



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**“EXPOSICIÓN A OZONO Y DISFUNCIÓN ENDOTELIAL:
BIOMARCADORES RELACIONADOS CON LA SÍNTESIS DE
ÓXIDO NÍTRICO”**

TESINA

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

PRESENTA:

VIRIDIANA BOTELLO TABOADA

CIUDAD UNIVERSITARIA, CDMX. 2023





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesor: MEDINA OCAMPO OMAR NOEL

VOCAL: Profesor: MORENO EUTIMIO MARIO ADÁN

SECRETARIO: Profesor: OSORIO YÁÑEZ CITLALLI

1er. SUPLENTE: Profesor: GARCÍA VELAZQUEZ LIZBETH ESMERALDA

2° SUPLENTE: Profesor: FIGUEROA FIGUEROA DIEGO IGNACIO

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: INSTITUTO NACIONAL DE
CARDIOLOGÍA IGNACIO CHÁVEZ, UNIDAD PERIFÉRICA DEL INSTITUTO DE
INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS**

ASESOR DEL TEMA: DRA. OSORIO YÁÑEZ CITLALLI

SUSTENTANTE: BOTELLO TABOADA VIRIDIANA

AGRADECIMIENTOS

A la vida, mis padres, abuelos y familiares; a mi pareja, amigos y compañeros, a mis profesores y asesora, a la Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Química, Instituto de Investigaciones Biomédicas e Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez, así como todas las instituciones y personas que han sido parte de mi formación personal y académica por su apoyo incondicional y las oportunidades brindadas para cumplir todos mis propósitos. Por confiar en mí y ser una guía para permitirme avanzar en este proyecto de vida en el que estoy segura que sólo es el principio de muchas cosas que me quedan por realizar y que sin su apoyo no podrían ser posibles, logrando minimizar cualquiera de las adversidades y haciendo de este camino una gran experiencia de la que no me arrepentiré jamás. A todos ellos les debo una parte de lo soy ahora y de lo que seré como persona y profesionalista.

Nunca encontraré las palabras para expresar mi gratitud, pero espero que sepan que los tengo siempre presentes y son muy importantes para mí.

CONTENIDO

INTRODUCCIÓN	5
ABREVIACIONES	5
MARCO TEÓRICO.....	7
1.1 Generalidades de la contaminación atmosférica	7
1.2 Generalidades del ozono	10
1.3 Normatividad de los niveles de ozono	13
1.4 Efectos en salud asociados a la exposición a ozono	14
1.5 Exposición a ozono y enfermedades cardiovasculares	15
1.6 Generalidades de la aterosclerosis	17
1.7. Etapas de la aterosclerosis	18
1.8. Generalidades y funciones del endotelio	20
1.9. Óxido nítrico y biomarcadores de disfunción endotelial	21
1.1 Exposición a ozono y biomarcadores de disfunción endotelial	26
JUSTIFICACIÓN.....	28
HIPÓTESIS	29
OBJETIVOS	29
MATERIALES Y MÉTODOS	30
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	32
CONCLUSIONES	53
REFERENCIAS	55

INTRODUCCIÓN

ABREVIACIONES

ADMA: Dimetil Arginina Asimétrica

CAT: Transportadores de Aminoácidos Catiónicos

CDMX: Ciudad de México

CECs: Células Endoteliales Circulantes

clMT: Íntima Media de la arteria Carótida

CO: Monóxido de Carbono

CO₂: Dióxido de Carbono

COV: Compuestos Orgánicos Volátiles

DE: Disfunción Endotelial

ECV: Enfermedades Cardiovasculares

EDN1: Gen Codificante de Endotelina 1

ELISA: Ensayo Inmunoabsorbente Ligado a Enzimas

eNOS: Óxido Nítrico Sintasa Endotelial

ETR-A, B: Receptor de Endotelina-A y B

FAD: Flavin Adenin Dinucleótido

FMN: Flavin Mononucleótido

HA: Hipertensión Arterial

HAP: Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos

HDL: Lipoproteínas de Alta Densidad

HO₂: Radical Hidroperoxilo

HPLC: Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia

IAM: Infarto Agudo al Miocardio

ICAM-1: Molécula de Adhesión Intracelular 1

IL: Interleucina

INF- γ : Interferón Gamma

iNOS: Óxido Nítrico Sintasa Inducible

ISA: Evaluación Científica Integrada

L-Arg: L-Arginina
LDL: Lipoproteínas de Baja Densidad
Lp PLA2: Fosfolipasa A2 asociada a lipoproteínas
nNOS: Óxido Nítrico Sintasa Neuronal
NO₂: Dióxido de nitrógeno
NO₂⁻: Nitritos
NO₃⁻: Nitratos
NOS: Óxido Nítrico Sintasa
NOX: Metabolitos Estables del Óxido Nítrico
O: Oxígeno
O₂⁻: Radical superóxido
O₂: Oxígeno molecular
O₃: Ozono
OMS: Organización Mundial de la Salud
PCR: Proteína C Reactiva
PM 2.5: Material Particulado 2.5
ppb: Partes por Billón
sLOX-1: Receptor-1 de lipoproteína de baja densidad oxidada similar a la lectina
SNC: Sistema Nervioso Central
SO₂: Dióxido de azufre
TMTM: Trombomodulina
TNF-α: Factor de Necrosis Tumoral Alfa
TNRF-2: Receptor-2 del Factor de Necrosis Tumoral
VCAM-1: Molécula de Adhesión Vascular 1
VSCM: Células de Músculo Liso Vascular

MARCO TEÓRICO

1.1 Generalidades de la contaminación atmosférica

La contaminación atmosférica es considerada una mezcla compleja de sustancias tanto químicas, físicas y biológicas y que, a ciertas concentraciones, causan daño a quienes se encuentren expuestos a ellas. La contaminación atmosférica se ha asociado con alteraciones en la salud como problemas respiratorios, cardiovasculares, intestinales, neurológicos y cáncer, entre otras (Sharbaf et al., 2021; Tiotiu et al., 2020).

De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS), en 2019, el 99% de la población mundial se encontraba expuesta a concentraciones de contaminantes atmosféricos que superaban los niveles permitidos, y en particular en países en desarrollo dichas concentraciones eran más altas aún. La contaminación atmosférica es considerada un problema grave de salud pública debido a la morbilidad y mortalidad asociada con la contaminación (WHO, 2021a). En 2016, en México, la tasa de mortalidad por contaminación atmosférica se encontraba alrededor de 36 por cada 100,000 habitantes y la principal causa de muerte asociada a la contaminación era la enfermedad cardiaca isquémica (OMS, 2018).

Las emisiones contaminantes atmosféricos como el dióxido de carbono (CO₂) han ido en aumento debido a las actividades antropogénicas y cambios meteorológicos derivados del cambio climático. Dicho incremento ha afectado adversamente a la salud y ha disminuido la calidad de vida de los habitantes, principalmente en los habitantes de las áreas urbanas como la Ciudad de México (Colman, 2021).

Los contaminantes atmosféricos se pueden clasificar de acuerdo con su fuente:

Naturales: Generados por las actividades naturales de la geósfera, la biosfera, la atmósfera y la hidrósfera, entre las que pueden citar erupciones volcánicas, incendios forestales, actividades de respiración y reproducción en los seres vivos, fuertes vientos, emisión de partículas salinas marinas y descargas eléctricas que llevan a la formación de sustancias como compuestos de azufre, óxidos de nitrógeno, CO₂, materia orgánica y otras partículas (Echeverri, 2019).

Antropogénicas: Originados por la actividad humana, como la industria, el uso de calefactores y aparatos en el hogar, transporte terrestre y aéreo, eliminación de residuos, entre otras que rompen la autorregulación del aire para mantener su composición constante (Echeverri, 2019).

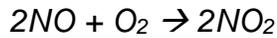
Por otra parte, los contaminantes se pueden clasificar en primarios o secundarios (Seigneur,2019). Los contaminantes primarios se emiten directamente a la atmósfera, ya sea de forma natural o por actividades humanas, y entre ellos encontramos:

-Monóxido de carbono (CO): Es un gas incoloro e inodoro que forma parte de los principales contaminantes y problemas ambientales (Téllez et al.,2006) cuyas fuentes de emisión son de tipo natural y antropogénico como emisiones de automóviles de gasolina o diésel, procesos industriales, incendios e incineración de materia orgánica. Las actividades humanas, en especial el uso de los vehículos automotores, son los principales causantes del aumento de emisiones de CO (Téllez et al.,2006). La oxidación de CO conduce a la formación de CO₂, y este promueve la conversión de monóxido de nitrógeno (NO) a dióxido de nitrógeno (NO₂), el cual participa en la reacción de fotólisis para la formación de ozono (Seigneur,2019).

-Dióxido de azufre (SO₂): Gas generado de forma natural y por la combustión de compuestos azufrados en procesos industriales y vehiculares; al hidrolizarse, se convierte en ácidos y aerosoles (como el H₂SO₄) que tienen efectos perjudiciales principalmente respiratorios, también participa en la formación de lluvia ácida y contribuye en la formación de partículas finas (Seigneur,2019).

Por otra parte, los contaminantes secundarios, son aquellos que no se emiten directamente a la atmósfera, sino que se forman mediante reacciones químicas o fotoquímicas de oxidación e hidrólisis entre los contaminantes primarios, (Seigneur,2019) por ejemplo:

-Dióxido de nitrógeno (NO₂): Gas marrón de olor desagradable que se produce en procesos de combustión a altas temperaturas mediante la siguiente reacción fotoquímica:



Donde el NO tiene como principal emisión los gases de escape de los automóviles (Colman,2021).

La mayor parte de este contaminante secundario se convierte en ácido nítrico y nitratos arrastrados por la lluvia (Colman,2021).

-Ozono (O₃): Gas oxidante incoloro formado a partir de reacciones fotoquímicas entre el oxígeno molecular, óxidos de nitrógeno e hidrocarburos en presencia de la luz solar (Calderón et al., 2000). Es el principal componente del esmog fotoquímico (Seigneur,2019).

Tabla 1. Tipos de contaminantes según su emisión y composición (Colman,2021)

Contaminante	Primario	Secundario
Compuesto de azufre	SO ₂ H ₂ S	SO ₃ H ₂ SO ₄ MSO ₄
Compuesto de nitrógeno	NO NH ₃	NO ₂ MNO ₃
Orgánicos compuestos de carbono	Compuestos de C1-C7	Aldehídos, cetonas, ácidos
Óxidos de carbono	CO CO ₂	-
Compuestos halogenados	HF HCl	-

SO₂: Dióxido de azufre, H₂S: Sulfuro de hidrógeno, SO₃: Trióxido de azufre, H₂SO₄: Ácido sulfúrico, MSO₄: Sulfatos, NO: Óxido nítrico, NH₃: Amoniac, NO₂: Dióxido de nitrógeno, MNO₃: Nitratos, C1-C7: De 1 a 7 carbonos, CO: Monóxido de carbono, CO₂: Dióxido de carbono, HF: Ácido fluorhídrico, HCl: Ácido clorhídrico.

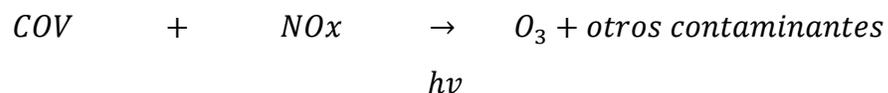
Debido a las contingencias ambientales por los altos niveles de ozono en la Ciudad de México y al aumento de temperaturas que favorece la formación de este contaminante, es de gran relevancia evaluar los efectos adversos de la exposición a ozono tales como los cardiovasculares que han sido muy poco estudiados en nuestro país.

1.2 Generalidades del ozono

El O₃, es un gas presente en la estratósfera (10-50 km sobre el suelo) y la tropósfera (8-15 km sobre el suelo) del planeta (Zhang et al.,2019). El ozono estratosférico se concentra en una zona llamada capa de ozono y absorbe la radiación ultravioleta que es dañina a los organismos (Zhang et al.,2019). Por otra parte, el ozono troposférico (ozono) es un contaminante secundario y principal componente del esmog fotoquímico causante principalmente de irritación ocular, enfermedades respiratorias y cardiovasculares (Seigneur,2019).

Este contaminante no se emite directamente a la atmósfera, sino que se forma a partir de la emisión de otros contaminantes primarios y secundarios provenientes de fuentes naturales y antropogénicas (Orru et al.,2017).

La fuente predominante del ozono es una reacción fotoquímica entre los compuestos orgánicos volátiles (COV) y los óxidos de nitrógeno (NOx) como el dióxido de nitrógeno (NO₂) y el óxido nítrico (NO) principalmente, en presencia de la radiación solar (Zhang et al.,2019).



Un aumento en la concentración de precursores del ozono favorecerá que aumenten los niveles de este contaminante en la atmosfera. Las actividades que generan la formación y emisión de COV (alcanos, alquenos, compuestos aromáticos, aldehídos, alcoholes, alquinos, éteres, etc.) son los procesos de combustión (como el de vehículos motorizados), evaporación de combustibles líquidos o gaseosos (como la gasolina) y el uso de productos con componentes

orgánicos como pinturas, solventes, pesticidas, adhesivos y recubrimientos, productos de belleza y otros utilizados principalmente por la industria (Zhang et al.,2019; Seigneur,2019).

Las emisiones de isopreno de forma natural por la vegetación también contribuyen a la formación de COV y por lo tanto de ozono (Seigneur,2019).

Los procesos industriales y aquellos derivados de la quema de combustibles fósiles para el transporte, electricidad y calefacción del hogar pueden generar los precursores de ozono como NO_x y contribuir de esta forma a la formación de ozono (Boström,1993; Zhang et al.,2019).

La reacción fotoquímica que lleva a la formación del ozono se ve favorecida bajo ciertas condiciones y una alteración de su equilibrio puede deberse al aumento o disminución de los componentes que participan en ella. (Seigneur,2019).

Por una parte, se ha observado que ante altas emisiones de NO y en zonas cercanas a su fuente de emisión, disminuyen los niveles de ozono (White,2009).

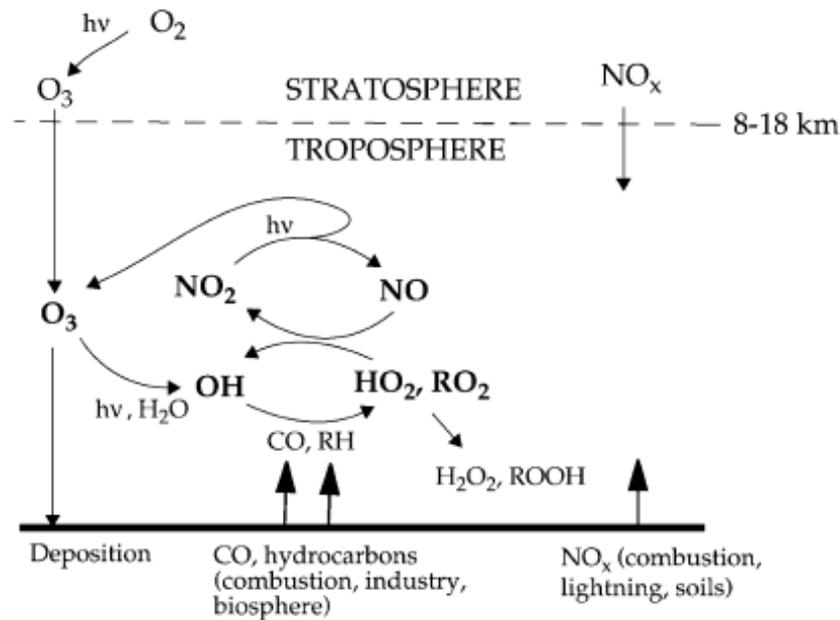
La formación de ozono también se ve favorecida ante una mayor intensidad solar y por lo tanto una elevada temperatura atmosférica. El aumento de la temperatura atmosférica esta influenciada por diferentes factores, tales como, el aumento en la emisión de hidrocarburos y COV como lo es el isopreno y otros de emisión antropogénica, presiones barométricas altas, circulaciones estancadas, disminución del ozono en la estratósfera, momento del día y la época del año (Sillman & Samson,1995). Hay condiciones y contaminantes que pueden tener un efecto contraintuitivo en la formación de ozono. Por ejemplo, una disminución en las emisiones de aerosoles producto de la combustión de carbono, diésel y biomasa, pueden aumentar la visibilidad en la atmósfera con un aumento de la intensidad solar y, por ende, mayor formación de ozono (Zhang et al.,2019). El hollín tiene efectos ambivalentes en la formación de ozono; por una parte, en ausencia de hollín, se aumenta la visibilidad, la intensidad solar y la formación de ozono; pero el hollín también puede absorber el calor, aumentar la temperatura y contribuir a la formación de ozono (Zhang et al.,2019; Orru et al.,2017).

Existen otros contaminantes atmosféricos que también repercuten en los niveles de ozono, entre ellos encontramos al material particulado 2.5 (PM2.5), 2.5 por su tamaño en μm , o partículas finas. Las PM2.5 tienen una composición variada de compuestos orgánicos e inorgánicos, primarios y secundarios y de origen tanto natural como antropogénico (Seigneur,2019). Un estudio previo en China (2013-2017) mostró que el aumento de los niveles de ozono se asociaba con una disminución de alrededor del 40% de las concentraciones de PM2.5 (Li et al,2018).

El O_3 de la estratosfera también tiene influencia en los niveles de ozono, ya que, durante los meses de primavera, tiene una afluencia hacia la tropósfera debido al máximo movimiento vertical del aire del hemisferio norte, contribuyendo a una acumulación de ozono en el ambiente (Zhang et al.,2019).

Finalmente, la destrucción de la capa de ozono por gases de efecto invernadero tiene como consecuencia un aumento en la radiación hacia la superficie y mayor formación del ozono (Seigneur,2019).

Figura 1a. Condiciones que regulan y favorecen la emisión de ozono a la tropósfera.



La figura 1a muestra los contaminantes precursores de la formación de ozono entre los que encontramos al CO, hidrocarburos y óxidos de nitrógeno; estos precursores pueden provenir de procesos de combustión e industriales, tormentas, descomposición del suelo, entre otros. La acumulación de ozono en la troposfera se favorece cuando se altera el proceso de formación de los precursores de ozono mediante reacciones de oxidación en cadena del CO y compuestos hidrocarbonados (Jacob, 2000).

1.3 Normatividad de los niveles de ozono.

Desde 1987, la OMS publica periódicamente las directrices acerca de los límites permisibles de contaminantes atmosféricos entre los que encontramos a el ozono (OMS,2021b). En cuanto a las directrices presentadas para un tiempo promedio de 8 horas (3-4 días de superación por año), la OMS recomienda una concentración máxima de $100 \mu\text{g}/\text{m}^3$ lo que equivale a aproximadamente 50 partes por billón (ppb), mientras que en temporada alta se establecen $60 \mu\text{g}/\text{m}^3$ (OMS,2021b).

En la Ciudad de México se han establecido sistemas de monitoreo de la calidad del aire tales como el Sistema de Monitoreo Atmosférico (SIMAT) que se encarga de medir permanentemente a los principales contaminantes atmosféricos mediante centros de monitoreo en toda la ciudad y zona conurbada del Estado de México con apoyo de la Red Automática de Monitoreo Atmosférico (RAMA) (Aire CDMX, s.f.). Estos sistemas de monitoreo surgieron con la finalidad de informar sobre la calidad de aire, la exposición de la población a ciertos contaminantes, prevenir riesgos y generar datos confiables en la Ciudad de México (CDMX) (Aire CDMX, s.f.).

En nuestro país, la NOM-020-SSA1-2021 establece los criterios para evaluar la calidad del aire respecto al ozono en México. Debido a que la NOM-020-SSA1-2014 (DOF,2014) establecía límites permisibles de ozono en el ambiente mayor a los establecidos en la guía de calidad del aire de la OMS, la NOM aprobada en el año 2021 propone una disminución gradual de las concentraciones de ozono permitidas con la finalidad de proteger a la salud de la población (Diario Oficial de la Federación,2021).

Tabla 1b. Cumplimiento gradual de valor límites permisibles ozono en el ambiente por la NOM-020-SSA1-2021.

Año °	Valor límite de 1 hora* (ppb)	Valor límite de 8 horas * (ppb)
1	90	65
3		60
5		51

*máximo de los máximos diarios. ° año transcurrido a partir de la entrada en vigor de la NOM (2021) (Diario Oficial de la Federación,2021).

1.4 Efectos en salud asociados a la exposición a ozono.

De acuerdo con el estudio Global Burden of Disease (GBD), que reúne y analiza los datos de tendencia mundial de salud, en 2015, la exposición al ozono causó 254,000 muertes adicionales y una pérdida de 4.1 millones AVAD (Años de Vida Ajustados por Discapacidad) por enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) (Cohen et al.,2017), mientras que, en el 2019, se estimaron alrededor de 0.4 millones de muertes atribuibles a la contaminación por ozono en países con altos ingresos (Niu et al., 2022).

Debido a su baja solubilidad y a la vía de exposición por inhalación, el ozono llega a las vías respiratorias sin ser eliminado previamente, reaccionando con las moléculas protectoras como proteínas, antioxidantes y lípidos formando compuestos oxidantes secundarios con diferente reactividad, lo que causa daño a las células del tracto respiratorio (Nuvolone & Voller,2017). Diversos estudios muestran que, en sujetos expuestos ambientalmente a ozono, ante un aumento en sus concentraciones hay una disminución aguda de su función pulmonar al disminuir

el volumen respiratorio forzado en un segundo, así como las tasas de flujo respiratorio máximo (Nuvolone & Voller,2017). En cuanto a enfermedades crónicas respiratorias, se estima que en 2015 pudieron existir de 9 a 23 millones de visitas anuales por emergencias asociadas a eventos por asma que se atribuyen a la exposición al ozono, siendo los niños el grupo más vulnerable (Anenberg et al.,2018; Hernández et al.,2000).

Evidencia proveniente de estudios epidemiológicos han mostrado que la exposición a ozono se asocia con efectos en el sistema cardiovascular y sistema nervioso central (SNC), así como, con trastornos neurodegenerativos, como la enfermedad de Alzheimer y Parkinson (Zhang et al.,2019). Estudios previos han mostrado alteraciones en los neurotransmisores como el ácido γ -aminobutírico (GABA), glutamato, serotonina y noradrenalina; así como con cambios en la actividad motora, sueño, memoria y signos de neurodegeneración (Nuvolone & Voller,2017).

Por otra parte, estudios experimentales en animales han mostrado diversos efectos de la exposición a O₃ como pérdida de peso corporal en ratones debido a una disminución en el consumo de alimento, muerte por apoptosis en células del hipocampo, déficit de aprendizaje y pérdida de memoria en ratas expuestas a altas concentraciones de ozono (Nuvolone & Voller,2017; Jerold et al.,2005; Zhang et al.,2019).

1.5 Exposición a ozono y enfermedades cardiovasculares

La contaminación atmosférica, entendida como una mezcla compleja de contaminantes, se ha asociado con enfermedades cardiovasculares, tales como infarto agudo al miocardio (IAM), muerte cardíaca súbita, arritmias y enfermedad arterial periférica (Shahrbaf et al.,2020).

Por otra parte, existen estudios que asocian específicamente la exposición a ozono, a corto y largo plazo, con desenlaces cardiovasculares (Niu et al. 2022; Goodman et al., 2015; Henrotin et al.,2007; Henrotin et al., 2010).

Observaciones en estudios epidemiológicos han asociado al ozono con un aumento en los ingresos hospitalarios por complicaciones como el IAM, aterosclerosis coronaria y cardiopatía pulmonar (Srbot et al.,2009; Guo et al.,2022). Además, otras investigaciones informaron disminuciones en la frecuencia cardíaca, riesgo de fibrilación auricular, infarto, estrés oxidante e inflamación. Estos desenlaces asociados a la exposición a ozono fueron más evidentes en sujetos que reportaban otros padecimientos cardíacos, mujeres y ancianos (Nuvolone & Voller,2017).

En un estudio en China, a nivel nacional, con 96,955 participantes se observó que la exposición a ozono ($89.7\mu\text{g}/\text{m}^3$, periodo de altas temperaturas) se asociaba con mayor riesgo de mortalidad cardiovascular (HR, hazard ratio, 1.093; 95% CI: 1.046, 1.142), enfermedad cardíaca isquémica (HR 1.184; 95% CI: 1.099-1.276) e infarto al miocardio (1.063; 95% CI: 1.002-1.128), estos riesgos calculados por cada $10\mu\text{g}/\text{m}^3$ de incremento en los niveles de ozono (Niu et al., 2022).

Los desenlaces tales como enfermedad cardíaca isquémica e infarto son manifestaciones clínicas tardías de un proceso denominado aterosclerosis (Cisneros&Carranza,2013).

De acuerdo con un estudio en 861 adultos jóvenes en el sur de California, se determinó la asociación entre la exposición a ozono y el aumento del grosor intima-media de la arteria carótida (cIMT). El estudio mostró un aumento del cIMT en los adultos jóvenes expuestos a ozono en la infancia, lo que podría incluir al ozono como un factor de riesgo para el desarrollo de aterosclerosis en población saludable (Breton et al. 2012).

Es importante mencionar que el aumento de cIMT es un importante indicador de la presencia y progresión de la aterosclerosis, lo que lo convierte en una medición útil para la evaluar el riesgo a presentar eventos cardiovasculares en adultos asintomáticos (Nezu et al., 2016).

1.6 Generalidades de la aterosclerosis.

La aterosclerosis es una enfermedad crónica de la pared vascular que ocurre principalmente en arterias de mediano y grueso calibre y que se caracteriza por el engrosamiento de la pared vascular y en esta participan elementos como macrófagos, monocitos, células de músculo liso vascular, las lipoproteínas de baja densidad oxidadas (LDLox) y mediadores inflamatorios, entre otros (Botet et al.,2020). La lesión resultante es denominada placa de ateroma que se encuentra compuesta principalmente de colesterol, lípidos y componentes celulares cubiertos de una placa fibrosa; el engrosamiento de la placa conlleva a la disminución de la luz arterial (estenosis) y la estenosis puede desencadenar las manifestaciones clínicas tardías de la aterosclerosis (Hernández,2016).

Cuando el proceso de aterosclerosis tiene lugar en las arterias que irrigan al corazón o coronarias, se manifiesta en enfermedades como el síndrome coronario agudo, IAM, angina de pecho, isquemia silente y muerte súbita; todas estas patologías se agrupan dentro de las enfermedades arteriales coronarias (Cisneros&Carranza,2013) (Lahoz & Mostaza,2007). Cabe resaltar que las enfermedades arteriales coronarias son las causantes del 16% de las defunciones a nivel mundial (OMS,2020).

La aterosclerosis es una enfermedad multifactorial y existen distintos factores de riesgo para su desarrollo entre los que encontramos a la dislipidemia en la cual existe un aumento de lipoproteínas de baja densidad (LDL) y una disminución de lipoproteínas de alta densidad (HDL) (Toth,2021).

Además de las dislipidemias, también existen otros factores de riesgo que se han clasificado en causales, condicionales y predisponentes. Los factores de riesgo causales son respaldados por diversos estudios, entre ellos encontramos al consumo de tabaco, la hipertensión arterial (HA), aumento del colesterol y la edad (Lahoz & Mostaza,2007; Cisneros&Carranza,2013).

Los factores de riesgo condicionales se han asociado con mayor riesgo de enfermedad arterial coronaria, pero no cuentan con una relación causal avalada por estudios epidemiológicos; entre ellos encontramos a la hipertrigliceridemia,

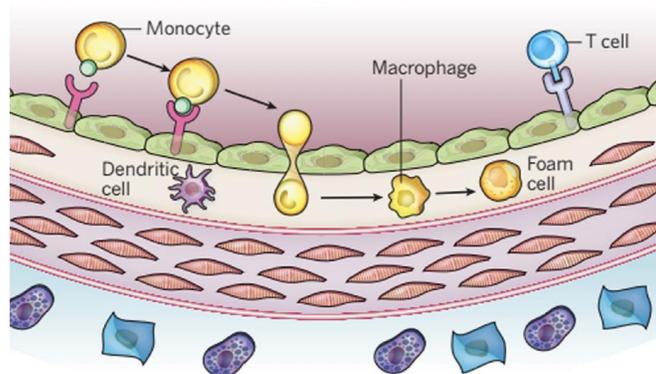
marcadores inflamatorios, LDL pequeñas y densas, entre otros (Lahoz & Mostaza,2007; Cisneros&Carranza,2013). Finalmente, los factores de riesgo predisponentes son aquellos que contribuyen al empeoramiento de los causales y algunos condicionales; ejemplos de ellos son la obesidad, inactividad física, antecedentes familiares y factores socioeconómicos y psicológicos (Lahoz & Mostaza,2007; Cisneros&Carranza,2013).

1.7. Etapas de la aterosclerosis.

La formación de la placa aterosclerótica es un proceso que puede iniciar en la primera década de vida y permanecer asintomática hasta llegada la edad adulta donde ocurren las manifestaciones clínicas (Sarre et al., 2018).

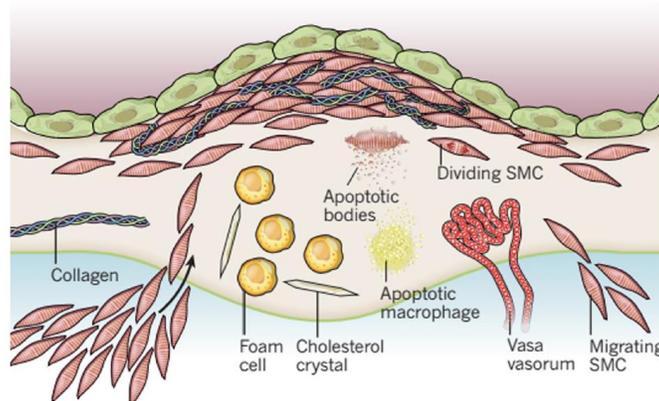
La siguiente serie de figuras describen las etapas del proceso de aterosclerosis:

Figura 1b. Etapa inicial del proceso de aterosclerosis (Melaku y Dabi, 2021).



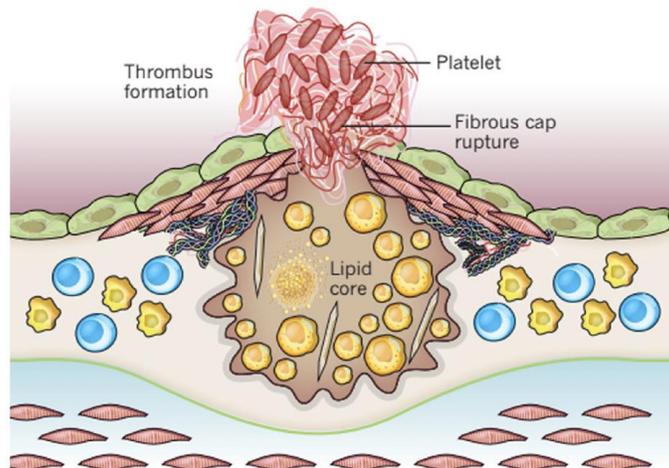
Los monocitos circulantes se adhieren a la capa endotelial activada que expresa moléculas de adhesión endotelial, y entonces migran al espacio subendotelial donde se diferencian a macrófagos capaces de fagocitar LDL oxidados y convertirse en células espumosas (Melaku and Dabi, 2021).

Figura 1c. Progresión del proceso de aterosclerosis (Melaku and Dabi, 2021).



Migración de células de músculo liso vascular (VSCM) de la capa media a la íntima, proliferación de VSCM residentes de la íntima y de la media y síntesis de macromoléculas de matriz extracelular como la colágena, elastina y proteoglicanos. Los macrófagos y VSCM de la placa aterosclerótica pueden morir en lesiones avanzadas, algunos por apoptosis. Los lípidos extracelulares provenientes de la muerte celular pueden acumularse en la región central de la placa, que frecuentemente se denomina núcleo necrótico o lipídico (Melaku and Dabi, 2021). Placas avanzadas también contienen cristales de colesterol y micro vesículas.

Figura 1d. Formación de trombo derivado del proceso de aterosclerosis (Melaku and Dabi, 2021).



Estadio avanzado del proceso de aterosclerosis con la formación de un trombo. La trombosis es una de las complicaciones de la aterosclerosis, que frecuentemente se complica con la ruptura de la placa aterosclerótica. La ruptura de capa fibrosa permite que

el trombo se extienda al lumen donde puede impedir el flujo sanguíneo y causar isquemia en distintos órganos (Melaku y Dabi, 2021).

Entre los mecanismos que desempeñan un papel importante en la aterosclerosis están la inflamación, presencia de especies reactivas de oxígeno que promueven la formación de LDL oxidado, y la disfunción endotelial (Schaffenaar et.al.2016; Botet et al.,2020; Prieto,2019).

La disfunción endotelial (DE) es un evento descrito o reconocido como causa de ECV y se define como la reducción de la capacidad vasodilatadora del endotelio y la perturbación de su función homeostática protectora debido a la alteración del metabolismo del óxido nítrico (NO) y otros vasodilatadores (Konukoglu & Uzun,2016; Xu et al.,2021). Entre las causas de la disfunción se encuentran las interacciones leuco-plaquetarias, inflamación, estrés oxidante y proliferación celular o cualquier cambio que afecte las funciones endoteliales y altere su homeostasis celular (Konukoglu & Uzun,2016; Xu et al.,2021).

1.8. Generalidades y funciones del endotelio

El endotelio es un órgano de superficie extensa formado por una monocapa de células endoteliales que recubre a los vasos arteriales, venosos y linfáticos vasculares; podemos encontrarlo en la sangre, órganos y tejidos, siendo el único órgano que se expone directamente a cambios de presión y flujo sanguíneo (Xu et al.,2021; Acosta et al.,2006).

Además de la función de barrera mecánica y biológica entre la sangre y la pared vascular, el endotelio cumple con funciones importantes tales como el control del tráfico de macromoléculas y células inflamatorias, regulación de la presión arterial, reparación de lesiones, intercambio y transporte de sustancias, metabolismo de lipoproteínas, angiogénesis, regulación de la coagulación, trombosis y sistema fibrinolítico, modulación de células del músculo liso y otras funciones

ateroprotectoras, de reparación tisular y relacionadas con patologías isquémicas (Xu et al.,2021; Acosta et al.,2006; Konukoglu & Uzun,2016) . Todas estas funciones son atribuibles a la capacidad del endotelio de convertir estímulos mecánicos en señales intracelulares bioquímicas que propician la adhesión y permeabilidad celular. El endotelio participa también en la secreción de sustancias vasoactivas (relajación/contracción), inhibición plaquetaria, modulación ante estímulos inflamatorios por factores de transcripción (como NF κ B), la regulación del sistema fibrinolítico y la biosíntesis de colesterol endotelial ante la tensión de cizallamiento por el flujo sanguíneo y los estímulos de ciertas lipoproteínas (Badimón & Martínez,2002; Konukoglu & Uzun,2016).

La regulación del diámetro de los vasos sanguíneos y los cambios en el tono vascular son una de las principales funciones del endotelio, que además de ajustar el flujo sanguíneo, participa en mantener la homeostasis mediante un balance entre el estado vasoconstrictor y el vasodilatador (Carvajal,2017). En cuando al estado vasodilatador, este se caracteriza por un estado antioxidante/antiinflamatorio/antitrombótico debido a la producción endotelial de factores vasodilatadores como el NO, el factor hiperpolarizante de endotelio (EDHF) y prostaciclina, mientras que, el estado vasoconstrictor se caracteriza por un estado prooxidante/proinflamatorio/protrombótico debido a la producción de endotelina 1 (ET-1), angiotensina II y tromboxano A2 (Mudau et al.,2012; Carvajal,2017). Un estado excesivo de vasoconstricción por sobre expresión de ET-1 se ha relacionado con disfunción endotelial al intervenir en la producción de compuestos vasodilatadores importantes para mantener las funciones del endotelio (Baltazares et al., 2005).

1.9. Óxido nítrico y biomarcadores de disfunción endotelial

El óxido nítrico (NO) es un gas incoloro, vasodilatador y de vida media corta, liberado desde el endotelio hacia las células de músculo liso vascular (VSMC). El NO funciona como mensajero intra e intercelular y promueve la vasodilatación debido a la formación de Guanosín Monofosfato cíclico (GMPc) producto de la activación de la enzima guanilato ciclasa soluble en el músculo liso (Konukoglu & Uzun,2016).

Además de sus propiedades vasodilatadoras, el NO funciona como inhibidor de la inflamación, trans migración leucocitaria, agregación y adhesión plaquetaria y proliferación de células vasculares, jugando un papel importante en la fisiopatología de la aterosclerosis (Acosta et al,2006; Konukoglu & Uzun,2016).

El NO es sintetizado como un radical libre por la enzima óxido nítrico sintasa (NOS) a partir del aminoácido L-Arginina (L-Arg). Existen tres isoformas de la NOS, la NOS endotelial (eNOS), la NOS inducible (iNOS) y la NOS neuronal (nNOS); de estas tres isoformas la eNOS es la principal isoforma presente en el endotelio vascular (Konukoglu & Uzun,2016). Además de la L-Arg como sustrato, es necesario la presencia de cofactores para la síntesis del NO, como (6R)-5,6,7,8-tetrahidrobiopterina (BH4), flavin adenin dinucleótido (FAD), flavin monocuclótido (FMN), calmodulina (proteína fijadora de calcio) y protoporfirina de hierro (Hern) (Mudau et al.,2012). La eNOS es estimulada por la acetilcolina, la bradicinina y la histamina (Konukoglu & Uzun,2016); sin embargo, la actividad enzimática de la eNOS también se ve inhibida por factores como el factor de necrosis tumoral (TNF- α), lipopolisacáridos, hipoxia, altas concentraciones de LDLox, entre otros. Otro inhibidor de la síntesis de NO es el aminoácido dimetil arginina asimétrica (ADMA), ADMA compite con la L-Arg por el sitio activo de la eNOS (Acosta et al,2006;

Los niveles de NO han sido estudiados como biomarcadores de efecto en padecimientos cardiovasculares asociados a la DE.

Un biomarcador es una respuesta o señal fisiológica cuantificable e inducida en compuestos celulares, bioquímicos o relacionados con las funciones o estructura de un organismo vivo ante la presencia de un xenobiótico. Los biomarcadores se clasifican en biomarcadores de exposición, susceptibilidad y efecto, siendo estos últimos los de nuestro interés al ser un indicativo de cambios bioquímicos en un organismo ante la exposición a xenobióticos (Gil, s.f.)

Para estudiar los niveles de NO en estudios epidemiológicos o modelos experimentales, es necesario determinar los metabolitos estables del NO (NOx), debido a que el NO tiene una vida media muy corta (0.1 segundos) y tiende a reaccionar rápidamente con otras especies como el oxígeno (Benavides &

Pinzón,2008). La oxidación del NO genera metabolitos estables como los nitritos (NO_2^-) y nitratos (NO_3^-), los cuales se forman ya sea por autooxidación al reaccionar con el O_2 , por reacciones con el radical superóxido o por la acción de la oxihemoglobina en eritrocitos (Tsikas,2005). Los NOx que se encuentran en mayor cantidad en fluidos corporales son los NO_3^- respecto los NO_2^- . (Benavides & Pinzón,2008; Tsikas,2007). Los NOx están presentes en fluidos biológicos como suero, plasma y orina, por lo que resultan adecuados para la evaluación *in vivo* de la síntesis dependiente de endotelio de NO (Tsikas,2007).

Estudios *in vivo* en humanos y mamíferos indican que el NO_2^- circulante, en comparación con el NO_3^- , refleja la síntesis de NO dependiente de endotelio (Tsikas,2005).

En la presente investigación se abordaron a los NOx y a los elementos como la enzima eNOS, L-Arg y ADMA como biomarcadores directos de DE, ya que son participantes directos en su síntesis o el reflejo de ella.

La L-Arg es un aminoácido básico endógeno que participa en el ciclo de la urea, ya que es un producto de desintoxicación del amoníaco. La L-Arg es también precursora de proteínas, centros enzimáticos, ornitina y creatinina (Cylwik et al.,2005).

Al ser precursor en la formación de NO es considerada un biomarcador de DE, indicando que, ante una disminución de L-Arg, también disminuya la cantidad de NO sintetizada (Cylwik et al.,2005). Entre los mecanismos implicados en la reducción de la L-Arg disponible para la eNOS se encuentra un aumento en las concentraciones de ADMA, aumento en la actividad de la enzima Arginasa II, encargada de la hidrólisis de la L-Arg con la subsecuente producción de urea y L-ornitina. La Arginasa II también es capaz de inhibir la actividad de la eNOS debido a la espermina, que es un producto intermedio del metabolismo de la Arginasa (Mammedova et al.,2021).

Diversos estudios experimentales han observado que ante aumentos en la ingesta de L-Arg (9 g/día) en ratas existe un aumento en la cantidad de NO, contribuyendo

a efectos benéficos sobre el endotelio, células de músculo liso y vasos cerebrales; mientras que, estudios clínicos, han demostrado que la administración de L-Arg (3-15 g/día, según el grupo de estudio) disminuye la presión arterial, se asocia con inhibición plaquetaria y mejoras en el estado del endotelio vascular por lo que la L-Arg se considera una alternativa terapéutica (Khalaf et al.,2019; Cylwik et al.,2005; Rodrigues-Krause et al., 2018). Sin embargo, otros estudios han indicado que la suplementación con este aminoácido no representa mejoras en pacientes con enfermedades cardiovasculares, obesidad y diabetes, por lo que aún existen limitantes que permitan asegurar el efecto terapéutico en todas las poblaciones, en especial en los sujetos sanos (Rodrigues-Krause et al., 2018). El fenómeno que explica estos resultados es llamado "paradoja de la arginina". La paradoja describe un fenómeno donde es necesario el aumento de la L-Arg extracelular para una máxima liberación de NO en las células a pesar de concentraciones citosólicas que superan las requeridas para la actividad de la eNOS, ya que esta enzima utiliza mayormente a la L-Arg extracelular. Sin embargo, ante suministros de dicho aminoácido a largo plazo o en sujetos sanos, la ubicación intracelular de la eNOS no permite el acceso a grupos en exceso de L-Arg, por lo que se difunde a otras ubicaciones celulares en donde se encuentran las Arginasas, reduciendo la actividad de la eNOS por falta de sustrato (Mammedova,2021; Elms et al., 2013).

ADMA es un aminoácido producto endógeno de la degradación de proteínas metiladas que podemos encontrar en plasma, células y tejidos (Acosta et al.,2006; Mammedova et al.,2021). En las células endoteliales, ADMA es sintetizado a partir de L-Arg por medio de la proteína arginina metiltransferasa clase 1 (PRMT-1) que permite la dimetilación asimétrica para después liberarse en la célula (Teerlink et al.,2009). ADMA es transportado por medio de transportadores de aminoácidos catiónicos (CAT) e inhibe a la eNOS (Teerlink et al.,2009), por lo que impide la producción de NO al restringir el acceso hacia el sitio activo a la L-Arg, aún con las cantidades intracelulares suficientes de este aminoácido (Mammedova,2021).

Otros biomarcadores que se abordan en este trabajo son los biomarcadores relacionados indirectamente con la síntesis del NO o que no interfieren directamente con la vía de síntesis de la NOS.

Diversos estudios determinan a la nitrotirosina como un marcador de estrés oxidante dependiente de NO en tejido y sangre ante diferentes enfermedades. Ante altas concentraciones de NO (micromolar), este puede reaccionar en un ambiente de estrés oxidante con el radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) llegando a formar peroxinitrito ($ONOO^-$), el cual llega a actuar como un importante vasoconstrictor o como molécula citotóxica al interactuar con moléculas como ADN, proteínas y lípidos. Además, el peroxinitrito ocasiona un desacoplamiento de la eNOS y reacciona con la tirosina de enzimas como la prostaciclina sintasa y superóxido dismutasa, produciendo nitrotirosina y a la vez limitando la actividad de dichas enzimas, su papel mediador endotelial y función protectora (Hanafy et al.,2001; Münzel et al.,2018).

Las endotelinas (ET-1, ET-2, ET-3), otro biomarcador de disfunción endotelial, son un grupo de péptidos con propiedades vasoactivas, siendo la ET-1 la más predominante y sintetizada principalmente por células endoteliales mediante estímulos como hipoxia, lesión endotelial e isquemia. Sin embargo, sustancias vasoactivas como el NO y las prostaciclinas inhiben su producción y secreción (Baltazares et al.,2005). Como modulación de su respuesta vasoconstrictora, el receptor de endotelina tipo B (ET-B) en células endoteliales, al tener contacto con la ET-1, incrementa los niveles de GMCC y por consecuencia, liberación de NO y prostaciclina I₂, ocasionando la relajación del endotelio (Flores,2013).

La ET-1 es detectada en plasma y suero y se correlaciona con estados como insuficiencia cardíaca. Sus niveles normales en plasma van de 1 a 2 $\mu\text{g/mL}$ y presenta una vida media de 4 a 7 minutos (Baltazares et al.,2005)

Otros biomarcadores que han permitido estudiar el estado de la función endotelial gracias a que su activación ante estados de inflamación son las moléculas de adhesión intercelular (CAMs) como la molécula de adhesión intercelular 1 (ICAM-1), vascular 1 (VCAM-1) y otras moléculas como la E Selectina. Biomarcadores como la LDLox, células endoteliales circulantes (CECs), micropartículas

endoteliales (EMPs), caveolina-1, citoquinas como las interleucinas 1, 4, 6 (IL-1, IL-4, IL-6), TNF- α , plasminógeno 1 y 2 (PAI-1 y PAI-2), trombomodulina, Proteína C Reactiva (PCR) entre otros, también se han asociado como indicadores de DE al influir en la síntesis del NO, inhibiendo o aumentando su producción por medio de la NOS (Mudau et al.,2012; Carvajal,2017; Serrani,2010).

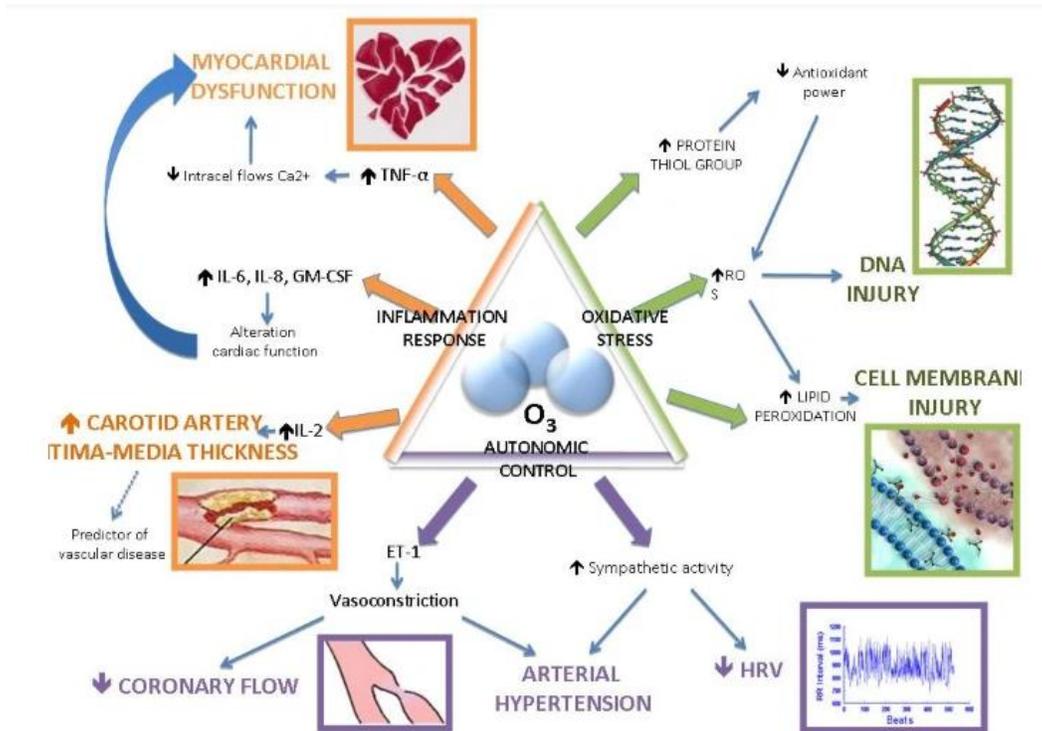
1.1 Exposición a ozono y biomarcadores de disfunción endotelial.

En el estudio FHS (Framingham Heart Study) se encontró una asociación entre la exposición a ozono a corto plazo (1-5 días) y una disminución de la proteína quimiotáctica de monocitos 1 (MCP-1), así como correlaciones negativas entre ozono y niveles de NOx. Por otra parte, exposiciones por periodos más prolongados se asociaron con un aumento de las concentraciones de interleucina 18 (IL-18) y la masa de la fosfolipasa A2 asociada a lipoproteínas (Lp PLA2) (Li et al., 2019)

Otros estudios epidemiológicos sobre contaminación ambiental han encontrado una asociación inversa entre el ozono y la trombomodulina (TM) y positiva entre el ozono y el factor tisular (TF) (Poursafa et al., 2011).

Biomarcadores sanguíneos estudiados en sujetos mayores también presentaron aumentos ante una mayor exposición a ozono como lo son la ET-1 y la nitrotirosina, los cuales se han asociado a vasoconstricción y estrés oxidante respectivamente (Balmes et al., 2019).

Figura 1e. Marcadores cardiovasculares y efectos celulares asociados a la exposición a ozono.



El efecto del ozono en el sistema cardiovascular se ve reflejado por afecciones en el tono vascular, control de la presión arterial, variabilidad de la frecuencia cardíaca (HRV), concentración de marcadores inflamatorios en suero y estrés oxidante. Dichas afecciones están implicadas en eventos como isquemia cardíaca, hipertensión arterial, insuficiencia cardíaca, aterosclerosis, disfunción miocárdica inmediata, entre otros observados en estudios epidemiológicos, incluso la muerte (Srbot et al.,2009).

JUSTIFICACIÓN

De acuerdo con la OMS, el 99% de la población mundial, se encuentra expuesta a contaminantes atmosféricos en concentraciones mayores a las permitidas por los organismos reguladores. La contaminación atmosférica es una causa importante para el desarrollo de diferentes enfermedades y muertes prematuras (OMS, 2021a). El ozono es un contaminante atmosférico, principal componente del smog, que se ha asociado con efectos adversos como asma, trastornos neurodegenerativos, hipertensión, entre otros. En la CDMX, las concentraciones de ozono exceden frecuentemente la normatividad nacional (65 ppb) e internacional (aprox. 50 ppb) (DOF,2021) (SEMARNAT,2018); donde en temporadas de contingencia, las concentraciones de ozono están por encima de 154 ppb (GOB.MX,2022).

El cambio climático y el aumento en la emisión de contaminantes precursores del ozono por fuentes antropogénicas ha favorecido las condiciones para su formación convirtiéndose en un importante contaminante en los últimos años y del cual sus concentraciones han ido en aumento, por lo que, es importante conocer sus efectos en la salud.

En 2019, las ECV como la cardiopatía isquémica (CAD) y el accidente cerebrovascular ocuparon los dos primeros lugares de muerte en el mundo, causando el 16 y 11% del total de defunciones respectivamente (WHO,2020). De acuerdo con el estudio GBD en 2019, las ECV siguen en aumento en todo el mundo, duplicando los casos durante las últimas tres décadas (1990-2019) y aumentando también el número de muertes de 12.1 a 18.6 millones (Roth et al.,2020). En México, durante el primer semestre del año 2022, las ECV se consideraron la primera causa de muerte según el INEGI (INEGI,2023).

Los desenlaces causantes de mortalidad cardiovascular tales como CAD, isquemia cardiaca e infarto, entre otras, tienen como enfermedad subyacente a la aterosclerosis (Cisneros&Carranza,2013). La aterosclerosis es un proceso fisiopatológico donde convergen mecanismos de inflamación, estrés oxidante, proliferación celular y disfunción endotelial, entre otros (Landmesser,2004). Aunque la evidencia es aún escasa, estudios previos han relacionado la exposición a

contaminantes como el ozono con mayor riesgo de aterosclerosis y sus desenlaces, sin embargo, los mecanismos de causa han sido escasamente estudiados. Los marcadores de disfunción, estrés oxidante e inflamación podrían ser moléculas que ayuden a explicar el riesgo cardiovascular asociado con ozono desde un punto de vista mecanístico. Por lo tanto, se pretende realizar una revisión bibliográfica en diferentes estudios de exposición a ozono que midan los diferentes biomarcadores relacionados con la síntesis del NO.

HIPÓTESIS

La exposición a ozono, tanto en estudios epidemiológicos como experimentales, modifica las concentraciones de biomarcadores de disfunción endotelial (DE) tales como L-Arginina, ADMA y NO, además de moléculas vasoconstrictoras e interleucinas inflamatorias.

OBJETIVOS

Objetivo general

Realizar una búsqueda bibliográfica de estudios epidemiológicos y experimentales que relacionen la exposición a ozono con biomarcadores de disfunción endotelial, particularmente, aquellos involucrados en la síntesis de NO.

Objetivos particulares

- Conocer las generalidades del ozono, su formación, la regulación de sus valores límite en el ambiente y las concentraciones presentes en la Ciudad de México.
- Comprender la relación entre el ozono como contaminante ambiental y los desenlaces cardiovasculares en la población.
- Conocer la relación entre ozono y marcadores de disfunción endotelial (NOX, L-Arginina, ADMA, ET-1, entre otros)
- Entender la asociación del ozono con biomarcadores directa o indirectamente relacionados con la síntesis de NO.
- Presentar un posible mecanismo molecular por el cual la exposición ambiental a ozono repercute en la salud cardiovascular.

- Sustentar bibliográficamente el uso de los biomarcadores de disfunción endotelial como indicadores de los efectos de la exposición aguda a ozono en la salud cardiovascular.

MATERIALES Y MÉTODOS

Realizamos una búsqueda bibliográfica de artículos de investigación sobre estudios epidemiológicos, *in vitro* y experimentales en animales mediante bases de datos por internet como Pubmed, Google Académico, ScienceDirect, bidíUNAM, SciELO, Ovid Technologies, Springer Link, Taylor & Francis Group, Oxford Journals Collection, así como en revistas: Environmental Health Perspectives, Journal of Toxicology and Environmental Health, The American Journal of Pathology, Environmental Pollution, Environmental Toxicology and Pharmacology, Environmental International, Toxicological Sciences, Toxicology Letters, Molecular and Cellular Biochemistry, Inhalation Toxicology, Environmental Pollution, Environmental Research, American Journal of Epidemiology, Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology (ATVB), Circulation, Environmental Science & Technology, Pharmacological Reviews, BMC Public Health, Lancet Planetary Health, entre otras.

Durante la búsqueda se utilizaron palabras clave como:

- Ozono-disfunción endotelial
- Contaminación ambiental-biomarcadores
- Ozono-biomarcadores
- Ozono-cardiovascular
- Contaminación ambiental-cardiovascular.

Además de las bases de datos, se buscó dentro de la misma bibliografía referenciada en los artículos evaluados, permitiendo encontrar más estudios relacionados.

Se obtuvo una variedad de artículos provenientes de estudios epidemiológicos de exposición controlada y ambiental en distintos países como Estados Unidos,

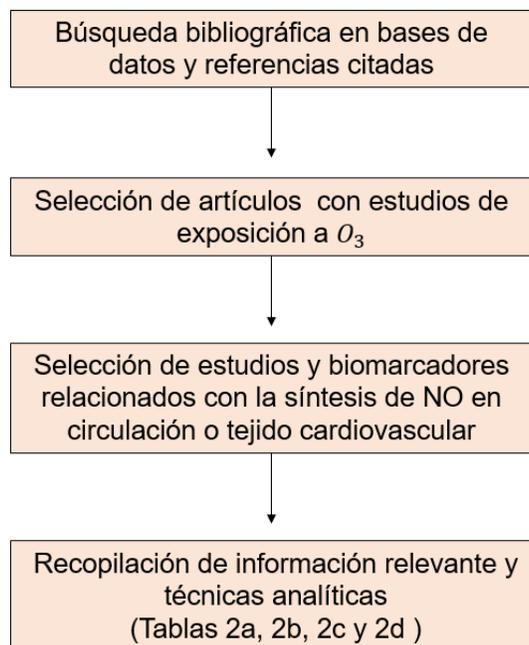
Canadá, China y ciertas zonas de Europa, así como estudios experimentales en animales.

Dentro de los artículos, se seleccionó a aquellos que cumplieran con los siguientes criterios:

1. Sujetos de estudio expuestos de forma ambiental o controlada a ozono.
2. Estudios que determinaran biomarcadores de disfunción endotelial relacionados de forma directa o indirecta con la síntesis de NO.
3. Medición del biomarcador en la matriz biológica, seleccionando a los medidos en circulación o en tejido cardiovascular.

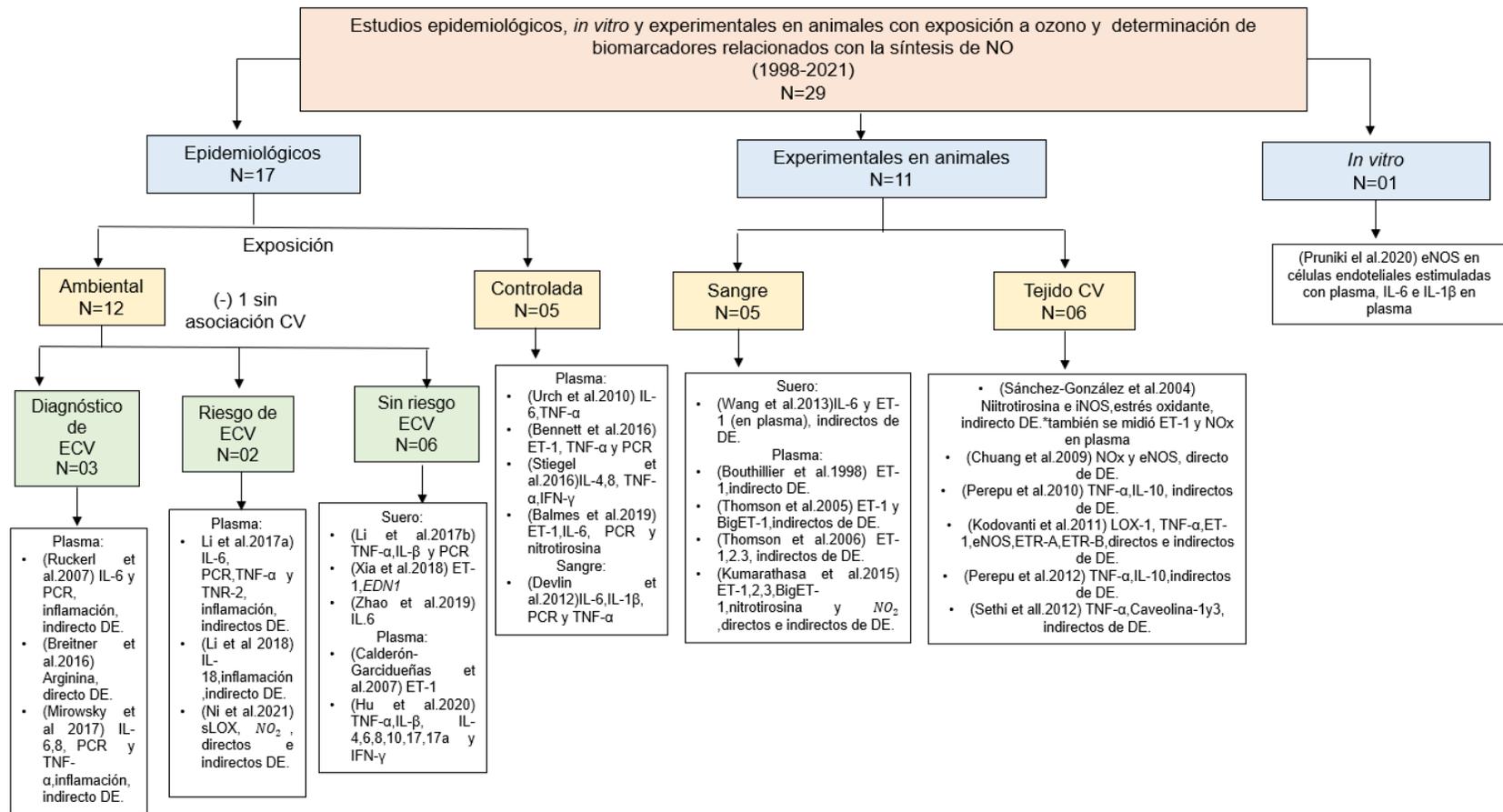
En los artículos evaluados, recopilamos la información que consideramos más relevante (Tablas 2a, 2b y 2c) como la población de estudio, el método de exposición o tiempo en el que fue evaluado y en qué condiciones, la concentración de ozono a la que fueron expuestos, los biomarcadores seleccionados con la matriz donde fueron medidos y los resultados significativos de estos ($p < 0.05$), además de las técnicas con las que fueron determinados los biomarcadores (Tabla 2d).

Figura 2a. Metodología de investigación acerca de la exposición a ozono y biomarcadores relacionados con la síntesis del NO.



RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Figura 3a. Estudios de exposición a ozono y biomarcadores relacionados con la síntesis del NO.



De acuerdo con la investigación bibliográfica, identificamos 17 estudios epidemiológicos de exposición a ozono (Tabla 2a), entre los cuáles, 12 corresponden a exposición ambiental y 5 a exposición controlada. Todos éstos evaluaron una exposición a corto plazo (desde horas hasta un máximo de dos semanas en solo un estudio), no obstante, no se encontraron resultados estadísticamente significativos para la totalidad de los estudios.

Referente a los estudios de exposición ambiental, en 3 de ellos se analizaron los efectos en sujetos tanto con riesgos como con presencia de enfermedades cardiovasculares (Mirowsky et al.2017) o con antecedentes de eventos como infarto y cirugía cardiaca (Ruckerl et al.2007; Breitner et al.2016), en los que se evaluaron biomarcadores de inflamación y disfunción endotelial en plasma como L-Arg, interleucinas (IL-6 y 8), PCR y Factor de Necrosis Tumoral Alfa (TNF- α). En los estudios restantes se evaluaron sujetos sanos (Calderón-Garcidueñas et al.2007; Li et al.2017b; Xia et al.2018; Zhao et al.2019; Hu et al.2020; Ni et al.2021), estudios que incluían participantes con riesgo de ECV presentando padecimientos como hipertensión arterial y diabetes (Li et al.2017a; Li et al.2018) y sólo un estudio con sujetos con antecedentes de asma (Thompson et al.2010), midiendo biomarcadores en suero y plasma como interleucinas, factores de transcripción, nitritos y ET-1.

Los estudios de exposición controlada a ozono (Urch et al.2010; Devlin et al.2012; Bennett et al 2016; Stiegel et al.2016; Balmes et al.2019) también analizaron en plasma y sangre total las concentraciones de biomarcadores de inflamación y estrés oxidante como interleucinas, PCR, TNF- α , ET-1 y nitrotirosina, siendo estos, biomarcadores indirectos de disfunción endotelial.

Tabla 2a. Estudios epidemiológicos de exposición a ozono y determinación de biomarcadores relacionados a la síntesis de NO.

<i>Referencia</i>	<i>Población</i>	<i>Método</i>	<i>Exposición a ozono Media (DE) (ppb)</i>	<i>Biomarcador relacionado a NO</i>	<i>Resultados significativos</i>
<i>Exposición ambiental</i>					
Calderón-Garciduenas et al.2007	n=81 6-13 años 3 zonas de México,2003-2004	1-7 días	Acumulado por hora (1-7 días respectivamente): 500-4500 (dependiendo de la zona del grupo)	ET-1	-
Ruckerl et al.2007	n=1003 sobrevivientes de infarto al miocardio 35-80 años 6 ciudades de Europa,2003-2004	0-5 días	14.4-30.99 (Varía entre ciudades)	IL-6 y PCR	-
Thompson et al.2010	n=45 (n=10 con antecedentes de asma controlada) 18-40 años Canadá, 1999-2006	0-7 días	21,94 (15,78)	IL-6	↑

Breitner et al.2016	n=2869 pacientes con cirugía cardiaca Media (DE)=59.4(12.1) años EE. UU.,2001-2010	0-5 días	43.3(15.9)	L-Arg	↓
Li et al.2017	n=3996 incluye sanos y con ECV, diabetes e HA. Media (DE)=53.5(14.2) años EE. UU.,1998-2011	1-7 días	23.7 (10.9) Resultados escalados a 10 ppb	TNF- α TNRF-2 IL-6 PCR	↑TNRF-2
Li et al.2017	n=31 Media (DE)=46(5) años China,2014	0-6 horas, 7-12 horas, 13-24 horas, 1 día, 2 días y 0-7 días	29.6(13)	TNF- α IL-1 β PCR	↑ IL-1 β
Mirowsky et al.2017	n=13 Pacientes hombres con enfermedad arterial coronaria 53-68 años	0-5 días	26 (10)	IL-6 TNF- α IL-8 IL-1 β PCR	↑ IL-6 a los 2 y 3 días ↑ TNF- α a los 2 días

	EE. UU. ,2012-2014				
Li et al.2018	n=3820 incluye sanos, con ECV, diabetes e HA. Media (DE)=56(15) años EE. UU., 1998-2005	1-7 días	23.2 (11.2)	IL-18	↑IL-18
Xia et al.2018	n=4019 29 años China,2016	Medición personal en periodos de hasta 8 horas	17.97-22.70(14.16-20.45)	ET-1 <i>EDN1</i>	↑ ET-1 ↓ metilación de <i>EDN1</i> en locus 1 (lags 0-2 h)
Zhao et al.2019	A: n=1330 10 años B: n= 1591 15 años Alemania,1995-1999	0-14 días	A: 35.5(14.7) B: 36.3(12.3)	IL-6 hs-PCR	↓ hs-PCR en ciertas poblaciones y adolescentes de 15 años ante niveles bajos de ozono
Hu et al.2020	n=53 Media (DE): 31.4(7.3) años	Exposición en exterior e interiores (con un	Exterior: A: 6.9(4.4) B: 8.1(4.7) C:9.0(3.5)	IL-(1β, 4,6,8,10, 17,17A),	A: ↓ IL-(6, 17A,10) e IFN-γ

	China,2014-2015	aumento de 3-10 ppb en el interior) A:12 horas B: 24 horas C: 1 semana D: 2 semanas	D:8.7(2.1)	IFN- γ y TNF- α	B: \downarrow IL-(6,17A,4,10) e IFN- γ , C: \uparrow IL-(1 β , 6) e TNF- α D: \uparrow IL-(1 β , 6, 8,17A), IFN- γ y TNF- α
Ni et al.2021	n=740 incluye fumadores, con diabetes e HA. 46-89 años EE. UU.,2002-2007	0-7 días	Alrededor de 20	sLOX-1 NO ₂	-
<i>Exposición controlada</i>					
Urch et al.2010	n=23 21-40 años Asmáticos y no asmáticos Canadá,1999-2003	2 horas	120	IL-6 TNF- α	-
Devlin et al.2012	n=23 19-33 años	2 horas (2 veces) con ejercicio alternado	300	TNF- α IL-6 IL-1 β PCR	\uparrow TNF- α , IL-1 β y PCR
Bennett et al.2016	n=19 con peso normal n=19 obesos	2 horas con 4 periodos de ejercicio	400	IL-6,8 TNF- α IL-1 β	\uparrow IL-6 y PCR \downarrow TNF- α

	Media (DE):27.7(5.2) años	de 15 minutos		PCR	en sujetos obesos
Stiegel et al.2016	n=15 18-55 años	2 horas	300	IL-4,8 IFN- γ y TNF- α	-
Balmes et al.2019	n=87 55-70 años	3 horas (3 veces) con ejercicio alternado	70 y 120	ET-1 IL-6 PCR Nitrotirosi na	↑ ET-1 con exposición de 120 ppb ↓ Nitrotirosina

ET-1: Endotelina 1, *EDN1*: Gen codificante de ET, TNF- α : Factor de Necrosis Tumoral Alfa, INF- γ : Interferón Gamma, IL: Interleucina, sLOX-1: Receptor-1 soluble de lipoproteína de baja densidad oxidada similar a la lectina, NO₂: Nitritos, eNOS: Óxido Nítrico Sintasa Endotelial, iNOS : Óxido Nítrico Sintasa Inducible NOx: Nitritos más nitratos, TNRF-2: Receptor-2 del Factor de Necrosis Tumoral, PCR: Proteína C Reactiva, hs-PCR: PCR de alta sensibilidad, L-Arg: _L-Arginina

Entre la búsqueda literaria, sólo recopilamos un estudio *in vitro* (Pruniki et al.2020) en donde se evaluó la eNOS por medio de PCR en tiempo real en líneas celulares endoteliales aórticas y microvasculares cardiacas incubadas con plasma de 10 participantes expuestos a corto plazo a ozono ambiental en los Estados Unidos. También se evaluaron interleucinas en la misma matriz biológica, sin embargo, no se mostraron resultados estadísticamente significativos en ninguno de ellos (Tabla 2b).

Tabla 2b. Estudios *in vitro* de exposición a ozono y determinación de biomarcadores relacionados a la síntesis de NO.

<i>Referencia</i>	<i>Población</i>	<i>Método</i>	<i>Exposición a ozono Media (DE) (ppb)</i>	<i>Biomarcador relacionado a NO</i>	<i>Resultados significativos</i>
Pruniki et al.2020	n=100 14-18 años EE. UU.	Exposición ambiental en sujetos y posterior extracción de sangre. (0-7 días)	Mediana (percentil 25- 75): 64,1 (56,3–68,6)	eNOS en células endoteliales estimuladas con plasma IL-1 β IL-6	-

eNOS: Óxido Nítrico Síntasa Endotelial, IL:Interleucina

La exposición de los sujetos a ozono ambiental en los estudios epidemiológicos fue variada de acuerdo con la zona monitoreada. Algunos de estos presentan los niveles de exposición a ozono con promedios máximos de 8 horas (Ruckerl et al.,2007, Breitner et al.,2016, Li et al.,2017b, Zhao et al.,2019) y 1 hora (estudios Hu et al.,2020), los cuales pueden ser comparados con la normatividad establecida por la OMS, la NOM-020-SSA1-2021 en México y la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (EPA) que indica valores de aproximadamente de 50 ppb (OMS), 65 ppb (NOM-020) y 70 ppb (EPA) para promedios máximos de 8 horas y 90 ppb (NOM-020) para máximos de 1 hora. De acuerdo con las concentraciones reportadas, ningún estudio excede la normatividad establecida.

Como se observa en la tabla 2a, los estudios de exposición controlada a ozono utilizaron concentraciones del contaminante mucho mayores que las reportadas en los estudios de exposición ambiental presentados, sin embargo, las concentraciones se acercan a las reportadas durante ciertos periodos del año en algunas ciudades urbanas como la Ciudad de México y Beijing, China, además de que el tiempo de exposición es menor al que se exponen los sujetos en su

cotidianidad ante temporadas altas de ozono (Urch et al., 2010; Devlin et al.,2012). De acuerdo con el estudio Genética Enfermedad Aterosclerótica (GEA) realizado en adultos de la CDMX, las concentraciones anuales de ozono a las que se expusieron de 2008 a 2013 se encontraron alrededor de 80 ppb, las cuales fueron mayores a las de otros países como Estados Unidos, China y países de Europa (Posadas et al.2022). En cambio, en temporadas de ozono (meses de febrero a junio), por ejemplo, en ciertas zonas del Valle de México durante el mes de marzo del 2023 se reportaron concentraciones de ozono mayores a los 150 ppb, activando las fases de contingencia ambiental (Barrios,2023).

Además, se han reportado efectos sobre inflamación sistémica y función pulmonar con concentraciones de 100-300 ppb de ozono en otros estudios de exposición controlada (Balmes et al.,2019).

Conforme a la Tabla 2a, los biomarcadores con cambios significativos en sus niveles en suero o plasma fueron ET-1, IL-6, L-Arg, TNRF-2, IL-1 β , TNF- α , IL-18, metilación de *EDN1*, PCR, IL-10, IL-17A, IFN- γ , IL-8 y nitrotirosina, no obstante, los aumentos o disminuciones no fueron coincidentes entre todos los marcadores como TNF- α e IL-6 debido al tiempo de exposición evaluado.

La Tabla 2c muestra los 11 estudios identificados en grupos de animales experimentales como ratas y ratones expuestos por horas a altas concentraciones de ozono (en su mayoría 800 ppm) durante semanas, entre ellos, 5 estudios examinaron los biomarcadores en suero (Wang et al.2013) y plasma (Bouthillier et al.1998; Thomson et al.2005; Thomson et al.2006; Kumarathasa et al.2015) y 6 estudios en tejidos cardiovasculares de corazón, aorta y ventrículo (Sánchez-González et al.2004; Chuang et al.2009; Perepu et al.2010; Kodovanti et al.2011; Perepu et al.2012; Sethi et al.2012). Sólo uno de los estudios presentados, posterior a la exposición de ozono reportó lesiones de isquemia y reperfusión en el corazón extraído de las ratas (Perepu et al.2010).

En cuanto a los biomarcadores incluidos, estos se clasificaban como de inflamación, estrés oxidante e indirectos y directos de disfunción endotelial, entre los que

encontramos a las interleucinas, ET-1, nitrotirosina, TNF- α , caveolinas, eNOS e iNOS y metabolitos del NO.

En su mayoría (a excepción de dos estudios), se presentaron resultados estadísticamente significativos en cuanto a los biomarcadores examinados y la exposición a ozono, reflejados en cambios en los niveles del ET-1 y 3, BigET-1, NOX, eNOS, IL-10, TNF- α , ETR-A y B, Caveolina 1 y 3.

Tabla 2c. Estudios experimentales en animales de exposición a ozono y determinación de biomarcadores relacionados a la síntesis de NO.

<i>Referencia</i>	<i>Población</i>	<i>Método</i>	<i>Exposición a O₃ Media (DE) (ppb)</i>	<i>Biomarcador relacionado a NO</i>	<i>Resultados significativos</i>
Bouthilliet al.1998	6 ratas Fischer	1-3 días	800(40)	ET-1 en plasma	-
Sánchez-González et al.2004	24 ratas Wistar macho	4 horas/día de 7, 14 y28 días	250	ET-1 NOx en plasma Nitrotirosina iNOS en aorta	↓ ET-1 ↑ NOx A los 14 días en plasma Detección de iNOS y nitrotirosina en el tejido dependiente del tiempo
Thomson et al.2005	Grupos de 4 ratas Fischer-344	5 días durante 4 horas	400-800	ET-1 BigET-1 en plasma	↑

Thoms on et al. 2006	4-12 ratas Fischer-344 macho	5 días durante 4 horas	800	ET-1,2 y 3 en plasma	↑ ET-1 y 3
Chuang et al.2009	Grupos de 5 ratones macho C57Bl/6 y apoE-/-	C57Bl/6: 1 o 5 días, 8 h/día apoE-/-: 5 días/semana, 8 h/día	500	NOx, eNOS en tejido vascular	↓ NOx, eNOS
Perepu et al.2010	Grupos de 6 ratas Sprague– Dawley	28-56 días, 8 horas /día con posteriores lesiones de isquemia y reperfusión.	800	TNF-α IL-10 en corazón	↓ IL-10 ↑ TNF-α
Kodava nti et al.2011	20 ratas Wistar Kyoto macho	1: 5 h/día, 1 día/semana por 16 semanas. 2: 5 h/día durante 2 días consecutivos	1: 0,403 (0,051) 2: 510- 1000	LOX-1, TNF-α, ET-1, eNOS, ETR-A y ETR-B en aorta y corazón	1: ↑ ET-1, ETR-A, eNOS, LOX- 1 2: ↑ ET-1, ETR-B a 1000 ppb
Perepu et al.2012	Grupos de 6 ratas Sprague– Dawley macho adultas	28-56 días, 8 horas /día	800	TNF-α IL-10 en corazón	↓ IL-10 ↑ TNF-α

Sethi et al 2012	Grupos de 4 ratas Sprague-Dawley adultas	28-56 días, 8 horas /día	800	TNF- α Caveolin a-1 y 3 En membrana de ventrículo izquierdo	\uparrow TNF- α a los 56 días \downarrow Caveolina-1 \uparrow Caveolina-3 a los 28 días y \downarrow a los 56 días
Wang et al.2013	Grupos de 6 ratas Wistar	4 horas, 2 veces por 3 semanas continuas	810	ET-1 en plasma IL-6 en suero	-
Kumara thasan et al.2015	Grupos de 22-23 ratas Fischer-344	No informado Medición a las 0 y 24 h	400-800	ET-1,2,3 BigET-1 3-nitrotirosina NO ₂ en plasma	\uparrow ET-1 y BigET-1

ET-1: Endotelina 1, BigET-1: Precursor de ET-1-1, TNF- α : Factor de Necrosis Tumoral Alfa, IL: Interleucina, LOX-1: Receptor-1 de lipoproteína de baja densidad oxidada similar a la lectina, NO₂: Nitritos, ETR-A, B: Receptor de Endotelina-A y B, eNOS: Óxido Nítrico Sintasa Endotelial, iNOS : Óxido Nítrico Sintasa Inducible NOx: Nitritos más nitratos

En los estudios realizados en animales, sólo uno de ellos manejó exposiciones menores a los 400 ppb (Sánchez-González et al.,2004), basándose en condiciones que pudieran ser cercanas a concentraciones de ozono es ciudades contaminadas como la CDMX en ciertas temporadas y horas del día. A pesar de esto, la exposición se realizó durante un periodo de 7 a 28 días basándose en estudios anteriores que mostraban efectos tóxicos bajo esos estándares de exposición.

Los otros estudios en animales manejaron altas concentraciones de ozono que van hasta los 800 ppb en la mayoría de ellos, dosis que asemejaran a las que pudieran causar efectos de importancia en la salud humana de acuerdo con algunos factores pulmonares como frecuencia respiratoria y la superficie alveolar para posteriormente hacer un escalamiento a los animales (Thomson et al.,2005). Además, los roedores presentan una menor susceptibilidad al ozono que los humanos debido a factores intrínsecos como su respiración nasal obligada (Chuang et al.,2009), momento de exposición, así como una mayor eficiencia de absorción por lo que es necesario aplicar niveles más elevados del gas para no subestimar resultados a concentraciones semejantes a las de la exposición en humanos. En general, se observan resultados estadísticamente significativos empleando concentraciones 5 veces mayores de ozono en los roedores comparados con los humanos (Perepu et al.,2010).

De acuerdo con el informe final en el año 2020 por la Evaluación Científica Integrada (ISA, por sus siglas en inglés) para el ozono y los oxidantes fotoquímicos relacionados, basándose en una revisión de estudios acerca de la exposición a ozono aguda y crónica, esta considera que la evidencia es sugerente, pero no suficiente para asegurar una relación causal ozono-ECV (US EPA,2020). En cuanto a su evaluación en el año 2013, se concluyó que los estudios de toxicidad a corto plazo de ozono en animales mostraban evidencia de DE y deterioro de la función cardiaca, mientras que los estudios en humanos eran inconsistentes y limitados, así como no han aumentado lo suficiente hasta entonces (US EPA,2020). Esta información es concisa con nuestros resultados presentados, ya que, en el caso de los estudios epidemiológicos, los resultados en cuando a la presencia de biomarcadores no fueron consistentes entre estudios y en algunos casos, nulos. Según la ISA, otro de los factores influyentes en la afección cardiovascular dada por el ozono es la edad, existiendo evidencias de que los niños y adultos mayores son poblaciones de mayor riesgo, sin embargo, los resultados pueden ser contradictorios entre ellos. La presencia de enfermedades predisponentes aumenta el riesgo en las afecciones, en especial el asma, ECV y diabetes; no obstante, los

resultados sobre ECV son limitados (US EPA 2020). En los resultados dados en nuestra investigación, no hubo resultados significativos en todos los estudios en sujetos con diagnóstico o riesgo de ECV (Tabla 2a), es decir, no presentaron mayores niveles de biomarcadores analizados ante aumentos en las concentraciones de ozono.

Calderón-Garcidueñas et al. (2007), Zhao et al. (2019) y Pruniki et al. (2020) llevaron a cabo sus estudios en una población de niños de 6 a 13 años, 10 y 15 años, así como de 14 a 18 años respectivamente, sin embargo, no se presentaron resultados significativos en alguno de ellos (Tabla 2a y 2b).

Los estudios relacionados con mortalidad cardiovascular y ozono también muestran evidencias ambiguas; estudios realizados en China, mostraron un mayor riesgo de mortalidad cardiovascular ante la exposición a ozono (Guo et al.,2022), así como otros estudios en los EE. UU. y Europa, asociándolos ante aumentos del 10 ppb de ozono con incrementos en la mortalidad y hospitalizaciones por IAM y aterosclerosis coronaria, además de problemas respiratorios (Srebot et al.,2009).

Un estudio realizado en 48 ciudades de EE. UU. entre 1989 y el año 2000 encontró una asociación de un aumento de 0.3% en la mortalidad debida a aumentos de 10 ppb de ozono en el lag 0 en verano y un aumento del 0.5% en ECV; sin embargo, existen limitaciones en el análisis, además de que es probable que la asociación se haya dado por el elevado riesgo de mortalidad de las personas que sufren eventos como IAM u otras condiciones (Zanobetti & Schwartz,2008).

El proyecto ESCALA determinó un aumento en la mortalidad en Latinoamérica asociada ante altas concentraciones a ozono, siendo en CDMX mayoritariamente asociada con muertes por causas naturales y con un mayor riesgo en lactantes (Romieu et al.,2012).

Los biomarcadores determinados se relacionan directa e indirectamente con la síntesis del NO mediante diferentes mecanismos. Entre los biomarcadores de relación directa encontramos a la L-Arg, la eNOS y los NOx. Como hemos mencionado, la L-Arg es un aminoácido sustrato de la enzima eNOS para la producción del NO, por lo que dichos biomarcadores al verse alterados también

afectarían los niveles de NO sintetizados (Acosta et al.,2006). Por otro lado, los NOx son metabolitos analizados ante la imposibilidad de medir el NO debido a su corta vida media (Benavides & Pinzón,2008).

La mayoría de los biomarcadores analizados son de relación indirecta con la síntesis del NO. Entre ellos se encuentra la familia de las endotelinas, siendo la ET-1 la isoforma más predominante, sintetizada en células epiteliales y de acción vasoconstrictora. Existen al menos dos grupos de receptores de endotelinas que median los efectos de vasoconstricción o vasodilatación. Entre ellos encontramos al ET-B que se encuentra principalmente en las células endoteliales, su estimulación media los efectos mencionados, estimula la producción de GMPc y con esto la liberación de NO. Así mismo, vasodilatadores como el NO y la prostaciclina inhiben la producción de ET-1. La producción de ET-1 se ve estimulada por citocinas, angiotensina II, trombina y ROS. La disfunción endotelial se desarrolla ante la disminución en la producción del NO por la sobreexpresión de vasoconstrictores como la ET-1 (Baltazares et al.,2005). Los estudios que presentaron resultados estadísticamente significativos con ET-1, reportaron aumentos ante la exposición a ozono, a excepción de un estudio en ratas con exposición a ozono de 250 ppb (Sánchez-González et al.2004).

Los estudios también midieron marcadores de inflamación, ya que las células endoteliales también son blancos de la respuesta inflamatoria. Algunos de ellos se ven involucrados en la síntesis del NO debido a estímulos inmunológicos de la iNOS independiente de calcio (como la NOS II), por ejemplo, TNF- α producido por macrófagos y células T activadas, IL-6 e IL-1 y 8, activa a las células endoteliales y la producción de NO. De igual forma se presenta una respuesta anti-inflamatoria que involucra a la IL-4 y 10 (Konukoglu & Uzun,2016).

Otros como el LOX-1, también juegan un papel importante en el desarrollo de DE y aterogénesis, ya que permiten que la LDLox ejerza sus efectos sobre las células epiteliales. Uno de los efectos que tiene dicho receptor de lipoproteína es la activación de la Arginasa II, lo que lleva a la supresión de los niveles de NO y aumenta el tono vascular (Ramos & Toledo,2020)

La nitrotirosina fue otro de los biomarcadores analizados por algunos estudios, como se mencionó, esta es el resultado del proceso de nitración ante los altos niveles de NO, su oxidación y su posterior reacción con la tirosina, todo esto en un ambiente de estrés oxidante. Su producción también se ve influenciada por la activación de las citocinas inflamatorias a la NOS II en el proceso de aterosclerosis, aumentando también la producción de NO. A su vez, la nitración de tirosina resulta en un mayor reclutamiento de citocinas y por lo tanto activación de la NOS II (Hanafy et al.,2001).

La PCR también tiene un papel en las ECV y es un importante marcador de inflamación. Es inducida en respuesta a daño tisular, regulada por citocinas como la IL-6, IL-1 y TNF- α . Se encuentra en las fases del proceso de aterosclerosis, así como se ha considerado un predictor de episodios cardiovasculares agudos. Entre los mecanismos pro-aterogénicos se encuentran en desarrollo de DE por su depósito en la íntima de las arterias, facilitando el reclutamiento de células inflamatorias y LDLox, ocasionando lesiones vasculares y células espumosas. Incrementa la producción de factores de coagulación y metaloproteasas, así como disminuye la secreción de NO por la reducción de la expresión de la NOS en el endotelio (Manzur et al.,2011).

Los biomarcadores analizados, fueron cuantificados mediante diferentes técnicas, y en el caso de los estudios epidemiológicos, en matrices biológicas como suero y plasma (Tabla 2d). En cuanto a las técnicas más utilizadas, fueron los inmunoensayos como el Ensayo Inmunoadsorción Ligado a Enzimas (ELISA) principalmente, utilizadas en la detección de las citocinas, PCR, ET-1 y nitrotirosinas, ya sea por kits comerciales o por laboratorios independientes. Los límites de detección y rangos también fueron variados, sin embargo, con esta técnica de inmuno análisis, fueron similares. La técnica ELISA suele ser muy utilizada por su alta sensibilidad de detección, su adaptación a los protocolos experimentales y la disponibilidad de los kits en el mercado (Swanson et al., s.f.), Las metodologías también utilizaron otras técnicas con equipos automatizados como citómetros de flujo y espectrómetro de masas, los cuales también cuentan con

una alta sensibilidad y permiten un análisis en menor tiempo, así como mediciones simultáneas (CNB,2008), por lo que, para analizar una muestra con grandes cantidades de analitos, es de gran utilidad.

Tabla 2d. Técnicas analíticas en la determinación de los biomarcadores en estudios epidemiológicos.

<i>Referencia</i>	<i>Biomarcadores</i>	<i>Matriz biológica</i>	<i>Técnica analítica/ Límites de detección</i>
Calderón-Garcidueñas et al.,2007	ET-1	Plasma	ELISA QuantiGlo Media min. detectable: 0.064 pg/mL R: 0.3-250 pg/mL LD:0.102 pg/mL
Ruckerl et al.,2007	IL-6	Plasma	ELISA LD: 0.7 pg/mL R: 3.1-300 pg/mL
	PCR		Inmunonefelometría, Dade Behring
Thompson et al.,2010	IL-6	Plasma	ELISA
Breitner et al.,2016	L-Arg	Plasma	Espectrofotometría de masas Rango de ensayo: 5-1000 μ mol
Li et al., 2017a	IL-6	Suero	ELISA
	PCR		Inmunonefelometría, Dade Behring e inmunturbidometría
	TNF- α	Plasma	ELISA Sensibilidad: 5.5 pg/mL Rango: 15.6-1000 pg/mL
	TNFR-2		ELISA LD: 2.3 pg/mL R: 7.8-500 pg/mL

Li et al.,2017b	TNF- α	Suero	ELISA LD: 0.7 pg/mL
	IL-1 β		ELISA LD: 0.8 pg/mL
	PCR		ELISA
Mirowsky et al.2017	IL-6	Plasma	ELISA LD: <2 pg/mL R: 6.25-400 pg/mL
	TNF- α		ELISA LD: 2.321 pg/mL R: 19.5-1250 pg/mL
	IL-8		ELISA LD: <5 pg/mL R: 6.25-800 pg/mL
	PCR		ELISA
	IL-1 β		ELISA LD: <1 pg/mL R: 4.69-600 pg/mL
Li et al.,2018	IL-18	Plasma	ELISA LD: 12.5 pg/mL
Xia et al.,2018	ET-1	Suero	ELISA LD: 0.207 pg/mL R: 0.4-25 pg/mL
	<i>EDN1</i>		Reacción en cadena de la polimerasa de bisulfito y pirosecuenciación
Zhao et al.,2019	IL-6	Suero	Citómetro de flujo R: 40-10000 pg/mL
	hs-PCR		Tina-quant® CRP R: <1-350 mg/L

Hu et al.,2020	IL-1 β	Plasma	Cytokine/Chemokine Magnetic Bead Panel LD:0.8 pg/mL
	IL-4		LD: 4.5 pg/mL
	IL-6		LD: 0.9 pg/mL
	IL-8		LD: 0.4 pg/mL
	IL-10		LD: 1.1 pg/mL
	IL-17A		LD: 0.7 pg/mL
	INF- γ		LD: 0.8 pg/mL
	TNF- α		LD: 0.7 pg/mL
Ni et al.,2021	sLOX-1	Plasma	ELISA R: 31.2-2000 pg/mL
	NO ₂		Ensayo Colorimétrico Nitratos/Nitritos R: 6-400 μ M
Urch et al.,2010	IL-6	Plasma	ELISA
	TNF- α		
Devlin et al.,2012	TNF- α	Sangre	Hemocitómetro
	IL-6		
	IL-1 β		
	PCR		ELISA LD: 0.124 ng/mL R: 1.9-150 ng/mL
Bennet et al.,2016	IL-6	Plasma	Inmunoensayo V-PLEX LD: 0.06 pg/mL R: 0.06-488 pg/mL
	IL-8		LD: 0.07 pg/mL R: 0.07-375 pg/mL
	TNF- α		LD: 0.04 pg/MI R: 0.04-248 pg/mL
	PCR		LD: 1.33 pg/mL

			R: 1.33-49600 pg/mL
	IL-1 β		LD: 0.05 pg/mL R: 0.05-375 pg/mL
Stiegel et al.,2016	IL-4	Plasma	Inmunoensayo sándwich LD: 0.31 pg/mL
	IL-8		LD: 0.14 pg/mL
	TNF- α		LD: 0.48 pg/ML
	INF- γ		LD: 0.39 pg/mL
Balmes et al.,2019	PCR	Plasma	Inmunoensayos basados en esferas Luminex LD: 0.4 pg/mL R: 9.77-40000 pg/mL
	IL-6		LD: 0.4 pg/mL R: 9.77-40000 pg/mL
	ET-1		
	Nitrotirosina		ELISA

LD: Límite de detección o sensibilidad

R: Rango

No todos los estudios reportaron las especificaciones de sus técnicas de análisis

Como se observa en los resultados presentados, la mayoría de los biomarcadores corresponden a aquellos de tipo relación indirecta con el NO, por lo que resulta interesante adentrarnos en los análisis de biomarcadores de tipo directo que puedan ser medidos en matrices como suero y plasma en humanos para conocer de forma más específica los efectos del ozono en la síntesis del NO. Estos biomarcadores incluyen a lo NO_x, la L-Arginina y ADMA. Para el caso de los NO_x, encontramos un mayor número de estudios en animales en donde fueron analizados.

De acuerdo con Breitner et al. (2016), los niveles de L-Arg cuantificados fueron alrededor de 66 (MD:65.6 (19.6)) μ M en pacientes sometidos a cateterismo cardiaco y con prevalencia de ECV. Estos niveles se encuentran por debajo de los niveles reportados por otros estudios en sujetos control que van de los 70 a los 100 μ M en

suero, analizados mediante Extracción en Fase Sólida (SPE), Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia (HPLC) y Cromatografía de Intercambio Iónico (IEX) (Erdélyi-Bótor et al.,2016; Barassi et al.,2017; Hess et al.,2017; Hong et al.,2010). Para el estudio de las concentraciones de L-Arg, en estudios epidemiológicos y experimentales se han determinados sus concentraciones por métodos inmunológicos tales como el ELISA, Cromatografía de Interacción Hidrofílica (HILIC), HPLC de fase reversa, IEX, técnicas de dilución y ultrafiltración, SPE, por precipitación de proteínas y espectrometría de masas (Martens-Lobenhoffer & Bode-Böger,2014).

De acuerdo con los parámetros farmacocinéticos, tras la administración oral e intravenosa de L-Arg, esta presenta un tiempo de vida media que va de 40-75 minutos, dependiendo de la dosis y vía de administración (Bode-Böger et al.,1998).

En cuanto a los niveles de NO₂ presentados en el estudio por Ni et al. (2021) estos fueron de 24.7 µM en una cohorte que incluía a sujetos fumadores, con diabetes e HA. Estos niveles fueron mayores a los reportados en un estudio por Wang en el 2020 en sujetos control en suero (Wang et al.,2021). Ambos estudios se midieron mediante el ensayo de Griess.

Entre los métodos utilizados para la medición de NO_x encontramos al ensayo de Griess, la Cromatografía de Gases/Masas (GC-MS), métodos espectrofotométricos y ultravioleta, ensayos fluorométricos, quimioluminiscencia (CL), HPLC, Electroforesis Capilar (CE) y Cromatografía de Gases (GC) y métodos analíticos basados en espectrometría de masas (Tsikas,2005).

En sangre humana, los NO₂⁻ presentan una vida media de alrededor de 13 minutos, mientras que los NO₂⁻ y NO₃⁻ almacenados en hielo e incubados a 37° C no cambian su concentración en al menos 60 minutos (Tsikas,2005). Otros estudios han reportado una vida media de 15 a 45 minutos de los NO₂⁻ en circulación con concentraciones basales de 0.2-0.5 µM. En el caso del NO₃⁻, este registra una vida media en plasma de hasta 6 horas después de su consumo en vegetales (Kapil et al.,2020).

Una vez separado el plasma, estos metabolitos son estables a -20°C por al menos 1 año (Giustarini et al.,2008).

En cuanto al biomarcador ADMA, este ha sido estudiado en plasma, suero y saliva en pacientes con migraña y lesiones cerebrales (Erdélyi-Bótor et al.,2016), diabetes tipo 2 y prediabetes (Wieczór ET AL.,2020), mujeres expuestas a Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAP) (Pruneda-Álvarez et al.,2016), ECV (Isola et al.,2020) entre otros padecimientos y condiciones como la edad, enfermedad renal terminal y crónica, hiper colesterolemia y trigliceridemia, resistencia a la insulina e HTA, en donde han detectado aumentos de ADMA. Además, se considera un importante marcador de DE, diagnóstico de ECV y mortalidad, con aumentos en los riesgos con concentraciones arriba de los 0.7 μM (De Gennaro Colonna V et al.,2009; Böger et al.,2009).

Las técnicas que se han empleado para determinar las concentraciones de ADMA tanto en estudios epidemiológicos como experimentales son principalmente por medio de HPLC y ELISA, así como las técnicas mencionadas para la determinación de L-Arg (Isola et al., 2019; Sonmez et al., 2010; Martens-Lobenhoffer & Bode-Böger,2014).

CONCLUSIONES

El ozono es un contaminante que ejerce efectos adversos en distintos órganos y sistemas incluyendo el cardiovascular. Un aumento en la temperatura ambiental favorece la formación de ozono, entre otros factores, por lo que se espera que la contaminación por ozono siga siendo una problemática ambiental debido al calentamiento global. Aunque la evidencia no es concluyente se ha observado mayor riesgo de mortalidad y enfermedad cardiovascular relacionados con la exposición a ozono en distintos estudios a nivel mundial. Algunos estudios epidemiológicos y experimentales han mostrado asociación entre ozono y biomarcadores de disfunción endotelial como el NO; sin embargo, la evidencia aún es escasa y no concluyente. Además, el ozono se asocia significativamente con

biomarcadores relacionados con disfunción endotelial tales como ET-1 y citocinas pro-inflamatorias (IL-6, IL-18 y TNF- α). De acuerdo con nuestra revisión diversas metodologías son adecuadas para detectar a los biomarcadores de disfunción endotelial en suero, plasma o tejido. Nuestra revisión resalta la necesidad de más estudios epidemiológicos donde se evalúen desenlaces cardiovasculares y biomarcadores de disfunción endotelial para poder sugerir posibles mecanismos por los cuales el ozono ejerce efectos adversos a nivel cardiovascular. Es importante considerar en estudios sobre efectos cardiovasculares crónicos asociados a la exposición a ozono, el tiempo de vida media de los biomarcadores de disfunción endotelial, ya que en algunos casos son de minutos e incluso segundos. De manera general, más investigaciones sobre el ozono y desenlaces adversos asociados podrían ser de utilidad para los tomadores de decisiones sobre una normatividad y vigilancia más estricta en los niveles de ozono y contaminantes relacionados con su formación.

REFERENCIAS

- 1 Acosta, A., Áñez J, Andara, C., Valmore P.,Bermúdez F. (2006). Mecanismos moleculares de la disfunción endotelial: de la síntesis a la acción del óxido nítrico. *Archivos Venezolanos de Farmacología y Terapéutica*, 25(2), 54-59. http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0798-02642006000200003&lng=es&tlng=es.
- 2 Aire CDMX. El monitoreo de la calidad del aire. <http://www.aire.cdmx.gob.mx/default.php?opc=%27ZaBhnml=%27>
- 3 Andrés, V., Pello, O. M., & Silvestre-Roig, C. (2012). Macrophage proliferation and apoptosis in atherosclerosis. *Current Opinion in Lipidology*, 23(5), 429–438. doi:10.1097/mol.0b013e328357a379
- 4 Anenberg, S. C., Henze, D. K., Tinney, V., Kinney, P. L., Raich, W., Fann, N., ... Kuylenstierna, J. C. I. (2018). Estimates of the Global Burden of Ambient PM2.5, Ozone, and NO2 on Asthma Incidence and Emergency Room Visits. *Environmental Health Perspectives*, 126(10), 107004. doi:10.1289/ehp3766
- 5 Aydin S. (2015) A short history, principles, and types of ELISA, and our laboratory experience with peptide/protein analyses using ELISA. *Peptides*.72:4-15. doi: 10.1016/j.peptides.2015.04.012. Epub 2015 Apr 20. PMID: 25908411.
- 6 Badimón L, Martínez-González J. (2002) Endothelium and vascular protection: an update. *Rev Esp Cardiol.*,55 (1),17-26. PMID: 15626352.
- 7 Balmes JR, Arjomandi M, Bromberg PA, Costantini MG, Dagincourt N, Hazucha MJ, Hollenbeck-Pringle D, Rich DQ, Stark P, Frampton MW. (2019) Ozone effects on blood biomarkers of systemic inflammation, oxidative stress, endothelial function, and thrombosis: The Multicenter Ozone Study in older Subjects (MOSES). *PLoS One.*, 14(9):e0222601. doi: 10.1371/journal.pone.0222601. PMID: 31553765
- 8 Baltazares,M., Rodriguez H., Ortega,J., Sotres-Vega A., Baltazares M. E. (2005) Sistema endotelina, *REV INST NAL ENF RESP MEX* , 18(4),308-320. <https://www.medigraphic.com/pdfs/iner/in-2005/in054j.pdf>

- 9 Bañeras J, Iglesias-Grau J, Téllez-Plaza M, Arrarte V, Báez-Ferrer N, Benito B, Campuzano Ruiz R, Cecconi A, Domínguez-Rodríguez A, Rodríguez-Sinovas A, Ujueta F, Vozzi C, Lamas GA, Navas-Acién A. (2022) Environment and cardiovascular health: causes, consequences and opportunities in prevention and treatment. *Rev Esp Cardiol (Engl Ed)*.S1885-5857(22)00204-3. doi: 10.1016/j.rec.2022.05.030.
- 10 Barassi, A., Corsi Romanelli, M. M., Pezzilli, R., Damele, C. A. L., Vaccalluzzo, L., Goi, G., ... Melzi d'Eril, G. V. (2017). Levels of L-arginine and L-citrulline in patients with erectile dysfunction of different etiology. *Andrology*, 5(2), 256–261. doi:10.1111/andr.12293
- 11 Barrios, R. (2023) Se mantiene la Fase I de contingencia ambiental atmosférica por ozono en la ZMVM. Gobierno de México, Comisión ambiental. <https://www.gob.mx/comisionambiental/prensa/se-mantiene-la-fase-i-de-contingencia-ambiental-atmosferica-por-ozono-en-la-zmvm-329988>
- 12 Basatemur, G. L., Jørgensen, H. F., Clarke, M. C. H., Bennett, M. R., & Mallat, Z. (2019). Vascular smooth muscle cells in atherosclerosis. *Nature Reviews Cardiology*. doi:10.1038/s41569-019-0227-9
- 13 Bejarano, J. Brotons, C. (2011) Factores de riesgo cardiovascular y atención primaria: evaluación e intervención. *Atención primaria*, 43(12), 668-677. doi:10.1016/j.aprim.2011.10.002
- 14 Benavides, M. C. & Pinzón A. (2008). Óxido nítrico: implicaciones fisiopatológicas. *Revista Colombiana de Anestesiología*, 36 (1), 45-52. Recuperado el 02 de octubre de 2022, de http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-33472008000100007&lng=en&tlng=es.
- 15 Bennett WD, Ivins S, Alexis NE, Wu J, Bromberg PA, Brar SS, et al. (2016) Effect of Obesity on Acute Ozone-Induced Changes in Airway Function, Reactivity, and Inflammation in Adult Females. *PLoS ONE* 11(8): e0160030, 1-13. doi:10.1371/journal.pone.0160030
- 16 Bode-Böger SM, Böger RH, Galland A, Tsikas D, Frölich JC. (1998) L-arginine-induced vasodilation in healthy humans: pharmacokinetic-pharmacodynamic

- relationship. *Br J Clin Pharmacol*,46(5),489-97. doi: 10.1046/j.1365-2125.1998.00803.x. PMID: 9833603
- 17 Böger, R.H., Mass, R., Schulze, F., & Schwedhelm, E. (2009) Asymmetric dimethylarginine (ADMA) as a prospective marker of cardiovascular disease and mortality-An update on patient populations with a wide range of cardiovascular risk. *Pharmacological Research*, 60(6),481-487. Doi:10.1016/j.phrs.2009.07.001
 - 18 Boström CE. (1993) Nitrogen oxides in ambient air--properties, sources and concentrations. *Scand J Work Environ Health*, 19(2), 9-13. PMID: 8209200.
 - 19 Botet,P Climent E, Benaiges D.(2020) Atherosclerosis and inflammation. New therapeutic approaches. *Med Clin (Barc)*,155(6):256-262. doi: 10.1016/j.medcli.2020.04.024
 - 20 Bouthillier L, Vincent R, Goegan P, Adamson IY, Bjarnason S, Stewart M, Guénette J, Potvin M, Kumarathasan P. (1998) Acute effects of inhaled urban particles and ozone: lung morphology, macrophage activity, and plasma endothelin-1. *Am J Pathol*,153(6),1873-84. doi: 10.1016/S0002-9440(10)65701-X
 - 21 Breitner, S., Schneider, A., Devlin, R. B., Ward-Caviness, C. K., Diaz-Sanchez, D., Neas, L. M., ... Kraus, W. E. (2016). Associations among plasma metabolite levels and short-term exposure to PM2.5 and ozone in a cardiac catheterization cohort. *Environment International*, 97, 76–84. doi:10.1016/j.envint.2016.10.012
 - 22 Breton CV, Wang X, Mack WJ, Berhane K, Lopez M, Islam TS, Feng M, Lurmann F, McConnell R, Hodis HN, Künzli N, Avol E. (2012) Childhood air pollutant exposure and carotid artery intima-media thickness in young adults. *Circulation*, 126(13):1614-20. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.112.096164. Epub 2012 Aug 15. PMID: 22896588
 - 23 Calderón,D. Hernández,J.
Castilla,L.Hernández,E.Barragán,G.Rodríguez,R.Villegas,G. (2000) El ozono como molécula reactiva. Concepto actual. *Perinatol Reprod Hum*, 14(2). 115-123
 - 24 Calderón-Garcidueñas, L., Vincent, R., Mora-Tiscareño, A., Franco-Lira, M., Henríquez-Roldán, C., Barragán-Mejía, G., ... Reed, W. (2007). Elevated Plasma Endothelin-1 and Pulmonary Arterial Pressure in Children Exposed to

- Air Pollution. *Environmental Health Perspectives*, 115(8), 1248–1253. doi:10.1289/ehp.9641
- 25 Carvajal, C. (2017). El endotelio: estructura, función y disfunción endotelial. *Medicina Legal de Costa Rica*, 34(2), 90-100. http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1409-00152017000200090&lng=en&tlng=es.
- 26 Chuang, G. C., Yang, Z., Westbrook, D. G., Pompilius, M., Ballinger, C. A., White, C. R., ... Ballinger, S. W. (2009). Pulmonary ozone exposure induces vascular dysfunction, mitochondrial damage, and atherogenesis. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 297(2), L209–L216. doi:10.1152/ajplung.00102.2009
- 27 Cisneros, G. Carranza, E. (2013) Risk factors in ischemic heart disease. *Revista Cubana de Medicina General Integral*, 29(3):369-378. http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0864-21252013000400010&lng=es&tlng=es.
- 28 Clarke G. Tankersley, Roger D. Peng, Djahida Bedga, Kathleen Gabrielson & Hunter C. Champion (2010) Variation in echocardiographic and cardiac hemodynamic effects of PM and ozone inhalation exposure in strains related to *Nppa* and *Npr1* gene knock-out mice, *Inhalation Toxicology*, 22:8, 695-707, DOI: [10.3109/08958378.2010.487549](https://doi.org/10.3109/08958378.2010.487549)
- 29 CNB. (2008) Servicio de citometría de flujo. Csic.es. <http://wwwuser.cnb.csic.es/~citometria/introduccion.html#:~:text=Las%20ventajas%20que%20proporciona%20la,separaci%C3%B3n%20celular%20en%20los%20Sorter>.
- 30 Cohen AJ, Brauer M, Burnett R, Anderson HR, Frostad J, Estep K, Balakrishnan K, Brunekreef B, Dandona L, Dandona R, Feigin V, Freedman G, Hubbell B, Jobling A, Kan H, Knibbs L, Liu Y, Martin R, Morawska L, Pope CA 3rd, Shin H, Straif K, Shaddick G, Thomas M, van Dingenen R, van Donkelaar A, Vos T, Murray CJL, Forouzanfar MH. (2017) Estimates and 25-year trends of the global burden of disease attributable to ambient air pollution: an analysis of data from

- the Global Burden of Diseases Study 2015. *Lancet*,389(10082):1907-1918. doi: 10.1016/S0140-6736(17)30505-6.
- 31 Cole MP, Freeman BA.(2009) Promotion of cardiovascular disease by exposure to the air pollutant ozone. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*,L205-8. doi: 10.1152/ajplung.00187.2009.
- 32 Colman,J. (2021) Air Pollution: Effects and Dangers. (11va edición) New York. Nova.Disponible en: <https://search-ebSCOhost-com.pbidi.unam.mx:2443/login.aspx?direct=true&db=nlebk&AN=2907054&lang=es&site=eds-live>.
- 33 Cylwik D, Mogielnicki A, Buczko W. (2005) L-arginine and cardiovascular system. *Pharmacol Rep.* 57(1):14-22. PMID: 15849373.
- 34 De Gennaro Colonna V, Bianchi M, Pascale V, Ferrario P, Morelli F, Pascale W, Tomasoni L, Turiel M. (2009) Asymmetric dimethylarginine (ADMA): an endogenous inhibitor of nitric oxide synthase and a novel cardiovascular risk molecule. *Med Sci Monit.* 15(4):RA91-101. PMID: 19333216.
- 35 Devlin RB, Duncan KE, Jardim M, Schmitt MT, Rappold AG, Diaz-Sanchez D. (2012) Controlled exposure of healthy young volunteers to ozone causes cardiovascular effects. *Circulation*, 126(1),104-11. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.112.094359.
- 36 Díaz, A. (2016). Factores de riesgo cardiovascular y disfunción endotelial en adultos que viven a gran altura. *Acta Médica Peruana*, 33(4), 289-295. http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1728-59172016000400005&lng=es&tlng=es.
- 37 DOF-Diario Oficial de la Federación (2014) Norma Oficial Mexicana NOM-020-SSA1-2014. Salud ambiental. Valor límite permisible para la concentración de ozono (O3) en el aire ambiente y criterios para su evaluación.http://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5356801&fecha=19/08/2014#:~:text=NORMA%20Oficial%20Mexicana%20NOM%2D020,y%20criterios%20para%20su%20evaluaci%C3%B3n.
- 38 DOF-Diario Oficial de la Federación (2021) Norma Oficial Mexicana NOM-020-SSA1-2021, Salud ambiental. Criterio para evaluar la calidad del aire ambiente, con respecto al ozono (O3). Valores normados para la concentración de ozono

(O₃) en el aire ambiente, como medida de protección a la salud de la población.
https://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5633956&fecha=28/10/2021#gsc.tab=0

- 39 Dowsett, L., Higgins, E., Alanazi, S., Alshuwayer, N. A., Leiper, F. C., & Leiper, J. (2020). ADMA: A Key Player in the Relationship between Vascular Dysfunction and Inflammation in Atherosclerosis. *Journal of Clinical Medicine*, 9(9), 3026. doi:10.3390/jcm9093026
- 40 Echeverri Londoño, C. A. (2019). *Contaminación atmosférica*. Ediciones de la U. <https://www-ebooks7-24-com.pbidi.unam.mx:2443/?il=8839>
- 41 Elms, S., Chen, F., Wang, Y., Qian, J., Askari, B., Yu, Y., ... Fulton, D. J. R. (2013). Insights into the arginine paradox: evidence against the importance of subcellular location of arginase and eNOS. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 305(5), H651–H666. doi:10.1152/ajpheart.00755.2012
- 42 Erdélyi-Bótor, S., Komáromy, H., Kamson, D. O., Kovács, N., Perlaki, G., Orsi, G., ... Pfund, Z. (2016). Serum L-arginine and dimethylarginine levels in migraine patients with brain white matter lesions. *Cephalalgia*, 37(6), 571–580. doi:10.1177/0333102416651454
- 43 Flores N. (2013) Endotelina-1 Vasoconstrictor intrínseco del endotelio vascular. *Revista Med*, 21 (2): 64-78
<http://www.scielo.org.co/pdf/med/v21n2/v21n2a08.pdf>
- 44 Gil, F. (s.f.) *El papel de los biomarcadores en Toxicología Humana*.
<https://www.ugr.es/~fgil/biomarcadoresrevtoxicol.pdf>
- 45
- 46 Giustarini, D., Rossi, R., Milzani, A., & Dalle-Donne, I. (2008). Nitrite and Nitrate Measurement by Griess Reagent in Human Plasma: Evaluation of Interferences and Standardization. *Methods in Enzymology*, 361–380. doi:10.1016/s0076-6879(07)00823-3
- 47 Gobierno de México (GOB.MX) (2022) Se activa contingencia ambiental atmosférica por ozono en la Zona Metropolitana del Valle de México (ZMVM). Comisión ambiental de la megápolis.

<https://www.gob.mx/comisionambiental/prensa/se-activa-contingencia-ambiental-atmosferica-por-ozono-en-la-zona-metropolitana-del-valle-de-mexico-zmvm-302694>

- 48 Goodman J, Prueitt R, Sax S, Pizzurro D, Lynch H, Zu K, Venditti F. (2015) Ozone exposure and systemic biomarkers: Evaluation of evidence for adverse cardiovascular health impacts. *Crit Rev Toxicol*, 45(5): 412–452
- 49 Grover, P. K., & Ryall, R. L. (2005). Critical Appraisal of Salting-Out and Its Implications for Chemical and Biological Sciences. *Chemical Reviews*, 105(1), 1–10. doi:10.1021/cr030454p
- 50 Guillén, M. V. L. (2009). Estructura y propiedades de las proteínas. *Bioquímica Médica*, 5, 1-34.
- 51 Guo X, Su W, Wang H, Li N, Song Q, Liang Q, Sun C, Liang M, Zhou Z, Song EJ, Sun Y. (2022) Short-term exposure to ambient ozone and cardiovascular mortality in China: a systematic review and meta-analysis. *Int J Environ Health Res*, 1-18. doi: 10.1080/09603123.2022.2066070
- 52 Hanafy KA, Krumenacker JS, Murad F. (2001) NO, nitrotyrosine, and cyclic GMP in signal transduction, *Med Sci Monit*, 7(4):801-19. PMID: 11433215.
- 53 Henrotin J, Zeller M, Lorgis L, et al. (2010) Evidence of the role of short-term exposure to ozone on ischaemic cerebral and cardiac events: the Dijon Vascular Project (DIVA) *Heart*, 96:1990-1996. <http://dx.doi.org/10.1136/hrt.2010.200337>
- 54 Henrotin JB, Besancenot JP, Bejot Y, et al. (2007) Short-term effects of ozone air pollution on ischaemic stroke occurrence: a case-crossover analysis from a 10-year population-based study in Dijon, France. *Occupational and Environmental Medicine*, 64:439-445. <http://dx.doi.org/10.1136/oem.2006.029306>
- 55 Hernández, Y. (2016). Aterosclerosis y sistema aterométrico. *Revista Cubana de Medicina Militar*, 45(2), 183-194. http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0138-65572016000200007&lng=es&tlng=pt.
- 56 Hernández-Cadena L, Téllez-Rojo MM, Sanín-Aguirre LH, Lacasaña-Navarro M, Campos A, Romieu I. (2000) Relationship between emergency consultations for

- respiratory diseases and air pollution in Juarez City, Chihuahua. *Salud Publica Mex*, 42(4):288-97. PMID: 11026070.
- 57 Hess, S., Baker, G., Gyenes, G., Tsuyuki, R., Newman, S., & Le Melledo, J.-M. (2017). Decreased serum L-arginine and L-citrulline levels in major depression. *Psychopharmacology*, 234(21), 3241–3247. doi:10.1007/s00213-017-4712-8
- 58 Hong, S.-K. S., Maltz, B. E., Coburn, L. A., Slaughter, J. C., Chaturvedi, R., Schwartz, D. A., & Wilson, K. T. (2010). Increased serum levels of L-arginine in ulcerative colitis and correlation with disease severity. *Inflammatory Bowel Diseases*, 16(1), 105–111. doi:10.1002/ibd.21035
- 59 Hu, X., He, L., Zhang, J., Qiu, X., Zhang, Y., Mo, J., ... Gong, J. (2020). Inflammatory and oxidative stress responses of healthy adults to changes in personal air pollutant exposure. *Environmental Pollution*, 263, 114503. doi:10.1016/j.envpol.2020.114503.
- 60 INEGI (2023) Estadística de defunciones registradas de enero a junio del 2022(preliminar).<https://www.inegi.org.mx/contenidos/saladeprensa/boletines/2023/DR/DR-Ene-jun2022.pdf>
- 61 Isola G, Alibrandi A, Currò M, Matarese M, Ricca S, Matarese G, Ientile R, Kocher T. (2020) Evaluation of salivary and serum ADMA levels in patients with periodontal and cardiovascular disease as subclinical marker of cardiovascular risk. *J Periodontol*. doi: 10.1002/JPER.19-0446
- 62 Jacob, D. (2000). Heterogeneous chemistry and tropospheric ozone. *Atmospheric Environment*, 34(12-14), 2131–2159. doi:10.1016/s1352-2310(99)00462-8
- 63 Kapil, V., Khambata, R. S., Jones, D. A., Rathod, K., Primus, C., Massimo, G., ... Ahluwalia, A. (2020). The Noncanonical Pathway for In Vivo Nitric Oxide Generation: The Nitrate-Nitrite-Nitric Oxide Pathway. *Pharmacological Reviews*, 72(3), 692–766. doi:10.1124/pr.120.019240
- 64 Khalaf D, Krüger M, Wehland M, Infanger M, Grimm D.(2019) The Effects of Oral L-Arginine and L-Citrulline Supplementation on Blood Pressure. *Nutrients*., 11(7):1679. <https://doi.org/10.3390/nu11071679>

- 65 Khosravi, M., Poursaleh, A., Ghasempour, G., Farhad, S., & Najafi, M. (2018). The effects of oxidative stress on the development of atherosclerosis. *Biological Chemistry*, 0(0). doi:10.1515/hsz-2018-0397
- 66 Kodavanti UP, Thomas R, Ledbetter AD, Schladweiler MC, Shannahan JH, Wallenborn JG, Lund AK, Campen MJ, Butler EO, Gottipolu RR, Nyska A, Richards JE, Andrews D, Jaskot RH, McKee J, Kotha SR, Patel RB, Parinandi NL. (2011) Vascular and cardiac impairments in rats inhaling ozone and diesel exhaust particles. *Environ Health Perspect*,119(3),312-8. doi: 10.1289/ehp.1002386.
- 67 Kohl, T. O., & Ascoli, C. A. (2017). Direct Competitive Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). *Cold Spring Harbor Protocols*,2017 (7), *pdb.prot093740*. doi:10.1101/pdb.prot093740
- 68 Konukoglu, D., & Uzun, H. (2016). Endothelial Dysfunction and Hypertension. *Hypertension: From Basic Research to Clinical Practice*, 511–540. doi:10.1007/5584_2016_90
- 69 Kumarathasan, P., Blais, E., Saravanamuthu, A. *et al.*(2015) Nitrate stress, oxidative stress and plasma endothelin levels after inhalation of particulate matter and ozone. *Part Fibre Toxicol* **12**, 28 . <https://doi.org/10.1186/s12989-015-0103-7>
- 70 Lahoz, C., & Mostaza, J. M. (2007). *La Aterosclerosis como enfermedad sistémica*. *Revista Española de Cardiología*, 60(2), 184–195. doi:10.1157/13099465
- 71 Landmesser, U. (2004). Endothelial Function: A Critical Determinant in Atherosclerosis? *Circulation*, 109(21_suppl_1), II-27–II-33.
- 72 Li W, Dorans KS, Wilker EH, Rice MB, Ljungman PL, Schwartz JD, Coull BA, Koutrakis P, Gold DR, Keaney JF Jr, Vasan RS, Benjamin EJ, Mittleman MA. (2019) Short-term exposure to ambient air pollution and circulating biomarkers of endothelial cell activation: The Framingham Heart Study. *Environ Res*. 171:36-43. doi: 10.1016/j.envres.2018.10.027. Epub 2018 Oct 28. PMID: 30654247
- 73 Li, H., Zhou, L., Wang, C., Chen, R., Ma, X., Xu, B., ... Kan, H. (2017). Associations Between Air Quality Changes and Biomarkers of Systemic

- Inflammation During the 2014 Nanjing Youth Olympics: A Quasi-Experimental Study. *American Journal of Epidemiology*, 185(12), 1290–1296. doi:10.1093/aje/kww209
- 74 Li, K., Jacob, D. J., Liao, H., Shen, L., Zhang, Q., & Bates, K. H. (2018). Anthropogenic drivers of 2013–2017 trends in summer surface ozone in China. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 201812168. doi:10.1073/pnas.1812168116
- 75 Li, W., Dorans, K. S., Wilker, E. H., Rice, M. B., Ljungman, P. L., Schwartz, J. D., ... Mittleman, M. A. (2017a). Short-Term Exposure to Ambient Air Pollution and Biomarkers of Systemic Inflammation. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 37(9), 1793–1800. doi:10.1161/atvbaha.117.309799
- 76 Li, W., Dorans, K. S., Wilker, E. H., Rice, M. B., Ljungman, P. L., Schwartz, J. D., ... Mittleman, M. A. (2018). Short-term Exposure to Ambient Air Pollution and Circulating Biomarkers of Endothelial Cell Activation: The Framingham Heart Study. *Environmental Research*, 171, 36–43 doi:10.1016/j.envres.2018.10.027
- 77 Mammedova JT, Sokolov AV, Freidlin IS, Starikova EA. (2021) The Mechanisms of L-Arginine Metabolism Disorder in Endothelial Cells. *Biochemistry (Mosc)*, 86(2):146-155. doi: 10.1134/S0006297921020036. PMID: 33832413.
- 78 Manzur F., Alvear C., Alayón N. (2011) Papel de la proteína C reactiva en las enfermedades cardiovasculares, *Revista Colombiana de Cardiología*, 18 (5), 273-278. http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-56332011000500006&lng=en&tlng=es
- 79 Martens-Lobenhoffer, J., & Bode-Böger, S. M. (2014). Mass spectrometric quantification of L-arginine and its pathway related substances in biofluids: The road to maturity. *Journal of Chromatography B*, 964, 89–102. doi:10.1016/j.jchromb.2013.10.030
- 80 Melaku, L., Dabi, A. (2021) The cellular biology of atherosclerosis with atherosclerotic lesion classification and biomarkers. *Bull Natl Res Cent*, 45, 22. <https://doi.org/10.1186/s42269-021-00685-w>
- 81 Mirowsky, J.E., Carraway, M.S., Dhingra, R. Tong, H. Neas, L. Díaz-Sánchez, D. Cascio, W. Case, M. Cooks, J. Hauser, E.R. Dowdy, Z.E. Kraus, W.

- Devlin,R. (2017) Ozone exposure is associated with acute changes in inflammation, fibrinolysis, and endothelial cell function in coronary artery disease patients. *Environ Health* **16**, 126. <https://doi.org/10.1186/s12940-017-0335-0>
- 82 Mudau, M., Genis, A., Lochner, A., & Strijdom, H. (2012). Endothelial dysfunction: the early predictor of atherosclerosis. *Cardiovascular Journal of Africa*, *23*(4), 222–231. doi:10.5830/cvja-2011-068
- 83 Münzel, T., Gori, T., Al-Kindi, S., Deanfield, J., Lelieveld, J., Daiber, A., & Rajagopalan, S. (2018). Effects of gaseous and solid constituents of air pollution on endothelial function. *European Heart Journal*. doi:10.1093/eurheartj/ehy481
- 84 Nezu, T., Hosomi, N., Aoki, S., & Matsumoto, M. (2016). Carotid Intima-Media Thickness for Atherosclerosis. *Journal of Atherosclerosis and Thrombosis*, *23*(1), 18–31. doi:10.5551/jat.31989
- 85 Ni, Y., Tracy, R. P., Cornell, E., Kaufman, J. D., Szpiro, A. A., Campen, M. J., & Vedal, S. (2021). Short-term exposure to air pollution and biomarkers of cardiovascular effect: A repeated measures study. *Environmental Pollution*, *279*, 116893. doi:10.1016/j.envpol.2021.116893
- 86 Niu Y, Zhou Y, Chen R, Yin P, Meng X, Wang W, Liu C, Ji JS, Qiu Y, Kan H, Zhou M. (2022) Long-term exposure to ozone and cardiovascular mortality in China: a nationwide cohort study. *Lancet Planet Health*, *6*(6):e496-e503. doi: 10.1016/S2542-5196(22)00093-6. PMID: 35709807.
- 87 Nuvolone, D., Petri, D., & Voller, F. (2017). The effects of ozone on human health. *Environmental Science and Pollution Research*, *25*(9), 8074–8088. doi:10.1007/s11356-017-9239-3
- 88 Organización Mundial de la Salud (OMS) (2021b) Directrices mundial de la OMS sobre calidad del aire <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/346062/9789240035461-spa.pdf?sequence=1&isAllowed=y#:~:text=Desde%201987%2C%20la%20OMS%20publica,directrices%20se%20publicaron%20en%202006>.
- 89 Orru H, Ebi KL, Forsberg B (2017) The Interplay of Climate Change and Air Pollution on Health. *Curr Environ Health*, *4*(4):504-513. doi: 10.1007/s40572-017-0168-6.

- 90 Perepu RS, Dostal DE, Garcia C, Kennedy RH, Sethi R. (2012) Cardiac dysfunction subsequent to chronic ozone exposure in rats, *Mol Cell Bioche*,360(1-2):339-45. doi: 10.1007/s11010-011-1073-1.
- 91 Perepu, R. S. P., Garcia, C., Dostal, D., & Sethi, R. (2009). Enhanced death signaling in ozone-exposed ischemic-reperfused hearts. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 336(1-2), 55–64. doi:10.1007/s11010-009-0265-4
- 92 Perepu, R. S. P., Garcia, C., Dostal, D., & Sethi, R. (2010). Enhanced death signaling in ozone-exposed ischemic-reperfused hearts. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 336(1-2), 55–64. doi:10.1007/s11010-009-0265-4
- 93 Posadas R, Vargas G, Cardenas A, Texcalac J.L., Osorio C, Sánchez M.(2022) Long-Term Exposure to Ozone and Fine Particulate Matter and Risk of Premature Coronary Artery Disease: Results from Genetics of Atherosclerotic Disease Mexican Study. *Biology*, 11, 1122. <https://doi.org/10.3390/biology11081122>
- 94 Poursafa P, Kelishadi R, Lahijanzadeh A, Modaresi M, Javanmard SH, Assari R, Amin MM, Moattar F, Amini A, Sadeghian B. (2011) The relationship of air pollution and surrogate markers of endothelial dysfunction in a population-based sample of children. *BMC Public Health*, 11:115. doi: 10.1186/1471-2458-11-115. PMID: 21332998
- 95 Prieto, D. (2019) Especies reactivas de oxígeno: papel en la función vascular y en la disfunción endotelial asociada a la enfermedad metabólica. *Real Academia Nacional de Farmacia*,85(4) ,288-300.
- 96 Pruneda-Alvarez, L. G., Ruíz-Vera, T., Ochoa-Martínez, A. C., Pérez-Vázquez, F. J., González Palomo, A. K., Ilizaliturri-Hernández, C. A., & Pérez-Maldonado, I. N. (2016). Plasma asymmetric dimethylarginine (ADMA) levels in Mexican women exposed to polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs): A preliminary study. *Science of The Total Environment*, 572, 1195–1202. doi:10.1016/j.scitotenv.2016.08.037
- 97 Prunicki, M., Cauwenberghs, N., Ataam, J.A. *et al.* (2020) Immune biomarkers link air pollution exposure to blood pressure in adolescents. *Environ Health* **19**, 108 . <https://doi.org/10.1186/s12940-020-00662-2>

- 98 R&DSsystems. Total Nitric Oxide and Nitrate/Nitrite Parameter Assay Kit. https://www.rndsystems.com/products/total-nitric-oxide-and-nitrate-nitrite-parameter-assay-kit_kqe001
- 99 Ramos, T., & Toledo, JR. (2020) LOX-1 en afecciones cardiovasculares, perspectivas terapéuticas futuras. *Bionatura*, 5(2),1156-1161. doi: 10.21931/RB/2020.05.02.14
- 100 Rodrigues-Krause, J., Krause, M., Rocha, I., Umpierre, D., & Fayh, A. (2018). Association of L-Arginine Supplementation with Markers of Endothelial Function in Patients with Cardiovascular or Metabolic Disorders: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Nutrients*, 11(1), 15. doi:10.3390/nu11010015
- 101 Romieu I, Gouveia N, Cifuentes LA, de Leon AP, Junger W, Vera J, Strappa V, Hurtado-Díaz M, Miranda-Soberanis V, Rojas-Bracho L, Carbajal-Arroyo L, Tzintzun-Cervantes G; HEI Health Review Committee. (2012) Multicity study of air pollution and mortality in Latin America (the ESCALA study). *Res Rep Health Eff Inst.*171, 5-86. PMID: 23311234.
- 102 Roth GA, Mensah GA, Johnson CO, Addolorato G, Ammirati E, Baddour LM, Barengo NC, Beaton AZ, Benjamin EJ, Benziger CP, Bonny A, Brauer M, Brodmann M, Cahill TJ, Carapetis J, Catapano AL, Chugh SS, Cooper LT, Coresh J, Criqui M, DeCleene N, Eagle KA, Emmons-Bell S, Feigin VL, Fernández-Solà J, Fowkes G, Gakidou E, Grundy SM, He FJ, Howard G, Hu F, Inker L, Karthikeyan G, Kassebaum N, Koroshetz W, Lavie C, Lloyd-Jones D, Lu HS, Mirijello A, Temesgen AM, Mokdad A, Moran AE, Muntner P, Narula J, Neal B, Ntsekhe M, Moraes de Oliveira G, Otto C, Owolabi M, Pratt M, Rajagopalan S, Reitsma M, Ribeiro ALP, Rigotti N, Rodgers A, Sable C, Shakil S, Sliwa-Hahnle K, Stark B, Sundström J, Timpel P, Tleyjeh IM, Valgimigli M, Vos T, Whelton PK, Yacoub M, Zuhlke L, Murray C, Fuster V. (2020) GBD-NHLBI-JACC Global Burden of Cardiovascular Diseases Writing Group. Global Burden of Cardiovascular Diseases and Risk Factors, 1990-2019: Update From the GBD 2019 Study. *J Am Coll Cardiol*, 76(25):2982-3021. doi: 10.1016/j.jacc.2020.11.010.

- 103 Rückerl, R., Greven, S., Ljungman, P., Aalto, P., Antoniades, C., Bellander, T., ... Peters, A. (2007). Air Pollution and Inflammation (Interleukin-6, C-Reactive Protein, Fibrinogen) in Myocardial Infarction Survivors. *Environmental Health Perspectives*, 115(7), 1072–1080. doi:10.1289/ehp.10021
- 104 Sánchez-González, D. J., Moro, M. A., Castillo-Henkel, C., Herrera-González, N., Hernández-Pando, R., Larios-Medina, F. J., ... Villanueva, C. (2004). Ozone exposure induces iNOS expression and tyrosine nitration in rat aorta. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 17(1), 1–7. doi:10.1016/j.etap.2004.01.002
- 105 Sarre D, Cabrera R, Rodríguez F, Díaz E. (2018). Enfermedad cardiovascular aterosclerótica. Revisión de las escalas de riesgo y edad cardiovascular. *Medicina interna de México*, 34(6), 910-923. <https://doi.org/10.24245/mim.v34i6.2136>
- 106 Schaftenaar, F., Frodermann, V., Kuiper, J. y Lutgens, E. (2016). Atherosclerosis: the interplay between lipids and immune cells. *Current Opinion in Lipidology*, 27(3), 209–215. doi:10.1097/mol.0000000000000302
- 107 Seigneur, C. (2019). Air Pollution: Concepts, Theory, and Applications. Cambridge: Cambridge University Press.146-189 doi:10.1017/9781108674614
- 108 SEMARNAT. Informe del medio ambiente. Sistema Nacional de Información Ambiental y Recursos Naturales. Informe del medio ambiente. <https://apps1.semarnat.gob.mx:8443/dgeia/informe18/tema/cap5.html>
- 109 Serrani Azcurra, D. (2010). Marcadores precoces de disfunción endotelial en trastorno de estrés postraumático. *Rol en la aterogénesis. Revista de Psiquiatría y Salud Mental*, 3(4), 128–136. doi:10.1016/j.rpsm.2010.09.004
- 110 Sethi, R., Manchanda, S., Perepu, R. S. P., Kumar, A., Garcia, C., Kennedy, R. H., ... Dostal, D. (2012). Differential expression of caveolin-1 and caveolin-3: potential marker for cardiac toxicity subsequent to chronic ozone inhalation. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 369(1-2), 9–15. doi:10.1007/s11010-012-1363-2
- 111 Shahrbafe MA, Akbarzadeh MA, Tabary M, Khaheshi I. Air Pollution and Cardiac Arrhythmias: A Comprehensive (2021) Air Pollution and Cardiac

- Arrhythmia, *Curr Probl Cardiol*, 46(3):100649. doi: 10.1016/j.cpcardiol.2020.100649.
- 112 Sillman, S., & Samson, P. J. (1995). Impact of temperature on oxidant photochemistry in urban, polluted rural and remote environments. *Journal of Geophysical Research*, 100(D6), 11497. doi:10.1029/94jd02146
- 113 Sonmez A, Celebi G, Erdem G, Tapan S, Genc H, Tasci I, Ercin CN, Dogru T, Kilic S, Uckaya G, Yilmaz MI, Erbil MK, Kutlu M. (2010) Plasma apelin and ADMA Levels in patients with essential hypertension. *Clin Exp Hypertens*, 32(3):179-83. doi: 10.3109/10641960903254505
- 114 Srebot, V., Gianicolo, EA, Rainaldi, G. et al., Ozono y daño cardiovascular. *Ultrasonido Cardiovascular* 7, 30 (2009). <https://doi.org/10.1186/1476-7120-7-30>
- 115 Stiegel MA, Pleil JD, Sobus JR, Madden MC. Inflammatory Cytokines and White Blood Cell Counts Response to Environmental Levels of Diesel Exhaust and Ozone Inhalation Exposures. *PLoS One*. 2016 Apr 8;11(4):e0152458. doi: 10.1371/journal.pone.0152458
- 116 Swanson, W., V. Sjaastad F., S. Griffith, T. (s.f.) Ensayos ELISA: Indirecto, Sándwich y Competitivo. JOVE. <https://www.jove.com/es/v/10496/elisa-assays-indirect-sandwich-and-competitive?language=Spanish>
- 117 Teerlink T, Luo Z, Palm F, Wilcox CS. (2009) Cellular ADMA: regulation and action. *Pharmacol Res*, 60(6):448-60. doi: 10.1016/j.phrs.2009.08.002. PMID: 19682580; PMCID: PMC2767414
- 118 Téllez J, Rodríguez A, Fajardo A. (2006) Carbon monoxide contamination: an environmental health problem. *Rev Salud Publica*, 8(1):108-17. doi: 10.1590/s0124-00642006000100010. PMID: 16703967.
- 119 Thompson, A. M. S., Zanobetti, A., Silverman, F., Schwartz, J., Coull, B., Urch, B., ... Gold, D. R. (2010). Baseline Repeated Measures from Controlled Human Exposure Studies: Associations between Ambient Air Pollution Exposure and the Systemic Inflammatory Biomarkers IL-6 and Fibrinogen, *Environmental Health Perspectives*, 118(1), 120-124 doi:10.1289/ehp.0900550

- 120 Thomson E, Kumarathasan P, Vincent R. (2006) Pulmonary expression of preproET-1 and preproET-3 mRNAs is altered reciprocally in rats after inhalation of air pollutants. *Exp Biol Med (Maywood)*,231(6):979-84. PMID: 16741034.
- 121 Thomson, E., Kumarathasan, P., Goegan, P., Aubin, R. A., & Vincent, R. (2005). Differential Regulation of the Lung Endothelin System by Urban Particulate Matter and Ozone. *Toxicological Sciences*, 88(1), 103–113. doi:10.1093/toxsci/kfi272
- 122 Tiotiu AI, Novakova P, Nedeva D, Chong-Neto HJ, Novakova S, Steiropoulos P, Kowal K. (2020) Impact of Air Pollution on Asthma Outcomes, *Int J Environ Res Public Health*, 17(17):6212. doi: 10.3390/ijerph17176212.
- 123 Toth, PP (2021). Epidemiología y factores de riesgo de las enfermedades cardiovasculares: conceptos generales. En: Cicero, AF, Rizzo, M. (eds) *Nutraceuticals and Cardiovascular Disease. Cardiología Contemporánea. Humana, Cham.* https://doi-org.pbidi.unam.mx:2443/10.1007/978-3-030-62632-7_1
- 124 Tsikas, D. (2005). Review Methods of quantitative analysis of the nitric oxide metabolites nitrite and nitrate in human biological fluids. *Free Radical Research*, 39(8), 797–815. doi:10.1080/10715760500053651
- 125 Tsikas, D. (2007). Analysis of nitrite and nitrate in biological fluids by assays based on the Griess reaction: Appraisal of the Griess reaction in the L-arginine/nitric oxide area of research. *Journal of Chromatography B*, 851(1-2), 51–70. doi:10.1016/j.jchromb.2006.07.054
- 126 U.S. EPA. (2020).Integrated Science Assessment (ISA) for Ozone and Related Photochemical Oxidants 4-808, Washington, DC, U.S. Environmental Protection Agency, EPA/600/R-20/012, 2020.
- 127 Urch, B., Speck, M., Corey, P., Wasserstein, D., Manno, M., Lukic, K. Z., ... Silverman, F. (2010). Concentrated ambient fine particles and not ozone induce a systemic interleukin-6 response in humans. *Inhalation Toxicology*, 22(3), 210–218. doi:10.3109/08958370903173666

- 128 Wang, G., Jiang, R., Zhao, Z., & Song, W. (2013). Effects of ozone and fine particulate matter (PM_{2.5}) on rat system inflammation and cardiac function. *Toxicology Letters*, *217*(1), 23–33. doi:10.1016/j.toxlet.2012.11.009
- 129 Wang, J. C., & Bennett, M. (2012). Aging and Atherosclerosis: Mechanisms, Functional Consequences, and Potential Therapeutics for Cellular Senescence. *Circulation Research*, *111*(2), 245–259. doi:10.1161/circresaha.111.26138
- 130 White WH. (2009) Considerations in the use of ozone and PM (2.5) data for exposure assessment. *Air Qual Atmos Health*, *2*(4):223-230. doi: 10.1007/s11869-009-0056-9.
- 131 Wiczór, R., Wiczór, A. M., Kulwas, A., & Rośc, D. (2020). ADMA (asymmetric dimethylarginine) and angiogenic potential in patients with type 2 diabetes and prediabetes. *Experimental Biology and Medicine*, *153537022095973*. doi:10.1177/1535370220959738
- 132 World Health Organization. (WHO) (2018) The global health observatory. Indicator 3.9.1: Mortality rate attributed to household and ambient air pollution (per 100 000 population, age standardized)[https://www.who.int/data/gho/data/indicators/indicator-details/GHO/ambient-and-household-air-pollution-attributable-death-rate-\(per-100-000-population-age-standardized\)](https://www.who.int/data/gho/data/indicators/indicator-details/GHO/ambient-and-household-air-pollution-attributable-death-rate-(per-100-000-population-age-standardized))
- 133 World Health Organization. (WHO) (2020) The top 10 causes of death. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death>
- 134 World Health Organization. (WHO) (2021a) Ambient (outdoor) air pollution. [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/ambient-\(outdoor\)-air-quality-and-health](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/ambient-(outdoor)-air-quality-and-health)
- 135 Xia, Y., Niu, Y., Cai, J., Lin, Z., Liu, C., Li, H., ... Kan, H. (2018). The effects of personal short-term exposure to ambient ozone on blood pressure and vascular endothelial function: a mechanistic study based on DNA methylation and metabolomics. *Environmental Science & Technology*, *52*, 12774–12782 doi:10.1021/acs.est.8b03044
- 136 Xu S, Ilyas I, Little PJ, Li H, Kamato D, Zheng X, Luo S, Li Z, Liu P, Han J, Harding IC, Ebong EE, Cameron SJ, Stewart AG, Weng J. (2021) Endothelial

- Dysfunction in Atherosclerotic Cardiovascular Diseases and Beyond: From Mechanism to Pharmacotherapies. *Pharmacol Rev.*;73(3):924-967. doi: 10.1124/pharmrev.120.000096. PMID: 34088867.
- 137 Zanolotti, A., & Schwartz, J. (2008). *Mortality Displacement in the Association of Ozone with Mortality. American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 177(2), 184–189. doi:10.1164/rccm.200706-823oc
- 138 Zhang J, Wei Y and Fang Z (2019) Ozone Pollution: A Major Health Hazard Worldwide. *Front. Immunol.* 10(2518):1-10.
- 139 Zhao, T., Markevych, I., Standl, M., Schikowski, T., Berdel, D., Koletzko, S., ... Heinrich, J. (2019). Short-term exposure to ambient ozone and inflammatory biomarkers in cross-sectional studies of children and adolescents: Results of the GINIplus and LISA birth cohorts. *Environmental Pollution*, 255, 113264. doi:10.1016/j.envpol.2019.113264