

El ozono como molécula reactiva. Concepto actual

DAVID CALDERÓN-GUZMÁN,^a JOSÉ LUIS HERNÁNDEZ-ISLAS,^a LUIS CASTILLA-SERNA,^a
ERNESTINA HERNÁNDEZ-GARCÍA,^a GERARDO BARRAGÁN-MEJÍA,^a
RAÚL ANTONIO RODRÍGUEZ-PÉREZ,^a GABRIEL VILLEGAS-OSNAYA^a

RESUMEN

Los radicales libres son especies químicas de gran reactividad. El ozono se caracteriza por ser un contaminante del aire, que está presente sobre todo en las grandes ciudades, a pesar de que no es propiamente un radical libre, es promotor de varios de ellos, por ejemplo, los radicales hidroxilo y peróxido. Los radicales libres también se generan como parte del metabolismo celular y son controlados por mecanismos de carácter endógeno, principalmente de tipo enzimático, resaltan por su importancia, las enzimas superóxido dismutasa, catalasa y glutatión peroxidasa. Diversos reportes señalan la participación del ozono en la producción de alteraciones en funciones neurológicas, conductuales, endocrinas y genéticas entre otras. Por otra parte, bajo condiciones controladas, el ozono ha sido utilizado con fines terapéuticos en el tratamiento de enfermedades virales. De manera que el ozono, puede verse como benéfico o dañino, dependiendo de su concentración y de la capacidad del metabolismo celular del organismo, para regular la producción de radicales libres, hasta culminar con la oxidación de moléculas orgánicas y producir CO₂ y H₂O.

PALABRAS GUÍA: Ozono, radicales libres, antioxidantes, estrés oxidativo.

INTRODUCCIÓN

El aire es una mezcla gaseosa compuesta por: 78% de nitrógeno, 21% de oxígeno y 1% de diferentes compuestos (tales como, argón, dióxido de carbono y ozono). La contaminación del aire es uno de los problemas ambientales más importantes de las grandes ciudades, la cual es resultado de la creciente actividad humana, que genera un proceso de alteración de los componentes y de las propiedades físicas y químicas

del aire. Las causas que originan la contaminación son diversas, pero en gran medida son provocadas por actividades industriales, comerciales, domésticas y agropecuarias.

La combustión empleada para obtener calor, generar energía eléctrica y/o movimiento, es el proceso de emisión de contaminantes más significativo. Existen otras actividades, como la fundición y la producción de sustancias químicas, que cuando se realizan sin control alguno, también provocan deterioro de la calidad del aire.

Los principales contaminantes del aire se clasifican en:

Primarios: Son los agentes que permanecen en la atmósfera tal y como fueron emitidos por la fuente, entre estos se consideran: óxidos de azufre, monóxido de carbono, óxido de nitrógeno, hidrocarburos y partículas.

Secundarios: Son los productos que han estado sujetos a cambios químicos, o bien, son el producto de la reacción de dos o más contaminantes primarios en

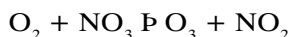
^aLaboratorio de Neuroquímica. Torre de Investigación "Dr. Joaquín Cravioto", Instituto Nacional de Pediatría-SSA.

Correspondencia:
David Calderón-Guzmán
Laboratorio de Neuroquímica.
Torre de Investigación "Dr. Joaquín Cravioto",
Instituto Nacional de Pediatría-SSA.
Av. I.M.A.N. No.1
Col. Insurgentes Cuicuilco, Coyoacán
México, D.F. CP. 04530
Tel. 606-50-26 Ext. 429 y 441.

Recibido: 4 de octubre de 1999.
Aceptado: 20 de enero de 2000.

la atmósfera, entre ellos destacan los oxidantes fotoquímicos que dan lugar a la formación del ozono y algunos radicales de corta existencia. En los lugares en que se generan contaminantes primarios en forma abundante, la radiación solar favorece que la atmósfera sea altamente fotorreactiva, ya que en presencia de la luz solar, los hidrocarburos y los óxidos de nitrógeno reaccionan fácilmente para formar ozono: y otros oxidantes.

El ozono es un contaminante que no se emite en los escapes o chimeneas, sino que se forma en la atmósfera a partir de reacciones muy complejas. Existen dos ciclos generales de reacciones fotoquímicas en la formación del ozono troposférico, en los que participan el oxígeno molecular y dos de los denominados precursores del ozono: los óxidos de nitrógeno (NOx) y los hidrocarburos (HC):



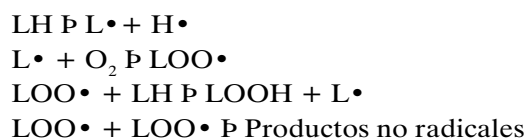
El ozono es un compuesto gaseoso incoloro que oxida materiales, que no son inmediatamente oxidables por el oxígeno gaseoso. Provoca daños a la salud, ocasionando principalmente irritación en los ojos y tracto respiratorio, agravando las enfermedades respiratorias y cardiovasculares. En los materiales causa alteración; por ejemplo, deterioro en el hule, los textiles y la pintura. En la vegetación provoca lesiones en las hojas y limita su crecimiento. Su presencia es causa también de una disminución de la visibilidad ambiental.

Los radicales libres son especies químicas capaces de tener una existencia independiente y que contienen uno o más electrones sin aparear, esto es, electrones que están solos en sus orbitales. La necesidad de este electrón por aparearse es la base de su reactividad, es decir, que la reactividad entre los radicales libres varía enormemente, mientras mayor sea la deslocalización del electrón desapareado, menor será la reactividad. Generalmente, la reactividad es alta y en su necesidad de aparearse, los radicales libres no discriminan la molécula con la que reaccionan, ya que tomarán el electrón que esté disponible. Una consecuencia de esta alta reactividad, es que una vez formados los radicales libres, desaparecen rápidamente. Esto hace que sea difícil detectarlos *in vivo*. El tiempo de vida del radical hidroxilo, en un sistema biológico, es de unos pocos nanosegundos y durante este tiempo no habrá viajado más de unos cuantos nanómetros, antes de haber reaccionado.¹

La mayoría de las moléculas orgánicas están formadas por átomos unidos por enlaces covalentes con dos electrones compartidos. Dado que ambos electrones comparten el mismo orbital y de acuerdo al principio de Pauli, que plantea que no pueden tener los mismos cuatro números cuánticos. Por ello, cada uno tiene un momento de espín angular diferente, ya sea $\frac{1}{2}$ ó $-\frac{1}{2}$, que son pares antiparalelos, por lo que se cancelan entre sí. Cuando se rompe un enlace covalente, por medio de la fractura homolítica, cada fragmento se lleva uno de los electrones del mismo, con lo que se crea una especie con un electrón desapareado, es decir, un radical libre.

Los radicales libres, que en la mayoría de los casos son derivados del oxígeno y del ozono (O₃), son moléculas tóxicas que dañan las moléculas al interior de la célula, principalmente: proteínas, lípidos y ácidos nucleicos. Asimismo, ocasionan la modificación de grupos funcionales por parte de las enzimas involucradas en el proceso *redox*, lo que en conjunto se denomina estrés oxidativo; y pueden provocar la alteración en la permeabilidad de las membranas y llevar hasta muerte celular.² El daño producido es posible medirlo como peroxidación de lípidos, cuantificación de carbonilos de proteínas y fragmentación y/o ruptura de DNA.³

La peroxidación de lípidos es un proceso relacionado con radicales libres, que principalmente se presenta como una destrucción oxidativa de los ácidos grasos poliinsaturados y que culmina con la formación de hidroperóxidos lipídicos y aldehídos.^{4,5} La formación de un radical lipídico (L•) a partir de un ácido graso poliinsaturado (LH), ya sea por interacción de fotones o por transferencia de electrones de un metal pesado, resulta en una reacción en cadena, de la siguiente forma:



La propagación continuará hasta que sea interrumpida al retirar, ya sea el radical lipídico, o el radical peróxido (LOO). Tal cadena de peroxidación puede generar hasta 1,000 moléculas de lípido oxidado. Las membranas biológicas y las lipoproteínas son muy susceptibles a este fenómeno, ya que contienen altos niveles de ácidos grasos poliinsaturados.

Hasta el momento, se han reportado dos mecanismos de reacción del O_3 con los ácidos grasos: ⁶ el primero implica la reacción del O_3 directamente con la olefina (ácido graso insaturado ($R-CH_2=CH_2$)) (figura 1), ocasionando que un radical (R) reaccione con el oxígeno diatómico (O_2) para formar el radical peróxido; el segundo mecanismo implica la reacción del O_3 con un donador de electrones (RH), esto significa que al sustraer un electrón se forma el ión (R-) respectivo, mientras que el anión formado por el O_3 reacciona con un protón para formar el radical -OH y O_2^- , como se indica en la siguiente reacción:



La determinación de malondialdehído (MDA) y 4-hidroxinonenal (HNE), como indicadores de peroxidación de lípidos, ha servido para inferir que un incremento en la peroxidación de lípidos en tejidos, está relacionado con una disminución de la glutatión peroxidasa (GSH-Px), enzima antioxidante que forma parte del mecanismo de defensa de los organismos.^{7,8} Estos indicadores se utilizan para medir el estrés oxidativo generado por los radicales y son de gran utilidad para identificar el nivel de daño celular. También es posible medir la peroxidación de lípidos evaluando los niveles de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) como indicador bioquímico de referencia.⁹

Los radicales libres tienen importancia en los sistemas biológicos. El proceso de la vida, en sí mismo, requiere la oxidación de diversas moléculas orgánicas hasta llegar al CO_2 y H_2O . Para proveer la energía que se requiere para mantener la integridad de la estructura ordinaria de un organismo vivo, el metabolismo celular inevitablemente genera radicales libres, en especial, el ion superóxido O_2^- .

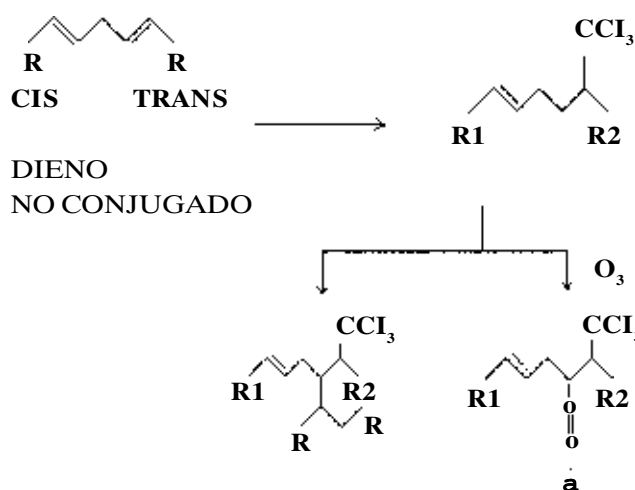
Para protegerse a sí mismo, de una superabundancia de estas especies dañinas, el organismo ha desarrollado una variedad de mecanismos endógenos de control.¹⁰ Clásicamente se distinguen dos modos de protección contra los radicales libres: el primero, basado en un sistema enzimático de defensa, que incluye a la superóxido dismutasa (Sod), catalasa (Cat) y GSH-Px. La Sod convierte los iones superóxido (O_2^-) en peróxido de hidrógeno (H_2O_2), cuya acumulación se evita por el sistema Cat/GSH-Px, que lo transforma en agua y oxígeno molecular o glutatión oxidado, respectivamente. Cuando estos sistemas fallan o se sobrepasan,

existe una sobreproducción de iones O_2^- y H_2O_2 , que no es totalmente eliminada, dando lugar al radical hidroxilo (-OH), altamente tóxico; el segundo sistema, paralelo al primero, es especialmente útil cuando éste se satura, está determinado por una serie de compuestos llamados limpiadores de radicales libres, que pueden hacer lento el ritmo de la producción de dichos radicales. Este sistema se localiza en el citosol (glutatión, ácido ascórbico) y en las membranas (a-tocoferol y vitamina A).¹⁰⁻¹²

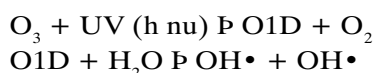
Las enzimas Sod y GSH-Px, con un peso molecular más elevado, están frecuentemente localizadas en porciones específicas de la célula y gracias a esta distribución, existe una interacción inmediata entre el sistema de antioxidantes y los radicales libres^{10,13} (figura 1).

En organismos expuestos a contaminación por ozono, se ha observado que es suficiente que éstos se expongan a 0.08 ppm de O_3 , durante 6.6 horas, para iniciar una reacción inflamatoria en el pulmón; en tanto que una exposición a 0.4 ppm de O_3 , durante 2 horas, inicia cambios bioquímicos que dan como resultado la inflamación y el daño agudo de este órgano.¹⁵ Por sus características fisicoquímicas, el O_3 es capaz de generar reacciones de oxidación al entrar en contacto con sistemas biológicos e infringir, por este mecanismo, daño en los organismos expuestos.¹⁶⁻²⁰ Se ha propuesto que el O_3 al entrar en contacto con el ion cloro (Cl^-), presente en

Figura 1
Mecanismo de reacción del ozono con ácidos grasos insaturados



el organismo, produce iones de hipoclorito (ClO^-), que al reaccionar con otros componentes del medio, forman finalmente el ion $-\text{OH}$, responsable principal de las reacciones de peroxidación en el organismo.²¹ Los radicales $-\text{OH}$ también se forman en el ambiente, debido a que el ozono ambiental al reaccionar con la luz ultravioleta (fotólisis); genera un átomo de oxígeno excitado, que a su vez reacciona con las moléculas de agua presentes en el medio, dando lugar al radical $-\text{OH}$, el cual alcanza altas concentraciones durante el día, hasta llegar al orden de $1 \times 10^6 \text{ cm}^{-3}$:²²



Los radicales $-\text{OH}$ atacan las proteínas, principalmente en el aminoácido fenilalanina, produciendo orto, meta y para-tirosinas.²³ Investigaciones realizadas en este campo, en especial sobre el daño que produce el O_3 sobre el sistema respiratorio, han demostrado que ejerce sus efectos nocivos en forma rápida y a bajas concentraciones, inicialmente en las vías aéreas superiores (principalmente en la mucosa nasal), causando alteraciones importantes en su estructura y mecanismo de replicación celular y posteriormente en las células pulmonares.²⁴⁻²⁸ Se ha reportado también que el O_3 está involucrado en la producción de alteraciones sobre el sistema cardiovascular y en funciones neurológicas, conductuales, endocrinas y genéticas, entre otras;²⁹⁻³² al respecto, Paz C. realizó una descripción muy amplia de estas alteraciones.³³ Otros estudios realizados en el ojo, muestran que su metabolismo se altera porque el órgano es altamente susceptible de dañarse por la luz solar, el oxígeno y otros contaminantes como el ozono.³⁴ El ojo expuesto a la luz ultravioleta puede padecer la formación de cataratas y la degeneración retinal, en ambos casos, puede iniciarse la formación de radicales libres, lo cual puede expresarse como la modificación de proteínas y la peroxidación de lípidos.³⁵

Estudios realizados en animales de experimentación, demostraron que la inflamación pulmonar inducida por la exposición aguda a O_3 , es mucho más severa en la última etapa del embarazo y lactancia, que en su etapa de postlactantes y vírgenes. Se cree que tales daños pulmonares, se deben en parte, a la reacción del O_3 con los Fosfolípidos de Ácidos Grasos Insaturados (FAGI), moléculas que están localizadas en el epitelio y/o en las membranas plasmáticas. También se obser-

varon diferencias mínimas en la composición del tejido de pulmón y los FAGI, entre animales vírgenes y animales preñados. El autor sugiere que el incremento en la sensibilidad de las ratas preñadas y lactantes expuestas a O_3 y los daños provocados en el pulmón, no puede atribuirse al incremento de la disponibilidad de ácidos grasos insaturados.³⁶ Otros estudios, reportan una concentración de ácido ascórbico en el tejido pulmonar significativamente menor en ratas preñadas y lactantes, que la mostrada en ratas hembras vírgenes. Es decir, que el déficit en la concentración de ácido ascórbico en estos animales, está relacionado con su amplia respuesta a dosis relativamente altas de O_3 .³⁷ Por otra parte, se determinó la severidad de la inflamación pulmonar mediante lavados broncoalveolares en ratas vírgenes, ratas en distintas etapas del embarazo y en periodo de lactancia, expuestas durante 6 horas a 1 ppm de O_3 ; con sus respectivos controles, expuestos solo a aire. Los resultados mostraron una significativa sensibilidad al desarrollo de inflamación pulmonar durante el embarazo, la que se mantuvo durante el período de lactancia y desapareció al término de ésta.³⁸ También se ha reportado que la sangre de algunos bebés prematuros fue capaz de catalizar los iones $-\text{OH}$, formados en el organismo.²³

Por su parte, Meadows y cols., realizaron un estudio en el que utilizaron proteínas (albúmina bovina), ácidos grasos (ácido linolénico), así como membranas de eritrocitos para burbujearlos con O_3 , en presencia y ausencia de ácido úrico. La ozonización no mostró tener efectos de degradación en las membranas y proteínas bovinas, mientras que los preparados de ácidos grasos estudiados después de 15 minutos de ozonización, mostraron valores mayores de sustancias reactivas al TBARS, 4 veces por arriba de las muestras sin O_3 . No obstante, estos valores disminuyeron aproximadamente en 50% y 90% para los ácidos grasos y las membranas, respectivamente, en presencia de ácido úrico.³⁹ Estos resultados sugieren que la presencia del ácido úrico en moléculas biológicas, brinda a los lípidos protección contra la oxidación por O_3 , situación que es posible, por el carácter fuertemente ácido de los protones, que unidos a los átomos de nitrógeno del ácido úrico, reaccionan con el O_3 para formar el radical que ataca los carbonilos, dando lugar a la formación de un compuesto inocuo para los lípidos.

Se ha reportado que la melatonina es un efectivo limpiador de radicales libres y antioxidantes. Se cree que actúa sobre los radicales $-\text{OH}$, anión peroxinitrilo

y posiblemente radicales peróxido. Secundariamente se ha reportado que actúa sobre los radicales superóxido y oxígeno simple. Estudios *in vitro* e *in vivo*, han demostrado que la melatonina reduce la peroxidación de lípidos y el daño oxidativo, al DNA nuclear. Las proteínas citosólicas son también protegidas por la melatonina frente a los radicales libres, y en situaciones experimentales de depleción de glutatión, la melatonina suple la falta de este compuesto.⁴⁰ La melatonina, al ser al mismo tiempo lipofílica e hidrofílica, puede alcanzar literalmente cualquier compartimiento intracelular, lo que, unido a su excelente actividad antioxidante, la hace idónea para regular los procesos celulares de óxido-reducción. Pero además, la melatonina alcanza y se acumula en el núcleo celular, en donde a través de un receptor específico, puede ejercer efectos de regulación, principalmente de las enzimas relacionadas con los procesos *redox*. Por ejemplo, la melatonina, igual que el gamma hidroxibutirato (GHB) puede favorecer la vía oxidativa directa, en la cual la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, es la enzima clave. La melatonina aumenta significativamente la actividad de esta enzima en el hígado y cerebro. Como consecuencia, la melatonina aumenta de forma indirecta el aporte a la célula del material requerido (NADPH_2) para la regeneración del glutatión oxidado.⁴¹

En años recientes el ozono ha comenzado a utilizarse con fines terapéuticos. La ozonoterapia es un tratamiento basado en una mezcla de oxígeno y ozono, el cual puede ser usado en varias aplicaciones médicas. El O_3 fue aplicado clínicamente por primera vez para el tratamiento de dolor ciático lumbar peridural en Pietrogrande, Italia.⁴² La ozonización de la sangre es un procedimiento médico que se lleva a cabo en varios países para el tratamiento de enfermedades virales.⁴³ También, de acuerdo a datos preliminares, se ha propuesto que la administración controlada de O_3 puede prevenir el daño hepatocelular, mediante la generación de radicales libres. Es decir, los resultados experimentales muestran que la administración repetida de O_3 , en dosis no tóxicas, es capaz de inducir la adaptación al estrés oxidativo.⁴⁴ El uso de la ozonoterapia reveló que influye indirectamente sobre las vías metabólicas de la glucólisis y gluconeogénesis, junto con una acción estimulante sobre la actividad de la vía de las pentosas.⁴⁵ Para evaluar la susceptibilidad de los componentes de la sangre a concentraciones bajas de O_3 empleadas en ozonoterapia ($40 \mu\text{g O}_3/\text{mL}$), se cuantificó en plasma los antioxidantes y constituyen-

tes de eritrocitos, después de mezclar sangre humana con 20, 40, 60 y $100 \mu\text{g}$ de O_3/mL de sangre. El análisis detectó que las concentraciones del ácido ascórbico, ácido úrico y vitamina E, disminuyeron en el plasma al incrementarse la concentración de O_3 , mientras que el contenido de TBARS fue mayor. No obstante, las enzimas antioxidantes GSH-Px, glutatión reductasa (GR) y *Sod*, no sufrieron cambios significativos en ninguna de las concentraciones de O_3 evaluadas. Únicamente se observó una disminución en la concentración del glutatión reducido, provocado por la ozonoterapia.⁴⁶ Para conocer experimentalmente el efecto de la ozonoterapia en ratas machos, se les administró por vía intraperitoneal durante 10 días, una mezcla que contenía oxígeno y $40 \mu\text{g}$ de O_3/mL . Previamente, las ratas fueron intoxicadas con 50 ppm de Cd^{+2} administradas en el agua de beber por un período de 12 semanas, y se realizaron inyecciones de O_3 que estimularon la peroxidación de lípidos en el hígado y riñón, la actividad de Cat en corazón y la actividad de glutatión S-transferasa (GST) en corazón, hígado y riñón. El O_3 incrementó la actividad de GST en cerebro y redujo la actividad de GSH-Px en el riñón. Estos resultados sugieren que el O_3 provoca estrés oxidativo, sin embargo, los efectos de la ozonoterapia en el modelo animal de la rata, no pueden ser conocidos ampliamente como resultado de la acción del O_3 sobre las enzimas antioxidantes. A pesar de que existen evidencias de que la terapia con oxígeno y ozono puede ser benéfica para algunas enfermedades, sólo algunos mecanismos bioquímicos y farmacodinámicos han sido elucidados, por lo que es necesario tomar con las debidas precauciones estos resultados, ya que aunque a la fecha existen investigaciones en el campo, aún prevalece una gran controversia respecto al uso del ozono como agente terapéutico. Es decir, es necesario efectuar más estudios que permitan dilucidar el uso adecuado del ozono en padecimientos en donde resulte factible su aplicación.

DISCUSIÓN

Durante el metabolismo oxidativo de los seres vivos, se generan de manera natural radicales libres que son capaces de producir daño a las moléculas biológicas, este daño es neutralizado o disminuido por la acción de enzimas antioxidantes que se activan ante la presencia de estos radicales. Debido a que actualmente un número importante de individuos se encuentran expuestos a agentes nocivos, como lo son

el ozono y otros contaminantes producidos por la actividad humana, algunos estudios han reportado alteraciones en los niveles de enzimas antioxidantes y en la formación de radicales libres que se generan durante el metabolismo. Este es uno de los factores que han favorecido la aparición en el mercado de productos que pretenden combatir los efectos tóxicos de los radicales libres y aumentar la respuesta del organismo, entre estas sustancias se puede mencionar: vitaminas, melatonina, extractos naturales, complejos de minerales, etc., los cuales pueden presentar efectos adversos, cuando se ingieren en forma abundante o innecesaria, sin la supervisión de profesionales de la salud.⁴⁷

Por otra parte, como resultado del uso del O₃ en dosis no tóxicas para combatir algunos padecimien-

tos, se ha sugerido que no todos los radicales libres son nocivos para el organismo, no obstante, la falta de conocimiento acerca del mecanismo de acción del ozono como agente terapéutico, nos inclina a tomar con cautela estos resultados. Sin duda, cuando se realicen más estudios para dilucidar por completo los mecanismos de ataque y/o formación de los radicales libres en el organismo, surgirá el uso de sustancias naturales o sintéticas con actividad antioxidante, para combatir y/o controlar diversos trastornos que involucran este mecanismo. Mientras tanto, la mayoría de las evidencias muestran que el ozono como generador de radicales libres es un agente dañino para los organismos expuestos, y que la contaminación del aire por ozono constituye un factor de riesgo para la salud.



ABSTRACT

Free radicals are chemicals species with high reactivity. Ozone is considered as an air pollutant in big cities, in spite of the fact that it is not properly a free radical, it acts as a promoter of many of them, for example, the hydroxide and peroxide radicals. Free radicals are also generated by the cellular metabolism and are controlled through mechanisms of endogenous character, mainly enzymatic, emphasized by their importance, the enzymes superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase. Several reports show the importance of the ozone in the alterations produced in neurological, behavioral, endocrinal and genetical functions. On the other hand, under controlled conditions, the ozone has been used with therapeutic purposes in infectious processes treatment. Ozone, plays a dual role, therapeutical or deleterious depending on their concentration and the capacity of the cellular metabolism, to regulate the free radicals production, resulting in the organic molecules oxidation and to production of CO₂ and H₂O.

KEY WORDS: *Ozone, free radicals, antioxidants, oxidative stress.*

REFERENCIAS

- Franklin J. Radicales libres. *Ciencia Cosmética*. 1997; Vol. 3: 45-48
- Mustafa MG. Biochemical basis of ozone toxicity. *Free Radic Biol Med* 1990; 9(3): 245-65.
- Reiter RJ, Carneiro RC, Oh CS. Melatonin in relation to cellular antioxidative defenses mechanisms. *Horm Metab Res* 1997; 29(8): 363-72.
- D'Erme M, Scarchilli A, Artale AM, Pasquali Lasagni M. Ozone therapy in lumbar sciatic pain. *Radiol Med* 1998; 95(1-2): 21-4.
- Chen LC, Qu Q. Formation of intracellular free radicals in guinea pig airway epithelium during in vitro exposure to ozone. *Toxicol Appl Pharmacol* 1997; 143(1): 96-101.
- Pryor WA. Mechanisms of radical formation from reactions of ozone with target molecules in the lung. *Free Radic Biol Med* 1994; 17(5): 451-65.
- Reiter RJ. Oxidative damage in the central nervous system: protection by melatonin. *Prog Neurobiol* 1998; 56(3): 359-384.
- Balakrishnan SD, Anuradha CV. Exercise, depletion of antioxidants and antioxidant manipulation. *Cell Biochem Funct* 1998; 16(4): 269-275.
- William A. Pryor. *Free Radicals in Biology*. Vol. IV. Nueva York, USA: Academic Press, 1980.
- Niwa Y [Oxidative injury and its defense system in vivo]. [Article in Japanese] *Rinsho Byori* 1999; 47(3): 189-209.
- Whiteside C, Hassan HM. Role of oxyradicals in the inactivation of catalase by ozone. *Free Radic Biol Med* 1988; 5(5-6): 305-12.
- Pryor WA. Can vitamin E protect humans against the pathological effects of ozone in smog? *Am J Clin Nutr* 1991; 53(3): 702-22.
- Parthiban A, Vijayalingam S, Shanmugasundaram KR, Mohan R. Oxidative stress and the development of diabetic complications-antioxidants and lipid peroxidation in erythrocytes and cell membrane. *Cell Biol Int* 1995; 19(12): 987-93.
- Hicks JJ, Medina-Navarro R, Guzman-Grenfell A, Wacher N, Lifshitz A. Possible effect of air pollutants (Mexico City) on superoxide dismutase activity and serum lipoperoxides in the human adult. *Arch Med Res* 1996; 27(2): 145-9.
- Devlin RB, McDonnell WF, Mann R, Becker S, House DE, Schreinemachers D, Koren HS. Exposure of humans to ambient levels of ozone for 6.6 hours causes cellular and biochemical changes in the lung. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1991; 4(1): 72-81.
- Menzel DB. The role of free radicals in the toxicity of air pollutants. In: *Free radicals in biology*. WA Pryor Ed; New York: Academic Press. 1976.
- Madden MC, Friedman M, Hanley N, Siegler E et al. Chemical nature immunotoxicological properties of arachidonic acid degradation products formed by exposure to ozone. *Environ Health Perspect* 1993; 101: 154-164.

18. Monn C, Hangartner MJ. Air Waste Manage Assoc 1990; 40: 357-358.
19. De Haan JB, Cristiano F, Iannello RC, Kola I. Cu/Zn-Superoxide dismutase and glutathione peroxidase during aging. Biochem Mol Biol Int 1995; 35: 1281-97.
20. Kanofsky JR, Sima P. Singlet oxygen production from the reactions of ozone with biological molecules. J Biol Chem 1991; 266(14): 9039-42.
21. Ueno I, Hoshino M, Miura T, Shinriki N. Ozone exposure generates free radicals in the blood samples in vitro. Detection by the ESR spin-trapping technique. Free Radic Res 1998; 29(2): 127-35.
22. Ehhalt DH. Free radicals in the atmosphere. Free Radic Res Commun 1987; 3(1-5): 153-64.
23. Kaur H, Halliwell B. Aromatic hydroxylation of phenylalanine as an assay for hydroxyl radicals. Measurement of hydroxyl radical formation from ozone and in blood from premature babies using improved HPLC methodology. Anal Biochem 1994; 220(1): 11-5.
24. Mehlman MA, Borek C. Toxicity and biochemical mechanisms of ozone. Environ Res 1987; 42: 36-53.
25. Mccord JM, Fridovich I. The biology and pathology of oxygen radicals. Ann Int Med 1978; 89: 122-127.
26. Scheel LD, Dobrogorski OJ, Mountain JT et al. Physiologic, biochemical, immunologic and pathology changes following ozone exposure. J Appl Physiol 1959; 14: 67-80.
27. Witz G, Amuroso MA, Golstein B. Effect of ozone on alveolar macrophage function membrane dynamic properties. In: Advances in modern environmental toxicology. Vol. V International Symposium on the Biomedical Effects of Ozone and Related Photochemical Oxidants. SD Lee, MG Mustafa & MA Melhman (Eds.). Princeton N.J.: Princeton Scientific Pub. 1983.
28. Reyes Haro, Paz C. Effects of ozone exposure during pregnancy on ontogeny of sleep in rats. Neuroscience Letters 1993; 164: 67-70.
29. Willekens H, Van-Camp W, Van-Montagu M, Inzé D, Langebartels Ch, Sandermann H, Jr. Ozone, sulfur dioxide, and ultraviolet B have similar effects on mRNA accumulation of antioxidant genes in *Nicotiana plumbaginifolia*. Plant Physiol 1994; 106: 1007-1014.
30. Bignami G, Musi B, Dell'omo G, Laviola G, and Alleva E. Limited effects of ozone exposure during pregnancy on physical and neurobehavioral development of CD-1 mice. Toxicology and Applied Pharmacology 1994; 129: 264-271.
31. Borek C, Troll W. Modifiers of free radical inhibit *in vitro* the oncogenic action of X-rays, bleomycin and the tumor promotor TPA. Proc Acad Sci 1983; 80: 1304-1307.
32. Gunnison AF, Finkelstein I. Lung. Rat lung phospholipid fatty acid composition in pre-pregnant, pregnant, and lactating rats: relationship to ozone-induced pulmonary toxicity. 1991; 175(2): 127-37.
33. Paz TC. Some consequences of ozone exposure on health. Archives of Medical Research 1997; 28(2): 163-170.
34. Rose RC, Richer SP, Bode AM. Ocular oxidants and antioxidant protection. Proc Soc Exp Biol Med 1998; 217(4): 397-407.
35. Van Kuijk FJ. Effects of ultraviolet light on the eye: role of protective glasses. Environ Health Perspect 1991; 96: 177-84.
36. Gunnison AF, Hatch GE. O₃-induced inflammation in pre-pregnant, pregnant, and lactating rats correlates with O₃ dose estimated by 180. Am J Physiol 1999; 276(2 pt 1): 332-40.
37. Gunnison AF, Weideman PA, Sobo M. Enhanced inflammatory response to acute ozone exposure in rats during pregnancy and lactation. Fundam Appl Toxicol 1992; 19(4): 607-12.
38. Goldstein BD, Lodi C, Collinson C, Balchum. Ozone and lipid peroxidation. Arch Environ Health 1969; 18: 631-635.
39. Meadows J, Smith RC, Reeves J. Uric acid protects membranes and linolenic acid from ozone-induced oxidation. Biochem Biophys Res Commun 1986; 137(1): 536-41.
40. Vatassery GT. Vitamin E and other endogenous antioxidants in the central nervous system. Geriatrics 1998; 53(Suppl 1): S25-7.
41. Crespo ME, García MJ, Arauzo JL, Escames G, Acuña CD. Mecanismos de neuroprotección de la melatonina durante el envejecimiento. Arch Neurocienc Mex 1997; 2(4): 247-257.
42. León OS, Menéndez S, Merino N, Castillo R, Sam S, Pérez L, Cruz E, Bocci V. Ozone oxidative preconditioning: a protection against cellular damage by free radicals. Mediators Inflamm 1998; 7(4): 289-94.
43. Bocci V, Paulesu L. Studies on the biological effects of ozone 1. Induction of interferon gamma on

- human leucocytes. *Haematologica* 1990; 75(6): 510-5.
44. Ivanchenko. Ozone hemotherapy and the basal metabolic pathways of body adaptation in gestoses. *Lik Sprava* 1998; (4): 149-50.
45. Shinriky N, Suzuki T, Takama K, Fukunaga K, Ohgiya S, Kubota K, Miura T. Susceptibilities of plasma antioxidants and erythrocyte constituents to low levels of ozone. *Haematologia* 1998; 29(3): 229-39.
46. Laszczyca P, Kawka-Serwecinska E, Witas I, Dolezych B, Falkus B, Mekail A, Ziolkowska B, Madej P, Migula P. Lipid peroxidation and activity of antioxidative enzymes in the rat model of ozone therapy. *Mater Med Pol* 1996; 28(4): 155-60.
47. Zentella de Piña M, Saldaña-Balmori Y. Papel fisiológico de los radicales libres. *Bol Educ Bioq (México)* 1996 15(4): 152-161.