

## ARTÍCULO ORIGINAL

# Respuesta local y sistémica a la contaminación ambiental aérea en los niveles molecular y funcional: la desnutrición crónica como factor de riesgo

*Local and systemic response to air pollution at the molecular and functional levels: chronic undernutrition as a risk factor.*

Kurtz, Melisa Lidia <sup>1\*</sup>; Lezón, Christian <sup>2</sup>; Masci, Ivana <sup>1</sup>; Bonetto, Julián <sup>1</sup>; Maglione, Guillermo Alberto <sup>1</sup>; Boyer, Patricia Mónica <sup>2</sup>; Álvarez, Laura <sup>3</sup>; Tasat, Deborah Ruth <sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio de Bio-Toxicología Ambiental, Instituto de Tecnologías Emergentes y Ciencias Aplicadas, Escuela de Ciencia y Tecnología, Universidad Nacional de San Martín-CONICET, Buenos Aires.

<sup>2</sup>Facultad de Odontología, Universidad de Buenos Aires, Ciudad Autónoma de Buenos Aires.

<sup>3</sup>Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires, Ciudad Autónoma de Buenos Aires.

\*Contacto: Kurtz, Melisa Lidia; Laboratorio de Bio-Toxicología Ambiental, Instituto de Tecnologías Emergentes y Ciencias Aplicadas, ECyT, UNSAM-CONICET. Martín de Irigoyen 3100, [1653] San Martín, Buenos Aires, Argentina; mkurtz@unsam.edu.ar

## Resumen

**Introducción:** La desnutrición y la contaminación del aire causan graves problemas de salud pública a nivel mundial, y los niños son una de las subpoblaciones más vulnerables. Sin embargo, los mecanismos que vinculan estos dos estresores no han sido aún dilucidados. Investigamos el efecto de la exposición a cenizas residuales del petróleo (ROFA) en la respuesta inmune pulmonar y en la vasculatura, en un modelo de desnutrición crónica (DC). **Métodos:** Durante 4 semanas, ratas macho destetadas fueron alimentadas con una dieta restringida al 20 % (DC) o *ad libitum* (control-C). DC y C se instilaron intranasalmente con (1 mg/kg de peso corporal) ROFA. 24 h después de la exposición. Se evaluaron en cultivo de macrófagos alveolares (MA): viabilidad celular, actividad fagocítica, respuesta oxidativa y citoquinas proinflamatorias. En la aorta torácica, se evaluaron CYP1A1, eNOS, TGFβ1, canal de calcio tipo L e IL-6, IL-10 y parámetros contráctiles. **Resultados:** La respuesta de MA-DC a ROFA mostró cambios en el metabolismo oxidativo y la producción de citoquinas que afectan sustancialmente la respuesta inmune. La exposición a ROFA aumentó los niveles de CYP1A1 y TGF-β1 y disminuyó los niveles de eNOS y de canales de calcio en la vasculatura. La capacidad contráctil y la relajación disminuyeron en ratas DC. **Conclusión:** En general, los animales DC no lograron estimular la respuesta inflamatoria y desintoxicante a ROFA. Asimismo, provocó un aumento en la resistencia vascular y una disminución en la distensibilidad de la aorta, lo que podría, consecuentemente, provocar episodios agudos de insuficiencia cardiovascular en escenarios de contaminación ambiental.

**Palabras clave:** contaminación aérea, desnutrición, material particulado, macrófagos alveolares, vasculatura, metabolismo oxidativo, citoquinas.

## Abstract

**Introduction:** Malnutrition and air pollution are known to cause serious public health problems worldwide, and children are one of the most vulnerable subpopulations. However, the mechanism linking undernutrition and air pollution exposure still remains unclear. The present study sought to investigate the effects of exposure to Residual Oil Fly Ash (ROFA) both locally on lung immune response and systemically on the vasculature, in a rat chronic undernutrition (DC) model. **Methods:** To achieve DC animals, male weanling rats were fed a diet restricted by 20% compared to *ad libitum* intake (control-C) for 4 weeks. DC and control rats were intranasally instilled with ROFA (1 mg/kg BW) 24 h after exposure the animals were euthanized. Lung alveolar macrophages (AM) were isolated by bronchoalveolar lavage, and cell viability, phagocytic activity, oxidative response and pro-inflammatory cytokine release were evaluated in cultured AM. The thoracic aorta was also isolated, and molecular (CYP1A1, eNOS, TGFβ1, Calcium channel type L and IL-6, IL-10) and contractile parameters were evaluated. **Results:** DC altered AM response to ROFA by modifying oxidative metabolism and cytokine production, substantially affecting immune responsiveness to air pollutants. Regarding the vasculature, we showed that ROFA increased CYP1A1 and TGF-β1 levels and decreased eNOs levels and calcium channels. The contraction and relaxation capacity of DC rats showed an important decrease. **Conclusions:** In general, DC animals failed to activate the inflammatory and detoxifying response to ROFA. Acute exposure to ROFA was followed by an increase in vascular resistance and a decrease in vessel distensibility, which may in turn increase cardiovascular failure.

**Key words:** Air pollution, undernutrition, particulate matter, alveolar macrophages, vasculature, oxidative metabolism, cytokines.

## Introducción

La malnutrición, en todas sus formas, es mundialmente la principal causa de problemas de salud.<sup>1</sup> La Organización Mundial de la Salud (OMS) define la malnutrición como “las carencias, los excesos o los desequilibrios de la ingesta de energía y/o nutrientes de una persona” y estima que alrededor del 45 % de las muertes de menores de 5 años está relacionado con la desnutrición, en su mayoría, en los países de ingresos bajos y medianos.<sup>2</sup>

En nuestro país, la malnutrición por defecto global de nutrientes o por insuficiencia de alimento se presenta en niños y adolescentes con consecuencias negativas en el crecimiento global, desarrollando una condición de desnutrición crónica. Según la última *Encuesta Nacional de Nutrición y Salud* del Ministerio de Salud de la Nación, la prevalencia de la desnutrición crónica en menores de 5 años es de 8 %, cifra que es más alta en poblaciones en situación de vulnerabilidad social.<sup>3</sup> Patrones alimentarios inadecuados como consecuencia del insuficiente acceso a alimentos en cantidad y calidad, y prácticas familiares relativas a la alimentación saludable son responsables del deterioro del crecimiento longitudinal y del retraso en el desarrollo puberal en niños y adolescentes, con importantes alteraciones metabólicas y neuroendócrinas secundarias al estrés nutricional.<sup>4</sup>

En nuestro laboratorio, hemos descrito un modelo de desnutrición crónica en ratas macho de destete, el cual recrea una entidad clínica observada en niños con retraso del crecimiento que consumen dietas deficientes en la energía global necesaria para lograr una ganancia de peso corporal y un crecimiento longitudinal adecuados.<sup>5</sup> Este tipo de desnutrición se manifiesta por un déficit de los índices antropométricos peso/edad y talla/edad con un peso/talla e indicadores bioquímicos de malnutrición dentro de límites normales.<sup>6</sup> Por otra parte, varios trabajos muestran los efectos de la privación nutricional sobre la estructura y función pulmonar, vía de entrada principal de los contaminantes aéreos al organismo, sobre todo en etapas de crecimiento.<sup>7,8</sup>

La contaminación aérea en las áreas urbanas es una problemática relevante de salud pública. La contaminación

aérea está compuesta por gases (CO, NO<sub>x</sub>, SO<sub>x</sub>) y material particulado (MP) que, en su mayoría, provienen de emisiones vehiculares e industriales. De acuerdo con su diámetro aerodinámico, la OMS clasificó el MP en partículas gruesas (2.5-10 μm), partículas finas (0,1-2,5 μm) y partículas ultrafinas (menores de 0,1 μm), denominadas *MP 10*, *MP 2,5* y *MP 0,1*, respectivamente.<sup>9</sup> Respecto de la composición química, el MP urbano generalmente presenta un núcleo carbonoso, trazas metálicas y compuestos orgánicos volátiles adsorbidos en su superficie: hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) y bifenilospoliclorados (PCB); reconocidos como compuestos carcinogénicos por IARC).<sup>10,11</sup>

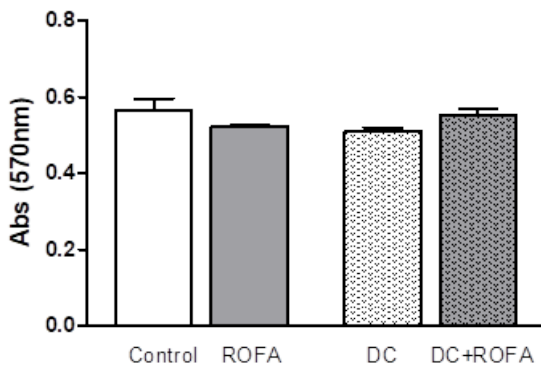
La vía principal de entrada del MP al organismo es la inhalación y el tracto respiratorio, mucosa respiratoria y fagocitos pulmonares son su blanco preferencial. En los macrófagos alveolares (MA), el MP induce la liberación de mediadores como especies reactivas del oxígeno (ROS) y del nitrógeno (NOS), interleuquinas pro y antiinflamatorias (IL-1, IL-6, TNF-α e IL-10, respectivamente), factores mitogénicos y quimiocinas.<sup>12,13</sup> En esta respuesta biológica, se activan caminos de señalización intracelular y factores de transcripción como NFκB y Nrf2 implicados en la respuesta celular de tipo inflamatoria y en la regulación de genes antioxidantes (detoxificantes de fase II).<sup>14,15</sup> Si bien la inhalación es el principal mecanismo por el cual ingresan los contaminantes aéreos al organismo, es conocido que, además de los efectos pulmonares, el MP también puede provocar efectos adversos a el nivel sistémico y en órganos a distancia (corazón, vasos, hígado, cerebro, etc.). La translocación de partículas ultrafinas a través de la barrera alvéolo-capilar y/o los mediadores liberados por las células pulmonares que pasan a circulación tienen su primer blanco de acción en la vasculatura. Diversos trabajos han mostrado que el MP se asocia con múltiples condiciones patológicas, tales como disfunción endotelial, vasoconstricción e incremento de la presión arterial, así como también favorece el desarrollo y progresión de la placa aterogénica.<sup>16,17</sup>

Aún cuando todos los habitantes de las grandes ciudades se encuentran expuestos al MP aéreo, sus efectos

**Tabla 1.** Análisis de parámetros zoométricos en animales controles (C) y animales con desnutrición crónica (DC).

Parámetro	Control (media ± EE)	DC (media ± EE)
Peso corporal (g)	253,4 ± 7,2	144,0 ± 2,9***
Longitud corporal (cm)	21,3 ± 0,2	18,8 ± 0,1***
Peso del fémur (g)	0,648 ± 0,023	0,440 ± 0,015***
Longitud del fémur (mm)	27,05 ± 0,15	23,73 ± 12,00***
Peso de la tibia (g)	0,420 ± 0,015	0,273 ± 0,013***
Longitud de la tibia (mm)	28,70 ± 0,14	25,52 ± 0,13***

► Los datos se expresan como media ± error estándar (EE); \*\*\*p < 0,001.

**Figura 1.** Viabilidad celular de macrófagos alveolares.

► Los histogramas representan la viabilidad celular evaluada por MTT de los grupos experimentales. C, controles; DC, con desnutrición crónica; ROFA, expuestos al material particulado; DC + ROFA, con desnutrición crónica y expuestos al material particulado. Los datos representan la media  $\pm$  error estándar.

dependen no sólo de las características fisicoquímicas de las partículas en suspensión/contaminantes, sino también del individuo en el cual impactan. Al respecto, los niños, los mayores de 65 años y los individuos con fallas cardiorrespiratorias previas son considerados subgrupos susceptibles a sus efectos adversos. Particularmente en niños y adultos jóvenes, la exposición a la contaminación aérea se asocia a cambios en marcadores subclínicos de aterosclerosis como la rigidez arterial y el aumento del espesor de la íntima-media carotídea y puede predisponer al desarrollo temprano de patologías cardiovasculares.<sup>18</sup>

Los niños son una subpoblación de riesgo, probablemente, debido a que presentan inmadurez en sus mecanismos de defensa e inhalan un volumen mayor de aire por unidad de peso corporal que los adultos.<sup>19</sup> La OMS estimó que 600000 niños murieron en 2016 por causas pulmonares asociadas a la contaminación atmosférica y que cerca del 93 % de los niños y niñas del mundo respira aire con niveles de contaminación que ponen en grave peligro su salud y su crecimiento.<sup>20</sup> Sin embargo, son limitadas las referencias sobre cómo afecta el MP a individuos con enfermedades de base no transmisibles, tales como las vinculadas con la malnutrición.

Estudios previos de nuestro laboratorio mostraron que animales con desnutrición crónica (DC), expuestos en forma aguda a cenizas residuales de la combustión del petróleo (ROFA, por sus siglas en inglés, *Residual Oil Fly Ash*) un suceso de la contaminación ambiental aérea, presentan alteraciones en pulmón, hígado y corazón. En el pulmón, se evidenció aumento del proceso inflamatorio, caracterizado por el reclutamiento de células polimorfonucleares y la reducción del espacio alveolar. En el hígado, se observó aumento de linfocitos en el parénquima hepático e incremento del número de hepatocitos binucleados, parámetro

relacionado con la regeneración hepática que representa una respuesta al daño tóxico tisular iniciado por estímulos xenobióticos o dietarios. Con respecto al corazón, la exposición a ROFA alteró el metabolismo oxidativo, que condujo a la peroxidación de lípidos en los animales desnutridos.<sup>21</sup> Estos resultados sugieren que el estado nutricional podría jugar un papel clave en la capacidad de respuesta a los contaminantes del aire.

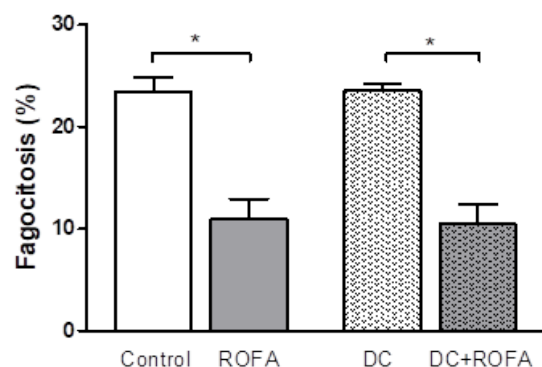
En este contexto, el objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de la exposición aguda a cenizas residuales del petróleo (ROFA) tanto localmente, en la respuesta inmune pulmonar, como sistémicamente en la vasculatura, en un modelo de desnutrición crónica (DC) en ratas. Para ello, se analizaron parámetros relacionados con el metabolismo oxidativo y el proceso inflamatorio, así como también, parámetros moleculares y funcionales.

## Materiales y Métodos

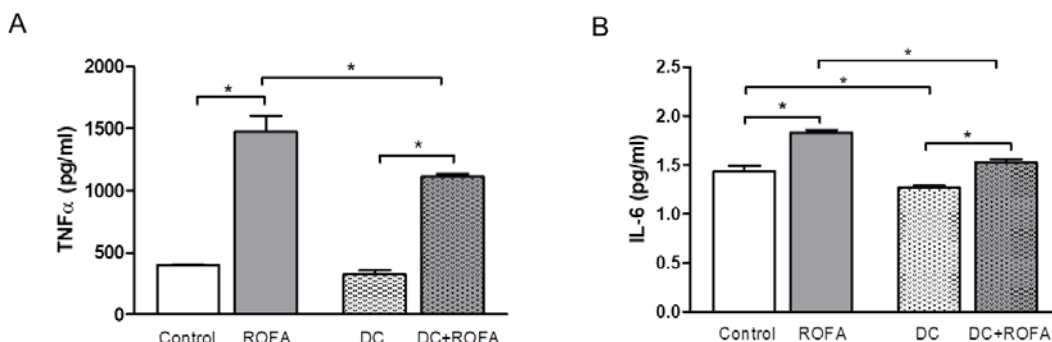
### Animales

Se emplearon ratas macho de la cepa Wistar de destete [21-23 días de edad] provenientes del Bioterio Central de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad de Buenos Aires. Los animales se mantuvieron en condiciones estándares de luz, temperatura y humedad y se alimentaron con una dieta balanceada para roedores, presentada bajo la forma de cilindros prensados con la siguiente composición (g/100 g): proteínas, 22,7; lípidos, 7,09; fibra, 6; Ca, 1,3; P, 0,8; cenizas, 6,5; agua, 7,96; dextrina, hasta 100g. Todos los experimentos se realizaron siguiendo las normas de la *Guía para el cuidado y uso de los animales de experimentación*, de acuerdo con el NIH (Res. 8023).

### 1- Modelo experimental de desnutrición crónica (DC)

**Figura 2.** Actividad fagocítica de macrófagos alveolares.

► Los histogramas representan el porcentaje de fagocitosis de los grupos experimentales. C, controles; DC, con desnutrición crónica; ROFA, expuestos al material particulado; DC + ROFA, con desnutrición crónica y expuestos al material particulado. Los datos representan la media  $\pm$  error estándar, \* $p < 0,05$ .

**Figura 3.** Producción de citoquinas proinflamatorias por macrófagos alveolares.

► Los histogramas representan los niveles del (A) factor de necrosis tumoral (TNF- $\alpha$ ) y (B) interleuquina 6 (IL-6), dosados en sobrenadantes de cultivo de macrófagos alveolares de los grupos experimentales. C, controles; DC, con desnutrición crónica; ROFA, expuestos al material particulado; DC + ROFA, con desnutrición crónica y expuestos al material particulado. Los histogramas muestran la media  $\pm$  error estándar, \* $p < 0,05$ .

Al momento del destete, las ratas fueron distribuidas aleatoriamente en 2 grupos según el consumo de alimento: control (C) y desnutrido crónico (DC). El grupo C recibió una dieta estándar en condiciones de libre demanda, mientras que el grupo DC recibió un 80 % de la dieta consumida por C, durante 4 semanas.

La cantidad de comida fue corregida por el peso corporal (ingesta de alimentos en gramos, por 100g/peso corporal por día). El peso corporal y la longitud fueron registrados a lo largo de todo el experimento.

## 2- Recolección y caracterización de material particulado

Las cenizas residuales de la combustión del petróleo (ROFA) se recolectaron en la planta industrial petrolífera de Mystic River, Everett, MA, USA y fueron donadas por el Dr. J. Godleski, de la Escuela de Salud Pública de Harvard, Boston, MA, USA. Estas partículas son ampliamente utilizadas en toxicología ambiental como sucedáneo de la contaminación ambiental aérea.<sup>22-25</sup>

ROFA fue previamente caracterizada morfológica y químicamente por microscopía electrónica de barrido y espectroscopía dispersiva de rayos X.<sup>25,26</sup> Las partículas de ROFA son morfológicamente heterogéneas, con trazas de metales (hierro, vanadio y níquel) en su composición.

## 3- Exposición animal a ROFA: protocolo experimental

Después de 4 semanas de tratamiento dietario, los animales fueron instilados intranasalmente<sup>27,28</sup> con ROFA (1 mg/kg de peso corporal) o con *buffer* fostato salino estéril (PBS-vehículo), conformando 4 subgrupos ( $n = 15$  por grupo): control, ROFA, DC, DC + ROFA. La dosis de ROFA fue seleccionada sobre la base de trabajos previos.<sup>21-24,26,29</sup> La eutanasia se realizó 24 horas después de la instilación intranasal con una sobredosis de ketamina/xilazina. Inmediatamente, se realizó 1) el lavado bronquioalveolar (LBA) a fin de obtener cultivos primarios de macrófagos alveo-

lares (MA) como modelo para los estudios *in vitro* y 2) se reseco la aorta torácica para los estudios funcionales y bioquímicos.

## 4- Estudios en Macrófagos Alveolares (MA)

### 4.1 Aislamiento de MA y cultivo celular

Los MA de animales de los cuatro grupos experimentales (C, ROFA, DC y DC + ROFA) se obtuvieron mediante el BAL, según Tasat y del Rey.<sup>30</sup> Brevemente, las tráqueas se canularon y perfundieron con 1 ml de PBS frío (libre de  $Ca^{2+}$  y  $Mg^{2+}$ , pH 7,2-7,4). Con el fin de obtener una cantidad óptima de células, el lavado con PBS 1X se repitió 12 veces. La suspensión celular se centrifugó durante 10 minutos a 800xg a 4°C y el precipitado celular se resuspendió en PBS. El recuento de células totales se realizó en cámara de Neubauer, bajo microscopio de contraste de fases. De acuerdo con criterios morfológicos, se determinó que más del 95 % de las células del LBA correspondió a MA. Las células se sembraron en placas de 24 pocillos en medio RPMI-1640 (Gibco, Thermo Fisher Scientific Inc.) con 10 % de suero fetal bovino (SFB), penicilina (100UI/ml) y estreptomocina (10  $\mu$ g/ml) en una densidad de  $0,125 \times 10^6$  células/ml. Luego de 20 - 30 minutos, las células no adheridas fueron removidas y se adicionó medio fresco. Los cultivos se mantuvieron por 24 h en estufa a 37°C y atmósfera de 5 % de  $CO_2$ .

### 4.2 Viabilidad celular

El metabolismo celular se evaluó mediante el ensayo colorimétrico del 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-bromuro de tetrazolio (MTT). Luego de 24 h de la siembra, el medio de cultivo de los MA fue removido y se adicionó 0,5 ml de medio fresco, suplementado con 50  $\mu$ l de MTT (4 mg/ml). Las células se incubaron por 3 h y los cristales de formazan se solubilizaron con SDS 10 %. La absorbancia correspondiente a cada muestra se midió a 570 nm.

#### 4.3 Ensayo de fagocitosis

La capacidad fagocítica de los MA provenientes de los animales C, ROFA, DC y DC + ROFA se determinó empleando esferas de látex de 2,2  $\mu\text{m}$  de diámetro. Brevemente, luego de 24 h de incubación, se agregaron al medio de cultivo esferas de látex opsonizadas con suero fetal bovino en una relación 1:10, durante 1 h a 37°C. Después, se lavó para remover las esferas no fagocitadas y las células fueron fijadas con paraformaldehído al 4 %. La capacidad fagocítica fue evaluada bajo microscopía óptica (Leica DM500) y se cuantificó el porcentaje de fagocitosis. Se contó un mínimo de 100 células por pocillo y al menos tres pocillos por grupo.

#### 4.4 Producción del factor de necrosis tumoral $\alpha$ (TNF $\alpha$ ) e interleuquina-6 (IL-6)

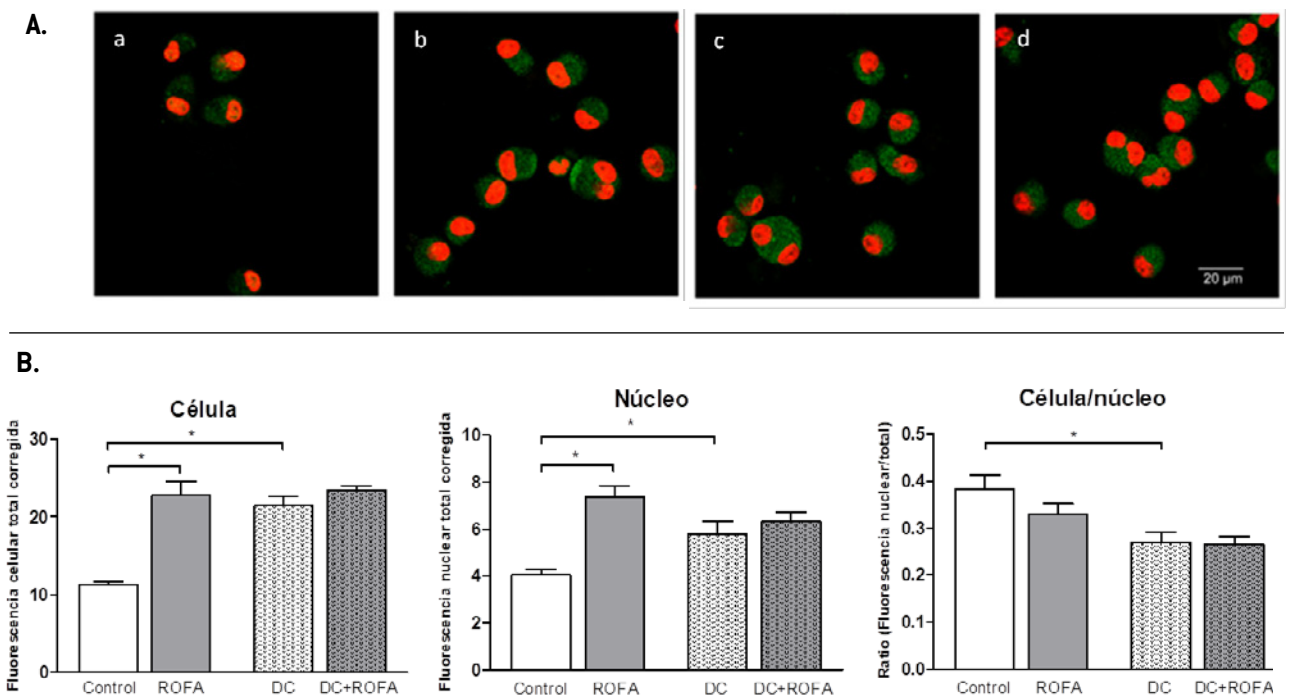
La secreción de las citoquinas proinflamatorias TNF $\alpha$  e IL-6 por MA fue evaluada en el medio de cultivo utilizando un ensayo inmunoabsorbente, ligado a enzimas (ELISA), siguiendo las instrucciones del fabricante. La absorbancia fue medida a 450 nm (longitud de onda de corrección 620 nm) en un lector de placa (BioRad, Benchmark).

#### 4.5 Determinación inmunocitoquímica de la activación del sistema de defensa antioxidante

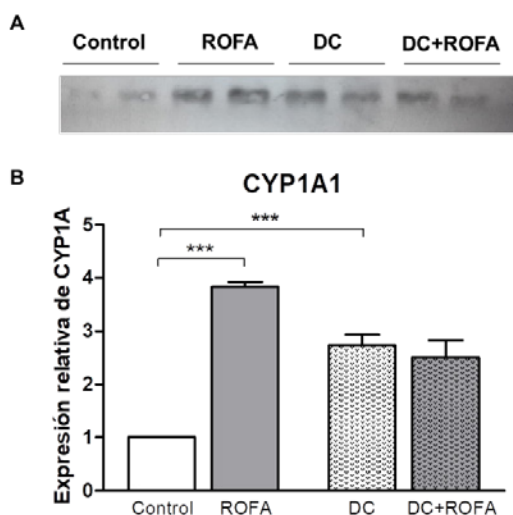
La activación del sistema de defensa antioxidante se evaluó mediante inmunocitoquímica, utilizando un anticuer-

po contra el factor nuclear eritroide similar al factor 2 (Nrf2) [Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX]. Las células fueron fijadas con paraformaldehído al 4 %, permeabilizadas con Tritón<sup>®</sup> X-100 (0,1 %) y se incubaron durante 12 - 14 h con el anticuerpo Nrf2 (1:250) diluido en seroalbúmina bovina (BSA 1%) y 0,03 % de Tritón<sup>®</sup> X-100 en PBS 1X. Luego, las células se lavaron 2 veces con PBS 1X y se incubaron con un anticuerpo secundario durante 1 h (Anti-rabbit- FITC Thermo Fisher Scientific Inc.). Para observar el núcleo de las células, se realizó una contratinción con TO-PRO<sup>™</sup>-3 Iodide (Thermo Fisher Scientific Inc.) por 10 min. Las células fueron observadas bajo microscopía confocal (Leica SP5 AOBs). Para cuantificar el nivel y localización de Nrf2, la fluorescencia celular total corregida (FCTC), la fluorescencia total nuclear corregida (FNTC) y la relación fluorescencia nuclear/fluorescencia celular total fueron analizadas según McCloy et al.<sup>31</sup> El análisis se llevó a cabo utilizando el programa *Image J version 1.53e*. Las células y el núcleo fueron manualmente delimitados y el área, la intensidad integrada y el valor medio de gris fueron determinados. Para obtener la FCTC y la FNTC, los valores fueron corregidos por la fluorescencia de fondo, midiendo la misma área y fluorescencia de sectores sin células, adyacentes a las células evaluadas, y este valor fue sustraído de la densidad integrada de la fluorescencia celular total y la fluorescencia nuclear.

**Figura 4.** Expresión y localización celular del factor nuclear eritroide 2 (Nrf2) en macrófagos alveolares.



► A) Microfotografías representativas de la localización inmunocitoquímica de Nrf2 en animales controles (a), con desnutrición crónica (b) y expuestos al material particulado, ROFA (c y d, respectivamente). Se observan las células marcadas con anticuerpo Nrf2-FITC (verde) y tinción nuclear de contraste empleando ToPro<sup>™</sup> (rojo). B) Cuantificación de la fluorescencia para Nrf2 en la totalidad de la célula, en el núcleo y su relación núcleo/célula total de animales. C, controles; DC, con desnutrición crónica; ROFA, expuestos al material particulado; DC + ROFA, con desnutrición crónica y expuestos al material particulado. Los histogramas muestran la media  $\pm$  error estándar, \* $p < 0,05$ .

**Figura 5.** Expresión del citocromo P450 1A1 (CYP1A1) en aorta.

► La fotografía del Western Blot [A] y el gráfico de barras [B] representan los niveles de CYP1A1 de los grupos experimentales. C, controles; DC, con desnutrición crónica; ROFA, expuestos al material particulado; ROFA y DC + ROFA, con desnutrición crónica y expuestos al material particulado. Los histogramas muestran la media  $\pm$  error estándar, \*\*\* $p < 0,001$ ,  $n = 5 - 7$  animales por grupo.

## 5- Estudios en aorta

### 5.1 Parámetros moleculares

Luego de 24 h de exposición a ROFA se reseco la aorta torácica y se determinaron los siguientes parámetros bioquímicos: citoquinas (IL-6, IL-10 y TNF $\alpha$ ) por ELISA; citocromo P450 familia 1 subfamilia 1 A miembro 1 (CYP1A1); factor de crecimiento transformante  $\beta 1$  (TGF $\beta 1$ ) y óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS) por Western Blot y canal de calcio tipo L por RT-PCR.

#### 5.1.1 Producción de citoquinas

La producción de las citoquinas IL-6, IL-10 y TNF $\alpha$  se evaluó en los sobrenadantes de los homogenatos de aorta de los cuatro grupos experimentales utilizando el ensayo de ELISA, como se describe en el ítem 4.4.

#### 5.1.2 Determinación de CYP1A1, TGF $\beta 1$ y eNOS

CYP1A1, TGF- $\beta 1$  y eNOS fueron evaluados por Western Blot. Las proteínas totales de una alícuota de homogenato de aorta se separaron en un gel de acrilamida 10 - 12 % (SDS-PAGE), en un equipo Mini - Protean III (BioRad). Una vez efectuada la electroforesis, las proteínas fueron transferidas a membranas de PVDF. Las membranas se bloquearon durante 1 h a 4 °C con leche descremada en polvo al 5 % en *buffer* TTBS (10 mM Tris-HCl, pH 8,0, 0,5% Tween 20, 150 mM NaCl) y se incubaron durante 10 -12 h a 4° C con el anticuerpo primario específico anti- $\beta$ -actina (1:500, Sigma-Aldrich Co), anti-TGF- $\beta 1$ , CYP1A1 o eNOS (1:500 Abcam Inc). Luego se las lavó 3 veces con TTBS y se incubaron con un anticuerpo secundario asociado a la enzima peroxidasa

(1:1000 Sigma-Aldrich Co). Las membranas nuevamente se lavaron 3 veces y la marcación se detectó con quimioluminiscencia (ECL- Amersham Biosciences Inc., UK). Las bandas fueron cuantificadas usando el programa *Image J* (1.50i, Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA).

#### 5.1.3 Determinación del canal de calcio tipo L (CCTL)

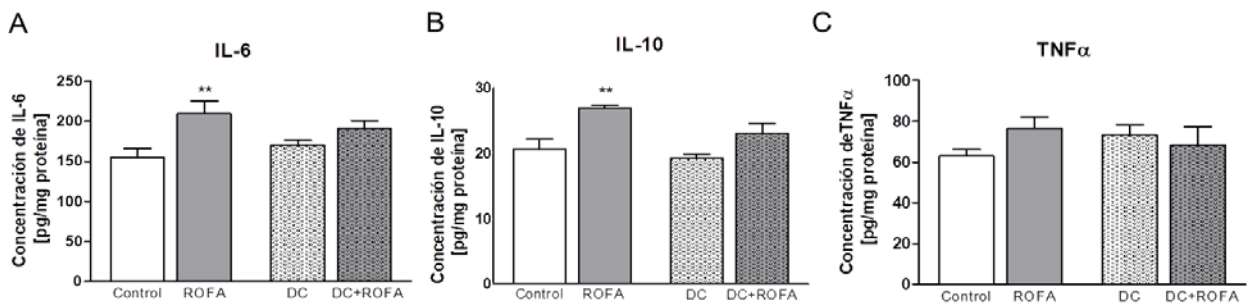
La expresión del CCTL fue evaluada por RT-PCR. El ARN total de las aortas fue extraído con TRIzol (Life Technologies, Inc.-BRL, Grand Island, NY). El ADN copia (ADNc) se sintetizó incubando 2  $\mu$ g del ARN extraído de las aortas, con cebadores de hexámeros al azar (Invitrogen), cada uno de los 4 dNTP (Invitrogen) y 200 unidades de la transcriptasa reversa MMLV (Promega, Buenos Aires, Argentina). El ADNc (2 $\mu$ l) se utilizó para llevar a cabo la amplificación (PCR) empleando Taq Polimerasa (GoTaq Polymerase, Promega) y cebadores específicos para CCTL: sentido: 5'-CCTTCAAGACTGTGTTCAAAGC-3' y antisentido: 5'-TCCTCCACATACCC GT-3'. La gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) se usó como control interno y se utilizaron los siguientes cebadores: sentido: 5'-ACCCAGAAGACTGTGGATGG-3' y antisentido: 5'-CACATTGGGGGTAGGAACAC-3'. Los productos de la amplificación fueron separados en un gel de agarosa al 1 % y teñidos con bromuro de etidio. La densidad de las bandas fue cuantificada utilizando un analizador de imágenes (*Image Quant 5.2*) y normalizada a GAPDH.

#### 5.2. Ensayo de contractibilidad. Medición de la tensión isométrica

Se resacaron las aortas, se sumergieron en solución de Krebs (4,7 mM KCl, 1,17 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 130 mM NaCl, 1,16 mM MgSO<sub>4</sub>, 24,0 mM HCO<sub>3</sub>Na, 2,5 mM CaCl<sub>2</sub> y 6 mM glucosa) y se cortaron en anillos de 3 - 4 mm. Para el montaje, tres anillos de aorta se fijaron en sus extremos con alambres de plata y fueron puestos en un baño de órganos con solución de Krebs-Henseleit (20 ml) a 37° C continuamente suplementado con carbógeno. El alambre inferior estaba unido a una varilla vertical sumergida en el baño de órganos; el otro, a un transductor isométrico de 50 g (TSD125, BIOPACTM) conectado a un equipo de adquisición de datos (MP-100, BIOPACTM) y este, a la computadora donde se registró la señal. Se aplicó una fuerza pasiva de 2 g y la preparación se estabilizó durante 1 h, lavando cada 15 min, antes de iniciar las mediciones. Las mediciones se analizaron con el programa *Labtech Notebook Pro* (Laboratory Technology, Wilmington, MA, EE. UU.).

Para evaluar la respuesta contráctil de la aorta, se agregaron secuencialmente dosis acumulativas (4x10<sup>-8</sup> a 4x10<sup>-4</sup>) de noradrenalina (NA) al baño de órganos. Para normalizar las medidas de los diferentes segmentos aórticos, se utilizó el peso del tejido aórtico húmedo, en gramos.

Para comenzar la prueba, una vez que se colocaron y estabilizaron los segmentos aórticos, se utilizó una solución de KCL (80 mM) para generar contracciones máximas, cuando se despolarizaron las células del músculo liso vas-

**Figura 6.** Perfil de citoquinas inflamatorias en aorta.

► [A-B-C] muestra los niveles de interleuquina 6 (IL-6), interleuquina 10 (IL-10) y factor de necrosis tumoral alfa (TNF) de los grupos experimentales. C, controles; DC, con desnutrición crónica; ROFA, expuestos al material particulado; ROFA y DC + ROFA, con desnutrición crónica y expuestos al material particulado. Los histogramas muestran la media  $\pm$  error estándar, \*\*\* $p < 0,001$ ,  $n = 5 - 7$  animales por grupo.

cular (VSMC). Posteriormente, se evaluó la relajación aórtica antes de la liberación de acetilcolina (ACh) de la aorta precontraída con NA. Al llegar a la meseta de contracción, se analizaron las concentraciones acumuladas de ACh ( $10^{-8}$  -  $10^{-4}$  M). La máxima relajación se expresó como porcentaje de la máxima contracción obtenida con NA.

## 6- Análisis estadístico

Todos los ensayos fueron realizados por triplicado para cada condición experimental y en tres experimentos independientes. Los datos de cada grupo fueron comparados utilizando ANOVA de dos factores y postest de Bonferroni. Los histogramas muestran la media  $\pm$  error estándar. La significancia estadística está indicada por un  $p < 0,05$ .

## Resultados

En línea con estudios realizados previamente en nuestro laboratorio<sup>21</sup>, los animales que recibieron la dieta de restricción calórica (DC), luego de cuatro semanas evidenciaron una disminución significativa en el peso y la longitud corporal total, así como también en fémur y tibia, respecto del grupo control (Tabla 1).

### Evaluación *ex vivo* de la respuesta de MA-DC expuestos a ROFA

Se estudió la respuesta funcional de MA obtenidos por medio de LBA para los cuatro grupos estudiados. Se determinaron los siguientes parámetros: viabilidad celular, capacidad fagocítica, producción de citoquinas proinflamatorias y activación del sistema de defensa antioxidante.

#### 1.1. Viabilidad celular

La exposición a ROFA no alteró la viabilidad de los MA de ninguno de los grupos (Control, ROFA, DC y DC + ROFA) de animales estudiados (Figura 1).

#### 1.2. Actividad fagocítica

Para determinar la capacidad funcional de los MA obtenidos de los grupos control, ROFA, DC y DC + ROFA, se evaluó su actividad fagocítica. Como se evidencia en la Figura 2, la

exposición a ROFA produjo una disminución en la actividad fagocítica tanto en los animales C como DC ( $p < 0.05$ ).

#### 1.3. Producción de citoquinas proinflamatorias

La secreción de citoquinas proinflamatorias de los cultivos de MA obtenidos de los grupos control, ROFA, DC y DC + ROFA se observa en la Figura 3. ROFA indujo un incremento significativo de los niveles de TNF $\alpha$  para C y DC ( $p < 0.05$ ). Cabe notar que el incremento de los niveles de TNF $\alpha$  fue menor en el grupo DC + ROFA en comparación con C + ROFA ( $p < 0.05$ , Figura 3A). Asimismo, el tratamiento con ROFA indujo un incremento significativo de los niveles de IL-6. Esta respuesta siguió un patrón similar al evidenciado por TNF $\alpha$  ( $p < 0.05$ , Figura 3B).

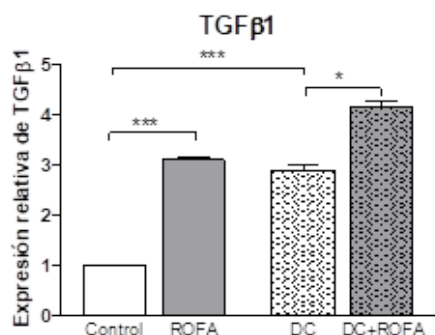
#### 1.4. Activación del factor nuclear antioxidante Nrf2

En respuesta al estrés oxidativo, la vía del Nrf2 se activa y desencadena una respuesta antioxidante que permite mantener la homeostasis redox celular. Es por ello que evaluamos el nivel de expresión del factor de transcripción Nrf2 e identificamos inmunocitoquímicamente su localización celular. Las Figuras 4A y 4B muestran imágenes representativas de la localización de Nrf2 y la cuantificación de su fluorescencia, respectivamente.

Al comparar MA-C y MA-DC no expuestos, se observa un incremento significativo en la inmunomarcación de Nrf2 para MA-DC (Figura 4A-a vs. c), que presenta un aumento de la expresión tanto en el nivel celular como en el nivel nuclear ( $p < 0.05$ , Figura 4B). Sin embargo, la relación de fluorescencia núcleo/célula total en MA-DC muestra que la activación antioxidante de Nrf2 fue menor que en los MA-C (Figura 4B).

La exposición a ROFA en los MA-C ocasionó una clara inducción de Nrf2, tanto en el nivel celular total como nuclear (Figuras 4A-b y 4B) con respecto a los MA-C no expuestos a ROFA (Figuras 4A-a y 4B). No se observaron cambios significativos en la expresión o en la localización celular de Nrf2 entre MA-DC y DC + ROFA (Figuras 4A-c y d, y Figura 4B).

**Figura 7.** Expresión del factor de crecimiento transformante  $\beta 1$  (TGF- $\beta 1$ ) en aorta.



► El gráfico de barras representa los niveles de TGF- $\beta 1$  de los grupos experimentales. C, controles; DC, con desnutrición crónica; ROFA, expuestos al material particulado; ROFA y DC + ROFA, con desnutrición crónica y expuestos al material particulado. Los histogramas muestran la media  $\pm$  error estándar, \* $p < 0,05$ , \*\*\* $p < 0,001$ ,  $n = 5 - 7$  animales por grupo.

## 2. Efectos de la exposición a ROFA en la vasculatura de animales DC

### 2.1 Parámetros moleculares vasculares

#### 2.1.1 Citocromo P450 1A1 (CYP1A1)

Como se muestra en la Figura 5, en las ratas control, ROFA aumentó los niveles de CYP1A1 con respecto a las ratas no expuestas (283 %,  $p < 0,001$ ), mientras que los animales desnutridos expuestos no mostraron cambios en la expresión de CYP1A1.

#### 2.1.2 Perfil de citoquinas

La Figura 6 muestra el perfil de citoquinas en homogenatos de aorta, en donde se observó que la exposición a ROFA, en las ratas C, indujo aumento significativo de IL-6 e IL-10 (35 % y 30 %, respectivamente,  $p < 0,05$ ), sin observarse cambios en los niveles de TNF $\alpha$ . Los animales DC expuestos a ROFA no mostraron variaciones en los niveles de ninguna de las citoquinas evaluadas.

#### 2.1.3 Factor de crecimiento transformante $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$ )

Como se muestra en la Figura 7, los animales DC presentan mayores niveles de los TGF- $\beta 1$  en aorta que los animales de C ( $p < 0,001$ ). La instilación con ROFA indujo un aumento significativo en la expresión de TGF- $\beta 1$  en ambos grupos de animales. Sin embargo, cabe destacar que la inducción de TGF- $\beta 1$  en los animales expuestos a ROFA fue menor en el grupo DC en comparación con el grupo C (41 %  $p < 0,05$  vs. 216 %  $p < 0,001$ , respectivamente).

#### 2.1.4 Óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS)

Se evaluó la expresión de la eNOS en las aortas de los cuatro grupos experimentales y se observó que la expresión de esta enzima está disminuida en aortas de animales DC con respecto a C (Figura 8  $p < 0,001$ ). La instilación con ROFA provocó una reducción significativa de la eNOS tanto

para el grupo C como para el DC, siendo este mayor para el grupo control (Figura 8,  $p < 0,001$ ).

#### 2.1.5 Canales de calcio tipo L (CCTL)

Al analizar los niveles de expresión de CCTL, se encontró un patrón similar a la expresión de eNOS (Figura 9). La expresión de CCTL en aortas de animales DC fue menor que en grupo C ( $p < 0,005$ ). Asimismo, la exposición a ROFA indujo una reducción en los grupos C y DC ( $p < 0,001$ ).

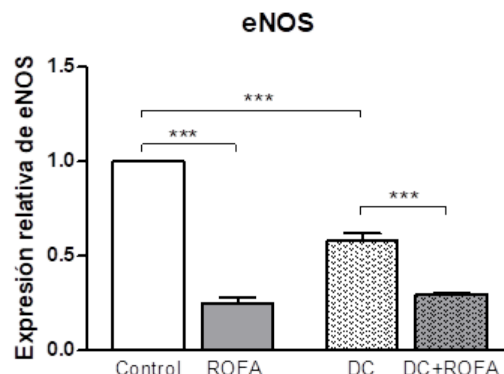
### 2.2 Parámetros funcionales: contractilidad aórtica

Con el objetivo de analizar la función arterial, se evaluó el tono vascular de los anillos de aorta (endotelio y músculo liso) en respuesta a la NA y Ach. Los animales DC presentaron una respuesta contráctil a la NA menor respecto de los animales controles. La exposición a ROFA provocó una disminución de la contractibilidad de la aorta en el grupo control, sin embargo, este efecto no se evidenció en los animales DC (Figura 10 A). Respecto de la relajación vascular, la instilación de ROFA provocó una reducción en la capacidad de relajación en respuesta a la Ach tanto en el grupo C como en el DC. En el grupo de animales DC + ROFA, se observó una marcada desaceleración de la relajación y se alcanzó un porcentaje final de relajación menor respecto del grupo control expuesto a ROFA (Figura 10 B).

## Discusión

Mundialmente la exposición a la contaminación aérea (gases y material particulado-MP) en los actuales escenarios, es casi inevitable. El impacto del MP sobre la salud depende tanto de sus características intrínsecas (tamaño aerodinámico, composición química), de la concentración y tiempo de exposición a las mismas como de las características del individuo sobre el cual impactan. Las partículas suspendidas en el aire pueden ingresar al organismo a través

**Figura 8.** Expresión la enzima óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS) en aorta.



► El gráfico de barras representa los niveles de eNOS de los grupos experimentales. C, controles; DC, con desnutrición crónica; ROFA, expuestos al material particulado; ROFA y DC + ROFA, con desnutrición crónica y expuestos al material particulado. Los histogramas muestran la media  $\pm$  error estándar, \*\*\* $p < 0,001$ ,  $n = 5 - 7$  animales por grupo.



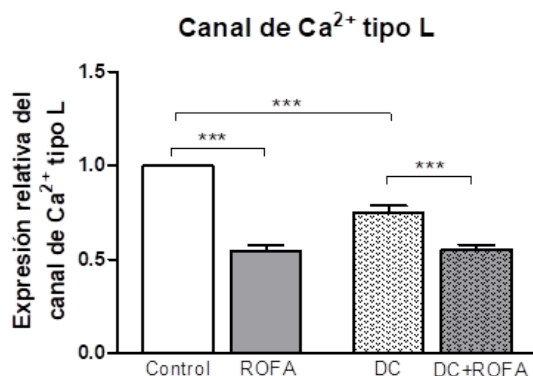
de tres vías principales: respiratoria, digestiva y dérmica, comprometiendo la salud humana.<sup>33</sup> La ruta predominante es la respiratoria y los macrófagos alveolares (MA) son la primera línea de defensa del organismo.<sup>34</sup>

Según la Organización Mundial de la Salud<sup>20</sup>, los niños son especialmente vulnerables a los efectos de la contaminación del aire, ya que presentan una mayor tasa de inhalación y sus mecanismos de defensa están aún inmaduros. Además, los niños son altamente susceptibles a la malnutrición. Las restricciones en la dieta pueden dar como resultado retraso en el crecimiento del niño asociado a una mayor morbilidad por infecciones respiratorias<sup>35</sup>, así como un mayor riesgo de padecer en la edad adulta enfermedades crónicas relacionadas con desórdenes metabólicos, hipertensión y otras patologías cardiovasculares.<sup>36</sup> Además, la restricción dietaria exagera la vulnerabilidad de los individuos a los efectos adversos de la contaminación ambiental sobre la salud.<sup>37-39</sup> Aun así, existen pocos estudios que asocien la desnutrición infantil y la contaminación ambiental aérea. En este contexto, investigamos los efectos de la exposición a MP aéreo y desnutrición en un modelo experimental murino.

Numerosos trabajos han demostrado que el estrés oxidativo y los procesos inflamatorios son las vías de señalización a través de las cuales tanto la contaminación como la malnutrición ejercen sus efectos adversos sobre el organismo. Además, algunos estudios muestran que la desnutrición afecta de manera diferente el metabolismo oxidativo y la inflamación provocados por la contaminación ambiental.<sup>40,41</sup>

La toxicidad del MP está relacionada con un incremento en la generación de especies reactivas del oxígeno (ROS), la expresión de citoquinas pro y antiinflamatorias (IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$  e IL-10), factores mitogénicos, quimiocinas<sup>13,42</sup> y la activación de células inflamatorias como macrófagos y neutrófilos.<sup>43</sup> En concordancia, nuestros resultados muestran que en macrófagos alveolares (MA) provenientes de ratas, expuestos a ROFA en cultivo, la producción de las citoquinas proinflamatorias IL-6 y TNF aumenta. Sin embargo, esta respuesta resultó atenuada en los MA provenientes de animales desnutridos (DC). Los metales presentes en las partículas aéreas son conocidos inductores de la generación de ROS.<sup>44,45</sup> En particular, la ROFA presenta en su composición metales tales como el vanadio, aluminio, etc.<sup>46</sup> En este sentido, en un estudio previo, mostramos que la exposición aguda a ROFA indujo en pulmón, mediante un aumento de la producción de ROS y una disminución de la capacidad de las enzimas antioxidantes SOD y CAT, desbalance redox resultante en un desequilibrio del metabolismo oxidativo celular.<sup>21</sup> La vía de señalización antioxidante Nrf2/Keap1/ARE celular se activa en respuesta a estresores con el fin de contrarrestar un posible daño oxidativo. Diversos estudios revelan la participación de Nrf2 en el balance energético celular y esta función está íntimamente ligada al estatus nutricional.<sup>47,48</sup> En este estudio, observamos que los MA-DC

Figura 9. Expresión del canal de calcio tipo L (CCTL) en aorta.

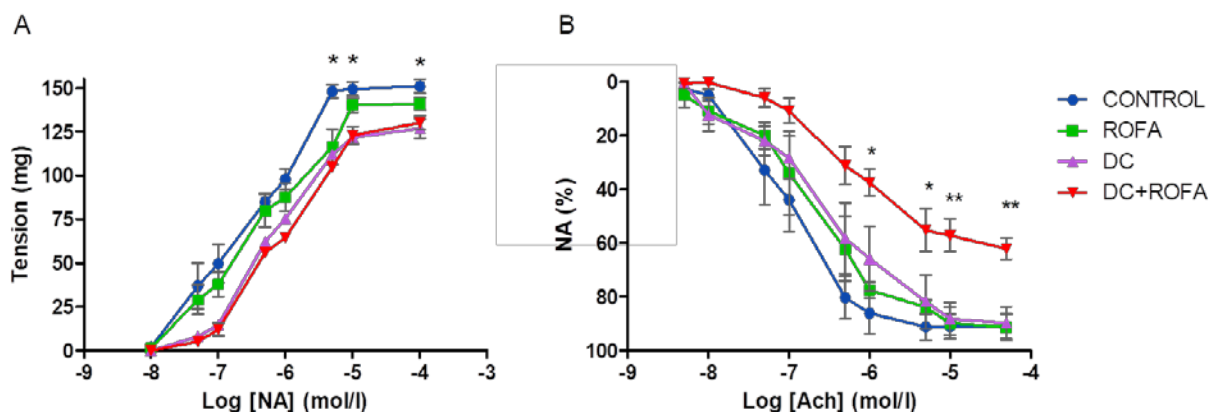


► El gráfico de barras representa los niveles de CCTL de los grupos experimentales. C, controles; DC, con desnutrición crónica; ROFA, expuestos al material particulado; ROFA y DC + ROFA, con desnutrición crónica y expuestos al material particulado. Los histogramas muestran la media  $\pm$  error estándar, \*\*\*  $p < 0,001$ ,  $n = 5-7$  animales por grupo.

presentaron basalmente mayores niveles de Nrf2 que los MA-C tanto en el citoplasma como en el núcleo. El aumento de Nrf2 podría ser parte de la respuesta frente al estado prooxidante que presentan en el pulmón los animales con desnutrición crónica, lo que fue evidenciado en trabajos previos como aumento del anión superóxido en células del LBA y alteraciones en enzimas antioxidantes tisulares.<sup>21</sup> Luego de la exposición a ROFA, aumentan la expresión y translocación nuclear de Nrf2 en los MA-C, mientras que en MA-DC, no se modifican los niveles de Nrf2 citoplasmático ni su translocación. Este fenómeno podría deberse a que los niveles basales de Nrf2 en MA-DC son más elevados, lo que podría representar una menor capacidad de respuesta a un xenobiótico.

El MP actúa no solo localmente sobre el sistema respiratorio, sino también alcanza órganos a distancia como corazón, hígado, cerebro, etc.<sup>49-52</sup> El MP puede atravesar la barrera alvéolo-capilar ingresando al sistema vascular para luego distribuirse en el organismo. Por ello, siendo la vasculatura un blanco de su acción, estudiamos el efecto de ROFA en los niveles molecular y funcional en la aorta. Como se mencionó anteriormente, la exposición a la contaminación del aire induce en las vías respiratorias la liberación de mediadores oxidantes e inflamatorios, con la consiguiente disfunción endotelial y aumento posterior de la presión arterial. En este sentido, la contaminación del aire juega un papel crucial desencadenando la disfunción endotelial.

La función endotelial fundamental se basa en un delicado equilibrio entre la formación y la degradación del óxido nítrico (NO). Este metabolito es clave para muchas funciones de la vasculatura como la regulación del tono vascular, el mantenimiento de la coagulación y la fluidez de la sangre, la producción de moléculas que regulan la función inflamatoria y la reparación vascular. La disfunción endotelial es un

**Figura 10.** Evaluación de contractilidad aortica.

► El tono vascular se evaluó en anillos de aorta de los grupos experimentales C, controles; DC, con desnutrición crónica; ROFA, expuestos al material particulado; ROFA y DC + ROFA, con desnutrición crónica y expuestos al material particulado. Se determinó la capacidad de contracción en respuesta a noradrenalina –NA (A) y la relajación en respuesta a acetilcolina– Ach (B). La línea celeste corresponde al grupo C; la verde, a ROFA; la lila, a DC y la roja, a DC + ROFA. \*\* $p < 0,01$ , \* $p < 0,05$ . N = 3 - 4 animales por grupo.

sello distintivo de la enfermedad cardiovascular (CVD), ya que puede afectar negativamente la rigidez arterial y provocar hipertensión persistente. En concordancia, en este modelo de desnutrición crónica, la exposición a ROFA indujo en la vasculatura respuestas moleculares y funcionales alteradas.

En cuanto a los resultados moleculares, la respuesta del sistema vascular a la exposición a ROFA se evaluó mediante el CYP1A1, enzima que juega un papel importante tanto en la activación metabólica como en la detoxificación. Cabe notar que los niveles de los citocromos P450 dependen del tipo de dieta de restricción calórica utilizada. Lee, JH et al. (2004), empleando una dieta de restricción proteica, encuentran disminución de las isoformas CYP1A2, CYP2C11, CYP2E1 y CYP3A1/2<sup>53</sup>, mientras que, en nuestro modelo de restricción calórica, donde no hay alteración en la proporción de los componentes dietarios, observamos un aumento de CYP1A1 en los animales DC. Sin embargo, en los animales DC expuestos a ROFA no se registraron cambios respecto de los niveles basales, lo que revela menor capacidad de respuesta que la observada en los animales controles.

La evaluación de las citoquinas IL-6 y IL-10 aumentó en respuesta a la exposición a ROFA en la vasculatura, coincidiendo con la respuesta observada en otros órganos como el pulmón<sup>54</sup> y en las células vasculares.<sup>55</sup> En los DC la respuesta inflamatoria, independientemente de la exposición a partículas, se mantuvo en los mismos niveles que los basales.

TGF- $\beta$ 1 es una citoquina pleiotrópica que vascularmente juega un rol importante tanto en condiciones fisiológicas como patológicas. En este trabajo, observamos cómo la desnutrición aumenta los niveles basales de TGF- $\beta$ 1. Sin embargo, en ambos grupos (C y DC), la exposición a ROFA aumenta significativamente la expresión de esta citoquina. TGF- $\beta$ 1 ejerce sus efectos tanto sobre las células endotelia-

les como sobre las fibras musculares lisas de la vasculatura.<sup>56</sup> El NO es generado principalmente por la enzima óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS) y es uno de los agentes vasoactivos más importantes producidos por el endotelio, que induce la relajación del músculo liso vascular e inhibe la activación y agregación plaquetaria. En este contexto, observamos que la expresión de eNOS está disminuida en aortas de animales DC con respecto a C. La exposición a ROFA indujo reducción de los niveles de eNOs en ambos grupos, independientemente de sus niveles basales. Se ha demostrado que TGF- $\beta$ 1 puede regular negativamente la producción de NO.<sup>57</sup> En concordancia, este trabajo muestra por primera vez cómo la exposición a ROFA aumenta los niveles de TGF- $\beta$ 1 y disminuye la eNOS vascular tanto en el grupo C como DC.

La concentración de  $Ca^{+2}$  intracelular es otro de los factores que intervienen en la función contráctil vascular. El canal de  $Ca^{+2}$  tipo L es uno de los marcadores del fenotipo contráctil en las células del músculo liso vascular. El patrón de expresión de esta molécula resultó semejante al descrito para eNOS e indica una disminución del canal en los DC, lo que podría afectar la función contráctil vascular.

Recientemente, algunos estudios han demostrado que la exposición a la contaminación del aire induce hipertensión asociada con vasorrelajación disminuida, inducida por acetilcolina en ratones.<sup>58,59</sup> En concordancia con estas observaciones, encontramos que la exposición a ROFA redujo significativamente la capacidad de contracción y relajación aórtica en ratas, procesos que se vieron más afectados en el grupo DC en comparación con los controles. Estos resultados se podrían interpretar como una menor capacidad de respuesta en el grupo desnutrido.

En conclusión, mostramos que los animales DC no lograron activar la respuesta inflamatoria y detoxificante a ROFA. En relación con la capacidad contráctil del sistema vascu-

lar, se observa una franca disminución, así como un cambio fenotípico hacia un tipo celular más indiferenciado. Nuestros resultados sugieren que la desnutrición aumentaría el riesgo de enfermedad cardiovascular a través de la disfunción endotelial en escenarios de contaminación ambiental.

### Agradecimientos

Los autores agradecen a los Dres. Verónica Delfosse y Diego Viale por la asistencia técnica y la cuantificación de la fluorescencia del Nrf2.

Este trabajo fue parcialmente subsidiado por la Agencia Nacional de Promoción de la Ciencia y la Tecnología, Argentina; PICT 2017-1309 y PICT 2017-4549, con subsidios de la Universidad de Buenos Aires UBACyT 20020170100001BA y de la Sociedad Argentina de Biología (Jóvenes investigadores 2021).

### Conflictos de interés

Los autores declaran no poseer conflictos de intereses.

### Referencias bibliográficas

1. Swinburn BA, Kraak VI, Allender S, Atkins VJ, Baker PI, Bogard JR et al. The Global Syndemic of Obesity, Undernutrition, and Climate Change: The Lancet Commission report. *Lancet*. 2019;393(10173):791-846.
2. Organización Mundial de la Salud. Malnutrición. [Internet]. OMS. 2021 Jun 9. [Consultado 10 Abril 2022]. Disponible en: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/malnutrition>
3. Ministerio de Salud y Desarrollo Social de la Nación. 2º Encuesta Nacional de Nutrición y Salud [ENNYS 2]. Resumen ejecutivo 2019. [Internet]. Argentina: Ministerio de Salud y Desarrollo Social de la Nación. Septiembre 2019. [Consultado 10 Abril 2022]. Disponible en: [https://bancos.salud.gob.ar/sites/default/files/2020-01/encuesta-nac-nutricion-salud\\_resumen-ejecutivo.pdf](https://bancos.salud.gob.ar/sites/default/files/2020-01/encuesta-nac-nutricion-salud_resumen-ejecutivo.pdf)
4. Ministerio de Salud de la Nación. Encuesta Nacional de Nutrición y Salud [ENNYS]. [Internet]. Argentina: Ministerio de Salud y Desarrollo Social de la Nación. 2007. [Consultado 10 Abril 2022]. Disponible en: [https://bancos.salud.gob.ar/recurso/encuesta-nacional-de-nutricion-y-salud\\_documento-de-resultados-2007](https://bancos.salud.gob.ar/recurso/encuesta-nacional-de-nutricion-y-salud_documento-de-resultados-2007)
5. Friedman SM, Rodríguez PN, Olivera MI, Bozzini C, Norese F, Gamba CA et al. Enanismo por desnutrición: cronodinamia de los procesos metabólicos en ratas. *Medicina [B Aires]*. 1998;58(3):282-6.
6. Lifshitz F, Pintos PM, Lezón CE, Macri EV, Friedman SM, Boyer PM. Dyslipidemia is not associated with cardiovascular disease risk in an animal model of mild chronic suboptimal nutrition. *Nutr Res*. 2012;32(1):52-8.
7. Sahebajani H. Nutrition and lung structure and function. *Exp Lung Res*. 1993;19(2):105-24.
8. Arbex MA, Santos Ude P, Martins LC, Saldiva PH, Pereira LA, Braga AL. Air pollution and the respiratory system. *J Bras Pneumol*. 2012;38(5):643-55.
9. World Health Organization. Regional Office for Europe. Air quality guidelines: global update 2005: particulate matter, ozone, nitrogen dioxide and sulfur dioxide. [Internet]. Copenhagen: World Health Organization. Regional Office for Europe; 2006 [Consultado 10 Abril 2022]. Disponible en: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/107823>
10. Martin S, Dawidowski L, Mandalunis P, Cereceda-Balic F, Tasat DR. Characterization and biological effect of Buenos Aires urban air particles on mice lungs. *Environ Res*. 2007;105(3):340-9.
11. Loomis D, Grosse Y, Lauby-Secretan B, El Ghissassi F, Bouvard V, Benbrahim-Tallaa L et al. International Agency for Research on Cancer Monograph Working Group IARC. The carcinogenicity of outdoor air pollution. *Lancet Oncol*. 2013;14(13):1262-3.
12. González-Flecha B. Oxidant mechanisms in response to ambient air particles. *Mol Aspects Med*. 2004;25(1-2):169-82.
13. Hiraiwa K, van Eeden SF. Contribution of lung macrophages to the inflammatory responses induced by exposure to air pollutants. *Mediators Inflamm*. 2013;2013:619523.
14. Zhang H, Liu H, Davies KJ, Sioutas C, Finch CE, Morgan TE et al. Nrf2-regulated phase II enzymes are induced by chronic ambient nanoparticle exposure in young mice with age-related impairments. *Free Radic Biol Med*. 2012;52(9):2038-46. Erratum in: *Free Radic Biol Med*. 2014;77:388.
15. Churg A, Xie C, Wang X, Vincent R, Wang RD. Air pollution particles activate NF-kappaB on contact with airway epithelial cell surfaces. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2005;208(1):37-45.
16. Pope CA 3rd, Bhatnagar A, McCracken JP, Abplanalp W, Conklin DJ, O'Toole T. Exposure to Fine Particulate Air Pollution Is Associated With Endothelial Injury and Systemic Inflammation. *Circ Res*. 2016;119(11):1204-1214.
17. Brook RD, Urch B, Dvornch JT, Bard RL, Speck M, Keeler G et al. Insights into the mechanisms and mediators of the effects of air pollution exposure on blood pressure and vascular function in healthy humans. *Hypertension*. 2009;54(3):659-67.
18. Lenters V, Uiterwaal CS, Beelen R, Bots ML, Fischer P, Brunekreef B et al. Long-term exposure to air pollution and vascular damage in young adults. *Epidemiology*. 2010;21(4):512-20.
19. Salvi SS, Kumar A, Puri H, Bishnoi S, Asaf BB, Ghorpade D et al. Association between air pollution, body mass index, respiratory symptoms, and asthma among adolescent school children living in Delhi, India. *Lung India*. 2021;38(5):408-415.
20. Organización Mundial de la Salud. Contaminación atmosférica y salud infantil: prescribir aire limpio. Resumen. [Internet]. 2018. Disponible en: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/275548>.
21. Kurtz ML, Astort F, Lezon C, Ferraro SA, Maglione GA, Orona NS et al. Oxidative stress response to air particle pollution in a rat nutritional growth retardation model. *J Toxicol Environ Health A*. 2018;81(20):1028-1040.
22. Orona NS, Ferraro SA, Astort F, Morales C, Brites F, Boero L et al. Acute exposure to Buenos Aires air particles (UAP-BA) induces local and systemic inflammatory response in middle-aged mice: A time course study. *Environ Pollut*. 2016;208(Pt A):261-270.
23. Marchini T, Magnani ND, Paz ML, Vanasco V, Tasat D, González Maglio DH et al. Time course of systemic oxidative stress and inflammatory response induced by an acute exposure to Residual Oil Fly Ash. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2014;274(2):274-82.
24. Delfosse VC, Tasat DR, Gioffré AK. In vivo short-term exposure to residual oil fly ash impairs pulmonary innate immune response against environmental mycobacterium infection. *Environ Toxicol*. 2015;30(5):589-96.
25. Ghio AJ, Silbajoris R, Carson JL, Samet JM. Biologic effects of oil fly ash. *Environ Health Perspect*. 2002;110(Suppl 1):89-94.
26. Ferraro SA, Yakisich JS, Gallo FT, Tasat DR. Simvastatin pretreatment prevents ambient particle-induced lung injury in mice. *Inhal Toxicol*. 2011;23(14):889-96.
27. Leong BK, Coombs JK, Sabaitis CP, Rop DA, Aaron CS. Quantitative morphometric analysis of pulmonary deposition of aerosol particles inhaled via intratracheal nebulization, intratracheal instillation or nose-only inhalation in rats. *J Appl Toxicol*. 1998;18(2):149-60.
28. Southam DS, Dolovich M, O'Byrne PM, Inman MD. Distribution of intranasal instillations in mice: effects of volume, time, body position, and anesthesia. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2002;282(4):L833-9.
29. Magnani ND, Marchini T, Vanasco V, Tasat DR, Alvarez S, Evelson P. Reactive oxygen species produced by NADPH oxidase and mitochondrial dysfunction in lung after an acute exposure to residual oil fly ashes. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2013;270(1):31-8.
30. Tasat DR, de Rey BM. Cytotoxic effect of uranium dioxide on rat alveolar macrophages. *Environ Res*. 1987;44(1):71-81.
31. McCloy RA, Rogers S, Caldon CE, Lorca T, Castro A, Burgess A. Partial inhibition of Cdk1 in G2 phase overrides the SAC and decouples mitotic events. *Cell Cycle*. 2014;13(9):1400-12.
32. Tasat DR, Lezón CE, Astort F, Pintos PM, Macri EV, Friedman SM et al.

- mRNA of cytokines in bone marrow and bone biomarkers in response to propranolol in a nutritional growth retardation model. *Pharmacol Rep.* 2014;66(5):867-73.
33. Oberdörster G, Maynard A, Donaldson K, Castranova V, Fitzpatrick J, Ausman K, et al. Principles for characterizing the potential human health effects from exposure to nanomaterials: elements of a screening strategy. *Part Fibre Toxicol.* 2005;2:8.
  34. Byrne AJ, Mathie SA, Gregory LG, Lloyd CM. Pulmonary macrophages: key players in the innate defence of the airways. *Thorax.* 2015;70(12):1189-96.
  35. Aguayo VM, Menon P. Stop stunting: improving child feeding, women's nutrition and household sanitation in South Asia. *Matern Child Nutr.* 2016;12 [Suppl 1]:3-11.
  36. Gluckman PD, Hanson MA, Cooper C, Thornburg KL. Effect of in utero and early-life conditions on adult health and disease. *N Engl J Med.* 2008;359(1):61-73.
  37. Bharatraj DK, Yathapu SR. Nutrition-pollution interaction: An emerging research area. *Indian J Med Res.* 2018;148(6):697-704.
  38. Miller CN, Rayalam S. The role of micronutrients in the response to ambient air pollutants: Potential mechanisms and suggestions for research design. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev.* 2017;20(1):38-53.
  39. Kordas K, Lönnnerdal B, Stoltzfus RJ. Interactions between nutrition and environmental exposures: effects on health outcomes in women and children. *J Nutr.* 2007;137(12):2794-7.
  40. Petriello MC, Newsome BJ, Dziubla TD, Hilt JZ, Bhattacharyya D, Hennig B. Modulation of persistent organic pollutant toxicity through nutritional intervention: emerging opportunities in biomedicine and environmental remediation. *Sci Total Environ.* 2014;491-492:11-6.
  41. Hennig B, Ettinger AS, Jandacek RJ, Koo S, McClain C, Seifried H et al. Using nutrition for intervention and prevention against environmental chemical toxicity and associated diseases. *Environ Health Perspect.* 2007;115(4):493-5.
  42. Tao F, Gonzalez-Flecha B, Kobzik L. Reactive oxygen species in pulmonary inflammation by ambient particulates. *Free Radic Biol Med.* 2003;35(4):327-40.
  43. Knaapen AM, Borm PJ, Albrecht C, Schins RP. Inhaled particles and lung cancer. Part A: Mechanisms. *Int J Cancer.* 2004;109(6):799-809.
  44. Guan L, Rui W, Bai R, Zhang W, Zhang F, Ding W. Effects of Size-Fractionated Particulate Matter on Cellular Oxidant Radical Generation in Human Bronchial Epithelial BEAS-2B Cells. *Int J Environ Res Public Health.* 2016;13(5):483.
  45. Rui Chen, Hong Yin, Ivan S. Cole, Shirley Shen, Xingfan Zhou, Yuqian Wang et al. Exposure, assessment and health hazards of particulate matter in metal additive manufacturing: A review. *Chemosphere.* 2020. Volume 259.
  46. Ferraro S, Orona N, Villalón L, Saldiva PH, Tasat DR, Berra A. Air particulate matter exacerbates lung response on Sjögren's Syndrome animals. *Exp Toxicol Pathol.* 2015;67(2):125-31.
  47. Tebay LE, Robertson H, Durant ST, Vitale SR, Penning TM, Dinkova-Kostova AT. Mechanisms of activation of the transcription factor Nrf2 by redox stressors, nutrient cues, and energy status and the pathways through which it attenuates degenerative disease. *Free Radic. Biol. Med.* 2015;88(Pt B):108-146.
  48. Vasconcelos AR, Dos Santos NB, Scavone C, Munhoz CD. Nrf2/ARE Pathway Modulation by Dietary Energy Regulation in Neurological Disorders. *Front Pharmacol.* 2019;10:33.
  49. Oberdörster G, Sharp Z, Atudorei V, Elder A, Gelein R, Lunts A et al. Extrapulmonary translocation of ultrafine carbon particles following whole-body inhalation exposure of rats. *J Toxicol Environ Health A.* 2002;65(20):1531-43.
  50. Brook RD, Franklin B, Cascio W, Hong Y, Howard G, Lipsett M et al. Expert Panel on Population and Prevention Science of the American Heart Association. Air pollution and cardiovascular disease: a statement for healthcare professionals from the Expert Panel on Population and Prevention Science of the American Heart Association. *Circulation.* 2004;109(21):2655-71.
  51. Brook RD. Cardiovascular effects of air pollution. *Clin Sci (Lond).* 2008;115(6):175-87.
  52. Nemmar A, Vanbilloen H, Hoylaerts MF, Hoet PH, Verbruggen A, Nemery B. Passage of intratracheally instilled ultrafine particles from the lung into the systemic circulation in hamster. *Am J Respir Crit Care Med.* 2001;164(9):1665-8.
  53. Lee JH, Suh OK, Lee MG. Pharmacokinetic changes in drugs during protein-calorie malnutrition: correlation between drug metabolism and hepatic microsomal cytochrome P450 isozymes. *Arch Pharm Res.* 2004;27(7):693-712.
  54. Orona N, Astort F, Maglione GA, Ferraro SA, Martin M, Morales C et al. Hazardous effects of urban air particulate matter acute exposure on lung and extrapulmonary organs in mice. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 2020;190:110120.
  55. Hu H, Wu J, Li Q, Asweto C, Feng L, Yang X et al. Fine particulate matter induces vascular endothelial activation via IL-6 dependent JAK1/STAT3 signaling pathway. *Toxicol Res (Camb).* 2016;5(3):946-953.
  56. Perrella MA, Jain MK, Lee ME. Role of TGF-beta in vascular development and vascular reactivity. *Miner Electrolyte Metab.* 1998;24(2-3):136-43.
  57. Park JH, Kim M, Yim B, Park CY. Nitric oxide attenuated transforming growth factor- induced myofibroblast differentiation of human keratocytes. *Sci Rep.* 2021;11(1):8183.
  58. Kopf PG, Scott JA, Agbor LN, Boberg JR, Elased KM, Huwe JK et al. Cytochrome P4501A1 is required for vascular dysfunction and hypertension induced by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Toxicol Sci.* 2010;117(2):537-46.
  59. Zhang J, Chen R, Zhang G, Wang Y, Peng J, Hu R, et al. PM2.5 increases mouse blood pressure by activating toll-like receptor 3. *Ecotoxicol Environ Saf.* 2022;234:113368.