

# Expresión de iNOS y producción de peroxinitrito en el parénquima pulmonar de ratas expuestas a ozono

Mayor M.C. Catalina **Martínez-Campos**,\* Tte. Cor. M.C. Martha P. **Fernández-Guzmán**,\*\*

Dr. Rogelio **Hernández-Pando**,\*\*\* Tte. Cor. M.C. Clea **Villanueva-López**\*\*\*\*

Escuela de Graduados de Sanidad. Facultad de Medicina-UNAM.

Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición "Salvador Zubirán". Ciudad de México.

## RESUMEN

**Introducción.** Los orígenes de la contaminación del aire se encuentran desde el descubrimiento del fuego; actualmente muchos estudios relacionan la contaminación ambiental con efectos adversos en la salud y el ozono es el principal componente de los contaminantes del aire. El ozono ataca las biomoléculas formando radicales libres que provocan daño pulmonar, inflamación y cambios en la capacidad de defensa del huésped. El óxido nítrico (NO) es una molécula radical libre, que es capaz de óxido-reducción, y al hacer contacto con otras moléculas reactivas produce muchos más radicales libres. Existen tres isomorfos de NOS codificados por genes diferentes; el tipo II o NOS inducible (iNOS) fue originalmente encontrada en los macrófagos, aunque existe en una variedad de tipos celulares. Los efectos del óxido nítrico incluyen nitrosación, oxidación y nitración.

**Material y métodos.** Se utilizaron 16 ratas Wistar machos de 200-250 g divididas en dos grupos: control con cuatro ratas, y otro de exposición a ozono que se conformó con tres grupos de cuatro ratas cada uno, los cuales fueron expuestos a ozono con un generador de ozono GE 60 (Yanco LTD), con una mezcla de oxígeno a 95% y CO<sub>2</sub> a 5%, con una concentración de ozono constante, medido por un lector digital interno a 0.25 ppm por cuatro horas diarias durante siete, 15 y 30 días. Dos horas después de la exposición a ozono, las ratas fueron sacrificadas y se realizó fijación de tejidos con etanol absoluto, para posterior inclusión en parafina. Las muestras fueron observadas para medición de área de infiltrado, conteo y porcentaje de células positivas al anticuerpo en las áreas perivasculares y parénquima pulmonar, utilizando un analizador de imágenes computarizado.

**Resultados.** Durante siete días después de la exposición a ozono se observó respuesta inflamatoria de tipo mononuclear; después de 15 días, respuesta inflamatoria intensa, con zonas de infiltrado inflamatorio y presencia de macrófagos; durante 30 días, zonas extensas de inflamación con presencia de macrófagos e in-

## *Expression of iNOS and peroxynitrite formation in lung parenchyma of ozone-exposed rats*

## SUMMARY

**Introduction.** The origins of pollution are from the discovery of the fire; at the moment many studies relate the environmental contamination to adverse effects in the health and ozone is the main component of the polluting agents of the air. Ozone attacks biomolecules forming free radicals causing lung damage, inflammation and changes in defense capabilities host. Nitric oxide (NO) is a free radical molecule oxide reduction capable, and when doing contact with other reactive molecules produces many more free radicals. There are three NOS isomorphic different gene codified; type II or induct NOS (iNOS) was originally found in macrophage, although in a cellular types variety exists. Nitric oxide effects include nitrosation, oxidation and nitration.

**Material and methods.** 16 Wistar 200-250 g male rats were used divided in two groups: control with four rats, and other ozone exposed conformed with three groups of four rats each, which were ozone exposed with a GE 60 (Yanco LTD) ozone generator, with a mixture of oxygen to 95% and CO<sub>2</sub> to 5%, with a constant ozone concentration measured by an internal digital reader to 0.25 ppm four hours daily during seven, 15, 30 days. Two hours after ozone exposition, rats were sacrificed and it was made tissue fixation with absolute ethanol for later paraffin inclusion. Samples were observed for infiltrated area measurement, count and percentage of antibody positive cells in perivascular areas and pulmonary parenchyma, using an image computerized analyzer.

**Results.** During seven days after ozone exposition it was observed mononuclear type inflammatory response; after 15 days, intense inflammatory response, with inflammatory infiltrated zones and macrophage presence; during 30 days, inflammatory extensive zones with macrophage presence and polymorphonuclears

\* Alumna del 4/o semestre de la Escuela Militar de Graduados de Sanidad del curso de Maestría en Ciencias Biomédicas. \*\* Jefa del Área de Morfología de la Escuela Médico Militar. \*\*\* Jefe del Área de Patología Experimental del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán. \*\*\*\* Área de investigación de la Escuela Superior de Medicina, IPN.

Correspondencia:

Dra. Catalina Martínez Campos

Dirección General de Sanidad. Periférico Esq. Av. Ejto. Nal. S/N. Campo Militar 1-J. Predio Reforma D.F. Col. Irrigación. C.P. 11500.

Recibido: Agosto 14, 2004.

Aceptado: Noviembre 29, 2004.

filtrado con polimorfonucleares. Del mismo modo, se observó respuesta positiva a iNOS.

**Discusión.** Estudios previos con exposición a ozono arrojan que se genera una respuesta inflamatoria con aumento de radicales libres. También se ha demostrado que hay un aumento en la activación de la enzima iNOS en ratas expuestas a ozono.

**Conclusiones.** La exposición a ozono indujo la producción de iNOS desde el primer periodo. La exposición a ozono estimuló la producción de peroxinitrito que aumentó conforme el tiempo de exposición.

**Palabras clave:** ozono, peroxinitrito, iNOS, nitrotirosina.

infiltrated. In the same way, positive response to iNOS was observed.

**Discussion.** Previous studies with ozone exposition indicate an inflammatory response is generated with free radical increase. Also it has been demonstrated there is an increase in iNOS enzyme activation in ozone exposed rats.

**Conclusions.** Ozone exposition induced iNOS production since first period. Ozone exposition stimulate peroxynitrite production that increases according to exposition time.

**Key words:** Ozone, peroxynitrite, iNOS, nitrotyrosine.

## Introducción

Se puede definir la contaminación del aire como la presencia en la atmósfera de una o más sustancias combinadas, en tales cantidades y con tal duración que pueden afectar la vida humana, la de animales, las plantas o propiedades, que interfiere en el goce de la vida, propiedad o ejercicio de actividades.

Los orígenes de la contaminación del aire se sitúan desde el descubrimiento del fuego, y se presentaba ya en las grandes ciudades de Roma, antes de la era cristiana, o pocos siglos después en Londres. En cuanto a los orígenes industriales, la contaminación del aire se remonta al nacimiento de la revolución industrial.

Muchos estudios relacionan la contaminación ambiental con efectos adversos en la salud. Muchas de esas evidencias realizadas en animales y voluntarios humanos, que son expuestos a contaminantes específicos del aire, atribuyen estos efectos al ozono.<sup>1-3</sup>

El ozono es el principal componente fotoquímico de los contaminantes del aire y se forma de manera natural, cuando la luz ultravioleta proveniente del Sol es absorbida en la estratosfera por el oxígeno molecular, dando lugar a la formación de ozono. El ozono de la estratosfera protege contra la peligrosa radiación ultravioleta.

El ozono también se forma por la reacción en presencia de la luz solar de óxidos de nitrógeno con compuestos orgánicos volátiles hechos por el hombre, produciendo niveles de ozono en la troposfera, de potencial daño a la salud.

El ozono es un potente oxidante, capaz de reaccionar con una amplia variedad de biomoléculas, particularmente aquellas que contienen tioles o grupos amino y enlaces de carbono no saturados.<sup>3</sup>

Aunque el ozono causa daño directo a las proteínas, lípidos o células del aparato respiratorio, se cree que su principal efecto se debe primariamente a los radicales libres formados cuando el ozono ataca las biomoléculas.<sup>3,4</sup> Los radicales libres así formados pueden iniciar una cascada de reacciones que resultan en daño pulmonar, inflamación y cambios en la capacidad de defensa del huésped.

El óxido nítrico (NO) es un gas incoloro e inodoro, compuesto de una molécula inorgánica biatómica, combinación

1:1 de los dos gases más abundantes de la atmósfera. Por contener un electrón no apareado, el NO es una molécula radical libre, que es capaz de óxido-reducción, y al hacer contacto con otras moléculas reactivas produce muchos más radicales libres. Dentro de sus funciones fisiológicas se encuentran: relajación del músculo liso, inhibición de la activación de las plaquetas, neurotransmisión, respuesta inmune y regulación de la expresión de genes.<sup>3,5-8</sup>

El óxido nítrico es formado a partir de L-arginina, por la enzima sintetasa del óxido nítrico (NOS). Existen tres isoformas de NOS, las cuales son codificadas por genes diferentes. La tipo II o NOS inducible (iNOS) fue originalmente encontrada en los macrófagos, aunque existe en una variedad de tipos celulares que incluyen hepatocitos, células del músculo liso vascular, fibroblastos y células epiteliales.

Los efectos del óxido nítrico pueden ser directos o indirectos. Los efectos directos incluyen la interacción del NO con complejos que contienen metales; los de relevancia fisiológica más importantes incluyen la guanilato ciclasa soluble y el citocromo P-450. Los efectos indirectos son mediados por especies de nitrógeno reactivas, que se producen por la interacción del óxido nítrico con el oxígeno o radicales superóxido.<sup>5</sup> Estos efectos incluyen nitrosación (un radical de óxido nítrico se combina con un grupo amino, tiol o un grupo hidroxiaromático), oxidación (dos o más electrones son removidos de un sustrato), y nitración (un grupo nitrato se añade a una molécula).<sup>6</sup>

Además de sus propiedades de autooxidación, el NO también reacciona con los radicales superóxido para producir un poderoso oxidante: el peroxinitrito.

El peroxinitrito es una molécula altamente oxidante, se forma cuando el NO con su electrón no apareado se une al electrón no apareado del anión superóxido, de donde resulta el anión peroxinitrito (ONOO<sup>-</sup>).<sup>9</sup>

Los procesos citotóxicos desencadenados por peroxinitrito incluyen la peroxidación de lípidos, que consiste en pérdida progresiva de la fluidez de la membrana,<sup>10,11</sup> inhibición de respiración mitocondrial, inhibición de bombas de membrana, con la consiguiente disminución del potencial de membrana;<sup>12</sup> también hay un aumento en la permeabilidad de membrana, disminución del glutatión y daño al DNA.

El peroxinitrito puede nitrar los residuos aromáticos de tirosina y triptófano. *In vivo* se acepta que el mayor agente

nitrate se debe al peroxinitrito.<sup>6,13</sup> El aumento en la producción del peroxinitrito se ha relacionado con enfermedades como Alzheimer, artritis reumatoide, aterosclerosis, lesión pulmonar, esclerosis lateral amiotrófica y otras.

## Material y métodos

Se utilizaron 16 ratas Wistar machos de 200-250 g, las cuales se dividieron en dos grupos: control con cuatro ratas, y otro de exposición a ozono, que se conformó con tres grupos de cuatro ratas cada uno, los cuales fueron expuestos a ozono con un generador de ozono GE 60 (Yanco LTD), con una mezcla de oxígeno a 95% y CO<sub>2</sub> a 5%, con una concentración de ozono constante, medido por un lector digital interno a 0.25 ppm por cuatro horas diarias durante siete, 15 y 30 días.

Dos horas después de la exposición a ozono, los animales fueron sacrificados y se realizó fijación de tejidos con etanol absoluto, para posterior inclusión en parafina. A los tejidos así obtenidos se les realizó técnica de H-E, así como procesamiento para realización de técnica inmunohistoquímica, siguiendo el método descrito por Hernández Pando y cols.<sup>14</sup>

Brevemente, se obtuvieron cortes de 5 micras de nuestro tejido incluido en parafina y fueron montados en portaobjetos silanizados a 2%. Posterior a desparafinar y rehidratar las muestras, se inactivó la peroxidasa endógena, con una solución de peróxido de hidrógeno a 30% con metanol absoluto, lavado y realización de bloqueo antigénico inespecífico con suero de cabra, para posterior incubación con anticuerpo policlonal inespecífico para nitrotirosina (Upstate Biotechnol, Lake Placid, NY, USA) a dilución de 1:2000 y con albúmina sérica bovina para incubar con anticuerpo policlonal específico para iNOS (Cayman, Lab USA) a dilución de 1:500 e incubados en cámara húmeda toda la noche. Se lavó el exceso de anticuerpo con solución buffer fosfatos y se aplicó anticuerpo secundario de cabra anticonejo biotilado (Dako, Carpintería, CA, USA), en dilución 1:200 durante una hora.

Se lavó el exceso de anticuerpo y se aplicó sol. de avidina peroxidada, para posterior revelado con solución de peróxido de hidrógeno-diaminobencidina en solución buffer de fosfatos.

Se contrastaron las laminillas en hematoxilina de Harris y se fijaron con resina sintética. Las muestras fueron observadas para medición de área de infiltrado, conteo y porcentaje de células positivas al anticuerpo en las áreas perivascularas y parénquima pulmonar, utilizando un analizador de imágenes computarizado (QwinLeica, Leica Imaging Systems, Cam, U.K.).

## Análisis estadístico

Para comparación del infiltrado perivascular y peribronquial se realizó la prueba de Tuckey, y para comparar las diferencias en los porcentajes de células inmunopositivas con iNOS y con nitrotirosina se realizó la prueba de ANOVA on rank.

Se consideraron con importancia estadística las diferencias con  $p < 0.05$ .

## Resultados

### Cinética, localización del infiltrado y morfometría

Durante los primeros siete días de exposición a ozono, los cambios histológicos observados fueron respuesta inflamatoria de tipo mononuclear, localizada en las áreas peribronquial y perivascular, que no se observa en ratas control (*Figuras 1 y 2*).

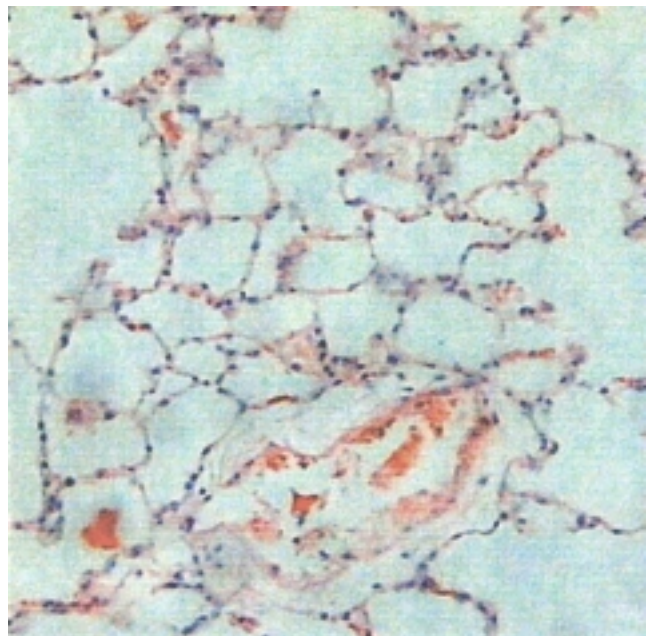
En las ratas expuestas a ozono por 15 días se observó una respuesta inflamatoria intensa, con zonas de infiltrado inflamatorio y presencia de macrófagos (*Figura 3*).

Durante el curso de 30 días de exposición a ozono, se observan zonas extensas de inflamación, con presencia de macrófagos con características de células activadas, caracterizadas por células muy grandes, con abundante citoplasma claro y eosinófilo con núcleos grandes y nucleolo prominente. También se observa infiltrado con polimorfonucleares (*Figura 4*).

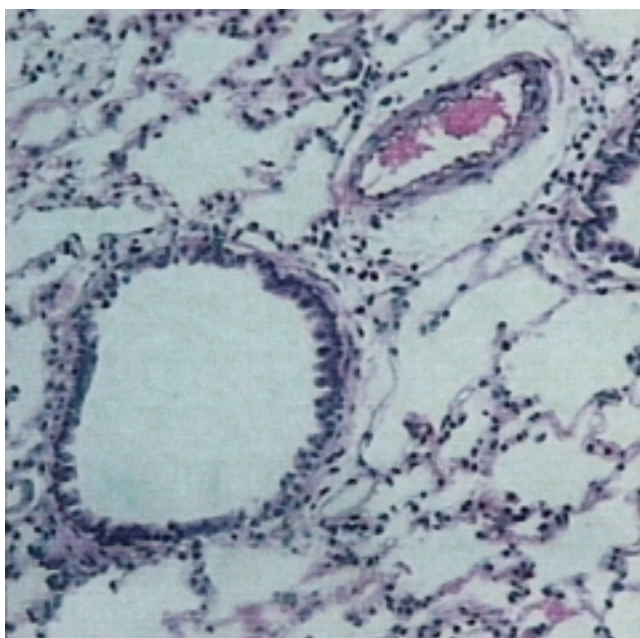
La medición de las áreas de inflamación perivascular en los diferentes tiempos de exposición, muestran un aumento del infiltrado inflamatorio con diferencias estadísticamente significativas respecto a los sujetos control y el curso del infiltrado con 15 y 30 días (*Figura 5*).

### Cinética y localización histológica de iNOS y NT determinados por inmunohistoquímica

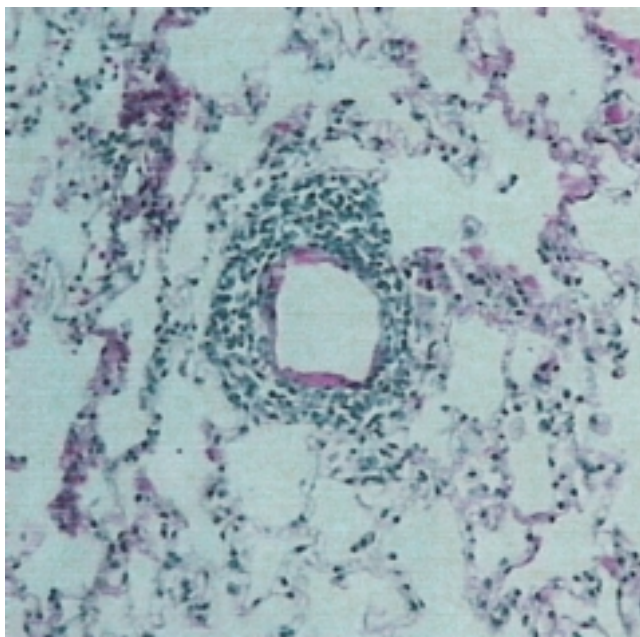
En las ratas con siete días expuestas a ozono se observó infiltrado de macrófagos alveolares intensamente positivos a iNOS; asimismo, se observan positivas células



**Figura 1.** Fotomicrografía de un corte histológico de pulmón de rata control. Se muestra área perivascular con infiltrado inflamatorio (H-E 10X).



**Figura 2.** Fotomicrografía de un corte histológico de pulmón de rata control con exposición a ozono de siete días.



**Figura 3.** Fotomicrografía de un corte histológico de pulmón de rata control con exposición a ozono de 15 días.

del músculo liso de vénulas y células epiteliales de bronquios (Figuras 6 y 7).

En estos macrófagos alveolares también muestran positividad para nitrotirosina, como también se observa en células endoteliales, músculo liso y epitelio bronquial (Figuras 8 y 9).

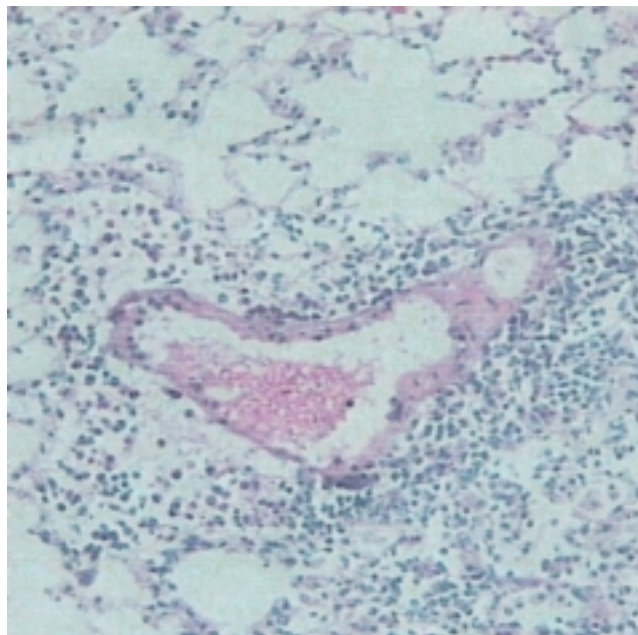
En las ratas expuestas a ozono por 15 días se observa lo siguiente: iNOS positivo en macrófagos y músculo liso de

vasos. La señal para NT es evidente en células endoteliales y músculo liso de vasos (Figuras 10 y 11).

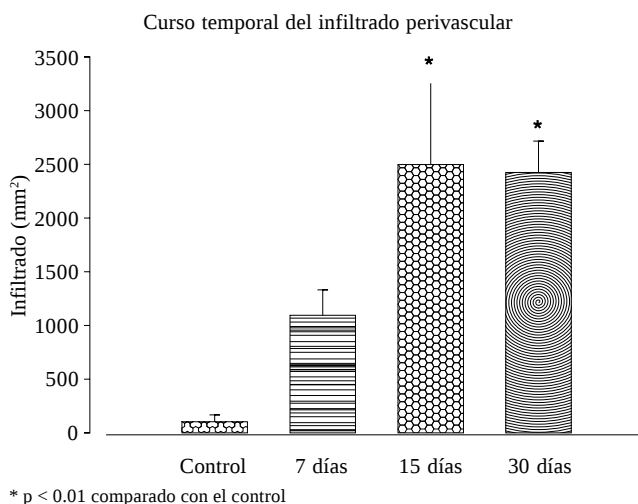
Con exposición a ozono por 30 días se observa marca de iNOS muy positiva en macrófagos activados, y la marca para NT se observa en músculo liso perivascular, así como macrófagos (Figuras 12 y 13).

La medición del porcentaje de células positivas para el anticuerpo iNOS en las áreas perivascular y en el intersticio, no mostró diferencias significativas en los diferentes grupos de exposición.

La medición del porcentaje de positividad para el anticuerpo de nitrotirosina mostró importancia estadística con p



**Figura 4.** Fotomicrografía de un corte histológico de pulmón de rata control con exposición a ozono de 30 días.

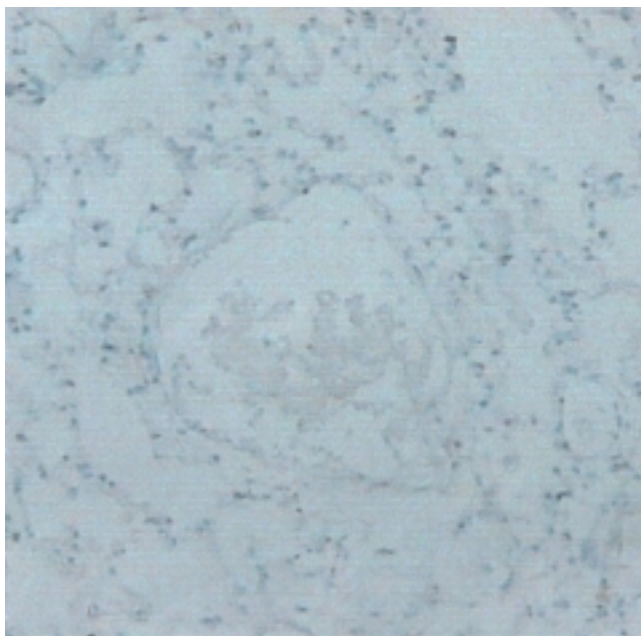


**Figura 5.** Área de infiltrado inflamatorio perivascular en ratas, a diferentes tiempos de exposición a ozono.

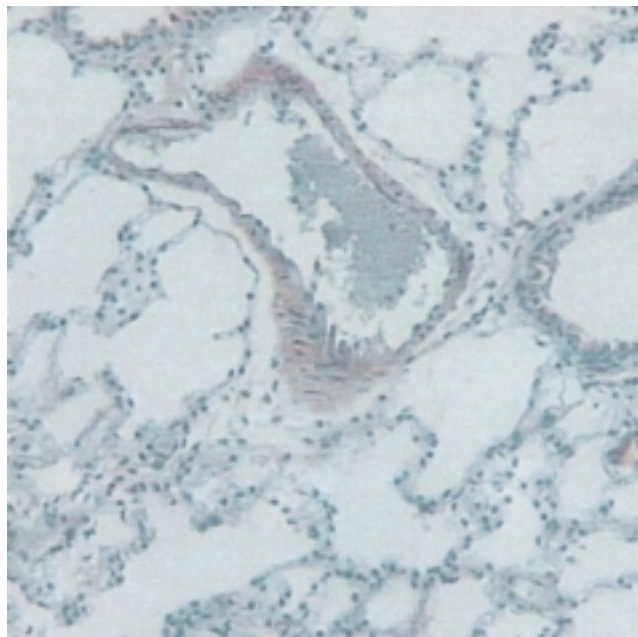
## Discusión

El óxido nítrico se ha relacionado como una vía final por la cual células inflamatorias activadas pueden mediar una respuesta citotóxica en respuesta a infección microbiana.<sup>14-16</sup>

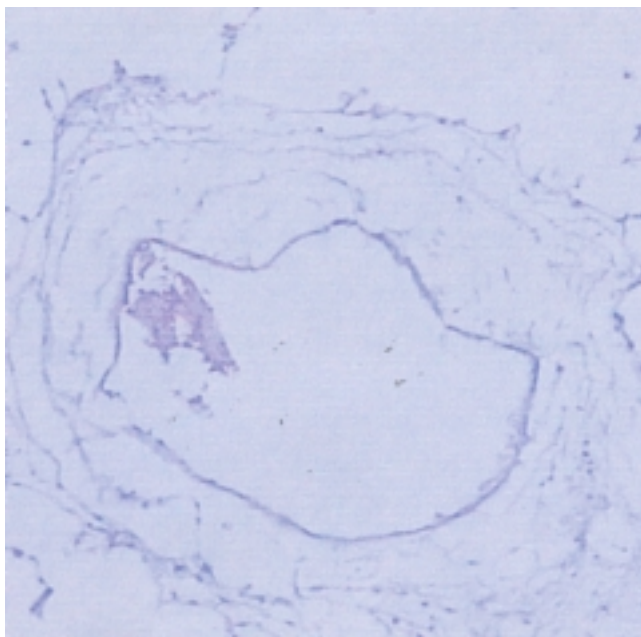
Investigaciones realizadas con *M. tuberculosis*, y *M. leprae* han demostrado que una vía por la cual se lleva a cabo actividad bactericida es consecuencia de la activación de la



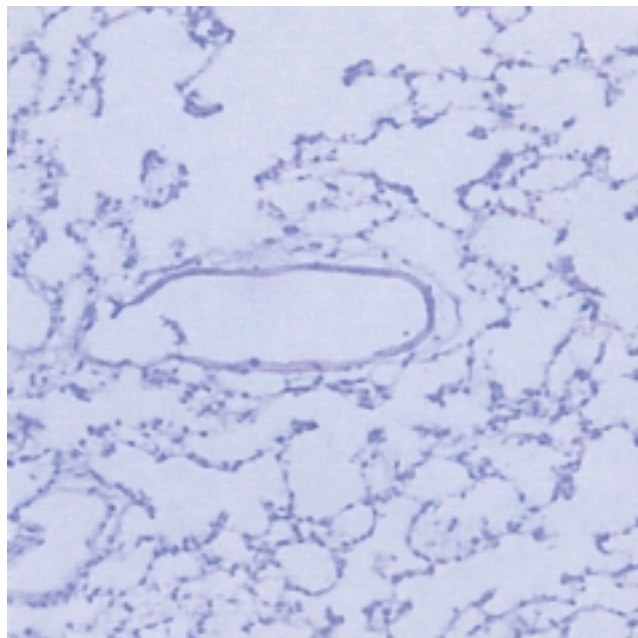
**Figura 6.** Fotomicrografía de corte histológico de pulmón de rata control con inmunotinción para iNOS A 10 X.



**Figura 8.** Fotomicrografía de corte histológico de pulmón de rata control con inmunotinción para iNOS. A 10 X y exposición a ozono de siete días.

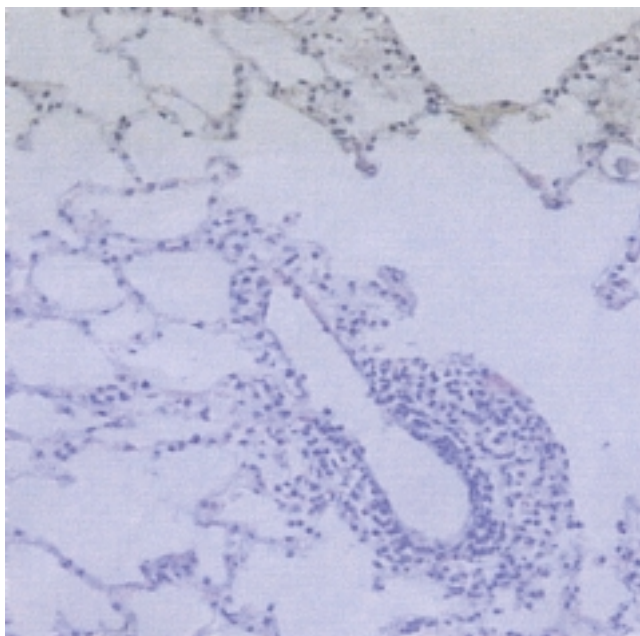


**Figura 7.** Fotomicrografía de corte histológico de pulmón de rata control, inmunoteñida para nitrotirosina.

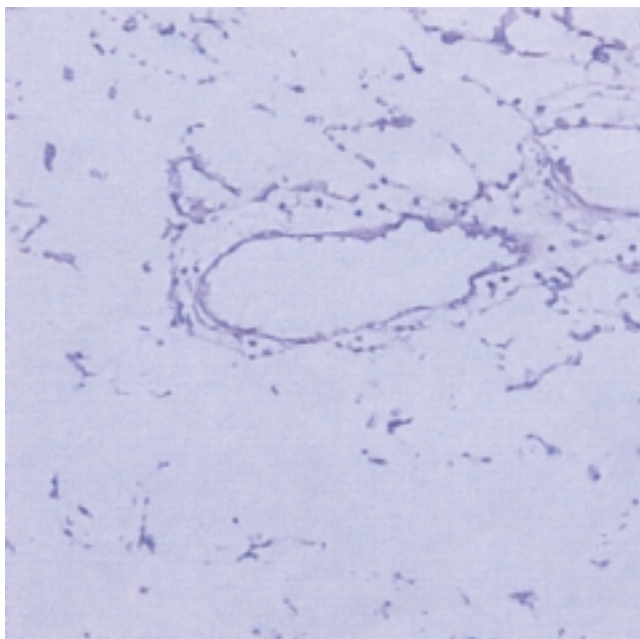


**Figura 9.** Fotomicrografía de corte histológico de pulmón de rata control, inmunoteñida para nitrotirosina, expuesta a ozono de siete días.

< 0.001 en el infiltrado perivascular en las ratas expuestas a ozono por 30 días con respecto a las ratas control. No se encontraron diferencias significativas con respecto a la positividad para la nitrotirosina en parénquima pulmonar, aunque existe una tendencia a aumentar la positividad con respecto al tiempo de exposición al ozono, como se muestra en el *cuadro 1*.



**Figura 10.** Fotomicrografía de corte histológico de pulmón de rata control con inmunotinción para iNOS. A 10 X y exposición a ozono de 15 días.

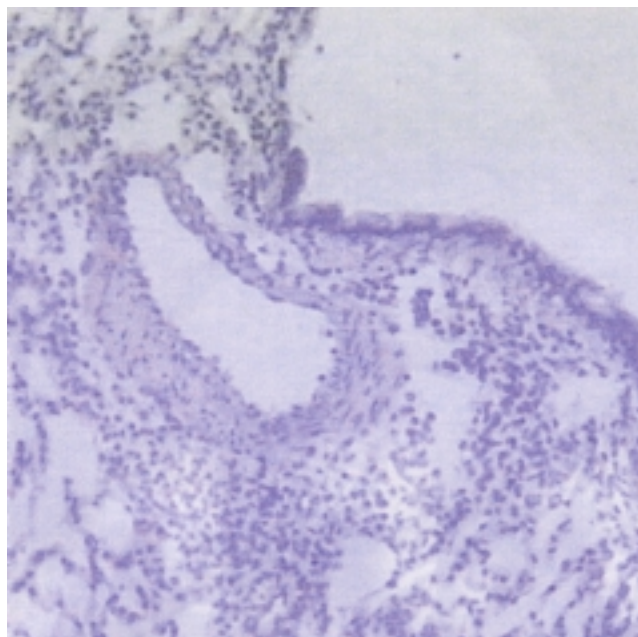


**Figura 11.** Fotomicrografía de corte histológico de pulmón de rata control, inmunoteñida para nitrotirosina, expuesta a ozono de 15 días.

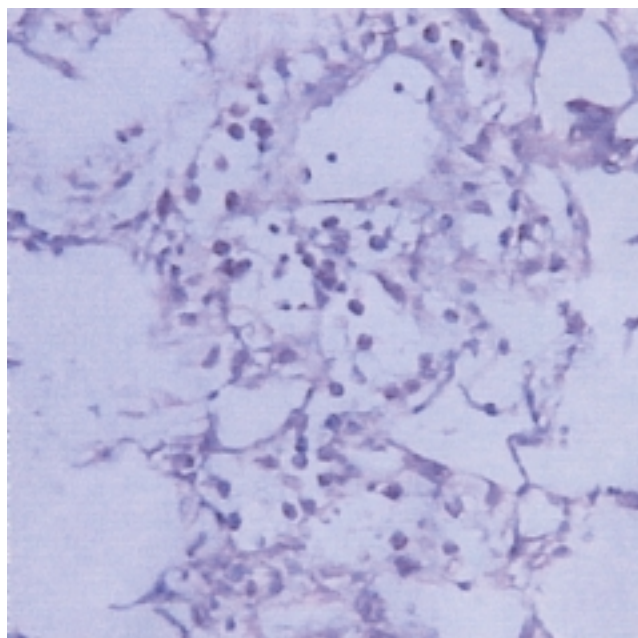
enzima iNOS, con subsecuente elevación del NO, que junto con la formación de radicales libres del oxígeno reacciona con el radical superóxido, formando peroxinitrito, agente oxidante que nitrifica aminoácidos aromáticos, entre los cuales se encuentra la tirosina, dando como resultado un producto final llamado nitrotirosina, el cual se ha utilizado como marcador de producción de peroxinitrito.

Estudios previos realizados con exposición a ozono han encontrado que se genera una respuesta inflamatoria, con aumento en la producción de radicales libres,<sup>16</sup> estado conocido como estrés oxidativo.

Por inmunohistoquímica se ha demostrado que también se realiza aumento en la activación de la enzima iNOS en ratas expuestas a ozono. En este trabajo, se encontró que la



**Figura 12.** Fotomicrografía de corte histológico de pulmón de rata control con inmunotinción para iNOS. A 10 X y exposición a ozono de 30 días.



**Figura 13.** Fotomicrografía de corte histológico de pulmón de rata control, inmunoteñida para nitrotirosina, expuesta a ozono de 30 días.

**Cuadro 1.** Producción de nitrotirosina en ratas expuestas a ozono.

| Grupo de exposición a ozono | Porcentaje de células positivas a la NT en parénquima pulmonar |
|-----------------------------|----------------------------------------------------------------|
| 7 días                      | 33.28 ± 4.44                                                   |
| 15 días                     | 34.66 ± 2.75                                                   |
| 30 días                     | 36.43 ± 6.19                                                   |

Los valores se expresan como la media más-menos el error estándar de la media.

exposición a ozono activa la enzima inducible, con la subsecuente sobreexpresión desde el primer tiempo de exposición y, probablemente, interactúa con radicales libres presentes en el medio, formando peroxinitrito.

No se encontró relación entre el tiempo de exposición y aumento en la actividad de la iNOS. En relación con la detección de nitrotirosina, se encontró presente desde los primeros días de exposición, con aumento hacia el día 15 en el infiltrado y leve descenso hacia el día 30, con tendencia a elevarse en parénquima pulmonar, a medida que se aumenta el tiempo de exposición. Esto se complementa con estudios previos en los que se demuestra elevación de nitratos y nitritos hacia el día 15, para disminuir hacia el día 30. Probablemente, se relacione con la reserva de antioxidantes que hacia el día 15 excedería su capacidad con el exceso de radicales libres generados por la exposición de ozono, y hacia el día 30 se compensara con aumento de enzimas antioxidantes.

No existen estudios previos en los que se haya demostrado la producción de peroxinitrito secundaria a la exposición a ozono, por lo que este trabajo sería el primero en tratar de explicar que el daño celular podría estar en relación con la formación de peroxinitrito, el cual se ha relacionado con diferentes estados patológicos en pulmón.<sup>15,16</sup>

La intensa marca para nitrotirosina encontrada en células de músculo liso de vasos sanguíneos y paredes bronquiales y la localización hacia cilios y mitocondrias, probablemente se puede relacionar con alguna disfunción contráctil en vasos sanguíneos y función ciliar, encontrándose de esta manera alguna relación con experimentos realizados en humanos, que relacionan el ozono con hiperreactividad bronquial; sin embargo, sería necesario continuar investigando en relación con este tema.

## Conclusiones

1. La exposición a ozono indujo la producción de NO (iNOS) desde el primer periodo de exposición. La activación de la iNOS no mostró cambios significativos a lo largo de la exposición.

2. La exposición a ozono estimuló la producción de peroxinitrito, evidenciada por la presencia de nitrotirosina. La

producción de peroxinitrito aumentó conforme aumentó el tiempo de exposición.

## Referencias

- Klanssen C, Amador M, Doull J. Casarett and Doull's toxicology. 5th Ed. McMillan; 1996; p. 857-76.
- Fauci A, Braunwald E, Isselbacher K, Wilson J, Martín JB, Harrison. Principios de Medicina Interna. Tomo II. 14a Ed. McGraw-Hill Interamericana; 1998; 1634-5.
- Devlin RB, Raub JA, Folins LJ. Health effects of the ozone. Science and Medicine 1997; 8-17.
- Scheel LD, Debrogorski OJ, Mountain JT, Svrbely JL, Storkinger HE. Physiologic, biochemical, immunologic and pathologic changes following ozone exposure. J Appl Physiol 1959; 14: 67-80.
- Testelli M. Óxido nítrico: un gas contaminante con propiedades biológicas. Su importancia en fisiopatología cardiovascular. Rev Sanid Mil 2000; 54(3): 164-75.
- Davis K, Martin E, Turko H, Murat F. Novel effects of nitric oxide. Ann Rev Toxicol 2000; 41: 203-36.
- Villa LM, Salas E, Darley-Usmar M, Radomsky MW, Moncada S. Peroxynitrite induces both vasodilatation and impaired vascular relaxation in isolated perfused rat heart. Proc Natl Sci USA 1990; 87: 12383-7.
- Mehl M, Herold S, Shoun H. Peroxynitrite reaction with heme protein. Nitric Oxide 1999; 3: 142-52.
- Beckman J, Chen J, Freeman BA. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. Proc Natl Acad Sci USA 1990; 87: 1620-4.
- Radi R, Beckman JS, Brush KM, Freeman BA. Peroxynitrite-induced membrane lipid peroxidation: the cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. Arch Biochem Biophys 1991; 288: 481-7.
- Pryor W, Squadrito G. The chemistry of peroxynitrite: a product from the reaction of nitric oxide with superoxide. Am J Physiol 1995; 268: L699-L722.
- Simonian NA, Cole JT. Oxidative stress in neurodegenerative diseases. Ann Rev Pharmacol Toxicol 1996; 36: 83-106.
- Zhang H, Squadrito G, Pryor W. Inhibition of peroxynitrite-mediated oxidation of glutathione by carbon dioxide. Arch Biochem Biophys 1997; 339(1): 183-9.
- Hernández-Pando R, Schon T, Serafín J, Estrada-García I. Expression of inducible nitric oxide synthase and nitrotyrosine during the evolution of experimental pulmonary tuberculosis. Exp Toxic Pathol 2001; 53: 257-65.
- Schon RT, Hernández-Pando H, Negesse Y, Leekassa R, Sundqvist T, Britton S. Expression of inducible nitric oxide synthase and nitrotyrosine in borderline leprosy lesions. Brit J Derma; 145: 809-15.
- Rivas-Arancibia S, Vázquez Sandoval R, González-Kladiano D, Schneider-Rivas S, Lechuga-Guerrero A. Effects of ozone exposure in rats on memory and levels of brain and pulmonary superoxide dismutase. Environ Res 1998; 76: 33-9.