

Rev.MVZ Córdoba 18(Supl):3731-3737, 2013.

ORIGINAL

Actividad mutagénica y genotóxica del material particulado PM_{2.5} en Cúcuta, Colombia

Mutagenic and genotoxic activity of particulate matter PM_{2.5} from Cucuta, Colombia

Ricardo Beleño H,¹ Qco, Alfonso Quijano P,¹ Ph.D, Iván Meléndez G,^{2*} M.Sc.

Universidad de Pamplona. Facultad de Ciencias Básicas. Pamplona, Colombia, ¹Grupo de Investigación en Química. ²Grupo de Investigación en Biología Molecular. *Correspondencia: imgelvez@unipamplona.edu.co.

Recibido: Marzo de 2012; Aceptado: Febrero de 2013.

RESUMEN

Objetivo. Determinar la actividad mutagénica y genotóxica del material particulado PM_{2.5}, captado cerca de una vía de alto flujo vehicular en Cúcuta, Colombia. **Materiales y métodos.** Entre Enero-Julio de 2011, el PM_{2.5} fue monitoreado con un equipo Partisol 2025 Plus usando filtros de cuarzo Palmflex. La actividad mutagénica y genotóxica de los extractos del PM_{2.5} fue determinada usando dos ensayos: el test de Ames y el ensayo cometa. En el ensayo mutagénico se utilizó la cepa TA 100 de *Salmonella* Typhimurium. Para determinar el daño genotóxico se utilizaron linfocitos de sangre periférica. **Resultados.** Por primera vez en la región fronteriza de Colombia y Venezuela, se reporta la actividad mutagénica y genotóxica asociada con el PM_{2.5} de Cúcuta. Los resultados muestran actividad mutagénica en la cepa de *Salmonella* Typhimurium TA-100 y genotoxicidad en linfocitos humanos de sangre periférica. **Conclusiones.** En las muestras del material particulado PM_{2.5} de la ciudad de Cúcuta se encuentran compuestos que inducen mutaciones, así como compuestos que pueden penetrar hasta la célula e inducir daño en su ADN, lo que puede representar un riesgo en la manifestación de enfermedades tales como el cáncer en la población expuesta.

Palabras clave: Ensayo cometa, *Salmonella typhimurium*, Test de mutagenicidad (Fuente: MeSH).

ABSTRACT

Objective. To determine mutagenic and genotoxic activity of particulate matter PM_{2.5} collected in high vehicular traffic way of Cucuta, Colombia. **Materials and methods:** Between January to July of 2011, PM_{2.5} was monitored by a Partisol 2025 sequential air sampler by using Plus Palmflex quartz filters. The mutagenic and genotoxic activity from extract of PM_{2.5} was determinate by using two assays: the Ames test and comet assay. In the mutagenic assay we used the *Salmonella* Typhimurium strain TA-100. To determine the genotoxic damage peripheral blood lymphocytes were used. **Results:** This is the first study that has been conducted in border region of Colombia and Venezuela that reports the mutagenic and genotoxic activity associated with particulate matter PM_{2.5} from Cucuta. The result show mutagenic activity in the *Salmonella* Typhimurium strain TA-100 and genotoxicity in peripheral blood human lymphocytes. **Conclusions:** Samples of particulate matter PM_{2.5} from Cucuta city were found, compounds that induced mutation by base substitution were found, also compounds that can reach the cell nucleus and induced genotoxic damage in their ADN were found. This can represent a risk in the population exposed for manifestation for diseases such as cancer.

key words: Comet assay, mutagenicity test, *Salmonella typhimurium* (Source: MeSH).

INTRODUCCIÓN

Un requisito básico para la salud y el bienestar humano es respirar un aire limpio, la contaminación atmosférica es una amenaza significativa para la salud por la presencia en el aire de materias o formas de energía que implican riesgo, daño o molestia grave para las personas (1). Los contaminantes del aire generalmente se clasifican en partículas en suspensión-material particulado (PM), contaminantes gaseosos y olores. La contaminación ambiental del aire se debe a las actividades industriales y al tráfico vehicular. Diferentes estudios epidemiológicos sugieren que la contaminación ambiental del aire puede ser la responsable del incremento del cáncer pulmonar (2).

El material particulado (PM) está compuesto por una mezcla heterogénea de partículas de diferentes tamaños y composición química, algunas de las cuales se emiten directamente mientras que otras son productos de la oxidación de estas emisiones directas (3).

La principal fuente de PM en nuestras ciudades son los procesos de combustión, en los cuales se incluyen fundamentalmente las emisiones vehiculares (4). La exposición al material particulado (PM) ha sido asociado con numerosos efectos adversos a la salud (5) y varios estudios específicos relacionan la exposición del PM proveniente de los vehículos con muertes prematuras (6,7)

De acuerdo con su proceso de formación las partículas se pueden dividir en dos grupos: finas y gruesas. Las partículas finas son las de diámetro aerodinámico comprendido entre 10 μm (PM_{10}), 2.5 μm ($\text{PM}_{2.5}$) y 1 μm (PM_{1}), son de mayor peligrosidad al ser totalmente respirables y tienen la capacidad de penetrar y depositarse en la región traqueo bronquial y alveolar del tracto respiratorio (8), Estas partículas absorben sustancias orgánicas de alta toxicidad (9), que están implicadas en la aparición de enfermedades, incluyendo problemas respiratorios, cáncer, artritis reumatoide, ataque al corazón y el envejecimiento (10). Por lo tanto, las partículas finas en el aire se consideran más tóxicas que las partículas gruesas (PST mayores de 10 μm), ya que estas se depositan principalmente en las cavidades nasal y oral (11).

Varios estudios que evalúan la actividad mutagénica del PM atmosférico, concluyen que los componentes mutagénicos están localizados en la fracción de partículas de menor tamaño, entre 2.0-3.3 μm de diámetro (12), lo que constituye efectivamente un riesgo para la

salud. El impacto del PM en la salud, se debe a que las partículas finas (PM_{10} y $\text{PM}_{2.5}$) tienen la capacidad de inducir estrés oxidativo en las células a través de la producción de especies reactivas de oxígeno (13,14), de igual manera el material particulado podría inducir mutación a través de compuestos orgánicos tales como hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP), que son carcinógenos humanos reconocidos (15) o por la presencia de compuestos inorgánicos tales como sulfatos, nitratos y metales (16).

El PM proveniente del diesel ha sido clasificado como un contaminante atmosférico tóxico, debido a sus propiedades carcinogénicas y mutagénicas (17). Potencialmente puede causar problemas respiratorios, cardiovasculares e inducir a reacciones alérgicas (18-20). Además, está implicado en el incremento de la morbimortalidad según el grado de exposición ambiental (21). El PM proveniente de la gasolina es considerado un posible carcinógeno humano, ya que contiene componentes tóxicos como el benceno, 1,3 butadieno, y metil-ter-butil-éter (MTBE) (22). Es conocido que las fuentes móviles contribuyen significativamente al nivel de mutágenos en el aire (23). La presencia de mutágenos en el aire atribuida a las fuentes móviles es debida a la correlación positiva entre mutagenicidad indirecta y benzo [g, h, i] perileno, que es un indicador de HAP emitidos por los escapes de motores diesel y gasolina (22).

Las concentraciones de Pb, Zn, V, Cd en el aire, (24) están relacionadas con la mutagenicidad de acción directa de la materia orgánica particulada; estos metales son emitidos desde distintas fuentes como los automóviles, los calentadores de agua de las casas y otras fuentes de combustión.

El objetivo del presente estudio fue determinar la actividad mutagénica y genotóxica del material particulado $\text{PM}_{2.5}$, captado cerca de una vía de alto flujo vehicular en la ciudad de Cúcuta, Colombia.

MATERIALES Y MÉTODOS

Sitio de muestreo del $\text{PM}_{2.5}$. El monitoreo del PM fracción respirable $\text{PM}_{2.5}$ se realizó en la localidad de Cúcuta, Colombia en el período de enero-Julio del año 2011, con el equipo Partisol- 2025 Plus de la Ruprecht-Patashnik, que se ubica en la azotea del edificio del CREAD de la Universidad de Pamplona en la Diagonal Santander que es una zona céntrica, donde predomina un mayor flujo de vehículos de transporte público y particular, que utilizan como combustible el diesel y la

gasolina. Las muestras ambientales de PM_{2.5}, se recolectaron en un filtro Palmflex de microquarzo de 47 mm, en muestreos de 24 horas, con una frecuencia de tres días.

Tratamiento químico de los filtros. Extracción Soxhlet. La materia orgánica particulada presente en los filtros de PM_{2.5} fue extraída con una mezcla de Diclorometano (DM) (Mallinckrodt Chemicals) y Acetona al 99.8% (v/v), (RA Chemicals) (1:1, la extracción se realizó por 48 horas en ciclos de 13 minutos).

Extracción por ultrasonido. Se utilizó un baño ultrasónico (Branson 1510, modelo 1510R-MT). Los filtros provenientes del monitoreo del PM_{2.5} se colocaron en un vaso de precipitado con 20 ml de DM/Acetona 1:1 durante 10 minutos a temperatura de 23°C-24°C; seguidamente se hicieron dos repeticiones utilizando 15 ml por 10 minutos a 23°C-24°C.

Concentración de material orgánico. Una vez obtenido el extracto, se concentró en un evaporador rotatorio de vacío, marca Heidolph modelo Laborota 400-1, a una temperatura de 30°C a 150 rpm; hasta alcanzar un volumen aproximado de 2 ml. Posteriormente el extracto se transfirió a viales, se sellaron y se mantuvieron en refrigeración y en la oscuridad hasta su análisis.

Detección de la actividad mutagénica. El efecto mutagénico de los extractos del PM_{2.5} del aire de Cúcuta, se determinó por medio del test de Ames, usando el protocolo descrito por Maron y Ames (25). En esta prueba el indicativo de la mutación está dado por la reversión his^- a his^+ , las revertantes se identifican porque crecen en medio mínimo sin histidina. Se trabajó con una cepa de *Salmonella Typhimurium* cepa TA 100 en la cual se produce la reversión por sustitución de un par de bases. Con cada muestra se trataron 10^7 UFC, se utilizaron controles positivos y negativos. Para el control positivo se utilizó 4-nitroquinolina óxido (4-NQO). Como control negativo se usó DMSO al 12%. Se catalogó como respuesta positiva, los resultados que presentaron un incremento significativo de revertantes con relación al control negativo y este resultado fue reproducible. Para realizar los análisis mutagénicos y genotóxicos se evaluaron tres concentraciones de material particulado (50 µg, 100 µg y 150 µg). Para verificar la reproducibilidad de los resultados se realizaron tres experimentos independientes, cada uno por duplicado.

Detección del daño en el ADN. Para detectar ruptura del ADN se utilizó el Ensayo "COMETA" en microgel de una célula. Se siguió la metodología

propuesta por Singh et al en 1988 (26). Esta metodología consta de los siguientes pasos: Se tomaron 200 ml de suspensión de células (1×10^6 UFC) se incubaron con 50 ml de la concentración de PM a ensayar. Luego se extraen 10 ml y se mezclan con 75 ml de agarosa de bajo punto de fusión (LMA) al 0.5 % (p/v), esta suspensión se pipetea sobre portaobjetos previamente impregnados con agarosa de punto de fusión normal y se cubre con cubreobjetos. Los portaobjetos se conservan a 3°C por 6 min para favorecer la polimerización de (LMA), se retira la laminilla y se agregan 100 ml más de (LMA), se vuelve a conservar otros 6 minutos. Luego los portaobjetos se sumergen en solución de lisis fresca (2.5 M NaCl, 100 mM Na EDTA, 10 mM Tris, 10% (p/v) DMSO, 1% (p/v) Sarcocinato de Na, 1% (v/v) Tritón X-100) a pH 10. Se deja en nevera a 3°C mínimo durante 1 hora. Después de la lisis, los portaobjetos son lavados y colocados en una cámara de electroforesis horizontal con tampón alcalino de electroforesis (pH 13) durante 30 minutos, luego se realizó la electroforesis a 25 V, 300 mA durante 30 min.

Los portaobjetos se tiñen con Bromuro de Etidio y se observan en Microscopio de Fluorescencia con un aumento de 400X. Se cuentan 50 células por placa. La ocurrencia de daño en el ADN se basó en la longitud de la cola del cometa, inducida por la ruptura del ADN. Se determinó que el daño basal fue de 41 µm que es la longitud total producida por otros factores diferentes al tratamiento. Se establecieron categorías de daño para mostrar que el daño no se distribuye uniformemente en todas las células, lo cual puede ser una ventaja, debido a que la exposición no necesariamente afecta a todas las células, disminuyendo así el riesgo. Los rangos establecidos fueron los siguientes: de 0 a 41 µm, tipo de daño 0= no daño; de 42 a 83 µm, tipo de daño 1= daño bajo; de 84 a 125 µm, tipo de daño 2= daño medio y mayor a 126 µm, tipo de daño 3 = daño alto. Las células usadas fueron linfocitos humanos de sangre periférica, que fueron obtenidas de un voluntario joven (25 años), a saber saludable, no fumador, sin ningún tipo de tratamiento clínico, no deportista de alto rendimiento. Para medir reproducibilidad de los resultados se hicieron cuatro experimentos por cada tratamiento y en cada uno se contaron 100 células. Como control positivo se utilizó el peróxido de hidrógeno 25mM y como control negativo dimetil sulfósido (DMSO 1% (p/v)), que es el disolvente de las muestras.

Análisis estadístico. Se determinó la homogeneidad de varianzas usando la prueba de Levene. Si el comportamiento de los datos era paramétrico, se aplicaba el Análisis de varianza (ANOVA). Si los datos no eran paramétricos

se utilizaron las pruebas de Mann-Whitney y Wilcoxon. Se utilizó la prueba de Dunnett para determinar el nivel de significancia entre el tratamiento y control, así como la prueba de Tukey para comparaciones múltiples. Los valores se expresaron como la media, la desviación estándar ($X \pm DS$) y las pruebas se consideraron significativas ($p \leq 0.05$).

RESULTADOS

Rendimiento de las extracciones de los filtros de $PM_{2.5}$ obtenido por ultrasonido y Soxhlet respectivamente. Los valores de los porcentajes de rendimiento de los extractos de material particulado $PM_{2.5}$, fueron establecidos de acuerdo al peso en gramos que contenía cada uno de los filtros antes y después de la extracción. La extracción por medio de destilación Soxhlet produjo un porcentaje de 61%. Al trabajar por ultrasonido, los rangos de extracción oscilaron entre 96 y 98%.

A partir de los datos registrados en la tabla 1, se halló la Razón de Mutagenicidad (RM) que es igual a RI/RE, donde RI = revertantes inducidos por el tratamiento y RE = revertantes espontáneos. La razón de mutagenicidad es el número de veces que la respuesta del tratamiento supera el control negativo.

La tabla 1 y la figura 1, muestran que las dosis de 50, 100 y 150 μg inducen una actividad mutagénica dependiente de la concentración, siendo altamente significativo con respecto al control negativo ($p \leq 0.05$) para las dosis de 100 y 150 μg .

Esta respuesta se origina por mutágenos que causan mutación por sustitución de bases, dentro de los cuales se encuentran los HPA

Tabla 1. Mutagenicidad y razón de mutagenicidad (RM) de diferentes dosis del $PM_{2.5}$ del aire de Cúcuta, analizados con la cepa TA-100 de *Salmonella Typhimurium*.

Dosis μg / caja	Promedio de revertantes / tratamiento	RM
Control negativo	112 \pm 10	0
50	120 \pm 13	1.1
100	179 \pm 8	1.6
150	299 \pm 16	2.7
Control positivo	384 \pm 20	3.4

Cada valor corresponde al promedio de tres experimentos independientes. Como control negativo se usó DMSO 12% (p/v) y como control positivo se usó 4-NQO. La razón de mutagenicidad.

RM: es el número de veces que la respuesta del tratamiento supera el control negativo.

Se utilizaron las pruebas de Mann-Whitney y Wilcoxon. Los valores se expresan como la media \pm la desviación estándar ($X \pm DS$) y las pruebas se consideraron significativas con una $p \leq 0.05$.

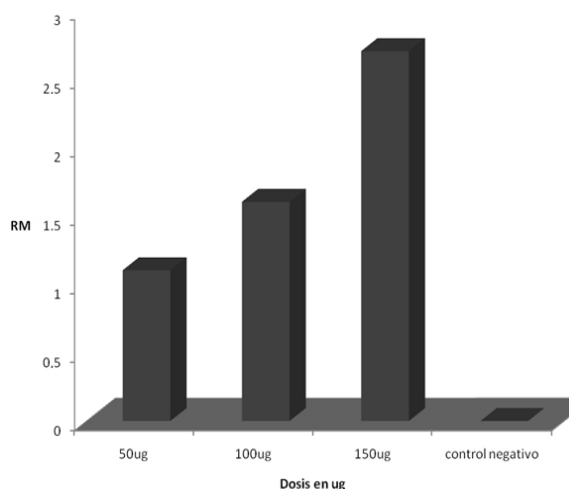


Figura 1. Mutagenicidad en *Salmonella Typhimurium* (cepa TA-100) en ausencia de S-9 del extracto de material particulado $PM_{2.5}$ obtenido en la ciudad de Cúcuta Norte de Santander. Las dosis se calcularon de acuerdo al peso del material particulado recuperado del filtro.

nitrogenados, derivados nitroso aromáticos y varios agentes carcinógenos amino, que son considerados la fuente principal de la actividad mutagénica directa (7,15,27). De acuerdo con las razones de mutagenicidad en las dosis de 100 y 150 μg ensayadas en la cepa TA-100, se aprecia que la razón de mutagenicidad fue moderada y alta superando 1.6 y 2.7 veces a la mostrada por el control negativo, por lo que se consideró una respuesta mutagénica positiva, e indica con base en las condiciones de la prueba, que las muestras del material particulado de $PM_{2.5}$ del aire de Cúcuta inducen reversión de la mutación por sustitución de bases.

Mediante el ensayo cometa se analizó el daño inducido en el ADN por extractos del material particulado $PM_{2.5}$ de la ciudad de Cúcuta a un total de 200 células por tratamiento en tres experimentos independientes. El indicativo del daño genotóxico en cada célula es la ruptura de su ADN, la cual se manifiesta como un cometa, de tal manera que a mayor daño, la longitud de la cola del cometa será mayor. Para mostrar que el daño en el ADN en las células, es debido al tratamiento y no a factores que conducen a la muerte celular, se determinó la viabilidad celular después del tratamiento y se encontró que siempre ésta se mantenía por encima del 90%. Como se puede observar en la tabla 2 y en la figura 2, las células que muestran daño espontáneo, no superan una longitud de cola de 41 μm y la mayoría de células (97.5%) están en el rango 0, mostrando que la mayoría de células no tiene daño o muestran algo de daño, pero muy bajo, solamente el 2.5% de las células mostraron

daño tipo 1 y ninguna de las células mostraron daño 2 ó 3. De igual manera con la dosis de 50 µg de PM_{2.5} se pudo observar que el 72.5% de las células tienen daño tipo 1, 13% daño tipo 2 y 5.5% daño tipo 3.

Tabla 2. Genotoxicidad (expresada en longitud de cola, µm) de tres experimentos independientes, en linfocitos humanos, expuestos a diferentes dosis material particulado fracción respirable PM_{2.5} de la ciudad de Cúcuta.

Tratamiento	Promedio ± DS	Tipo de daño				% de células dañadas	% de Viabilidad
		0	1	2	3		
DMSO 1%	41 ± 12	195	5	0	0	15	95
H ₂ O ₂ 25mM	164 ± 21	10	60	80	105	95	90
50 µg	90 ± 11	22	145	26	11	89	93
100 µg	110 ± 17	15	56	113	16	92.5	92
150 µg	157 ± 21	0	10	24	166	100	94

Todos los valores provienen de 200 datos, obtenidos de tres experimentos independientes. Se utilizó la prueba de Dunnett para determinar el nivel de significancia entre el tratamiento y control, así como la prueba de Tukey para comparaciones múltiples. Los valores se expresan como la media ± la desviación estándar (X±DS) y las pruebas se consideraron significativas con una p≤0.05.

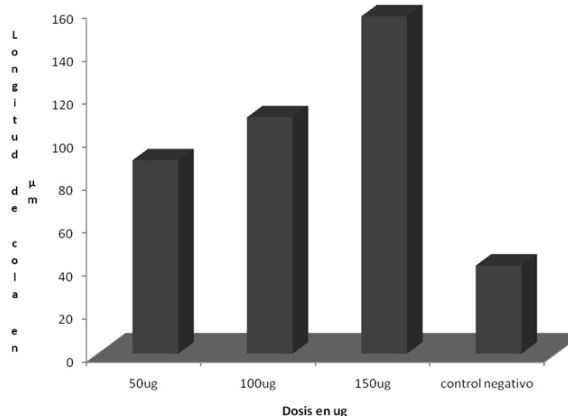


Figura 2. Genotoxicidad en linfocitos humanos inducida por extractos de material particulado (PM_{2.5}) de la ciudad de Cúcuta.

DISCUSIÓN

Resultados similares fueron encontrados cuando se analizaron muestras de aire de la ciudad de Pamplona Norte de Santander (22). La modificación química de nucleótidos, los apareamientos cruzados entre las bases, así como el daño oxidativo de los nucleótidos inducido por especies reactivas de oxígeno o radicales en general, son comúnmente considerados vías a través de las cuales se genera la mutagenicidad. Según la organización mundial de la salud varios hidrocarburos policíclicos aromáticos nitrogenados (nitro-HPA) son mutágenos de acción directa presentes en la

atmosfera. En otros estudios, se ha encontrado que el 1-8 dinitropireno es uno de los compuestos que más contribuyen en la actividad mutagénica directa en muestras de aire, cuando fueron analizados con las cepas TA-98 y YG1024 (15). Posiblemente parte de la respuesta mutagénica observada en estos resultados sea debida a este tipo de compuestos, dado que son compuestos que no requieren de activación metabólica y el mecanismo por el cual inducen mutaciones es por pérdida o ganancia de bases. Otra posible explicación a los resultados podría ser la presencia de metales pesados, dado que en los análisis realizados a las muestras del material particulado (PM_{2.5}) de la ciudad, se encontraron los metales Cd, Cr, Fe, K, Mn, Ni, Pb y Zn (28).

Hasta el momento no existe un mecanismo unificado para explicar la mutagenicidad de los metales, porque hay múltiples vías que conducen a ella, tales como daño oxidativo, interferencia con iones metálicos esenciales para los procesos de replicación y transcripción, alteración de los sistemas de reparación, completar, ligamientos cruzados y alteración de la molécula de ADN. Es de anotar que varios metales pesados se han sido relacionados con el incremento de la actividad mutagénica a través de diversos test de mutagenicidad (29).

Como se observa en la tabla 2, a medida que se incrementa la concentración de extracto, el tipo de daño se va incrementando hasta llegar a un daño alto como es el caso de la dosis de 150 µg, en la cual el 83% de las células muestran daño alto, el 12% daño medio y el 5% daño bajo. También se observa en la tabla 2 y en la figura 2 que las concentraciones que indujeron mayor frecuencia de células con daño en el ADN, también mostraron mayor longitud de migración del ADN (cola). Esto podría indicar que los genotóxicos que producen más daño en el ADN, también afectan más número de células. En la tabla 2 y en figura 2 se observa que todas las dosis de PM_{2.5} analizadas producen daño significativo en el ADN de linfocitos humanos p≤0.05. Esto indica que la mayoría de los mutágenos que llegan a la población en las partículas del aire pueden penetrar hasta el núcleo de células humanas y dañar su ADN. A pesar del uso de células humanas en ensayos *in vitro*, no se puede dar una respuesta definitiva sobre la carcinogenicidad del PM_{2.5} para humanos. La extrapolación de los resultados puede conducir a la hipótesis sobre el riesgo de la exposición a la contaminación del aire, dado que en el presente estudio se mostró que el PM_{2.5} causa mutagenicidad y genotoxicidad. Estos resultados concuerdan con estudios hechos por otros autores (22,23,30).

Teniendo en cuenta que se observó relación entre mutagenicidad en *Salmonella Typhymurium* y daño genotóxico en linfocitos humanos, se puede concluir que el material particulado fracción respirable PM_{2.5} en una zona de alto flujo vehicular de Cúcuta puede ser uno de los factores de riesgo que contribuyen al aumento del índice de cáncer en la población expuesta, debido a que pueden inducir mutaciones en el genoma de las células expuestas y además pueden penetrar

hasta el núcleo de linfocitos humanos y causar daño genotóxico en su ADN.

Agradecimientos

A los profesores Freddy Solano O, Reynaldo Gutiérrez, los laboratorios de Control de Calidad y Diagnostico, Biomédicas y Química de la Universidad de Pamplona.

REFERENCIAS

1. Monks PS, Granier C, Fuzzi S, Stohl A, Williams ML, Akimoto H, et al. Atmospheric composition change-global and regional air quality. *Atmos Environ* 2009; 43(33):5268-5350.
2. Goldberg MS, Burnett RT, Bailar JC, Brook J, Bonvalot Y, Tamblyn R, et al. The association between daily mortality and ambient air particle pollution in Montreal, Quebec. *Environ Res* 2001; 86:26-36.
3. Abbas I, Saint-Georges F, Billet S, Verdin A, Mulliez P, Shirali P, et al. Air pollution particulate matter (PM_{2.5})-induced gene expression of volatile organic compound and/or polycyclic aromatic hydrocarbon-metabolizing enzymes in an in vitro coculture lung model. *Toxicol in Vitro* 2009; 23:37-46.
4. Sioutas C, Delfino RJ, Singh M. Exposure assessment for atmospheric ultrafine particles (UFPs) and implications in epidemiologic research. *Environ Health Perspect* 2005; 113(8):947-955.
5. Westerdahl D, Fruin S, Sax T, Fine PM, Sioutas C. Mobile platform measurements of ultrafine particles and associated pollutant concentrations on freeways and residential streets in Los Angeles. *Atmos Environ* 2005; 39(20):3597-3610.
6. Pope CA, Dockery DW. Health effects of fine particulate air pollution: Lines that connect. *J Air Waste Manage Assoc* 2006; 56(6):709-742.
7. Tsai FC, Apte MG, Daisey JM. An exploratory analysis of the relationship between mortality and the chemical composition of airborne particulate matter. *Inhal Toxicol* 2000; 12:121-135.
8. Hoek G, Brunekreef B, Goldbohm S, Fischer P, Van den Brandt PA. Association between mortality and indicators of traffic-related air pollution in the Netherlands: a cohort study. *Lancet* 2002; 360 (9341):1203-1209.
9. Vinitketkumnun U, Kalayanamitra K, Chewonarin T, Kamens R. Particulate matter, PM₁₀ & PM_{2.5} levels, and airborne mutagenicity in Chiang Mai, Thailand. *Mutat Res* 2002; 519:121-131.
10. Samara C, Voutsas D. Size distribution of airborne particulate matter and associated heavy metals in the roadside environment. *Chemosphere* 2005; 59:1197-1206.
11. Luyi CD, Fu K, Wang D KW, Dann T, Austin CC. A new direct thermal desorption-GC/MS method: Organic speciation of ambient particulate matter collected in Golden, BC. *Atmos Environ* 2009; 43(32):4894-4902.
12. Claxton LD, Warren S, Zweidinger R, Creason J. A comparative assessment of Boise, Idaho, ambient air fine particle samples using the plate and microsuspension *Salmonella* mutagenicity assays. *Sci Total Environ* 2001; 275:95-108.
13. Senlin L, Zhenkun Y, Xiaohui Ch, Minghong W, Guoying S, Jiamo F, et al. The relationship between physicochemical characterization and the potential toxicity of fine particulates (PM_{2.5}) in Shanghai atmosphere. *Atmos Environ* 2008; 42:7205-7214.
14. Li N, Sioutas C, Cho A, Schmitz D, Misra C, Sempf J, et al. Ultrafine particulate pollutants induce oxidative stress and mitochondrial damage. *Environ Health Perspect* 2003; 111(4):455-460.

15. Kawanaka Y, Matsumoto E, Wang N, Yun S.J, Sakamoto K. Contribution of nitrated polycyclic aromatic hydrocarbons to the mutagenicity of ultrafine particles in the roadside atmosphere. *Atmospheric Environment* 2008; 42(32):7423–7428.
16. Machado A, Garcia N, Garcia C, Acosta L, Cordova A, Linares M, et al. Contaminación por metales (Pb, Zn, Ni, Cr) en el aire, sedimentos viales y suelo en una zona de alto flujo vehicular. *Rev Int Cont Amb* 2008; 24(4):171-82.
17. WHO. Health aspects of air pollution with particulate matter, ozone and nitrogen dioxide. Ginebra: World Health Organization; 2003.
18. Singh P, DeMarini DM, Dick CAJ, Tabor DG, Ryan JV, Linak WP, et al. Sample characterization of automobile and forklift diesel exhaust particles and comparative pulmonary toxicity in mice. *Environ Health Perspect* 2004; 112: 820–825.
19. Mills NL, Tonrqvist H, Robinson SD, Darnley K, Gonzales M, Boon NA, et al. Diesel exhaust inhalation causes vascular dysfunction and impaired endogenous fibrinolysis: An explanation for the increased cardiovascular mortality associated with air pollution. *J Am Coll Cardiol* 2005; 45(3):390a–390a.
20. Kleinman MT, Hamade A, Meacher D, Oldham M, Sioutas C, Chakrabarti L, et al. Inhalation of concentrated ambient particulate matter near a heavily trafficked road stimulates antigen-induced airway responses in mice. *J Air Waste Manage Assoc* 2005; 55(9):1277–1288.
21. Pope III CA, Burnett RT, Thun MJ, Calle EE, Krewski D, Ito K, et al. Lung cancer, cardiopulmonary mortality and long-term exposure to fine particulate air pollution. *J Am Med* 2002; 287(9):1132–41.
22. Melendez I, Quijano A, Martínez M. Actividad mutagénica y genotóxica en el material particulado fracción respirable PM_{2,5} en Pamplona-Norte de Santander-Colombia. *IATREIA* 2012; 25(4):347-356.
23. DeMarini DM, Brooks LR, Warren SH, Kobayashi T, Gilmour MI, Singh P. Bioassay-directed fractionation and *Salmonella* mutagenicity of automobile and forklift diesel exhaust particles. *Environ Health Perspect* 2004; 112:814–19.
24. Nguyen TH, Byeong-Kyu L. Characteristics of particulate matter and metals in the ambient air from a residential area in the largest industrial city in Korea. *Atmos Res* 2010; 98(2-4):526–537.
25. Mortelmans K, Zeiger E. The Ames *Salmonella*/microsome mutagenicity assay. *Mutat Res* 2000; 455(1-2):29–60.
26. Lia W, McNutt MA, Wei-Gou, Z. The comet assay; a sensitive method for detecting ADN damage in individuals cells. *Methods* 2009; 48:46-53.
27. Cassoni F, Bocchi C, Martino A, Pinto G, Fontana F, Buschini A. The *Salmonella* mutagenicity of urban airborne particulate matter (PM_{2,5}) from eight sites of the Emilia-Romagna regional monitoring network (Italy). *Sci Total Environ* 2004; 324:79-90.
28. Quijano A, Quijano M, Henao MJ. Caracterización fisicoquímica del Material particulado fracción respirable PM_{2,5} en Pamplona Norte de Santander Bistua 2010; 8(1):53-66.
29. Mari M, Nadal M, Domingo JL. Exposure to heavy metals and PCDD/Fs by the population living in the vicinity of a hazardous waste landfill in Catalonia, Spain: Health risk assessment. *Environ Int* 2009; 35:1034-1039.
30. US Environmental Protection Agency (EPA). Health assessment document for diesel engine exhaust. Washington (DC): National Centre for Environmental Assessment; 2002.