perspectives.* 101:138-144.
- Carpenter M.B. y Sutin J. 1990. *Neuroanatomía Humana*. Ed. El Ateneo. Buenos Aires. pp 488.
- Carr V. McM. y Farbman A.I. 1993. The dynamics of cell death in the olfactory epithelium. *Exp. Neurol.* 124: 308-314.
- Catalá I., Ferrer I., Galofré E., Fábregues 1988 Decreased numbers of dendritic spines on cortical pyramidal neurons in dementia. A quantitative Golgi study on biopsy samples. *Hum. Neurobiol.* 6: 255-259.
- Chang M.M., Plopper W.R, y Hyde D.M. 1998. IL-8 is one of the major chemokines produced by monkey airway epithelium after ozone-induced injury. *Am.J.Physiol.* 275: L524-532.
- Chen L.Ch. y Qu Q. 1997. Formation of intracellular free radicals in guinea pig airway epithelium during *in vitro* exposure to ozone. *Toxicol. Appl. Pharmac.* 143: 96-101
- Colín B.L., Avila C.M.R., Fortoul T., Rugerio V.C., Machado S.J.P., Espinosa V.J. y Rivas A.S. 1999. Morphologic alteration of the olfactory bulb after acute ozone exposure in rats. *Neurosci. Lett.* 274: 1-4.
- Corwin J., Serby M., Conrad P y Rotrosen J. 1985. Olfactory recognition deficit in Alzheimer's and Parkinsonian dementias. *IRCS Med Sci.* 13:260.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

- Devlin R.B., Raub J.A. y Folinsbee L.J. 1997 Health effects of ozone. *Science & Medicine*. May/June 8-17.
- Dexter D.T., Carter C.J., Wells F.R., Javoy-Agid F., Lees A., Jenner P., Marsden C.D. 1989. Basal lipid peroxidation in substantia nigra is increased in Parkinson's disease. *J. Neurochem.* 52:381-389.
- Diplock A. T. 1994. Antioxidants and free radical scavengers. En: *Free Radical Research and its Control*. Rice-Evans C.A. y Burdon R.H. (Eds.). Marcel Dekker, New York. pp. 113-130.
- Donato S. 2000. Disorders related to mitochondrial membranes: pathology of the respiratory chain and neurodegeneration. *J. Inherited Metabolic Disease.* 23: 247-263.
- Doty R.L., Perl D.P. Steele J.C. 1991 Olfactory dysfunction in three neurodegenerative disease. *Geriatrics* 46 (suppl 1): 47-51.
- Doty R.L. 1987. Olfactory dysfunction in Alzheimer's disease. 1987. *Ann.N.Y. Acad. Sci.* 510: 260-262
- Doty R.L. y Snow J.B. 1988. Age-Related alterations in olfactory structure and function. En *Molecular Neurobiology of the Olfactory System*. Margolis F.L. y Getchell T.U. (Eds.) Plenum Press New York pp.351-374,
- Dryrks T., Dryrks E., Hartmann T., Masters C. y Beyreuther K. 1992. Amyloidogenicity of beta A4 and beta A4-bearing amyloid protein precursor fragments by metal-catalyzed oxidation *J. Biol. Chem.* 267:18210-18217.
- Dykens J.A. 1999. Free radicals and mitochondria dysfunction in excitotoxicity and neurodegenerative disease. En: *Cell death and Disease of the Nervous System*. Koliatsos V.E. y Ratan R.R. (Eds.) Human Press: Totowa, New Jersey. pp 45-66.
- Evans P.H. 1993. Free radicals in brain metabolism and pathology. *Brit. Med. Bull* 49: 577-587.
- Fanucchi M., Hotchkiss J.A. y Harkema J.K. 1998. Endotoxin potentiates ozone-induced mucous cell metaplasia in rat nasal epithelium. *Toxicol. Appl. Pharm.* 152: 1-9
- Farber J.L., Kyle M.E. y Coleman J.B. 1990. Biology of Disease. Mechanisms of cell injury by activated oxygen species. *Lab. Invest.* 62: 670-679.
- Fernandez-Checa J.C., García-Ruiz C., Colell A., Morales A., Mari M. Miranda M. y Ardite E. 1998. Oxidative stress: role of mitochondria and protection by glutathione. *Biofactors* 8 : 7-11.
- Ferrer I., Fàbregues I., Rairiz J. y Galofré E. 1986. Decreased numbers of dendritic spines on cortical pyramidal neurons in human chronic alcoholism. *Neurosc. Lett.* 69: 115-119.

- Floor E. y Wetzel M.G. 1998. Increased protein oxidation in human substantia nigra parts compacta in comparison with basal ganglia and prefrontal cortex measured with an phenylhydrazine assay. *J. Neurochem.* 70:268-275.
- Folinsbee L.J., Bedi J.F. y Horvath S.M. 1984. Pulmonary functions changes after one hour continuous heavy exercise in 0.21 ppm ozone. *J. Appl. Physiol: Respirat. Environ. Exercise Physiol.* 57: 984-988.
- Gartner L.P. y Hiatt J.L. 1997. *Histología*. McGraw-Hill Interamericana. México, pp 301-303.
- Granville D.J., Carthy Ch M., Hunt D.W.C. y McManus B.M. 1998. Apoptosis: Molecular aspects of cell death and disease. *Lab. Inv.* 78: 893-913.
- Goldstein B.Y. y Schwob J.E. 1996. Analysis of the globose basal cell compartment in rat olfactory epithelium using GBC-1, a new monoclonal antibody against globose basal cells. *J. Neurosci.* 16:4005-4016.
- Hackney J.D., Linn W.S., Buckley R.D., Pederson E.E., Karuza S.K., Law D.C. y Fisher D.A. 1975. Experimental studies on human health effects of air pollutants. I. Design and considerations. *Arch. Environ. Health.* 30: 373-378.
- Halliwell B. y Gutteridge J.M. 1984. Lipid peroxidation, oxygen radicals, cell damage and antioxidant therapy. *The Lancet.* 23:1396-1398.
- Halliwell B. 1989. Oxidants and the central nervous system. some fundamental questions. *Acta Neurol. Scand.* 126: 23-33.
- Harkema J.R., Plopper C.G. Hyde D.M. 1987. Effects of an ambient level of ozone on primate nasal epithelial mucosubstances. Quantitative histochemistry. *Am J. Pathol.* 127: 90-96.
- Harkema J.R., Plopper C.G. Hyde D.M., St George Ja., Wilson D.W. y 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.
- Harkema J.R., Hotchkiss J.A., Barr E.B., Bennett C.B. Gallup M., Lee J.K. y Basbaum C. 1999. Long-lasting effects of chronic ozone exposure on rat nasal epithelium. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* 20: 517-529.
- Harris K.M. 1999. Structure, development, and plasticity of dendritic spines. *Current Opinion in Neurobiology.* 9: 343-348.
- Hazbun M.E., Hamilton R., Holian A. y Eschenbacher W.L. 1993. Ozone-induced increases in substance P and 8-epi-prostaglandin F2 alpha in the airways of human subjects. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* 17: 100-106.

Biol. 9:568-572.

Hawkes C.H., Shephard B.C., Geddes J.F., Body G.D. y Martin J.E. 1998. Olfactory disorder in motor neuron disease. *Exp. Neurol.* 150: 248-253.

Hirai K., Aliev G., Nunomura A., Fujioka H., Russell R.L., Atwood C.S., Johnson A.B., Kress Y., Vinters H.V., Tabaton M., Shimohama S., Cash A.D., Siedlak S.L., Harris P.L.R., Jones P.K., Petersen R.B., Perry G y Smith M.A. 2001. Mitochondrial abnormalities in Alzheimer's disease. *J Neurosci.* 21:3017-3023.

Hiroshima K., Kohno T., Owada H y Hayashi Y. 1987. A morphological study of the effects of ozone on rat lung. *Exp. Mol. Pathol.* 47: 327-345.

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

Hotchkiss J.A., Harkema J.R. y Henderson R.F. 1991. Effect of cumulative ozone exposure on ozone induced nasal epithelial hyperplasia and secretory metaplasia in rats. *Exp. Lung Research.* 15:589-600.

Hotchkiss J.A., Harkema J.R. y Johnson N.F. 1997. Kinetics of nasal epithelial cell loss and proliferation in F344 rats following a single exposure to 0.5 ppm ozone. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 143: 75-82.

Huitrón Reséndiz S., Custodio-Ramírez V., Escalante-Membrillo C., Gonzalez-Piña y Paz C. 1994. Sleep alterations and brain regional changes of serotonin and its metabolite in rats exposed to ozone. *Neurosci. Lett.* 177:119-122.

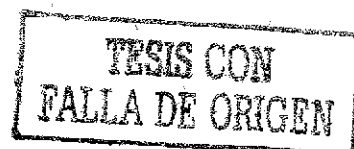
Ishii Y., Hashimoto K., Nomura A., Sakamoto T., Uchida Y., Ohtsuka M., Hasegawa S. y Sagai M. 1998. *Lung*, 176: 89-98.

Jacobs B., Driscoll L. y Schall M. 1997. Life-Span dendritic and spine changes in areas 10 and 18 of human cortex: A quantitative Golgi study. *J. Comp. Neurol.* 386: 661-680.

Janssen Y.M., Van Houten B., Borm P.J. y Mossmann B.T. 1993. Cell and tissue responses to oxidative damage. *Lab. Invest.* 63:261-274.

Jaspers I., Flescher E., y Chen L.C. 1997. Ozone-induced IL-8 expression and transcription factor binding in respiratory epithelial cells. *Am. J. Physiol.* 272: L504-L511.

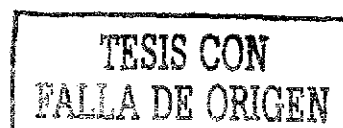
Johnson N.F., Hotchkiss J.A., Harkema J.R. y Henderson R.F. 1990. Proliferative responses of rat nasal epithelia to ozone. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 103: 143-155.



- Kandel E.R., Schwartz S.H. y Jessell T.M. 1991. Principles of Neural Science. Ed. Elsevier. New York. pp.512-518.
- Kehrl H.R., Vicent L.M. y Kowalsky R.J., Horsman D.H., O'Neil J.J., McCartney W.H. y Bromberg P.A. 1987. Ozone exposure increases respiratory epithelial permeability in humans. *Am. Rev. Respir. Dis.* 135: 1124-1128.
- Kerr J.F.R. y Harmon B.V. 1991. Definition and incidence of Apoptosis: An historical perspective. En *Apoptosis: The Molecular Basis of Cell Death*. Tomei D. (Ed.) Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York. pp.5-60.
- Koren H.S., Devlin R.B. y Graham D.E. Mann R., McGee P.M., Horstman H.D., Kozumbo J.W., Becker S., House E.D., McDonnell F.W. y Bromberg A.P. 1989. Ozone-induced inflammation in the lower airways of human subjects. *Am. Rev. Respir. Dis.* 139: 407-415.
- Kovacs I., Torok I., Zombori J. y Kasa P. 1998. Cholinergic structures and neuropathologic alterations in the olfactory bulb of Alzheimer's disease brain samples. *Brain Res.* 789: 167-170.
- Kowaltowski A.J. y Vercesi A.E. 1998. Mitochondrial damage induced by conditions of oxidative stress. *Free Rad. Med.* 26: 463-471.
- Krishna M.T., Madden J., Teran L.M. Biscione G.L., Lau L.C.K., Withers N.J., Sandström, Mudway I., Kelly F.J., Walls A., Frew A.J. y Holgate S.T. 1998. Effects of 0.2 ppm ozone on biomarkers of inflammation in bronchoalveolar lavage fluid and bronchial mucosa of healthy subjects. *Eur. Respir. J.* 11:1294-1300.
- Kruman I., Bruce-Keller A.J., Bredesen D., Waeg G. y Mattson M.P. 1997. Evidence that 4-hydroxynonenal mediates oxidative stress-induced neuronal apoptosis. *J. Neurosci.* 17:5089-5100.
- Leikauf G.D., Simpson L.G., Santrock J., Zhao Q., Abbinante-Nissen J., Zhou S. y Driscoll K.E. 1995. Airway epithelial cell responses to ozone injury. *Environ. Health. Perspect.* 103 (Suppl 2): 91-95.
- Lescudron L., Jaffard R. y Verna A. 1989. Modifications in number and morphology of dendritic spines resulting from chronic ethanol consumption and withdrawal: A Golgi study in the mouse anterior and posterior hippocampus. *Exp. Neurol.* 106: 156-163.
- Lenaz G. 1998. Role of mitochondria in oxidative stress and ageing. *Biochim Biophys. Acta.* 1366 : 53-67.
- Lippmann M. 1989. Health effects of ozone: A critical review. *J. Air Pollut. Control Assoc.* 39: 672-695.

- Longphre M., Zhang L-Y., Harkema J.R. y Kleeberger S.R. 1996. Mast cells contribute to O₃-induced epithelial damage and proliferation in nasal and bronchial airways of mice. *Am. Physiol. Soc.* 1322-1330.
- Majewska A., Tashiro A y Yuste R. 2000. Regulation of spine calcium dynamics by rapid spine motility. *J. Neurosci.* 20: 8262-8268.
- Matus A. 2000. Actin-based plasticity in dendritic spines. *Science.* 290: 754-758.
- McDonnell W.F., Kehrl H.R y Abdul- Salaam S. 1991. Respiratory response of humans exposed to lower levels of ozone for 6.6 hours. *Arch. Environ. Health.* 46: 145-150.
- McGee M., Devlin R., Saluta G. y Koren H.S. 1990. Tissue factor and factor VII messenger RNAs in human alveolar macrophages: effects of breathing ozone. *Blood.* 75: 122-127
- McLean J.H., Shipley M.T. y Bernstein D.I. 1989. Golgi-like, transneuronal retrograde labelling with CNS injections of herpes simplex virus type I. *Brain Res. Bull.* 22:867-881.
- Mena-López R. y Rivera-Rosas H. 1993. La enfermedad de Alzheimer: una revisión. *Rev. Biomed.* 4:205-217.
- Menzel D.B. y Meacher D.M. 1999. Ozone and nitrogen dioxide. En *Reactive Oxygen Species in Biological System.* Gilbert and Colton (Eds.) Academic Plenum, New York pp 335-366.
- Miller L.A., Barnett N.L., Sheppard D. y Hyde D.M. 2001. Expression of the beta6 integrin subunit is associated with sites of neutrophil influx in lung epithelium. *J. Histochem & Cytochem.* 49:41-48.
- Mudway I.S. y Kelly F.J. 2000. Ozone and the lung: a sensitive issue. *Molecular Aspects Medicine.* 21:1-48.
- Moser M.B., Trommald M. y Andersen P. 1994. An increase in dendritic spine density on hippocampal CA1 pyramidal cells following spatial learning in adult rats suggests the formation of new synapses. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91:12673-12675.
- Müller W. y Connor J.A. 1991. Dendritic spines as individual neuronal compartments for synaptic Ca²⁺ responses. *Nature.* 354: 73-76.
- Newson E.J., Krishna M.T., Lau L.C., Howarth P.H., Holgate S.T. y Frew A.J. 2000. Effects of short-term exposure to 0.2 ppm ozone on biomarkers of inflammation in sputum exhaled nitric oxide, and lung function in subjects with mild atopic asthma. *J. Occup. & Env. Med.* 42: 270-7.
- Nikula K.J., Wilson D.W., Giri S.N., Plopper Chg., Dungworth D.L. 1988. The response of the rat tracheal epithelium to ozone exposure. *Am. J. Pathol.* 131: 373-383.

- Noviski N., Brewer J.P., Skornik W.A., Galli S.J., Drazen J.M. y Martin T.R. 1999. Mast cell activation is not required for induction of airway hyperresponsiveness by ozone in mice. *J. Appl. Physiol.* 86:202-10.
- Olanow C. 1993. A radical hypothesis for neurodegeneration. *TINS.* 16(11).
- Olanow C. y Arendash G. 1994. Metals and free radicals in neurodegeneration. *Curr. Opin. Neurol.* 7:548-558.
- Oehme F.W., Coppock R.W., Mostrom M-S, Khan A.A. 1996. A review of the toxicology of air pollutants: Toxicology of chemical mixtures. *Vet. Human. Toxicol.* 38: 371-377.
- Oyama Y., Okazaki E., Chikahisa L., Nagano T. y Sadakata Ch. 1996. Oxidative stress-induced increase in intracellular Ca^{2+} and Ca^{2+} -induced increase in oxidative stress: an experimental model using dissociated rat brain neurons. *Jpn J. Pharmacol.* 72:381-385.
- P'an A.Y.S., Beland J. y Jegier Z. 1972. Ozone-induced arterial lesions. *Arch. Environ. Health* 24: 229-232.
- Park J.S., Bateman M.C. y Golberg M.P. 1996. Rapid alterations in dendritic morphology during sublethal hypoxia or glutamate receptor activation. *Neurobiol. Dis.* 3: 215-227.
- Paz C. y Huitrón-Reséndiz (1996). The effects of ozone exposure on the sleep-wake cycle and serotonin contents in the pons of the rat. *Neurosci. Lett.* 204: 49-52.
- Paz C. 1997. Some consequences of ozone exposure on health. *Arch. Med. Res.* 28: 163-170.
- Pearson R.C.A., Esiri M.M., Hiorns R.W. Wilcock G.K. y Powell T.P.S. 1985. Anatomical correlates of the distribution of the pathological changes in the neocortex in Alzheimer disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 82:4531-4534.
- Pendimo K.J., Shuler R.L., Laskin J.D. Laskin D.L. 1994. Enhanced production of interleukin-1, tumor necrosis factor-alpha and fibronectin by rat lung phagocytes following inhalation of pulmonary irritant. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* 11: 279-286.
- Pino M.V., Levin J.R., Stovall M.Y. y Hyde D.M. 1992. Pulmonary inflammation and epithelial injury in response to acute ozone exposure in the rat. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 122: 64-72.
- Plopper C.G., Hatch G.E., Wong V., Duan, Weir A.J. Tarkington B.K., Devlin R.B. Becker S. y Buckpitt A.R. 1998. Relationship of inhaled ozone concentration to acute tracheo bronchial epithelial injury, site-specific ozone dose and glutathione depletion in Rhesus monkeys. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 19: 387-399.
- Pongrácz F. 1985. The function of dendritic spines. A theoretical study. *Neuroscience.* 15: 933-946.



Postlethwait E.M., Cueto R., Velsor L.W. Pryor W.A. 1998. O₃- induced formation of bioactive lipids: estimated surface concentrations and lining layer effects. *Am. J. Physiol.* 274 : 1006-16.

Practico D. y Delanty Norman. 2000. Oxidative injury in disease of the Central Nervous System: Focus on Alzheimer's disease. *Am. J. Med.* 109: 577-585.

Pryor W.C. 1976. Free radicals reactions in biology: Initiation of lipiantioxidation by ozone and ozone and nitrogen dioxide. *Env. Health Perspect.* 16:1980-1981.

Putman E., van Golde L.M.G. y Haagsman H.P. 1997. Toxic oxidant species and their impact on the pulmonary surfactant system. *Lung* 175: 75-103.

Quartz S.R. y Sejnowski T. J. 1998. The neural basis of cognitive development: a constructivist manifesto. *Behav. Brain Sci.* 20:537-556.

Ramón A.C. 1999 Regeneración de la médula espinal. *Investigación y Ciencia.* julio pp. 20-22.

Rehn B., Panhuber H., Laing D.G. y Breipohl W. 1988. Spine density on olfactory granule cell dendrites is reduced in rats reared in a restricted olfactory environment. *Dev. Brain. Res.* 40: 43-147.

Rice-Evans C.A. 1994. Formation of free radicals and mechanisms of action in normal biochemical processes and pathological states: En *Free radical damage and its control* Rice-Evans y Burdon R.H. (Eds.) pp.131-153.

Richards D., Dean R.T. y Jessup W. 1988. Membrane proteins are critical target in free radical mediated cytolysis. *Biochemica et Biophysica Acta.* 946:281-288.

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

Rivas-Arancibia S., Colín-Barenque L., Dorado-Martinez C y Fortoul T. 2001. Estrés oxidativo y Neurodegeneración. En: *Tópicos Selectos de Neurociencias.* Velázquez Moctezuma J. (Ed) UAM. México. pp 351-374.

Rossum D.v. y Hanisch U.K. 1999. Cytoskeletal dynamics in dendritic spines: direct modulation by glutamate receptors?. *Trends. Neurosci.* 22: 290-295.

Rusznak C., Devalia J.L., Sapsford R.J. y Davies R.J. 1996. Ozone-induced mediator release from human bronchial epithelial cells *in vitro* and the influence of nedocromil sodium *Eur. Respir. J.* 9: 2298-2305.

- Salmon M., Koto H., Lynch O.T., Haddad E.B., Lamb N.J., Quinlan G.J., Barnes P.J. y Chung K.F. 1998. Proliferation of airway epithelium after ozone exposure. *Am. J. Crit. Care Med.* 157 : 970-977.
- Sánchez Q. 1992. La Ciudad de México y la contaminación atmosférica. Ed. Limusa. México D.F. pp37.
- Sandström T. 1995. Respiratory effects of air pollutants: experimental studies in humans. *Eur. Respir. J.* 8: 976-995.
- Schapira A.H.V. 1994. Mitochondrial dysfunction in neurodegenerative disorders and aging. En: *Mitochondrial disorders in Neurology.* Shapira H.V. y DiMauro (Eds.). Butterworth Heinemann. Oxford. pp227-244.
- Schelegle E.S., Adams W.C., Giri S.N. y Sjekin A.D. 1989. Acute ozone exposure increase plasma PGF_{2a} in ozone-sensitive human subjects. *Am. Rev. Respir. Dis.* 140: 211-216.
- Schierhorn K., Zhang M., Matthias C. y Kunkel G. 1999. Influence of ozone and nitrogen dioxide on histamine and interleukin formation in a human nasal mucosa culture system. *Am.J.Cell Mol. Biol.* 20:1013-1019.
- Schwartzman R.A. y Cidlowski J.A. 1993. Apoptosis: The biochemistry and molecular biology of programmed cell death. *Endocr. Rev.* 14: 133-151.
- Schwartz L.W. Dungworth D.L. Mustafa M.G. 1976. Pulmonary responses of rats to ambient levels of ozone. Effects of 7-day intermittent or continuous exposure. *Lab. Invest.* 34: 565-578.
- Scott J.W. and Aaron D. 1977. Averaged induced waves in the olfactory bulb of the rat during odor stimulation. *Exp. Neurol.* 55: 654-665.
- Simonian N.A. y Coyle J.T. 1996. Oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 36:83-106.
- Shepherd G.M. 1995. The synaptic organization of the brain. Oxford University Press, Oxford. pp.133-169.
- Shepherd G.M. 1996. The dendritic spine: A multifunctional integrative unit. *J. Neurophysiol.* 75: 2197-2210.
- Shiplely M.T., McLean J.H. y Ennis M. 1995 Olfactory System. En: *The Rat Nervous System.* (Paxinos Ed.). Academic Press. New York. pp.899-925.
- Smith M.A., Perry P.L., Richey P.L., Sayre L.M., Anderson V.E., Beal M.F., Kowall N. 1996. Oxidative damage in Alzheimer's disease. *Nature.* 382: 120-121.

- Smith M.A., Rottkamp C.A., Nunomura A., Raina A.K. y Perry G. 2000. Oxidative stress in Alzheimer's disease. *Biochimica Biophysica Acta*. 1502:139-144.
- Smythies J. 1999 The neurochemical basis of learning and neurocomputation: the redox theory. *Behav. Brain Res.* 99:1-6.
- Spector D.M. Lippman M. y Liou P J. 1988. Effects of ambient ozone on respiratory function in active, normal children. *Am. Rev. Respir. Dis.* 137: 313-320.
- Struble R.G. y Clark B. 1992. Olfactory bulb lesions in Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging.* 13: 469-473.
- Su W.Y. y Gordon T. 1996. Alterations in surfactant protein A after acute exposure to ozone. *J. Appl. Physiol.* 80: 1560-1567.
- Sunanda, Rao M.S. y Raju T.R. 1995. Effect of chronic restraint stress on dendritic spines and excrescences of hippocampal CA3 pyramidal neurons-a quantitative study. *Brain Res.* 694: 312-317.
- Suzuki Y. y Farbman A.I. 2000. Tumor necrosis factor- α -induced apoptosis in olfactory epithelium *in vitro*: Possible roles of caspase 1 (ICE), caspase 2 (ICH-1), and caspase 3 (CPP32). *Exp. Neurol.* 165:35-45.
- Torreilles F., Salman-Tabcheh S., Guérin M.Ch. y Torreilles J. 1999. Neurodegenerative disorders the role of peroxynitrite. *Brain Res. Rev.* 30:153-163.
- Tsukogashi H., Haddad E B., Sun J., Barnes P.J. and Chung K.F. 1995 Ozone- induced airway hyperresponsiveness: Role of superoxide anions, NEP and BK receptors. *J Appl. Physiol.* 78: 1015-1022.
- Urano S., Asai Y., Makabe S., Matsuo M., Izumiyama N., Ohtsubo K. y Endo T. 1997. Oxidative injury of synapse and alteration of antioxidative defense systems in rats, and its prevention by vitamin E. *Eur.J.Biochem.* 245:64-70.
- Wanner H.U. 1993 Effects of atmospheric pollution on human health. *Experientia.* 49. 754-758.
- Ward C.D., Hess W.A. y Calne D.B. 1983. Olfactory impairment in Parkinson's disease. *Neurology.* 33:943-946.
- Wilson D.W., Plopper C.G. y Dungworth D.L. 1984. The response of the macaque tracheobronchial epithelium to acute ozone injury: A quantitative ultrastructural and autoradiographic study. *Am J. Pathol.* 116: 193-206.

Wilson J.X. 1997 Antioxidant defense of the brain: a role for astrocytes. *Can J. Physiol. Pharmacol.* 75:1149-1163.

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

Yankner B., Dawes L., Fisher S., Villa-Komaroff L. y Oster-Granite M. 1989. Neurotoxicity of a fragment of the amyloid precursor associated with Alzheimer's disease. *Science.* 245:417-420.

Yin D. y Brunk U. 1998. Autofluorescent Ceroid/lipofuscin. En *Free radical and antioxidant protocols.* Armstrong D. (Ed.) Humana Press. Totowa, New Jersey. pp. 217-227.

Yuste R y Bonhoeffer T. 2001. Morphological changes in dendritic spines associated with long-term synaptic plasticity *Annu.Rev.Neurosci.* 24:1071-1089.