

Actividad mutagénica y genotóxica en el material particulado fracción respirable MP_{2,5} en Pamplona, Norte de Santander, Colombia

Iván Meléndez Gélvez¹, Mónica Liseth Martínez Montañez², Alfonso Quijano Parra²

RESUMEN

Objetivo: estudiar las actividades mutagénica y genotóxica del material particulado fracción respirable MP_{2,5} del aire de Pamplona, Norte de Santander.

Materiales y métodos: el MP_{2,5} fue monitorizado con un equipo *Partisol* 2025 con filtros de cuarzo *Plus Palmflex*. Los filtros se sometieron a dos tipos de extracción: *Soxhlet* que utiliza diclorometano y acetona y extracción por ultrasonido que utiliza diclorometano, acetona y una mezcla de ambos. A los extractos obtenidos se les determinaron las actividades mutagénica y genotóxica.

Resultados: por primera vez en Colombia, se reportan las actividades mutagénica y genotóxica asociadas con el MP_{2,5} captado cerca de una vía vehicular en Pamplona, Norte de Santander. El ensayo mediante el test de Ames usando las cepas TA98 y TA100 de *Salmonella typhimurium* mostró alta actividad mutagénica directa de los extractos analizados. También fue alta la genotoxicidad inducida por MP_{2,5} y evaluada con el ensayo cometa.

Conclusión: el MP_{2,5} presente en las muestras de aire de la ciudad de Pamplona constituye un factor de riesgo para la población expuesta, debido a que puede inducir mutaciones y además llegar hasta el núcleo de linfocitos humanos y causarles daño genotóxico.

PALABRAS CLAVE

Colombia; Contaminación del Aire; Ensayo Cometa; Material Particulado; Tests de Mutagenicidad; Salmonella typhimurium

¹ Universidad de Pamplona, Facultad de Ciencias Básicas, Grupo de Investigación en Biología Molecular, Pamplona, Colombia.

² Universidad de Pamplona, Facultad de Ciencias Básicas, Grupo de Investigación en Química, Pamplona, Colombia.

Correspondencia: imgelvez@hotmail.com

Ciudadela universitaria, Km 1, Vía Bucaramanga, Pamplona, Norte de Santander, Colombia. (Grupo de Investigación en Biología Molecular). Teléfono: 097-5685303 extensión 239. Celular: 3012530634 Carrera 10 N° 9-22 interior 4 Barrio La Favorita (Pamplona, Norte de Santander)

Recibido: septiembre 01 de 2011

Aceptado: octubre 27 de 2011

SUMMARY

Mutagenic and genotoxic activity of particulate matter $MP_{2.5}$ in Pamplona, North Santander, Colombia

Objective: To study the mutagenic and genotoxic activities of particulate material ($MP_{2.5}$) collected in Pamplona, Norte de Santander, Colombia.

Materials and methods: $MP_{2.5}$ was monitored by means of a *Partisol* 2025 sequential air sampler with *Plus Palmflex* quartz filters. The latter were subjected to two extraction procedures: *Soxhlet* extraction using dichloromethane-acetone; and ultrasonic extraction using dichloromethane, acetone and dichloromethane/acetone mix. The mutagenic and genotoxic activities were determined for each extract.

Results: This is the first study conducted in Colombia that reports the mutagenic and genotoxic activities associated with particulate matter ($MP_{2.5}$) taken from vehicular emissions in Pamplona, Norte de Santander. The mutagenic assay determined by the Ames test using *Salmonella typhimurium* strains TA98 and TA100 showed a high direct mutagenic activity in the analyzed extracts. On the other hand, the genotoxic activity, determined by means of the comet assay, was high too.

Conclusion: Particulate material ($MP_{2.5}$) present in air samples in Pamplona (northeastern Colombia) is a risk factor for the exposed population because it can directly induce mutations and also cause genotoxic damage.

KEY WORDS

Air Pollution; Colombia; Comet Assay; Particulate Matter; Mutagenicity Tests; Salmonella typhimurium

INTRODUCCIÓN

La contaminación ambiental por material particulado (MP) es uno de los mayores problemas mundiales de la atmósfera. Se ha asociado la exposición a dicho material con numerosos efectos adversos para la salud (1,2) y varios estudios epidemiológicos relacionan la exposición al MP proveniente de los vehículos con

muerres prematuras (3,4), enfermedades cardiovasculares (5-7) y cáncer de pulmón (8-10). En las áreas urbanas las fuentes principales de MP son los procesos de combustión (11), las emisiones de los motores de los vehículos (12) y las actividades industriales (13). El MP está compuesto por una mezcla compleja de especies, altamente heterogéneas, de productos químicos y/o elementos biológicos (14), algunas de las cuales se emiten directamente a la atmósfera mientras que otras son productos de la oxidación de estas emisiones directas (15). El mayor impacto en la salud lo causan las partículas de carbono elemental, compuestos orgánicos, especialmente hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP), sulfatos y nitratos, y determinados metales como As, Cd, Fe, Zn, Cr, Cu, Al, V, Ni y Pb (16-18). 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 $\leq 2,5 \mu\text{m}$ ($MP_{2.5}$) que son de mayor peligrosidad al ser totalmente respirables porque pueden penetrar a los pulmones y permanecer mayor tiempo en ellos, llevando consigo adsorbidas sustancias orgánicas de alta toxicidad (19); están implicadas en diversas condiciones médicas, incluyendo cáncer, artritis reumatoide, ataque al corazón y el envejecimiento (20). Por su parte, las partículas gruesas (PST, polvo en suspensión total) mayores de $10 \mu\text{m}$ se consideran menos tóxicas porque se depositan principalmente en las cavidades nasal y oral.

Las partículas que constituyen el $MP_{2.5}$ son producidas por la combustión de los vehículos, en especial por aquellos que funcionan con motores diésel (21). El MP que proviene del diésel es un contaminante muy tóxico debido a sus propiedades cancerígenas y tiene el potencial de causar problemas respiratorios y cardiovasculares (22-24) así como reacciones alérgicas (25). Las emisiones de partículas de diésel causan grandes contaminaciones en el aire urbano, porque contribuyen a la formación de hidrocarburos aromáticos policíclicos (26-28). Muchos de los efectos tóxicos y cancerígenos del aire contaminado en las ciudades se han vinculado a los hidrocarburos aromáticos policíclicos adsorbidos en el material particulado. Las propiedades cancerígenas de dichos hidrocarburos en mezclas orgánicas complejas derivadas del MP han sido principalmente atribuidas a su mutagenicidad. Sin embargo, los HAP son también activadores potentes de receptores aril hidrocarburos (AHR), que

pueden contribuir a sus efectos no genotóxicos, incluyendo la promoción de tumores (29). Muchos HAP se consideran cancerígenos (30), porque unidos a partículas con diámetro menor de $2 \mu\text{m}$ pueden depositarse en los pulmones y ejercer su carcinogenicidad en períodos de exposición largos (31).

MATERIALES Y MÉTODOS

La monitorización de la fracción respirable $\text{MP}_{2.5}$ se realizó en la localidad de Pamplona, Norte de Santander, Colombia, en el período de enero a julio de 2010, con el equipo *Partisol-2025 Plus de la Ruprecht-Pataschnik*, ubicado en la azotea del edificio de Ciencias Básicas de la Universidad de Pamplona, a la salida hacia Bucaramanga, donde es mayor el flujo de vehículos de transporte público y privado y de vehículos de carga pesada que utilizan como combustible el diésel. Las muestras ambientales de $\text{MP}_{2.5}$ se recolectaron en un filtro Palmflex de microcuarzo de 47 mm, en períodos de 24 horas, con una frecuencia de cada tres días (32).

Tratamiento químico de los filtros

Los filtros se colocaron en un equipo de extracción continua del tipo *Soxhlet*; se utilizaron diclorometano (Mallinckrodt Chemicals) y acetona (RA Chemicals) como solventes de extracción (1:1) (170 mL:170 mL); la extracción se hizo por 48 horas en ciclos de ocho minutos. Para la extracción por ultrasonido se utilizó un baño ultrasónico (*Branson 1510, modelo 1510R-MT*); se utilizaron diferentes solventes: diclorometano, acetona y una mezcla diclorometano/acetona (10:10 para la primera extracción y 10:5 para las siguientes). Los filtros provenientes de la monitorización del $\text{MP}_{2.5}$ se depositaron en un vaso de precipitado de 100 mL con 20 mL de cada uno de los solventes mencionados por un período de 10 minutos a temperatura de 23-24 °C; seguidamente se hicieron dos repeticiones utilizando 15 mL por 10 minutos a 23-24 °C. Una vez obtenido el extracto, se lo concentró en un evaporador rotatorio de vacío (*Heidolph modelo Laborota 400-1*), a temperatura de 30 °C a 150 rpm, hasta aproximadamente 2 mL. Posteriormente el extracto se transfirió a viales que 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 $\text{MP}_{2.5}$ se determinó por medio del test de Ames (33) usando el protocolo descrito por Maron y Ames (34). En esta prueba el indicativo de la mutación es la reversión his^- a his^+ , los revertantes se conocen porque crecen en medio mínimo sin histidina. Se trabajó con dos cepas de *Salmonella typhimurium*: la cepa TA 98 en la que se produce la reversión a his^+ por ganancia de un par de bases en el gen mutado, y la cepa TA 100, en la cual se produce la reversión por sustitución de un par de bases. Con cada muestra se trataron 10^7 bacterias, en ausencia de enzimas microsomales. Se utilizaron controles positivo y negativo. Para el control positivo se utilizó 4-nitroquinolina óxido (4-NQO) y como control negativo se usó dimetilsulfóxido (DMSO) al 12%. Se consideraron positivos los resultados que presentaron, de forma reproducible, un incremento significativo de la mutación con respecto al control negativo. Para los análisis mutagénico y genotóxico se probaron tres dosis de material particulado (50 μg , 100 μg y 150 μg). Para verificar la reproducibilidad de los resultados se hicieron tres experimentos independientes, cada uno por duplicado.

Detección del daño del ADN

Para detectar la ruptura del ADN se utilizó el ensayo *cometa*. Se siguió la metodología propuesta por Singh (35) y modificada por Pandrangi (36). La ocurrencia de daño en el ADN se basó en la longitud de la cola del cometa, inducida por la ruptura del ADN. Se consideró que la cola era producida por ruptura si su longitud era mayor de $41 \mu\text{m}$ que es la longitud total producida por factores diferentes a ruptura. Se definió el rango para los tipos de daño de la siguiente manera: 0 (no daño): de 0 a $41 \mu\text{m}$; 1 (daño bajo): de 42 a $83 \mu\text{m}$; 2 (daño medio): de 84 a $125 \mu\text{m}$; 3 (daño alto): $126 \mu\text{m}$ o más. Las muestras de sangre periférica se obtuvieron de un voluntario joven (25 años), saludable, no fumador, sin ningún tipo de tratamiento clínico, que no era deportista de alto rendimiento. Para medir la 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 25 mM (H_2O_2 25 mM) y como control negativo, el DMSO al 1%, que fue el solvente 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 eran no paramétricos se utilizaban las pruebas de Mann-Whitney y Wilcoxon. Los valores se expresan como la media \pm la desviación estándar ($X \pm DS$) y se consideraron significativos con una $p \leq 0,05$.

RESULTADOS

Rendimiento de las extracciones de los filtros de MP_{2,5} obtenidas por ultrasonido y Soxhlet respectivamente

Los valores de los porcentajes de rendimiento de los extractos de MP_{2,5} se establecieron de acuerdo con el 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 61% al trabajar con la mezcla diclorometano/acetona (1:1). Al trabajar por ultrasonido, el rango de extracción osciló entre 96% y 98% cuando se utilizó como único

solvente el diclorometano; cuando se hizo con acetona para la siguiente extracción, se obtuvo un porcentaje de 98% y, por último, cuando se extrajo con la mezcla (acetona/diclorometano) dio como resultado un rendimiento de 99%.

La tabla 1 y la figura 1 muestran que se detectó actividad mutagénica alta en la cepa TA-98 cuando se analizaron muestras de MP_{2,5} del aire de Pamplona. Como se observa en la tabla 1 y en la figura 2, la actividad mutagénica en la cepa TA-100 en cada una de las dosis superó entre 4 y 5 veces el valor del control negativo siendo altamente mutagénico. La reversión de esta cepa al estado silvestre se origina por mutágenos que causan mutación por sustitución de bases. De acuerdo con las razones de mutagenicidad en cada una de las dosis ensayadas, tanto en la cepa TA-100 como en la TA-98, se observa que la razón de mutagenicidad es de 2 o más, por lo que se considera una respuesta mutagénica positiva. Como se evidencia en la tabla 1 y en la figura 1, no existe un efecto de dosis en la respuesta mutagénica cuando se analiza el material particulado, posiblemente porque los rangos analizados son muy bajos.

Tabla 1. Mutagenicidad y razón de mutagenicidad (RM) de diferentes dosis de MP_{2,5} del aire de Pamplona analizadas con las cepas TA-98 y TA-100*

Dosis $\mu\text{g}/\text{caja}$	Promedio de revertantes/tratamiento		RM	
	TA-98	TA-100	TA-98	TA-100
50	237 \pm 14	385 \pm 18	10,3	5,4
100	191 \pm 16	299 \pm 13	8,3	4,2
150	222 \pm 8	322 \pm 12	9,6	4,5
Control negativo	23 \pm 3	71 \pm 9	1,0	1,0
Control positivo	250 \pm 25	334 \pm 20	10,8	4,7

* Cada valor corresponde al promedio de tres experimentos independientes con su respectiva desviación estándar; cada experimento se realizó por duplicado. Como control negativo se usó dimetilsulfóxido (DMSO) al 12% y como control positivo, 4-NQO. A partir de los datos registrados de mutagenicidad, se halló la razón de mutagenicidad (RM) que es igual a RI/RE, en la que RI son revertantes inducidos por el tratamiento y RE, revertantes espontáneos. La RM es el número de veces que la respuesta al tratamiento supera al control negativo

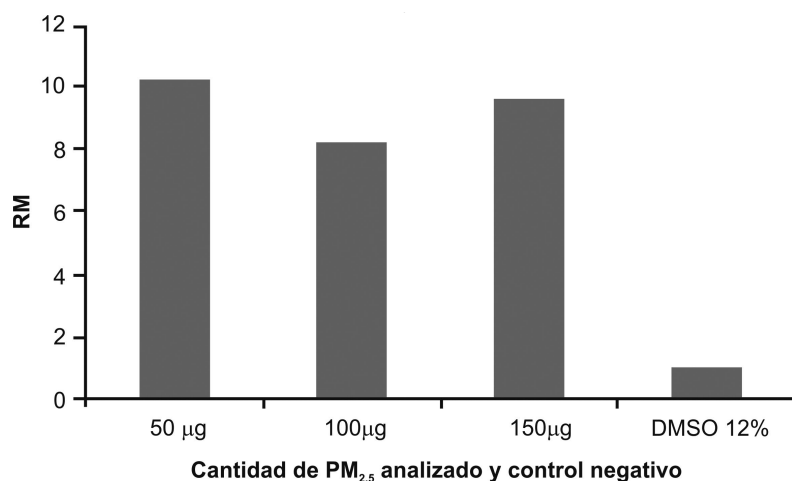


Figura 1. Mutagenicidad en *Salmonella typhimurium* (cepa TA-98) en ausencia de S-9* del extracto de material particulado MP_{2,5} obtenido en la ciudad de Pamplona. La razón de mutagenicidad es el número de veces que la respuesta al tratamiento supera al control negativo. Como control negativo se usó dimetilsulfóxido (DMSO) al 12%, que es el solvente en el cual se diluyó el extracto

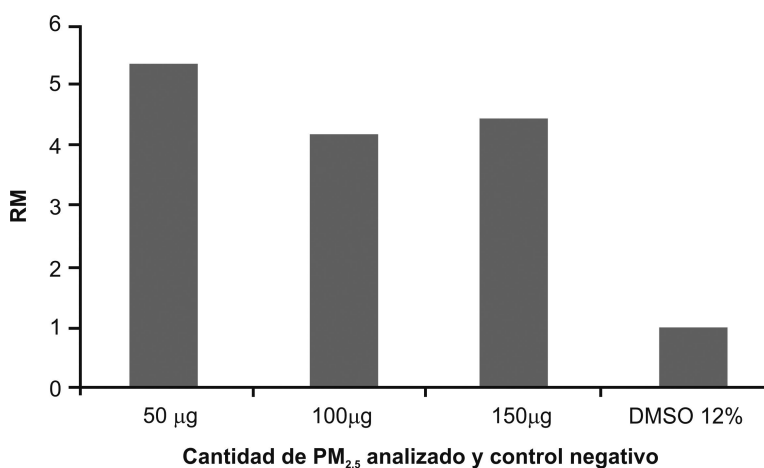


Figura 2. Mutagenicidad en *Salmonella typhimurium* (cepa TA-100) en ausencia de S-9* del extracto de material particulado MP_{2,5} obtenido en la ciudad de Pamplona. La razón de mutagenicidad es el número de veces que la respuesta al tratamiento supera al control negativo. Como control negativo se usó dimetilsulfóxido (DMSO) al 12%, que es el solvente en el cual se diluyó el extracto. Las dosis se calcularon de acuerdo con peso del material particulado recuperado del filtro

* Fracción microsomal presente en el sobrenadante después de haber centrifugado a 9.000 gravedades un homogenizado de hígado de rata

Mediante el ensayo cometa se analizó el daño inducido por extractos del material particulado $MP_{2.5}$ 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 (figura 3), 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 se debe 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 se mantenía por encima del 93% (tabla 2). Además, se establecieron categorías de daño para mostrar que este no se distribuye uniformemente en todas las células, lo cual puede ser una ventaja, debido a que la exposición no necesariamente las afecta a todas, disminuyendo así el riesgo. Como se puede observar en la tabla 2 y en la figura 4, la longitud de la cola de las células que muestran daño espontáneo no supera los $41 \mu m$ y la mayoría de las células (92,5%) están en el rango de daño de 0 a 1, lo que muestra que no tienen daño o si lo tienen, es muy bajo. De igual manera, con la dosis de $100 \mu g$ de $MP_{2.5}$ se puede

observar que 85% de las células tienen algo de daño, con más frecuencia de nivel 1 que es bajo. Como se puede observar en la tabla 2, a medida que se incrementa la concentración del extracto, aumenta el tipo de daño hasta llegar a un nivel alto como es el caso de la dosis de $150 \mu g$, con la cual 52% de las células muestran daño alto, 25% daño medio y 18% daño bajo. Se puede también observar en la tabla 2 y la figura 4 que las dosis 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 a un mayor número de células.

DISCUSIÓN

De acuerdo con los resultados observados, se puede atribuir la reversión de la mutación al estado silvestre a diversos agentes mutágenicos presentes en el material particulado que pueden alterar el marco de lectura u originar sustitución de bases; tales agentes pueden ser derivados nitroso-aromáticos, HPA, metales y varios agentes cancerígenos amino (13,37-39).

Tabla 2. Resultados de la genotoxicidad (expresada en longitud de cola en μm) de tres experimentos independientes, en linfocitos humanos expuestos a diferentes dosis de material particulado, fracción respirable $MP_{2.5}$ de la ciudad de Pamplona*

Tratamiento	Promedio $\pm DS$	Tipo de daño				% de células dañadas	% de viabilidad
		0	1	2	3		
DMSO 1%	41 ± 12	158	27	15	0	5	97
H_2O_2 25mM	164 ± 21	2	3	40	155	97	93
50 μg	108 ± 26	30	160	6	4	85	95
100 μg	154 ± 17	10	50	139	11	90	97
150 μg	162 ± 21	10	36	50	104	94	96

* Todos los valores provienen de 200 datos obtenidos en tres experimentos independientes. Se definió el rango para los tipos de daño de la siguiente manera: 0 (no daño): de 0 a $41 \mu m$; 1 (daño bajo): de 42 a $83 \mu m$; 2 (daño medio): de 84 a $125 \mu m$; 3 (daño alto): mayor de $126 \mu m$. Además se determinaron el porcentaje de células dañadas y la viabilidad celular después de 1 hora de tratamiento

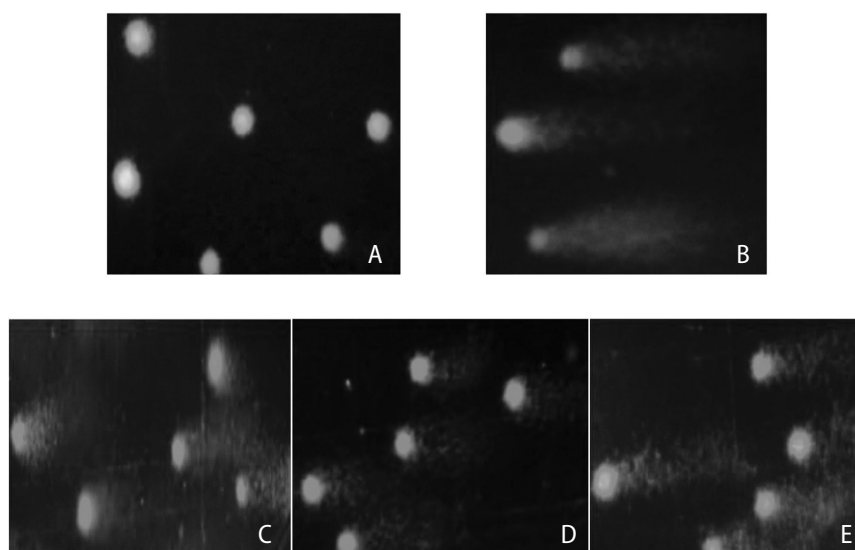


Figura 3. (A). Apariencia de los cometas en linfocitos humanos que no han sido expuestos a ningún tratamiento. (B) Cometas de células que han sido expuestas a H_2O_2 25 mM. (C) Cometas de células que han sido expuestas a 50 μg de $MP_{2.5}$. (D) Cometas de células que han sido expuestas a 100 μg de $MP_{2.5}$ y (E) Cometas de células que han sido expuestas a 150 μg de $MP_{2.5}$. Las células fueron incubadas durante 1 hora en presencia del material particulado o el control respectivo y posteriormente se determinó su viabilidad. Las imágenes se obtuvieron usando el analizador de imágenes *Comet assay II*, con un aumento de 250 X

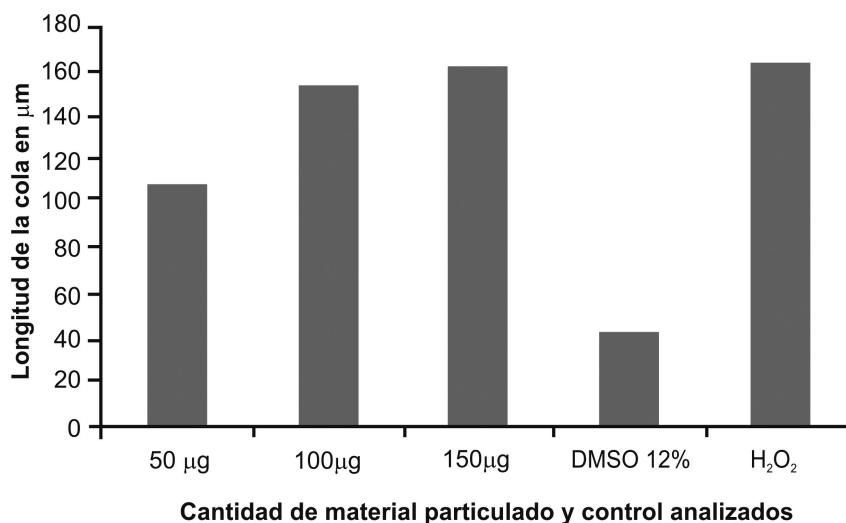


Figura 4. Genotoxicidad en linfocitos humanos inducida por extractos de material particulado ($MP_{2.5}$) de la ciudad de Pamplona

La mutagénesis es el resultado de malos apareamientos entre las bases involucradas en los enlaces Watson-Crick. Este fenómeno puede ser espontáneo o inducido y pasa inadvertido ante la maquinaria de reparación del ADN. La modificación química de los nucleótidos, por ejemplo la halogenación (5-bromouracilo), la alquilación (O⁶ de la guanina), los apareamientos cruzados entre las bases, así como el daño oxidativo de los nucleótidos inducido por especies reactivas de oxígeno o radicales en general, se consideran comúnmente vías por las cuales se genera la mutagenicidad. Según el *Programa Internacional de Seguridad Química de la Organización Mundial de la Salud* (WHO/IPCS, por su sigla en inglés) 2003 (37) varios hidrocarburos policíclicos aromáticos nitrogenados (nitro-HPA) son mutágenos de acción directa presentes en la atmósfera. Por otra parte (39), se encontró que el 1, 8 dinitropireno es uno de los compuestos que más contribuyen a la actividad mutagénica directa en muestras de aire, cuando fueron analizados con las cepas TA-98 y YG1024. Posiblemente parte de la respuesta mutagénica observada en nuestros resultados sea debida a este tipo de compuestos, dado que no requieren activación metabólica y el mecanismo por el cual inducen mutaciones es la pérdida o ganancia de bases. Otra posible explicación para nuestros resultados podría ser la presencia de metales pesados, dado que en análisis hechos a las muestras del MP_{2.5} de la ciudad de Pamplona, se encontraron los metales Cd, Cr, Fe, K, Mn, Ni, Pb, Zn (40). Hasta el momento no existe un mecanismo unificado para explicar la mutagenicidad de los metales, porque múltiples vías conducen a ella, tales como el daño oxidativo, la interferencia con iones metálicos esenciales para los procesos de replicación y transcripción, la alteración de los sistemas de reparación, los ligamientos cruzados y la alteración de la molécula de ADN. Es de anotar que varios metales pesados han sido relacionados con el incremento de la actividad mutagénica en diversas pruebas de mutagenicidad (41-43).

Como se puede observar en la tabla 2 y la figura 4, todas las dosis de MP_{2.5} analizadas produjeron daño en el ADN de linfocitos humanos. 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. Estos resultados concuerdan con los de estudios en otros países

(44-46). Se puede concluir, por lo tanto, que el MP_{2.5} constituye uno de los factores de riesgo que contribuyen al aumento del índice de cáncer en la población expuesta. Puede observarse que hubo relación entre la mutagenicidad en *Salmonella tiphymurium* y el daño genotóxico en linfocitos humanos, lo que indica la confiabilidad en el uso de los test.

Con los resultados obtenidos en la presente investigación, se puede concluir que el material particulado potencialmente mutagénico, presente en las muestras de aire de la ciudad de Pamplona, podría constituir un factor de riesgo para la población expuesta, y que, además, puede llegar hasta el núcleo de linfocitos humanos y causarles daño genotóxico en el ADN.

AGRADECIMIENTOS

A los profesores Freddy Solano Ortega y Reynaldo Gutiérrez Marín; a los laboratorios de Control de Calidad y Diagnóstico, Biomédicas y Química de la Universidad de Pamplona.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Samet JM, Dominici F, Curriero FC, Coursac I, Zeger SL. Fine particulate air pollution and mortality in 20 U.S. cities, 1987-1994. *N Engl J Med.* 2000 Dec 14;343(24):1742-9.
2. Pope CA, Dockery DW. Health effects of fine particulate air pollution: lines that connect. *J Air Waste Manag Assoc.* 2006 Jun;56(6):709-42.
3. Tsai F, Apte M, Daisey J. An exploratory analysis of the relationship between mortality and the chemical composition of airborne particulate matter. *Inhalation Toxicology.* 2000;12:121-35.
4. 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 Oct 19;360(9341):1203-9.
5. Pope CA. Particulate matter-mortality exposure-response relations and threshold. *Am J Epidemiol.* 2000 Sep 1;152(5):407-12.
6. Pope CA, Burnett RT, Thurston GD, Thun MJ, Calle EE, Krewski D, et al. Cardiovascular mortality and

- long-term exposure to particulate air pollution: epidemiological evidence of general pathophysiological pathways of disease. *Circulation*. 2004 Jan 6;109(1):71–7.
7. Laden F, Schwartz J, Speizer FE, Dockery DW. Reduction in fine particulate air pollution and mortality: Extended follow-up of the Harvard Six Cities study. *Am J Respir Crit Care Med*. 2006 Mar 15;173(6):667–72.
 8. 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. 2. Cause-specific mortality. *Environ Res*. 2001 May;86(1):26–36.
 9. Pope 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. *JAMA*. 2002 Mar 6;287(9):1132–41.
 10. Han X, Naeher LP. A review of traffic-related air pollution exposure assessment studies in the developing world. *Environ Int*. 2006 Jan 6;32(1):106–20.
 11. Sioutas C, Delfino RJ, Singh M. Exposure assessment for atmospheric ultrafine particles (UFPs) and implications in epidemiologic research. *Environ Health Perspect*. 2005 Aug;113(8):947–55.
 12. 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. *Atmospheric Environment*. 2005;39(20):3597–610.
 13. Ianistcki M, Dallarosa J, Sauer C, Teixeira CE, da Silva J. Genotoxic effect of polycyclic aromatic hydrocarbons in the metropolitan area of Porto Alegre, Brazil, evaluated by *Helix aspersa* (Müller, 1774). *Environ Pollut*. 2009 Jul;157(7):2037–42.
 14. 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. *Toxicology in vitro: an international journal published in association with BIBRA*. 2009 Feb;23(1):37–46.
 15. Huang X-F, He L-Y, Hu M, Zhang Y-H. Annual variation of particulate organic compounds in PM_{2.5} in the urban atmosphere of Beijing. *Atmospheric Environment*. 2006;40(14):2449–58.
 16. Machado A, García N, García C, Acosta L, Córdova A, María Inares Debora Giraldoth1 y Harvi Velásquez. Contaminación por metales (Pb, Zn, Ni, Cr) en el aire, sedimentos viales y suelo en una zona de alto flujo vehicular. *Rev. Int. Contam. Ambient*. 2008;24(4):171–82.
 17. Wichmann H-E, Peters A. Epidemiological evidence of the effects of ultrafine particle exposure. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. A*. 2000;358(1775):2751–2769;
 18. World Health Organization. Health aspects of air pollution with particulate matter, ozone and nitrogen dioxide. Bonn: World Health Organization; 2003. p. 95.
 19. Samara C, Voutsas D. Size distribution of airborne particulate matter and associated heavy metals in the roadside environment. *Chemosphere*. 2005 May;59(8):1197–206.
 20. Ding LC, Ke F, Wang DKW, Dann T, Austin CC. A new direct thermal desorption-GC/MS method: Organic speciation of ambient particulate matter collected in Golden, BC. *Atmospheric Environment*. 2009;43(32):4894–902.
 21. Westerholm R, Li H. A multivariate statistical analysis of fuel-related polycyclic aromatic hydrocarbon emissions from heavy-duty diesel vehicles. *Environ Sci Technol*. 1994 May 1;28(5):965–72.
 22. Stayner L, Dankovic D, Smith R, Steenland K. Predicted lung cancer risk among miners exposed to diesel exhaust particles. *Am J Ind Med*. 1998 Sep;34(3):207–19.
 23. Zmirou D, Masclet P, Boudet C, Dor F, Déchenaux J. Personal exposure to atmospheric polycyclic aromatic hydrocarbons in a general adult population and lung cancer risk assessment. *J Occup Environ Med*. 2000 Feb;42(2):121–6.
 24. Mills NL, Törnqvist H, Robinson SD, Gonzalez M, Darnley K, MacNee W, et al. Diesel exhaust inhalation causes vascular dysfunction and impaired endogenous fibrinolysis. *Circulation*. 2005 Dec 20;112(25):3930–6.
 25. Kleinman MT, Hamade A, Meacher D, Oldham M, Sioutas C, Chakrabarti B, et al. Inhalation of concentrated ambient particulate matter near a heavily trafficked road stimulates antigen-induced airway responses in mice. *J Air Waste Manag Assoc*. 2005 Sep;55(9):1277–88.

26. Tancell PJ, Rhead MM, Pemberton RD, Braven J. Survival of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons during Diesel Combustion. *Environ Sci Technol*. 1995 Nov;29(11):2871–6.
27. Boström C-E, Gerde P, Hanberg A, Jernström B, Johansson C, Kyrklund T, et al. Cancer risk assessment, indicators, and guidelines for polycyclic aromatic hydrocarbons in the ambient air. *Environ Health Perspect*. 2002 Jun;110 Suppl:451–88.
28. Limbeck A, Puls C, Handler M. Platinum and palladium emissions from on-road vehicles in the Kaiser-mühlen Tunnel (Vienna, Austria). *Environ Sci Technol*. 2007 Jul 15;41(14):4938–45.
29. Andryśík Z, Vondráček J, Marvanová S, Cigánek M, Neča J, Pňnčíková K, et al. Activation of the aryl hydrocarbon receptor is the major toxic mode of action of an organic extract of a reference urban dust particulate matter mixture: the role of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Mutat Res*. 2011 Sep 1;714(1-2):53–62.
30. Overall evaluations of carcinogenicity: an updating of IARC Monographs volumes 1 to 42. *IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum Suppl*. 1987 Jan;7:1–440.
31. Wang X, Cheng H, Xu X, Zhuang G, Zhao C. A wintertime study of polycyclic aromatic hydrocarbons in PM(2.5) and PM(2.5-10) in Beijing: assessment of energy structure conversion. *J Hazard Mater*. 2008 Aug 30;157(1):47–56.
32. Quijano Parra A, Orozco M. JA. Monitoreo de material particulado-fracción respirable(pm 2.5) en Pamplona (Colombia). *Bistua*. 2005;3(2):1–11.
33. Ames BN, Lee FD, Durston WE. An improved bacterial test system for the detection and classification of mutagens and carcinogens. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1973 Mar;70(3):782–6.
34. Maron DM, Ames BN. Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. *Mutat Res*. 1983 May;113(3-4):173–215.
35. Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res*. 1988 Mar;175(1):184–91.
36. Pandrangi R, Petras M, Ralph S, Vrzoc M. Alkaline single cell gel (comet) assay and genotoxicity monitoring using bullheads and carp. *Environ Mol Mutagen*. 1995 Jan;26(4):345–56.
37. World Health Organization. Selected nitro- and nitro-oxy-polycyclic aromatic hydrocarbons. Geneva: World Health Organization; 2003. p. 480.
38. Söderström H, Hajšlová J, Kocourek V, Siegmund B, Kocan A, Obiedzinski MW, et al. PAHs and nitrated PAHs in air of five European countries determined using SPMDs as passive samplers. *Atmospheric Environment*. 2005;39(9):1627–40.
39. 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):7423–8.
40. Quijano Parra A, Quijano Vargas MJ, Henao Martínez JA. Caracterización fisicoquímica del material particulado-fracción respirable PM2.5 en Pamplona-Norte de Santander-Colombia. *Bistua*. 2010;8(1):1–20.
41. Müller J, Sigel RK, Lippert B. Heavy metal mutagenicity: insights from bioinorganic model chemistry. *J Inorg Biochem*. 2000 Apr;79(1-4):261–5.
42. Léonard A, Lauwerys RR. Carcinogenicity and mutagenicity of chromium. *Mutat Res*. 1980 Nov;76(3):227–39.
43. Morita H, Umeda M, Ogawa HI. Mutagenicity of various chemicals including nickel and cobalt compounds in cultured mouse FM3A cells. *Mutat Res*. 1991 Oct;261(2):131–7.
44. Buschini A, Cassoni F, Anceschi E, Pasini L, Poli P, Rossi C. Urban airborne particulate: genotoxicity evaluation of different size fractions by mutagenesis tests on microorganisms and comet assay. *Chemosphere*. 2001 Sep;44(8):1723–36.
45. de Oliveira Alves N, Matos Loureiro AL, Dos Santos FC, Nascimento KH, Dallacort R, de Castro Vasconcellos P et al. Genotoxicity and composition of particulate matter from biomass burning in the eastern Brazilian Amazon region. *Ecotoxicol Environ Saf*. 2011 Jul;74(5):1427–33.
46. Topinka J, Rossner P, Milcova A, Schmuczerova J, Svecova V, Sram RJ. DNA adducts and oxidative DNA damage induced by organic extracts from PM2.5 in an acellular assay. *Toxicol Lett*. 2011 May 10;202(3):186–92.