

Indometacina protege de los efectos del ozono sobre el sueño

*M.C. Luxiola-González, **Alfaro-Rodríguez Alfonso, ***Verduzco-Mendoza Antonio, ****Escalante-Membrillo Carmen, *****Bueno-Nava Antonio, *****González-Piña Rigoberto.

Resumen

El ozono (O_3) produce efectos extrapulmonares cuyos mecanismos de toxicidad no son del todo claros debido a que no se difunde más allá del tracto pulmonar. Es probable que sus efectos involucren a las prostaglandinas (PG) y al óxido nítrico (NO), como resultado de las reacciones entre el O_3 y el factor surfactante. Con el fin de evaluar esta hipótesis, se administró indometacina (IND), un inhibidor de la producción de estas sustancias, a ocho ratas expuestas a 1 ppm de O_3 . Se empleó al sueño como modelo extrapulmonar de toxicidad, por lo que se aplicaron implantes a los animales para realizar registros poligráficos, los cuales se tomaron durante 24 horas en cada una de las siguientes condiciones: 1. exposición a aire libre de contaminantes; 2. IND, IM (4 mg/kg) + exposición a aire libre de contaminantes; 3. exposición a 1 ppm de O_3 y 4. IND + exposición a la misma dosis de O_3 . Se encontró que el O_3 aumenta el sueño de ondas lentas y disminuye el sueño paradójico, fase en la cual la IND mostró un claro efecto protector. Los resultados sugieren que los mecanismos que subyacen a la toxicidad extrapulmonar debida al O_3 están mediados por la producción y la acumulación del NO, considerando su papel en la expresión del sueño.

Palabras clave: ozono, indometacina, óxido nítrico, sueño de ondas lentas, sueño paradójico.

Abstract

Ozone (O_3) exposure cause extrapulmonary effects, whose mechanisms are unclear, since O_3 do not pass beyond the pulmonary tract. An involvement of prostaglandins (PG) and nitric oxide (NO), two molecules produced by reactions between O_3 and the surfactant factor, has been proposed. In order to assay that hypothesis, we administrated indometacin (IND, 4 mg/kg), a PG and NO inhibitor, to eight male wistar rats exposed to 1 ppm of O_3 . Sleep was the extrapulmonary toxicity model employed; so, animals were implanted in order to record polygraphically sleep states. Sleep recordings were taken during 24 hours in every of the experimental conditions: 1. clean-air exposure; 2. IND + clean air; 3. 1 ppm of O_3 exposure, and 4. IND + O_3 exposure. It was found an increase of slow waves sleep and a concomitant decrease of paradoxical sleep when rats were exposed to O_3 . IND showed a protective effect mainly on paradoxical sleep. Regarding its role in sleep maintenance, results suggest that NO production and accumulation could be primarily involved in the extrapulmonary toxicity induced by O_3 exposure.

Key words: ozone, indometacin, nitric oxide, slow waves sleep, paradoxical sleep.

*Laboratorio de Fisiología Animal, Universidad de Regensburg, Alemania. **Laboratorio de Neuroquímica, Instituto de la Comunicación Humana, Centro Nacional de Rehabilitación, SSA, México. ***Laboratorio de Cirugía Experimental, Instituto de la Comunicación Humana, Centro Nacional de Rehabilitación, México. ****Departamento de Banco de Sangre y Análisis Clínicos, Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía "Manuel Velasco Suárez", SSA, México. *****Laboratorio de Plasticidad Cerebral y Proliferación Celular, Instituto de la Comunicación Humana, Centro Nacional de Rehabilitación, SSA, México.

Introducción

El ozono (O_3) es el gas más distribuido en la atmósfera de las ciudades con altos niveles de contaminación ambiental.¹ En los últimos años, se han identificado diversos usos terapéuticos del O_3 en campos tales como la ginecoobstetricia² y la otorrinolaringología, en particular para el tratamiento de la otitis media.³ Aun con ello, complicaciones tales como la inesperada muerte de un paciente⁴ justifican la necesidad de investigar los efectos adversos de este gas sobre el organismo.

La exposición al O_3 se caracteriza, sobre todo, por ocasionar toxicidad inmediata en el sistema respiratorio⁵ y por sus efectos oxidantes dentro del organismo (peroxidación lipídica en el tejido pulmonar debida a la producción de radicales libres).⁶ También se han demostrado efectos extrapulmonares del O_3 tales como incremento de la peroxidación lipídica en corazón y cerebro de ratas expuestas durante varios días a este gas.⁷ El sistema nervioso es, en particular, muy vulnerable al estrés causado por los radicales libres y se han reportado diversas alteraciones en las funciones cerebrales de animales expuestos al O_3 . Por ejemplo, se ha descrito la disminución del sueño paradójico (SP) y el incremento del sueño de ondas lentas (SOL) tanto en gatos⁸ como en ratas.^{9, 10}

Se ha referido también un deterioro de la memoria,¹¹ así como la facilitación del desarrollo de crisis convulsivas en el modelo de la *kindling* (inflamación) amigdalina.¹² Los mecanismos bioquímicos que subyacen al control del sueño también se han visto alterados,^{13, 14} más aún la actividad serotoninérgica en el núcleo del rafe dorsal¹⁵ y el área preóptica medial (APM),¹⁶ estructura en la cual se ha encontrado, asimismo, reducción de las concentraciones de acetilcolina.¹⁷

No obstante, el O_3 no es capaz de viajar a través del organismo más allá de la barrera bronquioalveolar, por lo que se piensa que los efectos extrapulmonares observados ante la exposición a este gas se deben a algunos productos de reacción entre el O_3 y los tejidos de las vías aéreas. Entre éstos se encuentran las prostaglandinas (PG),¹⁸ los radicales libres¹⁹ y el óxido nítrico (NO).²⁰

Aunque las PG y el NO modulan algunas de las respuestas del sistema inmunitario, también se relacionan con diversas funciones neurofisiológicas, incluida la regulación del ciclo del sueño en los mamíferos.²¹⁻²³ En particular, se considera a la PG D_2 como una de las más

potentes promotoras del sueño,²³⁻²⁵ y se ha demostrado que la barrera hematoencefálica es permeable a estas sustancias.²⁶

Así pues, la participación de cualquiera de dichas moléculas, o la de ambas, puede presuponerse en los efectos de la exposición al O_3 . En consecuencia, cabría esperar que, al inhibir su producción, pudieran revertirse los efectos de la exposición a este gas sobre los estados del sueño. Considerando que el sueño es producto de la actividad integradora del sistema nervioso central, el propósito de este trabajo fue evaluar los efectos de indometacina (IND), un inhibidor de la síntesis de PG, sobre los estados de sueño en ratas expuestas a O_3 .

Material y métodos

- **Animales.** Se utilizaron ocho ratas macho de la cepa *wistar* con pesos de entre 250 y 300 g, a las que se mantuvo en condiciones estándares de bioterio, con acceso libre a alimento y agua, y un ciclo de 12 horas de luz/oscuridad. El tratamiento de los animales se apegó a las recomendaciones del *National Research Council* de EUA,²⁷ conforme con los lineamientos detallados por González-Piña y Escalante-Membrillo.²⁸

- **Implante de electrodos.** Los animales fueron anestesiados con pentobarbital sódico (40 mg/kg, IP) y se les implantaron electrodos bipolares de acero inoxidable (*A-M Systems, Inc.*) en los músculos del cuello para el electromiograma (EMG), y en la corteza sensorimotora derecha para el electroencefalograma (EEG). Los electrodos se fijaron a la superficie del hueso mediante acrílico dental y tornillo de fijación (*Bioanalytical Systems*).

- **Exposición al O_3 y registro poligráfico.** Siete días después de la cirugía, los animales fueron colocados en cajas de acrílico transparente (30 x 22 x 22 cm) con libre acceso a alimento y agua. Entonces, se les conectó a un polígrafo (*Grass, 7D*) cuyos filtros se ajustaron a pasa-bajas 30 Hz, pasa-altas 0.1 Hz para EEG en el canal 1, mientras que en el canal 2 se ajustaron a pasa-bajas 300 Hz y pasa-altas 10 Hz para EMG. Luego de ello, se tomó un registro basal del sueño durante 24 horas con los animales expuestos a aire filtrado libre de contaminantes (4 L/min). Tras concluir este registro, se aplicó a las ratas una dosis de 4 mg/kg de IND, IM, y se efectuó un nuevo registro de sueño durante la exposición a aire libre de

contaminantes. Al finalizar estos registros, los animales fueron trasladados a condiciones estándares de bioterio en las que permanecieron durante ocho días.

Después de este lapso, se tomó un nuevo registro de sueño durante 24 horas en condiciones de exposición a una mezcla de O_3 (1 ppm) y aire filtrado. El O_3 se administró mediante un generador de luz UV (*Trizon, P-15*) y su concentración se midió utilizando un medidor fotométrico (*DASIBI, 1008-PC*). Finalizado este registro, los animales volvieron a las condiciones de bioterio durante ocho días. Tras concluir este periodo, se les aplicaron 4 mg/kg, IM, de IND (*SIGMA, San Luis, MO*) y se tomó un nuevo registro de sueño durante 24 horas en condiciones de exposición a 1 ppm de O_3 .

• **Cuantificación de los estados de vigilia (V).** Se analizaron los registros poligráficos de manera visual mediante la clasificación electrofisiológica de la V, el SOL y el SP. El criterio electrofisiológico para definir los estados de sueño fue el siguiente:

- V: caracterizada por la desincronización del EEG con presencia de tono muscular.
- SOL: definido por la presencia de husos de sueño y señales de alto voltaje en el EEG, con disminución de la actividad muscular.
- SP: caracterizado por la desincronización del EEG y la ausencia total de tono muscular.

El parámetro básico de medición fue el porcentaje de tiempo total que, en cada registro de 24 horas, pasaron los animales en V, SOL y SP.

• **Expresión de resultados y estadística.** Dada la naturaleza de las variables estudiadas, se utilizó un análisis no paramétrico de Friedman. Cuando las diferencias fueron significativas, se aplicó una *W* de Wilcoxon para el contraste. Se ajustó un nivel de significancia máximo de $p < 0.05$ utilizando el criterio de dos colas.

Resultados

El análisis de los datos mostró que los animales pasaron $41.1 \pm 2.8\%$ del tiempo en V mientras respiraban aire libre de contaminantes. Este porcentaje fue muy similar al observado en los mismos animales al inyectárseles IND ($44.6 \pm 2.9\%$). Sin embargo, la V disminuyó notablemente cuando fueron expuestos al O_3 , ya que durante este periodo sólo permanecieron $19.0 \pm 1.8\%$ del tiempo en V. Las ratas a las que se les administró IND y fueron expuestas a O_3

permanecieron $33.5 \pm 1.7\%$ del tiempo en V, lo cual fue significativamente superior a lo observado en animales expuestos a O_3 , pero inferior a lo encontrado en los expuestos a aire libre de contaminantes (**Figura 1**).

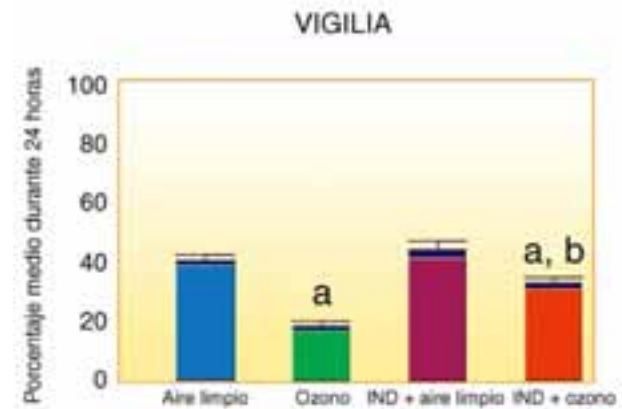


Figura 1. Cantidad relativa promedio en la que los animales permanecieron en V durante un periodo de 24 horas. Se observa una disminución significativa durante la exposición al O_3 , con una tendencia protectora de la IND ante los efectos de este gas. Empero, la protección no fue total. (a: significativo con respecto a aire limpio; b: significativo con respecto a O_3 ; *W* de Wilcoxon: $p \leq 0.05$.)

Por su parte, el SOL presentó un patrón similar al de reportes previos: la exposición al O_3 incrementó el tiempo en que los animales permanecieron en SOL ($50.0 \pm 2.8\%$ de SOL en controles), mientras que los mismos animales expuestos a O_3 presentaron $78.6 \pm 1.6\%$, lo cual equivale a un aumento significativo. En este sentido, no se observaron efectos significativos debidos a la administración de IND en animales expuestos a aire libre de contaminantes, ya que el porcentaje de tiempo que permanecieron en SOL ($51.4 \pm 1.9\%$) no acusó diferencias significativas con respecto al encontrado en los controles. Se observó que los animales a los que se administró IND y expuestos a O_3 alcanzaron una cantidad menor de SOL que los expuestos a O_3 sin administración de IND; esta cantidad fue significativamente más alta que la observada en controles ($62.1 \pm 1.9\%$; **Figura 2**).

Los efectos más relevantes se observaron en el SP, cuyo porcentaje en condiciones de exposición a aire libre de contaminantes fue de $4.3 \pm 0.3\%$. Este porcentaje es muy parecido al encontrado cuando a los animales se les suministró IND y fueron expuestos tanto a aire libre de contaminantes ($4.7 \pm 0.4\%$) como a 1 ppm de O_3 ($4.6 \pm$

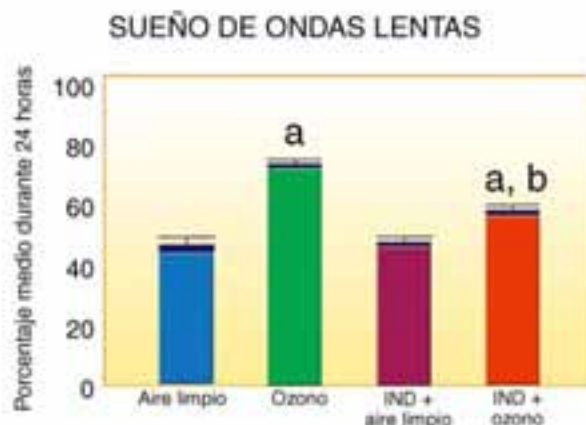


Figura 2. Cantidad relativa promedio en la que los animales permanecieron en SOL durante un periodo de 24 horas. Esta fase de sueño se incrementó significativamente durante la exposición al O_3 , con una tendencia protectora de la IND ante los efectos de este gas, de manera semejante a lo encontrado en la vigilia. (a: significativo con respecto a aire limpio; b: significativo con respecto a O_3 ; W de Wilcoxon: $p \leq 0.05$.)

0.5%). Estos valores contrastan significativamente con una disminución importante de SP durante la exposición al O_3 sin suministro de IND ($2.4 \pm 0.5\%$, **Figura 3**).



Figura 3. Cantidad relativa promedio en la que los animales permanecieron en SP durante un periodo de 24 horas. Esta fase de sueño disminuyó significativamente cuando las ratas fueron expuestas a O_3 , con una clara tendencia protectora de la IND contra los efectos de este gas en esta fase del sueño. (a: significativo con respecto a aire limpio; W de Wilcoxon: $p \leq 0.05$.)

Discusión

De acuerdo con los resultados del presente estudio, la exposición a 1 ppm de O_3 ejerce sobre el sueño efectos muy similares a los reportados previamente; estos efectos consisten, sobre todo, en disminución de SP e incremento de SOL,^{9, 10, 16} lo que convalida las técnicas de registro empleadas en este trabajo.

Debe destacarse que la IND por sí sola no produjo cambio alguno en los porcentajes de sueño con respecto a los registros control, aunque fue notable su efecto relativamente protector contra los efectos del O_3 sobre la V y el SOL; en cuanto al SP, la IND bloqueó totalmente la toxicidad mediada por O_3 .

Lo anterior puede explicarse al considerar la producción de moléculas secundarias que el O_3 genera al entrar en contacto con las mucosas de las vías aéreas y el factor surfactante.²⁹ Entre dichas moléculas se encuentran especies reactivas que viajan a otros órganos a través de la sangre mediante un mecanismo de cascada oxidativa,³⁰ y también se producen PG, formadas como respuesta al efecto del radical hidroxilo,³¹ la especie reactiva más oxidante que se conoce.

Es posible que las PG puedan viajar desde los pulmones hasta otros órganos, ya que se ha encontrado un incremento de PG E_2 en el plasma de ratas expuestas a 4 ppm durante ocho horas.¹⁸ En cerebro, los efectos de las PG pueden ir desde la promoción hasta la inhibición del sueño.³² No obstante, aunque la PG E_2 suprime el SP,³³ ello no explica el incremento de SOL en ratas expuestas a O_3 .

La evidencia más reciente sugiere la participación del NO, producido en pulmón en gran medida debido a la síntesis de PG, la cual se incrementa ante la exposición a O_3 . Algunos autores sugieren que la toxicidad derivada de la exposición a O_3 podría estar mediada por la acción del NO^{20, 34} y no por la acción de las PG. El NO es capaz, incluso, de acumularse en los tejidos, por lo que se esperaría que los efectos del O_3 continuaran expresándose aún después de concluida la exposición. Existen reportes sobre tales efectos remanentes posteriores a la exposición,^{13, 15, 35} lo cual sustenta la hipótesis sobre la importante participación del NO como parte del mecanismo de toxicidad debida a O_3 .

Por su parte, la síntesis de PG involucra la producción de NO debido a los efectos de la ciclooxigenasa (COX). Asimismo, la IND es un antiinflamatorio no esteroideo (AINE) que ejerce su actividad mediante la inhibición de la COX-2.³⁶ Debido a ello, es fácil inferir que el efecto protector de la IND ante la exposición a O_3 puede deberse al bloqueo de la producción de NO mediada por la COX. Esto es importante porque implica que los efectos extrapulmonares debidos a O_3 pueden bloquearse desde los primeros niveles de contacto de este gas con las vías

aéreas. De acuerdo con este concepto, sugerido en reportes previos, la administración de vitamina E (un bloqueador de la producción de radicales libres) protege de los efectos del O₃ sobre las catecolaminas cerebrales.³⁷

Aunque —de acuerdo con diversos reportes— algunos efectos de la exposición al O₃ sobre las vías respiratorias son similares entre animales experimentales y humanos,³⁸ ³⁹ en pocos estudios se describen los efectos del O₃ sobre el sistema nervioso central humano. En individuos de la especie humana, se han observado fatiga, letargia y dolor de cabeza,⁴⁰ probablemente como resultado de los efectos del O₃ sobre el ciclo humano de sueño-vigilia.

Las alteraciones del sueño observadas tras la exposición a O₃ pueden ser un efecto secundario importante en la terapia relacionada con este gas, dado que una baja calidad del sueño en niños suele conducir a problemas de aprendizaje. Pero mientras no se estudien lo suficiente los efectos del O₃ sobre el sistema nervioso humano, la prescripción del tratamiento con O₃ debe evaluarse con todo cuidado, o bien debe considerarse el uso concomitante de antioxidantes y/o antiinflamatorios.

Referencias

- Bravo H, Roy-Ocotla G, Sánchez P, Torres R. Contaminación atmosférica por ozono en la zona metropolitana de la ciudad de México: evolución histórica y perspectivas. *Rev Coord Gral Estad Postrad* 1991; 23: 39-48.
- Andikyan VM, Voloshchuk IN, Kovganko PA, Clemente JM. Morphofunctional changes in the placenta after ozone therapy. *Bull Exp Biol Med* 2001; 130: 715-8.
- Pogosov VS, Miroshnichenko NA, Tabinsev AN. Medial ozone in combination with low-frequency ultrasound therapy of patients with chronic purulent otitis media. *Vestn Otorinolaringol* 2001; 5: 24-5.
- Marchetti D, LaMonaca G. An unexpected death during oxygen-ozone therapy. *Am J Forensic Med Pathol* 2000; 21: 144-7.
- Willson DW, Plopper CG, Kauffman HK. The responses of the macaque tracheobronchial epithelium to acute ozone injury. *Am J Pathol* 1984; 116: 193-206.
- Pryor WA, Church DF. The reaction with ozone with unsaturated fatty acids: aldehydes and hydrogen peroxide as mediators of ozone toxicity. En: Davis KJA (ed.). *Oxidative damage and repair: chemical, biological and medical aspects*. Pergamon Press, New York, 1991; p. 142.
- Rahman UI, Massaro GD, Massaro D. Exposure of rats to ozone: evidence of damage to heart and brain. *Free Radic Biol Med* 1992; 12: 323-6.
- Paz C, Bazan-Perkins B. Sleep-wake disorganization in cats exposed to ozone. *Neurosci Lett* 1992; 140 (2): 270-2.
- Arito H, Uchiyama I, Yokoyama E. Acute effects on EEG activity, sleep-wakefulness and heart rate in rats. *Industrial Health* 1992; 30 (1): 23-34.
- Huitron-Resendiz S, Custodio-Ramirez V, Escalante-Membrillo C, Gonzalez-Piña R, Paz C. Sleep alterations and brain regional changes of serotonin and its metabolite in rats exposed to ozone. *Neuroscience Lett* 1994; 117: 119-22.
- Avila-Acosta MR, Colin-Barenque L, Fortoul TI, Machado-Salas JP, Espinoza-Villanueva J, Rugeiro-Vargas C, Rivas-Arancibia S. Memory deterioration in an oxidative stress model in its correlation with cytological changes on rat hippocampus CA1. *Neurosci Lett* 1999; 270: 107-9.
- Escalante-Membrillo C, Paz C. Development of an experimental model of epilepsy in rats exposed to ozone. *Toxicol Lett* 1997; 93: 103-7.
- Gonzalez-Piña R, Paz C. Brain monoamine changes in rats after short periods of ozone exposure. *Neurochem Res* 1997; 22: 63-6.
- Cottet-Emard JM, Dalmaz Y, Pequignot J, Peryrin L, Pequignot JM. Long term exposure to ozone alters peripheral and central catecholamines activity in rat. *Pflügers Arch Eur J Physiol* 1997; 433: 744-9.
- Gonzalez-Piña R, Alfaro-Rodriguez A, Morales-Martinez JJ. The role of the dorsal raphe in the sleep disruptions produced by ozone exposure. *Proc West Pharmacol Soc* 2003; 46: 116-20.
- Gonzalez-Piña R, Alfaro-Rodriguez A. Ozone exposure alters 5-hydroxy-indole-acetic acid contents in dialyzates from dorsal raphe and medial preoptic area in freely moving rats. Relationships with simultaneous sleep disturbances. *Chem Biol Interacc* 2003; 146: 147-56.
- Gonzalez-Piña R, Alfaro-Rodriguez A, Paz C. Hypothalamic acetylcholine depressed levels produced by ozone exposure. *Brain Res Assoc (Abst)* 1997; 14: 73.
- Giri SN, Hollinger MA, Scheide MJ. The effect of ozone and paraquat on PG F_{2α} and PG E₂ levels in plasma and combined pleural effusion and lavage of rats. *Environ Res* 1980; 21: 467-76.
- Kennedy CH, Hatch GE, Slade R, Masson RP. Application of EPR spin trapping technique to the detection of radicals produced *in vivo* during inhalation exposure of rats to ozone. *Toxicol Appl Pharmacol* 1992; 364: 402-13.
- Laskin DL, Fakhrzadeh L, Laskin JD. Nitric oxide and peroxynitrite in ozone-induced lung injury. *Adv Exp Med Biol* 2001; 500: 183-90.
- Shimizu T, Wolfe L. Arachidonic acid cascade and signal transduction. *J Neurochem* 1990; 55: 1-15.
- Hayaishi O, Matsumura H. Prostaglandins and sleep. *Advances in Neuroimmunology* 1995; 5: 211-6.
- Urade Y, Hayaishi O. Prostaglandin D₂ and sleep regulation. *Biochem Biophys Acta* 1999; 1436: 606-15.
- Ueno R, Ishikawa Y, Nakayama T, Hayaishi O. Prostaglandin D₂ induces sleep when microinjected into the preoptic area of conscious rats. *Biochem Biophys Res Commun* 1982; 109 (2): 576-82.
- Onoe H, Ueno R, Fujita I, Nishino H, Oomura Y, Hayaishi O. PG D₂, a cerebral sleep inducing substance in monkeys. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; 85: 4082-6.
- Minagawa T, Sakanaka K, Inaba S, Sai Y, Tamai I, Suwa T, Tsuji A. Blood-brain-barrier transport of lipid microspheres containing clinprost, a prostaglandin I₂ analogue. *J Pharm Pharmacol* 1996; 48 (10): 1016-22.
- National Research Council (USA). *The guide for the care and use of laboratory animals*. National Academic Press, Washington, D.C., 1996.
- González-Piña R, Escalante-Membrillo C. Algunas consideraciones bioéticas en los estudios de sueño simultáneos al muestreo neuroquímico en animales con libertad de movimientos. *Animales de Experimentación* 2000; 6 (3): 26-32.
- Steinberg JJ, Gleeson JL, Gil D. The pathobiology of ozone-induced damage. *Arch Environ Health* 1990; 45: 80-7.
- Pryor WA, Squadrito GL, Friedman M. The cascade mechanisms to explain ozone toxicity: the role of lipid ozonation products. *Free Radic Biol Med* 1995; 12: 323-6.

31. Liu D, Li L. Prostaglandin F_2 alpha rises in response to hydroxyl radical generated *in vivo*. *Free Radic Biol Med* 1995; 18 (3): 571-6.
32. Koyama Y, Hayaishi O. Modulation by prostaglandins of activity of sleep-related neurons in the preoptic/anterior hypothalamic areas in rats. *Brain Res Bull* 1994; 33: 367-72.
33. Matsumura H, Honda K, Choi WS, Inoue S, Sakai T, Hayaishi O. Evidence that brain prostaglandin F_2 is involved in physiological sleep-wake regulation in rats. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86: 5666-9.
34. Toward TJ, Broadley KJ. Airway function, oedema, cell infiltration and nitric oxide generation in conscious ozone-exposed guinea-pigs: effects of dexamethasone and rolipram. *Br J Pharmacol* 2002; 136: 735-45.
35. Escalante-Membrillo C, López-Pérez A, Paz C. El contenido de malondialdehído se incrementa de acuerdo al tiempo de exposición en diferentes regiones cerebrales de ratas expuestas a 1 ppm de ozono. *Arch Neurosc* 1998; 3 (Supl.): 84-5.
36. Bakhle Y, Botting R. Cyclooxygenase-2 and its regulation in inflammation. *Mediat Inflamm* 1996; 5: 305-23.
37. Gonzalez-Piña R, Alfaro-Rodriguez A, Castorena-Maldonado A, Morales-Martinez JJ. Acute orogastric administration of alpha-tocopherol protects from ozone-induced changes in striatal catecholamine levels. *Proc West Pharmacol Soc* 2002; 45: 59-61.
38. Calderon-Garcidueñas L, Roy-Ocotla G. Nasal cytology in south-west metropolitan Mexico City inhabitants: a pilot intervention study. *Environ Health Perspect* 1992; 101: 138-44.
39. Johnson NF, Hotchkiss JA, Harkema JR, Henderson RF. Proliferative responses of rat nasal epithelia to ozone. *Toxicol Appl Pharmacol* 1990; 103-45.
40. Hackney JD, Linn WS, Karuza SK, Buckley RD, Pedersen EE, Law DC, Bates DV, Hazucha M, Pengelli LD, Silverman F. Effects of ozone exposure in Canadians and southern Californians. *Arc Environ Health* 1977; 32: 110-6.