

Mutagenicidad y genotoxicidad en fracciones de $PM_{2,5}$ del aire de Villa del Rosario, Colombia

Mutagenicity and genotoxicity in fractions of $PM_{2,5}$ Air Villa del Rosario, Colombia

Iván Meléndez-G.^{1, 4}, Greila P. Quintero-S.^{2, 5}, Alfonso Quijano-Parra^{3, 6}

Resumen

Las partículas atmosféricas constituyen uno de los contaminantes atmosféricos más importantes, debido a que contienen metales e hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) que son compuestos con conocida actividad genotóxica, mutagénica y carcinogénica. Las partículas finas con diámetro menor a $2,5 \mu m$ ($PM_{2,5}$) producidas por la combustión de los vehículos diésel están implicadas en efectos sobre la salud humana. El propósito de esta investigación fue determinar la actividad mutagénica y genotóxica de la fracción respirable del $PM_{2,5}$, presente cerca de la avenida fronteriza de alto flujo vehicular en Villa de Rosario (Norte de Santander), la cual comunica los países de Colombia y Venezuela. El $PM_{2,5}$ fue evaluado con filtros de cuarzo Pallflex. La actividad mutagénica y genotóxica de los extractos del $PM_{2,5}$ fue determinada mediante la prueba de Ames y el ensayo cometa. En la prueba de Ames se utilizaron las cepas TA98 y TA100 de *Salmonella typhimurium* y el daño genotóxico se evaluó en linfocitos de sangre periférica. Los resultados mostraron mutagenicidad y genotoxicidad asociada con la fracción $PM_{2,5}$ en Villa del Rosario, lo cual representa un riesgo en la aparición de enfermedades como el cáncer en la población expuesta.

Palabras clave: cepas TA98 y TA100, ensayo cometa, $PM_{2,5}$, *Salmonella typhimurium*

Abstract

Atmospheric particles are one of the most important pollutants because they contain metals and polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), which are compounds with known mutagenic, genotoxic, and carcinogenic activity. Particles with an aerodynamic diameter less than $2,5 \mu m$ ($PM_{2,5}$) are generally referred to as fine particles and are involved in human health effects. The $PM_{2,5}$ fraction is produced by the combustion of vehicles that run on diesel fuel. The purpose of this research is to determine the mutagenic and genotoxic activity of respirable-fraction $PM_{2,5}$ particulate material captured near a high traffic flow pathway in Villa de Rosario (Norte de Santander), which connects Colombia and Venezuela. $PM_{2,5}$ was monitored with a Partisol 2025 Plus computer using quartz filters Pallflex. The mutagenic and genotoxic activity of extracts of $PM_{2,5}$ was determined using two tests: the Ames and the comet assay. In the Ames test, *Salmonella typhimurium* strains TA98 and TA100 were used. To determine the genotoxic damage, peripheral blood lymphocytes were used. Mutagenic and genotoxic activity associated with $PM_{2,5}$ in Villa del Rosario is reported. It is concluded that $PM_{2,5}$ samples from Villa del Rosario induced mutation in *Salmonella typhimurium* and DNA damage in human lymphocytes, representing a risk in the occurrence of diseases such as cancer for the exposed population.

Key words: comet assay, $PM_{2,5}$, *Salmonella typhimurium*, strain TA98 and TA100

Recibido: marzo 2015; aceptado: abril 2016 (Received: March 2015; accepted: April 2016).

¹ Profesor, Departamento de Biología, Facultad de Ciencias Básicas, Grupo de Investigación en Biología Molecular (Biomogen), Universidad de Pamplona. Pamplona (Santander del Norte), Colombia.

² Departamento de Química, Facultad de Ciencias Básicas, Grupo de Investigación en Química, Universidad de Pamplona. Pamplona (Santander del Norte), Colombia.

³ Profesor, Laboratorio de Control de Calidad, Departamento de Química, Facultad de Ciencias Básicas, Grupo de Investigación en Química, Universidad de Pamplona. Pamplona (Santander del Norte), Colombia.

Correos electrónicos: ⁴ <imgelvez@unipamplona.edu.co>; ⁵ <greila@unipamplona.edu.co>; ⁶ <alfonsoquijanoparra@unipamplona.edu.co>.

INTRODUCCIÓN

Los contaminantes atmosféricos se pueden clasificar en partículas en suspensión como polvos, gases, neblinas, humos; contaminantes gaseosos y olores. Varios estudios han señalado el papel de la contaminación del aire en el cáncer humano (Künzli et al. 2010, Silva et al. 2013), por esa razón el material particulado (**PM**) es de gran interés en el estudio de la calidad del aire de las ciudades, principalmente por sus efectos sobre la salud humana (Janssen et al. 2013, Raaschou-Nielsen et al. 2013, Shah et al. 2013). Estudios epidemiológicos han mostrado que las partículas en suspensión PM_{10} y $PM_{2,5}$ seguido de SO_2 y NO_x son los principales elementos de la contaminación urbana (Greenwell et al. 2002).

La exposición prolongada a altas concentraciones de **PM** aumenta el riesgo de cáncer de pulmón, enfermedades respiratorias y arteriosclerosis; mientras que la exposición a corto plazo, causa exacerbación de varias enfermedades respiratorias, incluyendo bronquitis y asma, así como cambios en la variabilidad del ritmo cardíaco (Janssen et al. 2013, Raaschou-Nielsen et al. 2013, Shah et al. 2013). La exposición al **PM** de las emisiones vehiculares parece ser importante en las enfermedades cardiopulmonares (Nel 2005). Una fuente importante de contaminación del aire en las zonas urbanas es la combustión de las fuentes móviles que utilizan combustibles diésel y gasolina (U.S. EPA 2004), ya que las emisiones de partículas de diésel contribuyen a la formación de los metales e hidrocarburos aromáticos policíclicos (**HAP**) (Bostrom et al. 2002). Las fracciones de material particulado respirable (PM_{10} y $PM_{2,5}$) tienen la capacidad de penetrar y depositarse en las regiones traqueo-bronquial y alveolar del tracto respiratorio, por lo que son las fracciones más relevantes para la salud (Kaonga y Kagabi 2010, Mehta et al. 2013, Slezakova et al. 2011, Traversi et al. 2009). Los efectos tóxicos de las partículas $PM_{2,5}$ están implicadas en gran número de afecciones médicas, incluyendo artritis reumatoide, cáncer, cardiopatías y envejecimiento. La identificación de mutágenos en las partículas del escape del diésel y el aire urbano, no sólo confirmó la contribución de **HAP** a la actividad mutagénica, sino que también condujo al descubrimiento de nitroarenos, compuestos altamente mutagénicos en las partículas del diésel del aire urbano (WHO/IPCS 2003). Uno de estos compuestos, 3-nitrobenzantrone, es un mutágeno extremadamente potente y carcinógeno en humanos (Enya et al. 1997), así como inductor de tumores en roedores (Arlt 2005).

La mutagenicidad y carcinogenicidad de las partículas suspendidas en el aire se atribuyó inicialmente a los **HAP** (IARC 1984) y su carcinogenicidad es probablemente mediada por su capacidad de dañar el ADN (Novotna et al. 2007). Es bien conocido que los extractos de **PM** pueden inducir estrés oxidativo en las células (Li et al. 2008). El efecto del **PM** en el organismo depende de su composición química, alto contenido de **HAP** incrementa la genotoxicidad del **PM** con la formación preferencial de aductos de **HAP**-ADN (Sevastyanova et al. 2008). La presencia de otros compuestos incluidas las o-quinonas o metales de transición, pueden conducir a la formación de especies reactivas de oxígeno (**ROS**) y la posterior inducción del estrés oxidativo. La exposición al **PM** puede conducir a formación de macrófagos alveolares que conducen a la generación de radicales libres y aumento el estrés oxidativo (Topinka et al. 2011). El estrés oxidativo resulta del desequilibrio en el organismo entre los prooxidantes y los antioxidantes, generando daños a nivel del ADN, lípidos y proteínas (Klaunig y Kamendulis 2004).

El objetivo del presente estudio fue determinar la actividad mutagénica y genotóxica del material particulado-fracción respirable $PM_{2,5}$, presente cerca de una vía de alto flujo vehicular en la ciudad de Villa de Rosario (Norte de Santander), Colombia.

MATERIALES Y MÉTODOS

Metodología. Se efectuó la evaluación de la fracción respirable $PM_{2,5}$ con el equipo Partisol-Plus 5 Modelo 2025, que se ubicó en la entrada de la sede de la Universidad de Pamplona en Villa del Rosario, ya que en este sector hay mayor flujo de vehículos de transporte público, particular y vehículos de carga pesada. Las muestras de $PM_{2,5}$ se obtuvieron con filtros de Pallflex de micro cuarzo de 47 mm. Las muestras ambientales fueron el resultado de muestreos de 24 horas para un total de 24 m^3 de volumen de aire; muestreo efectuado cada tres días, entre los meses de enero a julio de 2013. Se guardaron en bolsas plásticas con cierre hermético y se mantuvieron refrigeradas hasta el día del análisis. La extracción de la materia orgánica presente en los filtros de $PM_{2,5}$ se realizó por ultrasonido. Los filtros de $PM_{2,5}$ se depositaron en un vaso de precipitado con 20 ml de hexano, se sometieron a ultrasonido durante 15 minutos a temperatura de 23-24 °C; seguidamente se hicieron repeticiones con el mismo volumen y tiempo hasta completar 200 ml; luego se concentró en un evaporador rotatorio de vacío, marca Heidolph modelo Laborota 400-1, a

temperatura de 30 °C a 150 rpm; hasta alcanzar un volumen aproximado de 10 ml, obteniéndose el extracto global (F_1), que se transfirió a viales, los cuales se sellaron y se mantuvieron en refrigeración hasta su análisis.

Fraccionamiento del extracto global de la materia orgánica del $PM_{2.5}$. Para el fraccionamiento del extracto global, se utilizó una columna de silicagel (Yang et al. 2010). La sílica tuvo un tratamiento térmico de ocho días a 170 °C y dos días a 110 °C. Después del tratamiento, se acondiciona una columna de vidrio con 10 g de sílica. Posteriormente en la columna ya preparada, se agregan 5 ml del extracto global. Para la elución de la columna se agregan 200 ml de diclorometano, obteniéndose la fracción 1 (F_1); 200 ml de una mezcla diclorometano-hexano (3:1, v/v) obteniéndose la fracción 2 (F_2); y 200 ml de hexano obteniéndose la fracción 3 (F_3). Para los análisis mutagénicos y genotóxicos se usaron tres concentraciones no tóxicas: dosis 1 (100 μ g, D_1); dosis 2 (200 μ g, D_2) y dosis 3 (500 μ g, D_3). Para verificar la reproducibilidad de los resultados, se realizaron tres experimentos independientes, cada uno por duplicado.

Detección de la actividad mutagénica. El efecto mutagénico de los extractos del $PM_{2.5}$ del aire de Villa del Rosario, se determinó por medio de la prueba de Ames, usando el protocolo descrito por (Mortelmans y Zeiger 2000). 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 usaron las cepas de *Salmonella typhimurium* TA98 y TA100. Como control positivo se utilizó 4-nitroquinolina óxido (4-NQO) y como control negativo se usó dimetil sulfoxido (DMSO) al 12%. Para determinar la mutagenicidad se calculó la razón de mutagenicidad (**RM**), que es la relación de los revertantes inducidos por el tratamiento (**RI**) con los revertantes espontáneos en el control (**RE**), así: $RM = RI/RE$. La respuesta positiva se catalogó cuando hubo incremento significativo de revertantes con relación al control negativo.

Detección del daño en el ADN. Para detectar ruptura del ADN se utilizó el ensayo cometa o electroforesis en gel de células individuales, según metodología propuesta por Pandrangi et al. (1995). 200 μ l de suspensión de células (5×10^4 células) se incubaron durante 1 h con el extracto de PM a ensayar. Después de la incubación, se extrajeron 10 μ l y se mezclaron con 75 ml de agarosa punto de fusión bajo (**APFB**) al 0,5% (p/v), esta suspensión se pipeteo sobre portaobjetos previamente impregnados con agarosa de punto de fusión normal. Las placas se incuban a 4 °C por seis minutos, para luego agregarle 100 μ l de APFB, e incubar nuevamente seis minutos a 4 °C.

Luego los portaobjetos se sumergieron en solución de lisis fresca (2,5 mM 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. Después de la lisis, los portaobjetos son llevados a una cámara de electroforesis horizontal con tampón alcalino (pH 13) durante 30 minutos, luego se corrió la electroforesis a 25 V y 300 mA durante 30 minutos. Los portaobjetos se tiñeron con bromuro de etidio (0,02 μ g/ μ l) y se observaron a 400X en microscopio de fluorescencia. 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 25 μ m que es la longitud total producida por otros factores diferentes al tratamiento. 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. Se realizaron cuatro experimentos por cada tratamiento y en cada uno se contaron 100 células. Como control positivo se utilizó el peróxido de hidrógeno 25 mM y como control negativo se utilizó DMSO al 12% (p/v). Como las concentraciones ensayadas en la prueba de Ames fueron tóxicas para las células usadas en la determinación de la actividad genotóxica, se seleccionaron dosis subtóxicas de 12,5, 25 y 50 μ g, tanto para el extracto global como para cada una de las fracciones.

Análisis estadístico. Se utilizó la prueba de Dunnett para determinar el nivel de significancia entre el tratamiento y el control. Las diferencias de las medias se consideraron significativas con un $p < 0,05$.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la tabla 1, se muestra la actividad mutagénica inducida por diferentes fracciones de material particulado (**FPM**) con las cepas TA98 y TA100. Los datos muestran incremento significativo con $p < 0,05$, en la mutagenicidad para las dosis D_2 y D_3 , en cada una de las fracciones analizadas. La fracción total (F_1) y la fracción eluida con diclorometano (F_3), presentaron mayor razón de mutagenicidad en la cepa TA98, en la que principalmente se da mutación por pérdida o ganancia de bases. Los resultados observados, se pueden atribuir a agentes mutagénicos presentes en el PM que pueden alterar el marco de lectura u originar sustitución de bases; dichos agentes pueden ser derivados nitro-aromáticos, HPA, metales y agentes cancerígenos amino (Janistcki et al. 2009, Kawanaka et al. 2008). Gran parte de la actividad mutagénica encontrada en este estudio podría ser debida a dinitropirenos, compuestos que no requieren activación metabólica y lesionan el ADN

originando pérdida o ganancia de bases (Kawanaka et al. 2008). Estos resultados son similares a los encontrados en las muestras de PM_{2,5} del aire de la ciudad de Pamplona (Norte de Santander; Meléndez et al. 2012).

Tabla 1. Actividad mutagénica inducida por diferentes fracciones de material particulado (FMP) provenientes del municipio de Villa de Rosario (Norte de Santander), Colombia {RM = razón de mutagenicidad; TA98 y TA100: cepas; F_T: fracción total; F₁: fracción 1 (eluida con n-hexano); F₂: fracción 2 [eluida con n-hexano/DCM (3:1) (v/v)]; F₃: fracción 3 (eluida con DCM); D₁: dosis 1 (100 µg); D₂: dosis 2 (200 µg); D₃: dosis 3 (500 µg); * = diferencia significativa con p < 0,05]}

FMP	RM en <i>Salmonella typhimurium</i>		
	TA98	TA100	
F _T	D ₁	1,24	1,23
	D ₂	4,98*	3,18*
	D ₃	6,93*	5,31*
F ₁	D ₁	1,27	1,21
	D ₂	2,10*	1,84
	D ₃	3,27*	2,49*
F ₂	D ₁	1,32	1,37
	D ₂	3,47*	2,80*
	D ₃	5,38*	3,60*
F ₃	D ₁	1,31	1,26
	D ₂	6,10*	3,46*
	D ₃	6,34*	4,78*

El solvente que mostró mayor eficiencia en la elusión de compuestos potencialmente mutagénicos fue el diclorometano (F₃D₃), comparado con hexano (F₁D₃) y la mezcla n-hexano/diclorometano (3:1) (v/v) (F₂D₃).

En la tabla 2, podemos observar los resultados de la genotoxicidad después de analizar 400 núcleos/fracción/dosis. En cada una de ellas se muestra el promedio de los datos y la desviación estándar. Los datos muestran que el daño genotóxico incrementa significativamente (p < 0,05), a medida que aumenta la concentración del PM.

Se puede observar que la dosis mayor de la fracción total (F_T) y las dosis mayores de las fracciones eluidas con hexano/DCM (F₂) y DCM (F₃), presentan daño genético alto, reflejado en las longitudes de los cometas con una p < 0,05, los cuales superan los 100 µm. Para todas las

Tabla 2. Promedio del daño genotóxico inducido por muestras de material particulado (PM_{2,5}) en el municipio de Villa de Rosario (Norte de Santander), Colombia [El daño se cuantificó como el promedio de la longitud de la cola (LP) en 300 células analizadas. Se realizaron tres ensayos, cada uno por duplicado: F_T: fracción total; F₁: fracción 1 (eluida con n-hexano); F₂: fracción 2 [eluida con n-hexano/DCM (3:1) (v/v)]; F₃: fracción 3 (eluida con DCM); D₁: dosis 1 (12,5 µg); D₂: dosis 2 (25 µg); D₃: dosis 3 (50 µg); C⁻ = control negativo, se usó dimetil sulfóxido (DMSO) al 1%; como control positivo se usó peróxido de hidrógeno 25 mM; DE = desviación estándar; * = diferencia significativa con p < 0,05]

FMP		LP de daño ± DE
F _T	D ₁	93,23 ± 20*
	D ₂	99,31 ± 25*
	D ₃	110,27 ± 27*
F ₁	D ₁	27,29 ± 10
	D ₂	33,67 ± 12
	D ₃	40,55 ± 10
F ₂	D ₁	82,43 ± 15*
	D ₂	93,32 ± 14*
	D ₃	107,98 ± 17*
F ₃	D ₁	100,89 ± 20*
	D ₂	123,53 ± 22*
	D ₃	133,35 ± 18*
C ⁻	C ⁻	23,00 ± 5

muestras analizadas podemos observar incremento en la genotoxicidad a medida que aumenta la dosis con p < 0,05.

El daño causado al material genético por las muestras de aire analizadas, muy posiblemente es inducido por los compuestos químicos presentes en el PM_{2,5}. En estudios recientes se encontró correlación directa entre la genotoxicidad de las partículas respirables PM_{2,5} determinada como los niveles de aductos en el ADN y la presencia de HPA, especialmente el benzo(a)pireno (BaP) (Topinka et al. 2011). Teniendo en cuenta, que en estas muestras de aire ya se identificaron algunos HAP (Quijano et al. 2015), la respuesta genotóxica encontrada la podemos atribuir a la presencia de compuestos como el BaP. La actividad genotóxica de estos compuestos se da a través de la biotransformación a reactivos intermedios que se enlazan covalentemente al ADN induciendo rupturas en sus cadenas, lo que trae como consecuencia la promoción de alteraciones en el ADN (Zhang et al. 2011). Los resultados

de esta investigación sugieren que las muestras de aire provenientes del municipio de Villa del Rosario contienen compuestos químicos que inducen mutagenicidad y genotoxicidad. Teniendo en cuenta los criterios de la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer y la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos, que clasifican al BaP como cancerígeno para los humanos (IARC 1987, US EPA 2012), en la población del municipio de Villa del Rosario pueden aumentar los riesgos para la población urbana por su constante exposición al aire contaminado cada vez con mayores concentraciones de estos elementos carcinogénicos por el incremento del tráfico vehicular.

REFERENCIAS

- Arlt VM. 2005. 3-Nitrobenzanthrone, a potential human cancer hazard in diesel exhaust and urban air pollution: a review of the evidence. *Mutagenesis*, 20 (6): 399-410.
- Boström CE, Gerde P, Hanberg A, Jernstrom B, Johansson C, Kyrklund T, Rannug A, Tornqvist M, Victorin K, Westerholm R. 2002. Cancer risk assessments, indicators, and guidelines for polycyclic aromatic hydrocarbons in the ambient air. *Environmental Health Perspective*, 110 (3): 451-488.
- Enya T, Suzuki H, Watanabe T, Hirayama T, Hisamatsu Y. 1997. 3-Nitrobenzanthrone, a powerful bacterial mutagen and suspected human carcinogen found in diesel exhaust and airborne particles. *Environmental Science Technology*, 31 (10): 2772-2776.
- Greenwell LL, Moreno T, Jones TP, Richards RJ. 2002. Particle-induced oxidative damage is ameliorated by pulmonary antioxidants. *Free Radical Biology and Medicine*, 1 (32): 898-905.
- Ianisteki M, Dallarosa J, Sauer C, Teixeira CE, da Silva J. 2009. Genotoxic effect of polycyclic aromatic hydrocarbons in the metropolitan area of Porto Alegre, Brazil, evaluated by *Helix aspersa* (Müller, 1774). *Environmental Pollution*, 157 (7): 2037-2042.
- IARC (International Agency for Research on Cancer). 1984. Polynuclear aromatic compounds, Part 3, Industrial exposures in aluminium production, coal gasification, coke production, and iron and steel founding. Vol 34. Monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans. Lyon (France): World Health Organization International Agency for Research on Cancer. p. 222.
- Janssen NAH, Fischer P, Marra M, Ameling C, Cassee FR. 2013. Short-term effects of PM_{2.5}, PM₁₀ and PM_{2.5-10} on daily mortality in The Netherlands. *Science of The Total Environment*, 463-464: 20-26.
- Kaonga B, Kagabi NA. 2010. Investigation into presence of atmospheric particulate matter in Marikana, mining area in Rustenburg Town, South Africa. *Environmental Monitoring and Assessment*, 178 (1-4): 213-220.
- Kawanaka Y, Matsumoto E, Wang N, Yun S-J, Sakamoto K. 2008. Contribution of nitrated polycyclic aromatic hydrocarbons to the mutagenicity of ultrafine particles in the roadside atmosphere. *Atmospheric Environment*, 42 (32): 7423-7428.
- Künzli N, Perez L, Rapp R. 2010. *Air Quality and Health*. Lausanne (Switzerland): European Respiratory Society. World Health Organization. p. 89.
- Klaunig JE, Kamendulis LM. 2004. The role of oxidative stress in carcinogenesis. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 44: 239-267.
- Li N, Xia T, Nel AE. 2008. The role of oxidative stress in ambient particulate matter induced lung diseases and its implications in the toxicity of engineered nanoparticles. *Free Radical Biology and Medicine*, 44 (9): 1689-1699.
- Mehta S, Shin H, Burnett R, North T, Cohen AJ. 2013. Ambient particulate air pollution and acute lower respiratory infections: a systematic review and implications for estimating the global burden of disease. *Air Quality, Atmosphere, and Health*, 6 (1): 69-83.
- Meléndez-Gélvez I, Martínez-Montañez ML, Quijano-Parra A. 2012. Actividad mutagénica y genotóxica en el material particulado fracción respirable MP_{2,5} en Pamplona, Norte de Santander, Colombia. *Iatreia*, 25 (4): 347-356.
- Mortelmans K, Zeiger E. 2000. The Ames Salmonella/microsome mutagenicity assay. *Mutation Research*, 455 (1-2): 29-60.
- Nel A. 2005. Atmosphere. Air pollution-related illness: effects of particles. *Science*, 308 (5723): 804-806.
- Novotna B, Topinka J, Solansky I, Chvatalova I, Lnenickova Z, Sram RJ. 2007. Impact of air pollution and genotype variability on DNA damage in Prague policemen. *Toxicology Letters*, 172 (1-2): 37-47.
- Pandurangi R, Petras M, Ralph S, Vrzoč M. 1995. Alkaline single cell gel (comet) assay and genotoxicity monitoring using bulheads and carp. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 26 (4): 345-356.
- Quijano-Parra A, Quijano-Vargas MJ, Meléndez-Gélvez I. 2015. Genotoxicidad de los contaminantes prioritarios en el aire de Villa del Rosario-Norte de Santander, Colombia. *Revista Universidad y Salud*, 17 (1): 69-79.
- Raaschou-Nielsen O, Andersen ZJ, Beelen R, Samoli E, Stafoggia M, Weinmayr G, Hoffmann B, Fischer P, Nieuwenhuijsen MJ, Brunekreef B, Xun WW, Katsouyanni K, Dimakopoulou K, Sommar J, Forsberg B, Modig L, Oudin A, Oftedal B, Schwarze PE, Nafstad P, De Faire U, Pedersen NL, Ostenson CG, Fratiglioni L, Penell J, Korek M, Pershagen G, Eriksen KT, Sørensen M, Tjønneland A, Ellermann T, Eeftens M, Peeters PH, Meliefste K, Wang M, Bueno-de-Mesquita B, Key TJ, de Hoogh K, Concin H, Nagel G, Vilier A, Grioni S, Krogh V, Tsai MY, Ricceri F, Sacerdote C, Galassi C, Migliore E, Ranzi A, Cesaroni G, Badaloni C, Forastiere F, Tamayo I, Amiano P, Dorronsoro M, Trichopoulos A, Bamia C, Vineis P, Hoek G. 2013. Air pollution and lung cancer incidence in 17 European cohorts: prospective analyses from the European Study of Cohorts for Air Pollution Effects (ESCAPE). *The Lancet Oncology*, 14 (9): 813-822.
- Shah ASV, Langrish JP, Nair H, McAllister DA, Hunter AL, Donaldson K, Newby DE, Mills NL. 2013. Global association of air pollution and heart failure: a systematic review and meta-analysis. *The Lancet*, 382 (9897): 1039-1048.
- Sevastyanova O, Novakova Z, Hanzalova K, Binkova B, Sram RJ, Topinka J. 2008. Temporal variation in the genotoxic potential of urban air particulate matter. *Mutation Research*, 649 (1-2): 179-186.

- Silva RA, West JJ, Zhang Y, Anenberg SC, Lamarque J-F, Shindell DT, Collins WJ, Dalsoren S, Faluvegi G, Folberth G, Horowitz LW, Nagashima T, Naik V, Rumbold S, Skeie R, Sudo K, Takemura T, Bergmann D, Cameron-Smith P, Cionni I, Doherty RM, Eyring V, Josse B, MacKenzie IA, Plummer D, Righi M, Stevenson DS, Strode S, Szopa S, Zeng G. 2013. Global premature mortality due to anthropogenic outdoor air pollution and the contribution of past climate change. *Environmental Research Letters*, 8: 034005 (11pp.). DOI: 10.1088/1748-9326/8/3/034005.
- Slezakova K, Castro D, Begonha A, Delerue-Matos C, Alvim-Ferraz MdC, Morais S, Pereira MdC. 2011. Air pollution from traffic emissions in Oporto, Portugal: Health and environmental implications. *Microchemical Journal*, 99 (1): 51-59.
- Traversi D, Degan R, De-Marco R, Gilli G, Pignata C, Villani S, Bono R. 2009. Mutagenic properties of PM_{2.5} urban pollution in Northern Italy: the nitro-compounds contribution. *Environment International*, 35 (6): 905-910.
- Topinka J, Rossner PJr, Milcova A, Schmuczerova J, Svecova V, Sram RJ. 2011. DNA adducts and oxidative DNA damage induced by organic extracts from PM_{2.5} in an acellular assay. *Toxicology Letters*, 202 (3): 186-192.
- U.S. EPA. 2004. Air quality criteria for particulate matter (Final Report, Oct 2004). Washington, D. C.: U.S. Environmental Protection Agency. EPA 600/P-99/002aF-bF, 2004.
- WHO/IPCS (Kielhorn J, Wahnschaffe U, Mangelsdorf I). 2003. Selected nitro- and nitro-oxy-polycyclic aromatic hydrocarbons. *Environmental Health Criteria*, 229: 1-480 [Internet]. Geneva (Italy): United Nations Environment Programme, International Labour Organization, World Health Organization, Inter-Organization Programme for the Sound Management of Chemicals. Accessed: 3 May 2016. Available from: <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/42537/1/WHO_EHC_229.pdf>.
- Yang XY, Igarashi K, Tang N, Lin JM, Wang W, Kameda T, Toriba A, Hayakawa K. 2010. Indirect- and directacting mutagenicity of diesel, coal and wood burning-derived particulates and contribution of polycyclic aromatic hydrocarbons and nitropolycyclic aromatic hydrocarbons. *Mutation Research*, 695 (1-2): 29-34.
- Zhang Y, Yang B, Gan J, Liu C, Shu X, Shu J. 2011. Nitration of particle-associated PAHs and their derivatives (nitro-, oxy-, and hydroxy-PAHs) with NO₃ radicals. *Atmospheric Environment*, 45 (15): 2515-2521.