



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

**Evaluación de la citotoxicidad y  
genotoxicidad del material químico en filtros  
PM<sub>2.5</sub> de las estaciones de monitoreo de la  
red de calidad del aire del Valle de Aburrá**

**Alejandra Betancur Sánchez**

**Universidad Nacional de Colombia  
Sede Medellín  
Facultad de Minas  
Departamento de Geociencias y Medio Ambiente  
Medellín, Colombia  
2016**



# **Evaluación de la citotoxicidad y genotoxicidad del material químico en filtros PM<sub>2.5</sub> de las estaciones de monitoreo de la red de calidad del aire del Valle de Aburrá**

**Alejandra Betancur Sánchez**

Trabajo de investigación presentado como requisito parcial para optar al título de:

**Magíster en Medio Ambiente y Desarrollo**

Director:

MSc. Juan Bautista López Ortiz

Codirectora:

MSc. Carmen Elena Zapata Sánchez

Líneas de Investigación:

Contaminación atmosférica

Bioactividad de Productos Naturales y Sintéticos

Grupos de Investigación:

Biotechnología Animal

Red-Aire UNAL

Universidad Nacional de Colombia

Sede Medellín

Facultad de Minas

Departamento de Geociencias y Medio Ambiente

Medellín, Colombia

2016



*“La contaminación del agua y del aire  
contaminan incluso la mente humana”*

*Kurosawa*



## **Agradecimientos**

Agradezco principalmente a mis padres por su apoyo durante toda mi formación profesional.

Al profesor Juan Bautista López, quien me dio la oportunidad de llevar a cabo este proyecto.

A la profesora Carmen Elena Sánchez, por confiar en mí y apoyarme en una decisión tan importante al momento de definir el rumbo de mi maestría.

A la profesora Maria Elena Márquez por la ayuda en las correcciones de este manuscrito.

A Yudrum Militza por entrenarme en el laboratorio y brindarme su amistad y apoyo durante todo este tiempo.

A Suly Saray Villa por el apoyo en la parte de test cometa y en el análisis estadístico.

A Duvan Nanclares por el apoyo, amistad y colaboración en el proyecto.

A Isabel Ortega por apoyarme en las extracciones del material particulado.

Agradezco además al Laboratorio de calidad del aire-CALAIRE y al Laboratorio de Genética así como al Área Metropolitana del Valle de Aburrá por brindarme los espacios y medios para poder realizar esta tesis de maestría.

Agradezco a todos aquellos que confiaron en mí y estuvieron conmigo en los momentos más difíciles del desarrollo de este proyecto.





## Resumen

El aumento de la contaminación del aire y sus efectos adversos han generado preocupación acerca de las políticas de regulación y ha fomentado el desarrollo de nuevas normas sobre calidad del aire (Coronas et al., 2009). Los compuestos tóxicos ambientales pueden ejercer varios efectos desde la irritación hasta la muerte de células y tejidos, sin embargo, algunos genotóxicos producen alteraciones en el material genético o en sus componentes asociados, lo que provoca mutaciones o interfieren con algunos procesos de reparación o polimerización involucrados en la segregación cromosómica (Du Four, Van Larebeke, & Janssen, 2004). El objetivo de este estudio, fue evaluar el efecto sobre la viabilidad y el potencial genotóxico sobre las líneas celulares CHO-K1 y Jurkat y sobre linfocitos T de sangre periférica del material particulado PM<sub>2.5</sub> obtenido de filtros colectados de tres estaciones de monitoreo de la red de calidad del aire del Valle de Aburrá. Las pruebas realizadas, reducción de MTT, azul de tripano, captación de rojo neutro, ensayo cometa, intercambio de cromátidas hermanas (ICH) y aberraciones cromosómicas permitieron evidenciar reducción en la viabilidad celular en las líneas celulares CHO-K1 y Jurkat y daño sobre el ADN de la línea celular CHO-K1, sin embargo, no se observaron efectos significativos en el número de ICHs y de aberraciones cromosómicas. Los resultados sugieren que el material PM<sub>2.5</sub> tiene potencial genotóxico y puede inducir desarrollo de cáncer, tal como se ha sugerido en otros estudios.

**Palabras clave:** material particulado, viabilidad celular, daño en el ADN.

## Abstract

Increased air pollution and its adverse effects have raised concerns about regulatory policies and has encouraged the development of new air quality standards (Coronas et al., 2009). Environmental toxic compounds can have various effects from irritation to death of cells and tissues, however, some genotoxic produce alterations in the genetic material or associated components, causing mutations or interfere with some repair processes or polymerization involved in chromosome segregation (Du Four, Van Larebeke, & Janssen, 2004). The aim of this study was to evaluate the effect on the viability and the genotoxic potential on the cell lines CHO-K1 and Jurkat and peripheral blood of particulate matter PM T lymphocytes 2.5 obtained from filters collected three monitoring stations network air quality Aburrá Valley. Tests, reduction of MTT, trypan blue, NRU, comet assay, sister chromatid exchange (SCE) and chromosomal aberrations allowed evidence reduction in cell viability in cell lines CHO-K1 and Jurkat and damage to the DNA from cell line CHO-K1, however, no significant effects were observed in the number of SCEs and chromosomal aberrations. The results suggest that PM2.5 material has genotoxic potential and can induce cancer development, as has been suggested in other studies

**Keywords:** particulate contaminant, cell viability, DNA damage

# Contenido

	Pág.
Resumen .....	IX
Lista de figuras.....	XIII
Lista de tablas .....	XIV
Introducción .....	1
<b>1. Antecedentes.....</b>	<b>5</b>
<b>2. Marco teórico.....</b>	<b>11</b>
2.2 Estaciones de monitoreo de la calidad del aire del Valle de Aburrá.....	13
2.3 Análisis del potencial citotóxico y genotóxico.....	14
<b>3. Objetivos.....</b>	<b>18</b>
3.1 Objetivo general.....	18
3.2 Objetivos específicos .....	18
<b>4. Metodología.....</b>	<b>19</b>
4.1 Sitios de estudio .....	19
4.2 Obtención de PM <sub>2.5</sub> de los filtros .....	20
4.2.1 Extracción mediante equipo Soxhlet .....	20
4.2.2 Extracción por ultrasonido.....	20
4.3 Tratamientos con PM <sub>2.5</sub> .....	21
4.4 Cultivos celulares .....	21
4.5 Pruebas de viabilidad .....	21
4.5.1 Prueba MTT .....	21
4.5.2 Prueba de Azul de Tripano.....	22
4.6 Pruebas de genotoxicidad .....	23
4.6.1 Aberraciones cromosómicas. ....	23
4.6.2 Intercambio de cromátidas hermanas (ICH) .....	23
4.7 Análisis estadístico .....	25
4.8 Formulación del protocolo de salud ambiental.....	25
<b>5. Resultados y discusión .....</b>	<b>27</b>
5.1. Prueba MTT.....	27
5.2 Prueba azul de tripano .....	28
5.3 Prueba de captación de rojo neutro.....	30
5.4 Electroforesis alcalina en gel de células individuales.....	31
5.5 Intercambio de cromátidas hermanas (ICH) .....	32

---

5.6 Aberraciones cromosómicas .....	32
5.7 Propuesta protocolo de salud ambiental .....	33
<b>6. Conclusiones y recomendaciones .....</b>	<b>36</b>
6.1. Conclusiones.....	36
6.2. Recomendaciones.....	36
<b>Bibliografía .....</b>	<b>37</b>

## Lista de figuras

	Pág.
<b>Figura 1-1.</b> Comportamiento promedio diario de material particulado PM <sub>2.5</sub> . Estación MED-UNFM. Fuente: AMVA – UN, 2015. ....	10
<b>Figura 4-1</b> Ubicación geográfica de las estaciones de la Red de Calidad de Aire del Valle de Aburrá que monitorean PM <sub>2.5</sub> . <i>Fuente: Tomada de Google Earth, 2015.</i> .....	20
<b>Figura 5-1</b> Porcentaje de viabilidad mediante MTT en (A) células CHO-K1 (B) células Jurkat tratadas con diferentes concentraciones de extractos de filtros PM <sub>2.5</sub> obtenidos de 3 estaciones de monitoreo en el Valle Aburrá. ....	27
<b>Figura 5-2</b> Viabilidad por Azul de Tripano de células CHO-K1 y Jurkat tratadas con diferentes concentraciones de extractos de filtros PM <sub>2.5</sub> obtenidos de (A) Estación MED-UNFM (B) Estación MED-PJIC (C) Estación BAR-PDLA.....	29
<b>Figura 5-3</b> Viabilidad por captación de rojo neutro en CHO-K1 tratadas con extractos de filtros PM <sub>2.5</sub> muestreados en las estaciones MED-UNFM, MED-PIJC y BAR-PDLA ene l Valle de Aburrá.....	30
<b>Figura 5-4</b> Porcentaje de daño en ADN obtenido por ensayo cometa en células CHO-K1 tratadas con PM <sub>2.5</sub> de los filtros de tres estaciones del Valle de Aburrá. ....	31
<b>Figura 5-5</b> Número de ICH en linfocitos de sangre periférica tratadas con PM <sub>2.5</sub> de filtros de tres estaciones del Valle de Aburrá.....	32
<b>Figura 5-6</b> Índice mitótico en linfocitos de sangre periférica tratadas con PM <sub>2.5</sub> de filtros de tres estaciones del Valle de Aburrá. ....	33
<b>Figura 5-7</b> Propuesta de protocolo de salud ambiental, para monitoreo de contaminación de material particulado PM <sub>2.5</sub> . ....	34

## Lista de tablas

Pág.

<b>Tabla 2-1</b> Límites máximos permisibles para PM <sub>2.5</sub> .....	14
---	----

## Introducción

El crecimiento económico y la globalización han originado beneficios a la humanidad y al mismo tiempo han generado nuevos riesgos. La medición de la exposición a numerosos factores ambientales es compleja porque no disponemos de sistemas adecuados de información y vigilancia sanitaria que permitan valorar la magnitud y gravedad de los riesgos, así como la relación causal entre medio ambiente y salud (Vargas, 2005). Por lo anterior se ha aumentado la preocupación acerca de las políticas de regulación y se ha fomentado el desarrollo de nuevas normas sobre la calidad del aire (Coronas et al., 2009).

La concentración elevada de contaminación por partículas finas se relaciona con mortalidad elevada por enfermedades cardíacas, afecciones respiratorias y cáncer. La evaluación de partículas con diámetro iguales o menores a  $2,5\mu\text{m}$  ( $\text{PM}_{2,5}$ ) es el indicador más adecuado para calcular los riesgos de la contaminación atmosférica (CORDIS, 2014). El material particulado (MP) se ha asociado con la muerte y enfermedades cardiopulmonares en pacientes de tercera edad con condiciones respiratorias pre-existentes (fumadores y asmáticos) (Gillespie et al., 2013). Numerosos estudios en animales, muestran que la inhalación de MP causa toxicidad inflamatoria de las vías respiratorias (Chen et al., 2010).

El incremento en la concentración de contaminantes atmosféricos debido principalmente a las emisiones de la industria, altera la sensibilidad de los organismos, ocasionando mutaciones y cáncer. La contaminación del aire incrementa el riesgo de la salud pública, principalmente por las dificultades en la identificación de los componentes tóxicos de la mezcla compleja que constituye el MP y el poco conocimiento de las sustancias genotóxicas asociadas a éste (Zuluaga et al., 2009). La emisión de partículas finas de los procesos industriales a la atmósfera, inducen daño al ADN celular, no obstante, son muy

limitadas las evaluaciones de la composición química, tamaño, forma de las partículas y la toxicidad de las fuentes y zonas de estudio específicas (Jayasekher, 2009).

En la actualidad, varios componentes del MP como los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP), los metales y sales inorgánicas, son considerados responsables de efectos adversos en la salud ya que son carcinógenos y citotóxicos. A nivel mundial, se estima que el MP causa aproximadamente el 3% de los problemas cardiopulmonares y el 5% de las muertes por cáncer de pulmón (WHO, 2013), además, algunos de los contaminantes atmosféricos requieren activación metabólica del huésped a través de enzimas como citocromo P450 y epóxido hidrolasa, para producir especies electrofílicas altamente reactivas capaces de causar efectos mutagénico, tumorigénico y carcinogénico en ácidos nucleicos y proteínas y (Xue & Warshawsky, 2005).

En 2013, el Centro Internacional de Investigaciones en Cáncer de la OMS reconoció que las partículas del aire contaminado están estrechamente relacionadas con la creciente incidencia del cáncer de pulmón, de vías urinarias y vejiga. En 2012, se estimó que en las ciudades y zonas rurales del mundo, la contaminación atmosférica provoca 3,7 millones de defunciones prematuras/año debida a la exposición a partículas de  $10\mu\text{m}$  o menos de diámetro ( $\text{PM}_{10}$ ) causantes de cardiopatías, neumopatías y cáncer (WHO, 2014), además, la evaluación de partículas con diámetro de  $2,5\ \mu\text{m}$  o menos ( $\text{PM}_{2,5}$ ) constituye el indicador más adecuado para calcular los riesgos de la contaminación atmosférica (CORDIS, 2014).

La contaminación por partículas representa un gran problema en centros urbanos debido a la alta densidad de población, lo que hace rugosa la superficie de las ciudades, dificultando el movimiento del flujo atmosférico y la dispersión de los contaminantes y su acumulación en determinados puntos de la ciudad. El incremento de contaminantes en zonas urbanas como el Valle de Aburrá aumenta los riesgos en salud pública por las características topográficas de ser un valle semi-cerrado y estrecho en el cual se dan fenómenos de inversión térmica, ya que durante el día se calienta la atmósfera cercana a la superficie terrestre y en las noches baja la temperatura y el frío desciende por las laderas, eleva el aire caliente y acumula contaminantes en el Valle. La inversión térmica, por lo tanto, detiene el ascenso y dispersión de los contaminantes ocasionando un problema localizado del aire (Enkerlin et al., 1997)



En los años 70s, los estudios realizados en el Valle de Aburrá se centraron en el diagnóstico y evaluación ambiental. A finales de los 90s, los estudios comenzaron a caracterizar y clasificar como *contaminantes criterio* a los contaminantes perjudiciales de la salud y bienestar de las personas, dentro de los cuales se encuentra el  $PM_{2.5}$  (EPA, 2001). Desde el 2001, el Área Metropolitana del Valle de Aburrá (AMVA) ha realizado estudios de la calidad del aire en convenio con diferentes universidades; dichos estudios han permitido la evaluación del control y vigilancia de fuentes fijas (2001), la formación de contaminantes fotoquímicos (2001), la identificación de episodios de contaminación atmosférica (2002), caracterización de emisiones de carbón (2005), caracterización de combustibles y su distribución (2005), inventario de emisiones atmosféricas (2005) y la evaluación y diagnóstico de diferentes contaminantes en el aire pero no se ha determinado el efecto del MP sobre la salud.

Herrera, et al (2006 y 2007) establecieron la asociación entre la concentración de varios contaminantes atmosféricos en la ciudad de Medellín y la presencia de patologías respiratorias en niños escolarizados. Se encontró que contaminantes como  $PM_{2.5}$ ,  $PM_{10}$ , hollín y plomo en el aire, aumentan el riesgo (49.3%) de sufrir infecciones respiratorias o crisis asmáticas. El Convenio de Asociación 243 de 2012 del AMVA realizó la evaluación y monitoreo de la calidad del aire del Valle de Aburrá para determinar el comportamiento de  $PM_{10}$  y  $PM_{2.5}$  en diferentes estaciones y su evolución a lo largo del tiempo. Por tal razón, en este trabajo, se trazaron los objetivos de evaluar el efecto citotóxico y genotóxico del MP en filtros  $PM_{2.5}$  de tres estaciones de monitoreo del Valle de Aburrá con el fin de correlacionar dicho efecto con el riesgo en salud pública y contribuir al conocimiento de la calidad del aire en este Valle.



## 1. Antecedentes

Actualmente, la contaminación atmosférica es uno de los principales problemas que enfrenta el hombre; 1/5 de la población latinoamericana está expuesta a este tipo de contaminación. La falta de planeación urbana, el crecimiento demográfico y el aumento de automóviles, son algunas de las causas del aumento de los contaminantes atmosféricos que afecta a más de 80 millones de personas y es responsable de más de 2 millones de casos/año de enfermedades respiratorias en niños (Zuluaga et al., 2009).

El hollín y los alquitranes, productos de combustión del carbón fueron los primeros carcinógenos reconocidos (Lewtas, 2007). A principios de los 70's, la Agencia Internacional para la Investigación sobre el Cáncer (IARC) realizó la evaluación e identificación de los riesgos de los seres humanos a cancerígenos, sustancias químicas y mezclas complejas. Estos estudios mostraron que la presencia del MP está asociada al incremento del riesgo de muerte por causas cardiopulmonares en adultos (Pope, 2004).

Al ambiente atmosférico llegan diversas sustancias incluyendo genotóxicos que pueden afectar la salud humana (Pereira et al., 2010), de ahí que la exposición prolongada a altas concentraciones de MP aumente el riesgo de cáncer de pulmón, enfermedades respiratorias y arteriosclerosis, mientras que la exposición a corto plazo puede agudizar enfermedades respiratorias como bronquitis, asma, y el ritmo cardíaco. Se ha demostrado que las partículas más pequeñas son más tóxicas debido a su más alto contenido de materia orgánica y mayor capacidad de generar radicales libres (de Kok et al., 2006). Lo anterior hace que el MP se considere factor de riesgo en la salud causante de diferentes enfermedades.

Los mecanismos biológicos de estas asociaciones son desconocidos, sin embargo estudios toxicológicos *in vitro* han demostrado que el MP induce varios tipos de efectos citotóxico, mutagénico, daño en el ADN y estimulación de la producción de citoquinas pro-inflamatorias (de Kok et al., 2006), entre otros. Otros estudios relacionan la exposición al MP de los vehículos con muertes prematuras (Hoek et al., 2002) enfermedades cardiovasculares (Laden et al., 2006) y cáncer de pulmón (Pope III & Dockery, 2006). Estudios en Río de Janeiro también mostraron una relación entre la exposición al MP y la mortalidad por cáncer de pulmón (Junger et al., 2005) y

evaluaciones de diferentes biomarcadores y células blanco sugieren que la contaminación del aire induce daño en el ADN de los seres humanos (Vineis, 2005). En Colombia, se ha reportado alta actividad mutagénica y genotóxica asociada con el MP respirable PM<sub>2.5</sub> captado cerca de una vía vehicular en Pamplona, Norte de Santander (Meléndez, Martínez, & Quijano, 2012).

Los compuestos orgánicos, especialmente HAPs, sulfatos, nitratos y determinados metales ocasionan el mayor impacto en la salud (Wichmann & Peters, 2000). Algunos estudios han sugerido que los efectos genotóxicos del MP son causados por HAPs y sus derivados, (Novotna et al., 2007), de modo que la exposición a largo plazo a estos agentes pueden producir lesiones al hígado, riñones y al sistema nervioso central, mientras que la exposición a corto plazo puede generar irritación de ojos y vías respiratorias, dolor de cabeza, mareo, trastornos visuales, fatiga, pérdida de coordinación, reacciones alérgicas de la piel, náusea y trastornos de la memoria (*Air quality guidelines for Europe, 2000*). Las partículas de tamaño inferior a 2.5µm alcanzan los alvéolos pulmonares por inhalación, donde se depositan y pueden causar infecciones o reacciones alérgicas (Stetzenbach, 2002).

Piraino et al. (2006) usando *Trifolium repens* como bioindicador de genotoxicidad del aire en la provincia italiana de Novara demostró que los HAPs interactúan covalentemente con centros nucleofílicos y causan daño en el ADN de los organismos vivos, inflamación pulmonar y afectan la coagulación sanguínea (Riediker et al., 2004). Otras investigaciones sugieren que la presencia de peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), anión superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) y el radical hidroxilo (OH<sup>-</sup>) en el PM<sub>2.5</sub> pueden generar estrés oxidativo en el sistema respiratorio. En los niveles más bajos de estrés, las enzimas antioxidantes protegen el pulmón y en niveles tóxicos puede causar muerte celular tipo apoptosis y necrosis (Li et al., 2003).

Los componentes metálicos del MP se encuentran en trazas, pero son altamente tóxicos porque poseen alto potencial para inducir estrés y daño oxidativo (Roig et al., 2013). Su biodisponibilidad y sus propiedades redox causan daños oxidativos en el sistema cardiopulmonar. Por otra parte, el hierro (Fe) y níquel (Ni) reaccionan con peróxidos, ocasionando la producción de radicales libres que pueden dañar el ADN y otras biomoléculas (Roig et al. 2013). Un reporte evidencia los efectos de PM<sub>2.5</sub> sobre el

sistema cardiovascular, asociado con cambios en marcadores inflamatorios e inmunes por aumento de estrés oxidativo, inflamación, deterioro de la modulación autónoma, la coagulación de la sangre y desequilibrio de linfocitos Th1/Th2 y de linfocitos Th17/T-reguladores (Wang et al., 2013).

En otro reporte de Italia, se asoció el aumento de partículas PM<sub>10</sub> y PM<sub>2.5</sub> con altos ingresos hospitalarios por afecciones cardiorrespiratorias en general (Biggeri et al., 2000). Otro estudio de Italia demostró que los óxidos y sales metálicas adheridos al MP causaron genotoxicidad y reducción de la proliferación de macrófagos (Poma et al., 2006), además, estimulan la expresión de oncogenes de células alveolares (Timblin et al., 2002). Otras publicaciones, resaltan que además del cáncer pulmonar, la exposición a largo plazo a MP desencadena rápida progresión de la EPOC, enfermedad pulmonar, estrés oxidativo pulmonar y sistémico, inflamación, aterosclerosis y enfermedad cardiovascular, cambios adversos en la función cardíaca, alteraciones vasculares y daño en el sistema inmune (Pope III & Dockery, 2006). Además, se han asociado el aumento de morbilidad y mortalidad del infarto de miocardio, arritmia y exacerbación de la insuficiencia cardíaca congestiva con la contaminación por PM<sub>2.5</sub> (Laumbach, 2010).

Por otro lado, los contaminantes del aire también afectan el desarrollo y crecimiento del feto en mujeres embarazadas (Schell et al., 2006), los metales pesados como el plomo causan efectos adversos en mujeres en estado de lactancia y aumenta los riesgos de aborto espontáneo, además es responsable de malformaciones congénitas y lesiones en el desarrollo del sistema nervioso, deterioro en el recién nacido y alteración de sus capacidades cognitivas (Bellinger, 2005). Asimismo, las dioxinas presentes en la mezcla compleja del MP se pueden transferir de la madre al feto a través de la placenta actuando como disruptores endocrinos que afectan el crecimiento y desarrollo del sistema nervioso central (Wang et al., 2004).

Otra investigación realizada en Buenos Aires mostró efectos citotóxico y proinflamatorio del MP en el sistema respiratorio, disminución de la viabilidad celular y aumento de la generación de radicales libres en una línea celular de pulmón (Orona et al., 2014). En Francia, Chakra et al. (2007) reportó mayor efecto genotóxico en partículas PM<sub>2.5</sub> que en PM<sub>10</sub> y mayor efecto en invierno que en el verano. Los individuos que viven en el área metropolitana de París muestran mayor genotoxicidad en sectores con alto tráfico. Otros estudios epidemiológicos han demostrado asociación de la exposición a PM<sub>2.5</sub> con la

incidencia de asma infantil y otros informes sugieren que la misma exposición puede promover el desarrollo o exacerbación de enfermedades alérgicas y respiratorias en ratones normales (Zhang et al., 2015). Algunos estudios también reportan sinergia entre la exposición combinada a contaminantes del aire y alérgenos (Baldacci et al., 2015).

Estudios toxicológicos sugieren que los efectos del MP están relacionados con sus propiedades físicoquímicas ya que pueden ejercer respuestas celulares diferenciales como inducción de antioxidantes, respuestas proinflamatorias y muerte celular (Akhtar et al., 2014). De hecho, la IARC y la OMS han clasificado al MP como carcinógeno Grupo 1 basado en la generación de tumores de pulmón después de una larga exposición a niveles de 10 a 30  $\mu\text{g}/\text{m}^3$  de PM<sub>2.5</sub> (Hamra et al., 2014), sin embargo, no todos los componentes de esta mezcla compleja pueden ser identificados y caracterizados, lo cual dificulta establecer su relación con el riesgo de la salud (Vaccari et al., 2015).

En 2013, la OMS reconoció que la contaminación del aire es determinante de la salud en los países en desarrollo y junto con aspectos social y económico, causan enfermedades en las regiones menos favorecidas de la sociedad ya que esta exposición está fuera del control de los individuos y requiere acciones de autoridades públicas a nivel nacional, regional e internacional (WHO, 2013).

En Colombia, la normativa ambiental se expidió en el documento CONPES 3550 (2008) en el que se establecen los “*Lineamientos para la formulación de la política integral de salud ambiental con énfasis en los componentes de calidad de aire, calidad de agua y seguridad química*”. La resolución 610 del 2010, modifica la Resolución 601 del 4 de abril de 2006 y rige actualmente los límites máximos permisibles anual ( $25\mu\text{g}/\text{m}^3$ ) y diario ( $50\mu\text{g}/\text{m}^3$ ) sobre la calidad del aire en el territorio nacional e incluye el material particulado PM<sub>2.5</sub> como *contaminante criterio*.

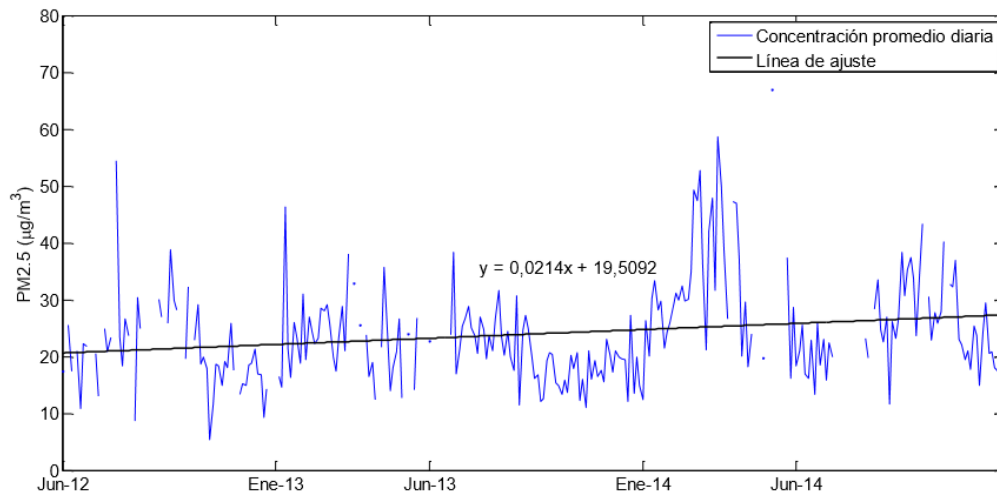
En el Valle de Aburrá (Medellín-Colombia) se realizaron estudios sobre la calidad del aire a través del Convenio de Asociación No 243 de 2012 del Área Metropolitana, con el cual se evaluó y monitoreó la calidad del aire para determinar el efecto de PM<sub>10</sub> y PM<sub>2.5</sub> en diferentes estaciones y su incremento a lo largo del tiempo. Se determinaron ligeros aumentos por encima de los límites máximos permisibles, concordante con el incremento en el ingreso de pacientes con infecciones respiratorias a centros hospitalarios.

El Convenio 243 del Área Metropolitana del Valle de Aburrá (2012) reportó aumentos en los límites permisibles del contaminante  $PM_{2.5}$  en la calidad del aire, establecidos en la Resolución 610 de 2010 del MAVDT para  $PM_{10}$ ,  $PM_{2.5}$ , ozono y dióxido de nitrógeno (AMVA, 2013). Los resultados del 2014 en las estaciones urbanas mostraron incremento de  $27,1 \mu\text{g}/\text{m}^3$  (2013) y  $32,0 \mu\text{g}/\text{m}^3$  (2014) en la concentración promedio anual de  $PM_{2.5}$ , superior a la norma anual colombiana (valor permisible  $PM_{2.5}=25 \mu\text{g}/\text{m}^3$ ) (AMVA-UNAL, 2015). Por otro lado, la contaminación intramural por el uso de combustibles y carbón en la preparación de alimentos, se relaciona con 1000 muertes/año y se estima que el 42% de los casos de EPOC coinciden con factores ambientales.

En Colombia, se estima que 1.5 billones de pesos anuales se invierten en salud pública, mortalidad y morbilidad por contaminación del aire, un problema mayor y costoso (CONPES, 2005). Por ejemplo, se han reportado 6000 muertes/año, 7400 nuevos casos de bronquitis crónica, 13000 hospitalizaciones y 255000 emergencias atribuidas a la contaminación atmosférica (Larner, 2004). El CONPES (2008) también concluyó que el  $PM_{2.5}$  deterioró la calidad del aire al superar los límites máximos permisibles anuales y diarios en la mayoría de estaciones del país (IDEAM, 2012). En Bogotá y el Área Metropolitana del Valle de Aburrá, representan más del 75% de la mortalidad (la mitad de la morbilidad atribuible a la contaminación atmosférica y la otra mitad a la morbilidad como tal). Cada año surgen 4,700 nuevos casos de bronquitis crónica atribuibles a la contaminación del aire urbano (Golub, 2012).

Por último, son ampliamente evaluados los efectos *in vitro* del MP en ciudades europeas y americanas, tales como la actividad mutagénica, intercambios de cromátidas hermanas (ICH) (Hornberg et al., 1998), ensayo de micronúcleos (Monarca et al., 1999), aberraciones cromosómicas (Hadnagy et al., 1989), aductos de ADN (de Kok et al., 2006) y ensayo cometa (Hsiao et al., 2000), entre otros.

La Figura 1 muestra el aumento en las concentraciones diarias promedio de  $PM_{2.5}$  (2012 y 2014) en la estación MED-UNFM. Algunos días superan el valor diario.



**Figura 1-1.** Comportamiento promedio diario de material particulado PM<sub>2.5</sub>. Estación MED-UNFM. Fuente: AMVA – UN, 2015.



## 2. Marco teórico

Los compuestos tóxicos son agentes ambientales con diversos efectos adversos desde la irritación hasta la muerte de células y tejidos. Estos agentes pueden ser calor, radiaciones, toxinas, algunos alcaloides o productos sintéticos (xenobióticos). Los agentes genotóxicos interactúan directa ó indirectamente con el ADN lo que provoca mutaciones, interfieren en procesos de reparación, en el inicio o polimerización de proteínas o en la segregación cromosómica (Du Four, Van Larebeke, & Janssen, 2004). Un contaminante del aire puede contribuir a la mortalidad o enfermedad grave y representar un peligro potencial permanente para la salud humana (Kampa & Castanas, 2008).

Las poblaciones humanas están expuestas a un amplio rango de mezclas ambientales complejas liberadas de fuentes industriales, del humo del cigarrillo, componentes tóxicos de alimentos asados, emisiones vehiculares, residuos de petróleo, entre otros. Debido a la exposición continua a estas mezclas ambientales, es imprescindible entender las interacciones potenciales de los componentes de las mismas y el efecto que éstas generan en la salud humana (USEPA, 1993).

Las principales fuentes *fijas* de contaminación del aire en las ciudades se atribuyen a la industria, los desechos domésticos, los agroquímicos, combustiones, entre otros, y las fuentes *móviles* por vehículos de motor de gasolina o diesel. Los contaminantes emitidos por ambas fuentes son sustancias inorgánicas como óxidos de azufre, nitrógeno, carbono y sustancias orgánicas adheridas a material particulado suspendido (MPS) constituido por los aerosoles (Quintero et al., 2009), suspensión de líquidos, sólidos, o múltiples fases de la materia condensada presentes en la atmósfera con tamaño aproximado de 0,001-100µm, la cual se determina por los procesos de formación y transformaciones fisicoquímicas que sufren en la atmósfera (Georgakopoulos et al., 2008).

El MP incluye partículas de diámetro aproximado a 100 µm. Las partículas entre 5 y 10µm provienen en su mayoría de fuentes naturales, mientras que las de 0.1 y 5µm de diámetro son productos de procesos a altas temperaturas como procesos de combustión en la industria y tráfico vehicular (Oliva, García, & Cortez, 2001).

Las partículas pequeñas de metales pesados e hidrocarburos que ingresan los alvéolos humanos pueden ser altamente tóxicas y cancerígenas. Dependiendo de su tamaño, se

agruparon en subcategorías, así las partículas totales suspendidas (TSP) con diámetros menores a 10µm se conocen como PM<sub>10</sub> o *fracción respirable* y partículas con diámetros menores a 2.5 µm (PM<sub>2.5</sub>) llamada *fracción inhalable* (Oliva et al., 2001). Los PM<sub>2.5</sub> y PM<sub>0.1</sub> al ser inhalado en los alvéolos pueden entrar en la circulación pulmonar y probablemente a la circulación sistémica, causando efectos adversos en el sistema cardiovascular (Miller et al., 2007). La principal vía por la que este material contribuye a un mayor riesgo cardiaco es el inicio y progresión aterosclerótica que puede conducir a isquemia del corazón, el cerebro o las extremidades (Suwa et al., 2002).

Los contaminantes atmosféricos se pueden clasificar en *primarios*, aquellos que se emiten de una fuente directa al ambiente mientras que los *secundarios* se forman en el ambiente, a través de reacciones químicas y fotoquímicas de los contaminantes primarios (Arbex et al., 2004). En las áreas urbanas el MP primario está conformado principalmente por hollín, emitido por el transporte automotor; el material de los caminos sin asfaltar y de operaciones de molienda de piedras, de construcción y metalurgia. Otros contaminantes primarios incluyen al dióxido de azufre (SO<sub>2</sub>), óxidos de nitrógeno (NOx) y monóxido de carbono (CO). Por otro lado, el MP secundario se forma en la atmósfera con partículas finas de gases, e incluye sulfatos, nitratos y carbón (EPA, 2004) otros componentes como el ozono y los aerosoles ácidos son también muy comunes en las áreas urbanas (Lippmann, 2003).

Por lo anterior, el MP resulta ser una mezcla compleja y heterogénea de elementos químicos y biológicos unidos a un núcleo de carbono que difieren en su composición química, propiedades de reacción, tiempo de desintegración y la capacidad de difundirse en distancias largas o cortas, además de los efectos que producen en salud pública (Kampa & Castanas, 2008).

## **2.1 Origen y composición del material particulado (MP)**

El MP es una mezcla compleja de productos químicos y partículas derivados de las emisiones de diesel utilizados en el tráfico vehicular. Estas partículas consisten en un núcleo de carbono elemental con una gran superficie a la que se adhieren cientos de productos químicos y metales de transición (Ji & Hershey, 2012). El MP contiene sólidos y líquidos que varían en número, tamaño, forma, superficie, composición química,

solubilidad y origen. Los tamaños del MP están dentro de un rango aerodinámico dando relevancia a la inhalación, la deposición, las fuentes o la toxicidad (Pope III & Dockery, 2006). El PM<sub>2.5</sub> posee partículas ultrafinas con diámetro menor a 0.1 µm, tienen vida muy corta (minutos a horas), crecen rápidamente (por coagulación y/o condensación) para formar agregados más grandes y formar parte del PM<sub>2.5</sub> (Pope III & Dockery, 2006), el cual también puede contener otros productos químicos como metales, sales, materiales carbonosos, orgánicos volátiles, compuestos volátiles (COV), HAPs y moléculas biológicas como endotoxinas (Billet et al., 2007).

## **2.2 Estaciones de monitoreo de la calidad del aire del Valle de Aburrá**

La Red de Monitoreo de Calidad del Aire del Valle de Aburrá (RMCAVA) está formada por 22 estaciones ubicadas en todo el Valle de Aburrá, en donde se miden los principales contaminantes de la atmósfera mediante equipos automáticos, semiautomáticos y manuales. Estos sitios de muestreo son fijos y cuenta con 8 medidores para cuantificar el MP<2.5 µm. Las estaciones de monitoreo se pueden clasificar de acuerdo a su ubicación el Valle, la *Estación de tráfico* se refiere a sitios ubicados de tal manera que mida las emisiones del tráfico cercano. La *Estación de Fondo* son estaciones ubicadas para medir la contribución de los vientos a la carga contaminante. Por ejemplo, se consideran estaciones de fondo, las ubicadas en un centro urbano a las afueras del Valle de Aburrá, con la influencia indirecta del tráfico, procesos de combustión debido a la dirección del viento, o estaciones de áreas rurales influenciadas por los vientos de centros urbanos o áreas industriales. Otros sitios considerados de fondo son estaciones influenciadas por vientos arriba de la fuente evaluada (AMVA-UN, 2015).

La Agencia de Protección del Medio Ambiente de Estados Unidos y la OMS han identificado *los contaminantes criterio* por su efecto perjudicial para la salud, tales como, dióxido de azufre, óxidos de nitrógeno, MP, óxido de carbono, ozono, compuestos orgánicos volátiles. En la Tabla 2-1, se muestran los límites máximos permisibles para PM<sub>2.5</sub> en el ámbito nacional e internacional.

**Tabla 2-1** Límites máximos permisibles para PM<sub>2.5</sub>. Fuente: (DICTUC 2009).

País	Límite Anual (µg/m <sup>3</sup> )	Limite Diario (µg /m <sup>3</sup> )	Entrada en vigencia
EE.UU	15	65	1997
	15	35	2006
Canadá		30	2010
Australia	8	25	2004
Ecuador	15	65	2003
México	15	65	2005
Perú	15	65	2001
		50	2010
		25	2014
OMS	10	25	2005
Unión Europea	25	--	2010
	20		2015
Colombia	15*	65*	--
	25	50	2010

Actualmente, la norma que rige estos límites máximos permisibles es la Resolución 610 de 2010 que considera el PM<sub>2.5</sub> como *contaminante criterio* y lo reglamenta para ser medido en el país, ya que antes de esto, sólo se regulaba el PM<sub>10</sub> y las PST. De la Tabla 2-1 se deduce que los límites más estrictos en estas determinaciones son los de la OMS y Australia.

## 2.3 Análisis del potencial citotóxico y genotóxico

### 2.3.1 Métodos de extracción de PM<sub>2.5</sub> de la mezcla compleja.

La evaluación citotóxica y genotóxica de la mezcla compleja de los filtros PM<sub>2.5</sub>, implica protocolos de extracción (Šrám et al, 1999) de las partículas de PM<sub>2.5</sub>; en algunos estudios se realiza con diclorometano en equipo soxhlet, luego se concentran los extractos en rotaevaporador al vacío. En el método, propuesto por Hamers et al. (2000) los filtros se desecan a 45% de humedad relativa, se pesan y se almacenan a -20°C. Otra técnica de extracción empleada para este tipo de muestra es la asistida por ultrasonido, la cual se fundamenta en el uso de sonidos de alta frecuencia, con el fin de desprender el compuesto de interés. Las partículas sólidas y líquidas vibran y se aceleran permitiendo el paso del soluto de la fase sólida al solvente (Gao & Liu, 2005).

### 2.3.2 Pruebas de viabilidad celular

Los protocolos que determinan la integridad de la membrana y del citoesqueleto, el metabolismo celular, síntesis y degradación de moléculas, la liberación de constituyentes celulares o productos, la regulación iónica y la división celular, se utilizan como medidas de viabilidad e integridad celular (Repetto, 2002).

- *Azul de tripano*

Esta prueba evalúa la integridad de la membrana celular, dado que el azul de tripano tiene alta afinidad por los lípidos de membrana. Cuando la célula presenta ruptura de membrana celular el colorante ingresa y la tiñe de azul (no viables), mientras que las células viables no tiñen con el colorante. Luego se realiza un conteo en el microscopio mediante cámara de Neubauer (UAH, 2008).

- *Prueba MTT*

El MTT (3-(4, 5-dimetiltiazol-2-y1) 2, 5-difenil bromuro de tetrazolio) es un ensayo colorimétrico para la medición de la viabilidad o citotoxicidad *in vitro* el cual ofrece importantes ventajas en velocidad, simplicidad, costo y seguridad. Además, es un método sensible, preciso, rápido y económico utilizado en muchos estudios (Wan et al. 1994). El principio de este ensayo consiste en la reducción del MTT a formazán por la enzima succinato deshidrogenasa determinada por un cambio en la coloración de amarillo soluble a púrpura insoluble. La capacidad de las células para reducir al MTT constituye un indicador de la integridad funcional de las mitocondrias y medida de la viabilidad celular (Jiménez, 2007). La cantidad de formazán generado es directamente proporcional al número de células viables.

- *Ensayo de captación de rojo neutro*

Esta prueba mide la toxicidad de un compuesto a corto o largo plazo basado en la liberación del colorante rojo neutro, por pérdida en la viabilidad celular. Este ensayo considera que un compuesto es citotóxico independientemente de su mecanismo de acción si interfiere con el proceso de división celular, lo cual se refleja en la inhibición del crecimiento celular o en el número de células presentes en el cultivo relacionado con la concentración del compuesto que se evalúa (índice de toxicidad). El rojo neutro es

captado y guardado por los lisosomas y endosomas (células viables) y en la medida en que la célula pierda la viabilidad por la acción del compuesto que se evalúa, se libera al medio el colorante (células no viables) (Reinecke & Helling, 2002).

### 2.3.3 Pruebas de genotoxicidad

Con las pruebas de genotoxicidad se evalúa el daño a nivel del genoma (cromosomas, cromátidas o la estructura del ADN) u otros cambios epigenéticos en los organismos desde la diferenciación en la expresión génica sin mutaciones del material genético relacionadas con el cambio.

- *Aberraciones cromosómicas*

Las aberraciones cromosómicas (AC) abarcan un amplio espectro de cambios en el ADN como consecuencia de la exposición humana a la radiación ionizante y otros agentes genotóxicos. En estudios epidemiológicos, se ha demostrado que las personas con frecuencias elevadas de AC en linfocitos de sangre periférica tienen un riesgo significativamente elevado de desarrollar cáncer (Obe et al., 2002), esto es debido a que la mayoría de las mutaciones espontáneas o inducidas en aberraciones cromosómicas específicas están relacionadas con exposición a agentes cancerígenos (Bailey & Bedford., 2006).

Las AC pueden ser estructurales o numéricas. Las roturas cromosómicas o entrecruzamiento desigual generan cromosomas en anillo, duplicaciones, translocaciones, inserciones e inversiones. Estos reordenamientos estructurales afectan el contenido y la forma de uno o más cromosomas alterando la distribución de los genes dentro del genoma, además, pueden alterar el ciclo celular y producir procesos neoplásicos (Moore & Best, 2001). Los mecanismos que inducen AC incluyen inhibidores de la síntesis de desoxirribonucleótidos, desnaturalización o degradación de ADN, producción de ADN lábil por incorporación química de precursores (HAC, intercalantes, pirimidinas halogenadas, hidrazida de ácido maleico, hidroxilamina) y eliminación de metales unidos al ADN (cianuro de potasio, 8-hidroxiquinolina) (Natarajan, 2002).

- *Ensayo cometa*

El ensayo cometa permite medir las roturas de ADN de cadena sencilla y doble cadena que ocasiona un determinado compuesto (Zúñiga, 2009), luego de eliminar proteínas, péptidos y carbohidratos de las células tratadas (Speit, Vasquez, & Hartmann, 2009). Las células evaluadas son embebidas en agarosa en una lámina portaobjetos, lisadas con detergente, tratadas con sales y sometidas a electroforesis. El ADN con quiebres se extiende hacia el ánodo, formando la “cola” del cometa mientras que el ADN intacto se mantiene en la “cabeza”, los cuales se hacen visibles en un microscopio de fluorescencia después de tinción del ADN con un fluorocromo (Azqueta et al., 2011). El daño causado en el material genético, generalmente es reparado enzimáticamente, pero el daño no reparado, se acumula y con el tiempo puede afectar mecanismos de control del ciclo celular, comunicación citoplasma-mitocondria, expresión génica, entre otros.

- *Intercambio de cromátidas hermanas (ICH)*

Inicialmente, los ICHs fueron descritos por Taylor (1957), pero Zakharov y Egolina (1972) encontraron que las células animales en cultivo podían duplicar dos veces su ADN, en presencia de 5-bromodeoxiuridina (BrdU), luego se sometía a tinción con Giemsa y se diferenciaban las cromátidas, una teñida de color claro y la otra de color oscuro, de ahí que la coloración diferencial permite visualizar los ICHs (Orta et al., 2008). Murty et al (1977) demostraron que la prueba de ICH era lo suficientemente sensible para evaluar el efecto mutagénico y/o carcinogénico de un compuesto (Valenciano, 1995). Desde 1971, las técnicas de bandeo cromosómico enriquecieron la técnica citogenética convencional, ya que permiten detectar pequeñas alteraciones estructurales no visualizadas con la tinción clásica. Algunos trabajos sobre diferentes tipos de alteraciones estructurales, por exceso (duplicaciones) o por defecto (delecciones), son referidas a uno o varios cromosomas, incluyendo las producidas *de novo* y derivadas de alteraciones balanceadas de origen parental (Martínez-Fernández et al. 2011).

Por lo anterior, el ensayo de número de ICH es un biomarcador para determinar el efecto de exposiciones de las células a agentes genotóxicos. Así la determinación del efecto genotóxico se obtiene contabilizando los ICHs observados en metafases de segundo ciclo (Ben Salah et al., 2011).

### **3. Objetivos**

#### **3.1 Objetivo general**

Determinar el potencial citotóxico y genotóxico de la contaminación atmosférica en el Valle de Aburrá en las líneas celulares CHO-K1 y Jurkat y su correlación con el riesgo en salud pública.

#### **3.2 Objetivos específicos**

3.2.1 Evaluar los efectos citotóxico y genotóxico del material químico contenido en los filtros PM<sub>2.5</sub> de las estaciones de monitoreo de la Red de Calidad de Aire del Valle de Aburrá.

3.2.2 Correlacionar los resultados obtenidos con los potenciales riesgos en salud pública.

3.2.3 Formular un protocolo de Salud Ambiental para evaluar el impacto de la genotoxicidad y citotoxicidad del componente químico presente en filtros PM<sub>2.5</sub>



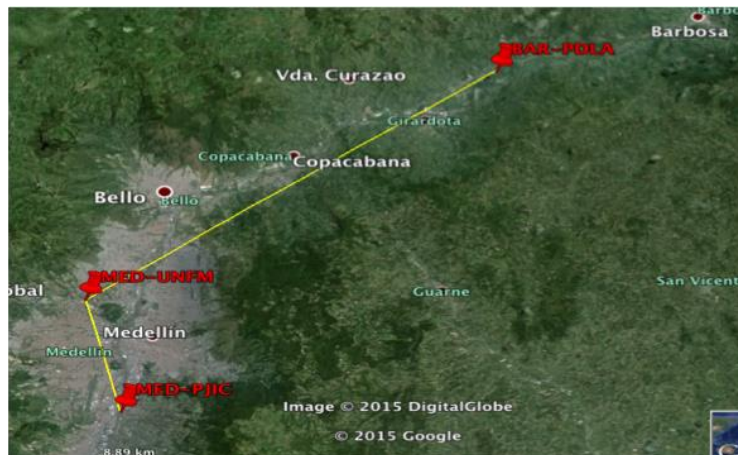
## 4. Metodología

### 4.1 Sitios de estudio

Para la recolección de las muestras se utilizaron equipos de muestreo de aire BGI PQ200 semiautomático y Partisol Plus 2025 los cuales captan el MP con un separador de PM<sub>2.5</sub> con filtros de teflón de 47mm de diámetro y tamaño de poro de 0.2 µm expuestos durante 24 horas. Los tres puntos de muestreo de la Red de Monitoreo de Calidad del Aire del Valle de Aburrá evaluados fueron:

- **Estación 1:** MED-UNFM (Facultad de Minas, Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín). Punto estratégico por su cercanía a la Carrera 80, una de las vías de mayor flujo vehicular de la ciudad y salida hacia los municipios del Occidente Antioqueño y la Costa Atlántica, sitio de gran afluencia de personas a las labores académicas en esta Sede de la Universidad. Además, es una zona residencial y en general, múltiples actividades se desarrollan en este sector. De la Estación 1, se analizaron 3 filtros de mayo a octubre de 2015.
- **Estación 2:** MED-PJIC (Politécnico Jaime Isaza Cadavid). Sitio cuyo propósito es hacer seguimiento en áreas de influencia directa del tráfico vehicular. De la Estación 2, se analizaron 5 filtros de mayo a octubre de 2015.
- **Estación 3:** BAR-PDLA (Parque de las Aguas, municipio de Barbosa (Antioquia)) evaluado como control de referencia, es una estación de fondo cuyo objetivo es determinar los niveles de contaminantes que ingresan al Valle de Aburrá. De la Estación 3, se analizaron 3 filtros de mayo a octubre de 2015.

En la Figura 4-1 se muestran la ubicación de las estaciones de monitoreo MED-UNFM, MED-PJIC y BAR-PDLA que se tuvieron en cuenta para este estudio.



**Figura 4-1** Ubicación geográfica de las estaciones de la Red de Calidad de Aire del Valle de Aburrá que monitorean PM<sub>2.5</sub>. Fuente: Tomada de Google Earth, 2015.

## 4.2 Obtención de PM<sub>2.5</sub> de los filtros

### 4.2.1 Extracción mediante equipo Soxhlet

El protocolo evaluado fue el reportado por Meléndez et al. (2012). Para la extracción Soxhlet, los solventes empleados fueron acetona y diclorometano (160 a 170 mL (1:1)) por 4 horas en dedales de celulosa. Luego, el extracto se rotaevaporó hasta aproximadamente 2mL, a 30°C y 150 rpm; se diluyó en DMSO puro y se mantuvo en refrigeración a 4°C en oscuridad hasta su posterior análisis.

### 4.2.2 Extracción por ultrasonido

La metodología fue la reportada por Sato et al. (1995) con modificaciones. Brevemente, por cada mg de filtro se usó 1mL de diclorometano, se sometió a ultrasonido por media hora y luego se filtró. Luego, cada filtro en un volumen de solvente equivalente se sonicó media hora más, se rotaevaporó hasta 2 mL aproximadamente y se sometió a sequedad. El extracto obtenido se diluyó en DMSO puro y se guardó en refrigeración y oscuridad hasta su posterior análisis.

### 4.3 Tratamientos con PM<sub>2.5</sub>

A partir de los extractos disueltos en DMSO puro, se obtuvieron por dilución las soluciones stock en DMSO al 10%, de las cuales se diluyeron en PBS para obtener las soluciones de trabajo. Las concentraciones evaluadas en las pruebas de MTT y captación de rojo neutro fueron: 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80,90 y 100 µg/mL y en las pruebas de Azul de Tripano y genotóxicas se estudiaron las concentraciones de 10, 30 y 50 µg/mL.

### 4.4 Cultivos celulares

En las pruebas de citotoxicidad y genotoxicidad (ensayo cometa) se emplearon las líneas celulares CHO-K1 (ATCC® CCL-61™) derivada de ovario de hámster Chino, crece adherida al sustrato (Ahn & Antoniewicz, 2013) y la línea celular Jurkat (ATCC® TIB-152™) de origen leucemoide, establecida de células de sangre periférica de un niño de 14 años con leucemia aguda, crecen en suspensión, adoptan morfología de linfoblasto y forman racimos (Cai et al., 2010). Las líneas celulares fueron mantenidas en medio RPMI-1640 (Sigma) suplementado con 5% de suero bovino fetal (SBF, Gibco), en atmósfera húmeda con CO<sub>2</sub> al 5% e incubadas a 37°C. En los experimentos realizados se utilizaron cultivos en fase exponencial, con confluencia mayor al 80%.

### 4.5 Pruebas de viabilidad

Los experimentos para evaluar la viabilidad se realizaron por triplicado y a cada tratamiento se le realizó tres réplicas. Los controles empleados fueron negativo (células no tratadas), solvente (DMSO 10%) y positivo (DMSO puro).

#### 4.2.1. Prueba MTT

Esta prueba se realizó usando el protocolo de Ulukaya *et al.* (2008) con algunas modificaciones. La prueba MTT se evaluó en platos de 96, en cada pozo se adicionaron  $6 \times 10^3$  células Jurkat o  $7 \times 10^3$  células CHO-K1 en medio RPMI-1640 suplementado con 5% de SBF a 37°C y CO<sub>2</sub> al 5%. Después de 20 horas, se trataron las células y se incubaron en las mismas condiciones descritas durante 20 horas. Luego, se adicionó a cada uno de

los pozos 10 µl de la solución de MTT (5mg/ml), se incubaron por 3, 5 horas en oscuridad y se les adicionó 100 µl de isopropanol-ácido a cada pozo para diluir los cristales de formazán formados, se agitó vigorosamente y finalmente se leyó el en lector de ELISA a 570 nm.

El porcentaje de viabilidad se determinó a partir de la siguiente ecuación:

$$\%Viabilidad = \frac{Absorbancia\ del\ tratamiento}{Absorbancia\ del\ control\ no\ tratado} * 100 \text{ (ecuación 1)}$$

#### 4.2.2. Prueba de Azul de Tripano

En este ensayo se sembraron 80.000 células/pozo en platos de 24 (CHO-K1 y Jurkat) se incubaron durante 24 horas, luego las células fueron tratadas por 24 horas. La suspensión celular fue incubada con azul de tripano (0.04%) y contadas en cámara de Neubauer. La viabilidad celular se determinó a partir de la ecuación 2:

$$\%Viabilidad = \frac{número\ de\ células\ vivas}{número\ de\ células\ totales} * 100$$

#### 4.2.3. Ensayo de captación de rojo neutro

El protocolo que se sigue es el propuesto por Reppeto et al., (2008) con algunas modificaciones. Este ensayo se llevó a cabo en platos de 96, en cada pozo, se sembraron 6000 a 7000 células de la línea CHO-K1 y se incubaron por 24 horas, se trataron con 10 µl de extracto del filtro durante 24 horas. Posteriormente, se retiró el medio de cultivo, se lavó cada pozo con PBS o medio y se adicionó 50 µl de rojo neutro (0,1 mg/mL) y se incubó por 1,5 horas. Luego, se retiró el rojo neutro, se lavó con medio y se agregó 100 µl de etanol (50%)-ácido acético (0,1%) por 10 minutos. Finalmente se leyó en lector de Elisa a 540nm. La viabilidad se determinó con la ecuación (1).

### 4.3. Pruebas de genotoxicidad

Las pruebas de aberraciones cromosómicas e ICHs se realizaron por triplicado en linfocitos de sangre periférica de una mujer con las siguientes características: 29 años de edad, no fumadora, no bebedora. Los cultivos de sangre se realizaron en medio RPMI-1640, suplementado con 5% de SFB, antibiótico al 1%, fitohemaglutinina (PHA) y BrdU (1mg/ml) y se incubaron por 54 horas a 37°C. Los tratamientos por 24 horas fueron 10, 30 y 50 µg/mL. Una hora antes de la cosecha, se adicionó 100µl de Colcemid (1%). Luego con el protocolo estándar citogenético, se obtuvieron extendidos cromosómicos que posteriormente fueron teñidos y analizados. Los controles realizados fueron cultivo de sangre no tratada, control solvente (DMSO al 10%) y control positivo con Mitomicina C (5µg/mL).

#### 4.3.1. Aberraciones cromosómicas.

Los extendidos cromosómicos obtenidos, se sometieron a tinción homogénea con Giemsa (5%) por 2 minutos, luego se realizó el análisis de aberraciones cromosómicas al microscopio en aumento de 100X. Se identificaron 30 células metafásicas de buena calidad, dotación cromosómica completa y buena separación entre los cromosomas y se clasificaron los daños cromosómicos así: quiebres cromatídicos (B), quiebres cromosómicos (BC), fragmentos acéntricos (BB), cromosomas dicéntricos (DC), cromosomas en anillo (R) y figuras multirradiadas (MR). Además, se calculó el índice mitótico en una población de 1000 células de la siguiente manera:

$$IM = \frac{(N^{\circ} \text{ Mitosis})}{(N^{\circ} \text{ nucleos interfásicos} + N^{\circ} \text{ de mitosis})} * 100 \text{ (ecuación 3)}$$

#### 4.3.2. Intercambio de cromátidas hermanas (ICH)

Los extendidos cromosómicos obtenidos después de exposición a 54 horas de 5-bromodeoxiuridina (BrdU) fueron teñidos con tinción diferencial de la siguiente manera: las placas goteadas se sumergieron en solución bis-BENZIDIMIDE (0.05mg/mL)(Hoechst 33258) durante 10 minutos. Luego las placas se lavan con agua destilada en dos pasos sucesivos y se secan suavemente, hasta remover el agua. A cada lámina en posición

horizontal, se le agrega 0.3 mL de solución 2xSSC y se coloca un cubreobjetos y se expone a una lámpara Sylvania capsylite 75w, 120w PAR 30, a una distancia de 30 cm más o menos a 60°C por 20 minutos. Finalmente se tiñe con Giemsa (5%) durante 2 minutos. Se analizan 30 metafases en microscopio a 100X y se cuenta el número de ICH en cada célula por cada tratamiento.

### **4.3.3. Electroforesis alcalina en gel de células individuales (Ensayo Cometa)**

El protocolo usado fue el reportado por Singh, et al (1988). En este ensayo se tomaron  $1 \times 10^5$  células CHO\_K1 en 2250  $\mu$ l de medio y se trataron 24 horas con el componente químico de los filtros PM<sub>2.5</sub>. Luego, se analizó el porcentaje de daño en el DNA y se compararon con el control no tratado, además, se hicieron controles de DMSO (0.03%) y positivo con peróxido de hidrogeno (25  $\mu$ M).

Después del tratamiento, las suspensiones celulares se centrifugaron a 2400 rpm durante 5 minutos, se retiró el sobrenadante y las células se mezclaron con 90  $\mu$ l de agarosa de bajo punto de fusión (LMA 0,05%, SIGMA) y fueron depositadas en portaobjetos pre-tratados con agarosa de punto de fusión normal (NMA 0.5%, SIGMA). Se dejaron solidificar a 4° C durante 8 minutos. Posteriormente, las placas fueron sumergidas en buffer de lisis (sarcosinato de Na 1%, NaCl 2.5M; Na<sub>2</sub>-EDTA 100 mM, tris 10mM; pH 10 y tritón X-100, 1%). Las placas se lavaron con PBS y se incubaron durante 20 minutos en una cámara de electroforesis con buffer de corrido (NaOH 300mM, EDTA 1mM) y luego se corrieron las muestras a 25V y 300 mA durante 30 minutos a pH de 13. Después de la electroforesis, las placas fueron lavadas con buffer neutralizante (tris 0,4 M pH 7,5) por 15 minutos. Posteriormente, las láminas se deshidrataron con metanol y se guardaron durante un día para ser teñidas con Bromuro de Etidio (2 $\mu$ g/mL). Por último, se observaron en un microscopio de fluorescencia (ZEISS) con objetivo de 20X. Se analizaron al azar 50 nucleoides por placa y con ayuda del programa CASP se midió el porcentaje de daño en la cola de los cometas formados en las células con los tratamientos. Todos los pasos fueron realizados en la oscuridad desde la exposición al buffer de lisis, para prevenir daño adicional al ADN.

#### **4.4. Análisis estadístico**

Los datos fueron expresados como la media  $\pm$  error estándar. El análisis de significancia estadística se realizó con análisis de varianza ANOVA; el error estándar se representa con  $p < 0.001$  para el análisis de comparación múltiple mediante prueba de Tukey, los resultados se compararon con el control no tratado en todas las pruebas.

#### **4.5. Formulación del protocolo de salud ambiental**

Los resultados obtenidos en las pruebas anteriores y la revisión bibliográfica sobre los riesgos de Salud Pública asociados a la contaminación atmosférica, permitió la formulación de un protocolo de salud ambiental que enmarca las pruebas de genotoxicidad y viabilidad de la mezcla compleja de los filtros  $PM_{2.5}$  de la Red de Monitoreo de Calidad de Aire del Valle de Aburrá, siguiendo las directrices propuestas por el Ministerio de Salud y Protección Social, con base en el "*Protocolo para la vigilancia sanitaria y ambiental de los efectos en salud relacionados con la contaminación del aire en Colombia*" publicado por dicha organización en 2012.

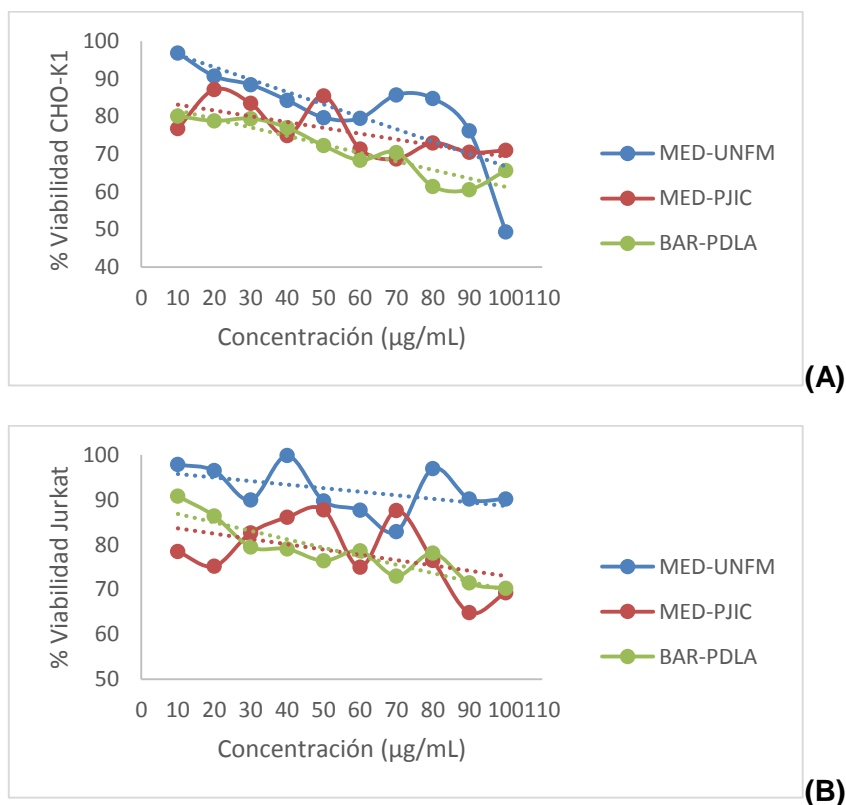




## 5. Resultados y discusión

### 5.1. Prueba MTT

En este ensayo, se mostró disminución en la viabilidad celular para las tres estaciones de monitoreo analizadas. La estación MED-UNFM mostró mayor disminución (50%) en la viabilidad con la concentración más alta (100 $\mu$ g/m). Los datos que no siguen la tendencia de la línea recta, podrían explicarse teniendo en cuenta que las muestras analizadas son mezclas complejas, por tal razón, algunos compuestos pueden presentar sinergismo o antagonismo con otras moléculas. Además, los puntos de las estaciones de tráfico MED-UNFM y MED-PJIC se presentan más alejados de la línea de tendencia, reflejando posiblemente mayor heterogeneidad en los componentes de la mezcla.



**Figura 5-1** Porcentaje de viabilidad mediante MTT en (A) células CHO-K1 (B) células Jurkat tratadas con diferentes concentraciones de extractos de filtros PM<sub>2.5</sub> obtenidos de tres estaciones de monitoreo en el Valle Aburrá.

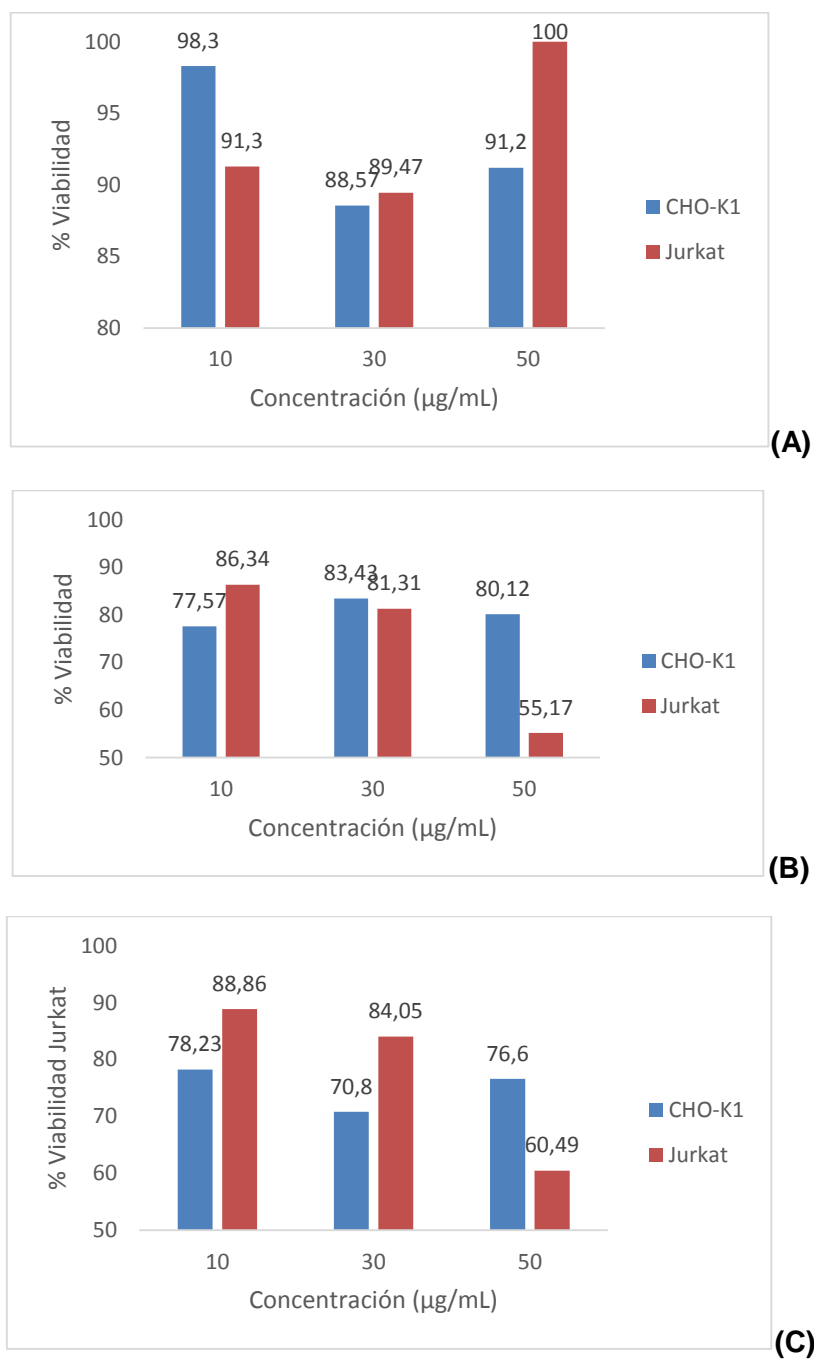
La disminución en el porcentaje de viabilidad celular se observó en ambas líneas celulares CHO-K1 y Jurkat, sin embargo, el efecto fue más variable en la línea celular Jurkat. En ambas líneas celulares, el efecto de la mezcla obtenida de la estación BAR-PDLA fue el más homogéneo. El análisis estadístico mostró diferencia altamente significativa ( $p < 0.001$ ) con los tratamientos a 60 µg/mL. Estos resultados están de acuerdo con los estudios realizados por Orona et al (2014) quienes reportaron cambios en la viabilidad celular en la línea celular de pulmón en concentraciones mayores a 50 µg/mL.

## 5.2. Prueba Azul de Tripano

A partir de los resultados obtenidos en la prueba MTT, se seleccionaron tres concentraciones intermedias para ser evaluadas con Azul de Tripano. Los resultados observados en las líneas celulares CHO-K1 y Jurkat tratadas con el extracto de los filtros de la estación MED-UNFM, mostraron menor viabilidad celular a la concentración 30 µg/mL, lo cual no es significativo comparado con el control no tratado (96,9% línea CHO-K1 y 94,89%, células Jurkat).

Los resultados de la Figura 5-2 (B) de la estación MED-PJIC muestra que el extracto de los filtros no afecta la viabilidad de las células CHO-K1 mientras que las células Jurkat muestra disminución en el porcentaje de viabilidad celular a 55% con la concentración 50 µg/mL. El extracto de los filtros recolectados en esta estación, exhibieron mayor daño en la línea celular leucemoide, lo cual podría estar relacionado con la susceptibilidad de la línea tumoral que presentan los individuos con cáncer frente al MP reportado en los estudios de De Kok et al (2006) y Pope III & Dockery (2006).

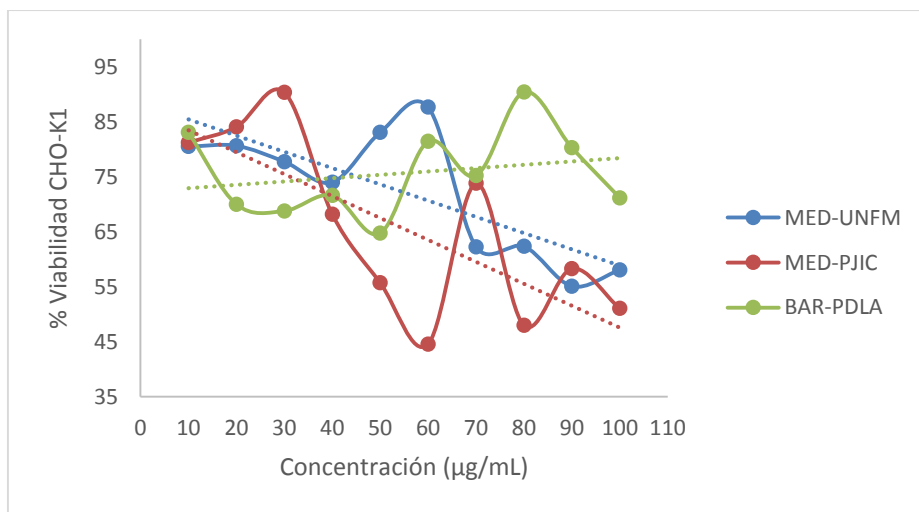
Los resultados de la estación BAR-PDLA Figura 5-2 (C) mostraron viabilidades más bajas comparadas con las otras dos estaciones. Nuevamente, se observó menor efecto sobre la viabilidad con la concentración 50 µg/mL en la línea celular Jurkat y mayor efecto en la línea CHO-K1 comparados con los controles no tratados (94% y 98% de viabilidad para CHO-K1 y Jurkat, respectivamente).



**Figura 5-2** Viabilidad por Azul de Tripano de células CHO-K1 y Jurkat tratadas con diferentes concentraciones de extractos de filtros PM 2.5 obtenidos de (A) Estación MED-UNFM (B) Estación MED-PJIC (C) Estación BAR-PDLA

### 5.3. Prueba de captación de rojo neutro

En la Figura 5-3 se muestran los resultados de captación de rojo neutro sobre la línea celular CHO-K1 tratadas con los extractos de las estaciones MED-UNFM y MED-PJIC similar a lo observado en la prueba MTT. Los picos que se alejan de la tendencia se podrían explicar a partir de la heterogeneidad de la mezcla compleja para estaciones de tráfico. En la estación BAR-PDLA, el efecto fue diferente a lo reportado en las otras pruebas de viabilidad celular ya que se observa un efecto inverso, al aumentar la concentración del material particulado, se incrementa la viabilidad celular. Es probable que la composición de la mezcla para esta estación genere una pérdida de viabilidad celular a bajas concentraciones y que este daño disminuya a medida que aumenta la concentración. El análisis estadístico mostró alta significancia con las concentraciones de 80, 90 y 100 µg/mL.

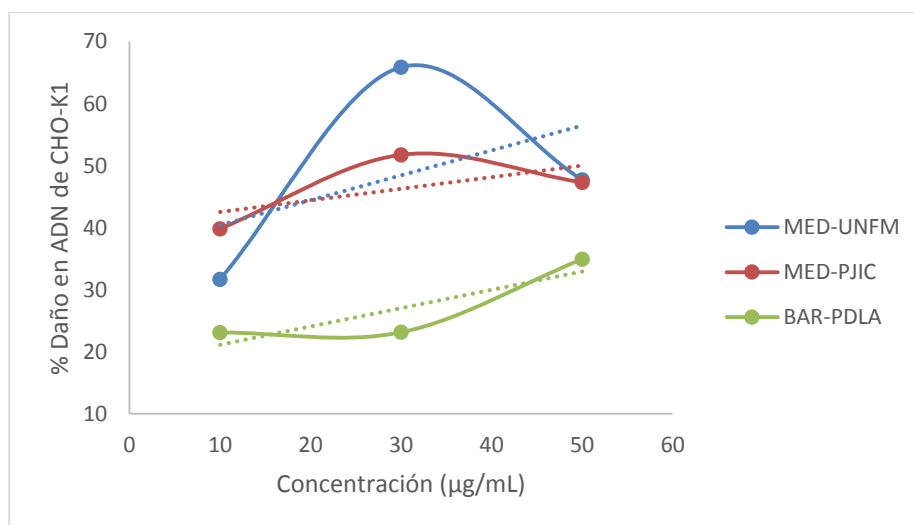


**Figura 5-3** Viabilidad por captación de rojo neutro en CHO-K1 tratadas con extractos de filtros PM<sub>2.5</sub> muestreados en las estaciones MED-UNFM, MED-PIJC y BAR-PDLA en el Valle de Aburrá.

## 5.4. Electroforesis alcalina en gel de células individuales

La Figura 5-4 muestra el porcentaje de daño en el ADN en células CHO-K1 tratadas con MP de filtros evaluados en las tres estaciones de monitoreo. Los datos de las estaciones de tráfico son similares entre sí, mientras que los resultados de la estación de fondo (BAR-PDLA) son contrarios a las otras dos estaciones. En las estaciones de tráfico se observa mayor daño en el ADN para la concentración de 30  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , mientras que para la estación BAR-PDLA se muestra un efecto dosis respuesta, es decir, a medida que aumenta la concentración, se incrementa el daño en el ADN, sin embargo, ese valor no se acerca a los puntos críticos que se reportaron en las estaciones de tráfico. Los datos del ensayo cometa obtenidos línea celular CHO-K1 tratados con  $\text{PM}_{2.5}$  son similares a los reportados por Vargas et al (2014) en linfocitos de sangre periférica.

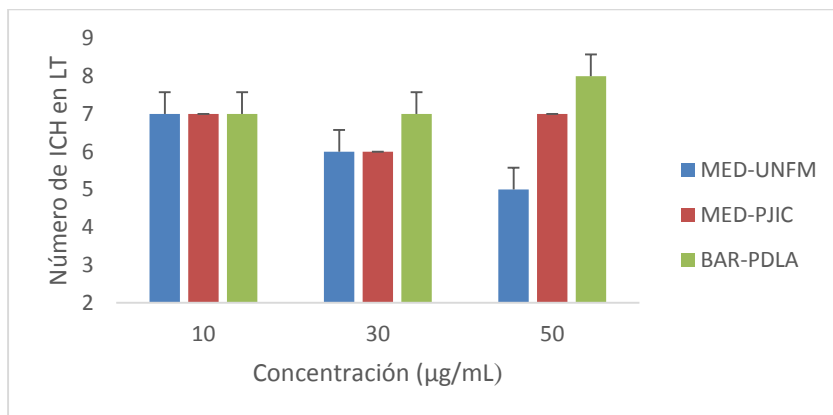
Todos los datos mostraron diferencia significativa respecto al control no tratado (% de daño en el ADN <10%). De lo anterior, se puede sugerir que el material particulado de las estaciones de monitoreo MED-UNFM y MED-PJIC tienen efecto genotóxico agudo, que podría acumularse en el tiempo, pudiendo generar daños a nivel de genoma total.



**Figura 5-4** Porcentaje de daño en ADN obtenido por ensayo cometa en células CHO-K1 tratadas con  $\text{PM}_{2.5}$  de los filtros de tres estaciones del Valle de Aburrá.

## 5.5. Intercambio de cromátidas hermanas (ICH)

El conteo del número de ICH en linfocitos de sangre periférica humana, no mostró resultados significativos que evidenciaran daño genotóxico sobre el genoma total de las células. En este ensayo, la estación control mostró un número promedio de ICH=8, por lo cual, los resultados del menor valor ICH=5 en la Figura 5-5 con las células tratadas con 50 µg/mL del MP se encontró en la estación MED-UNFM.

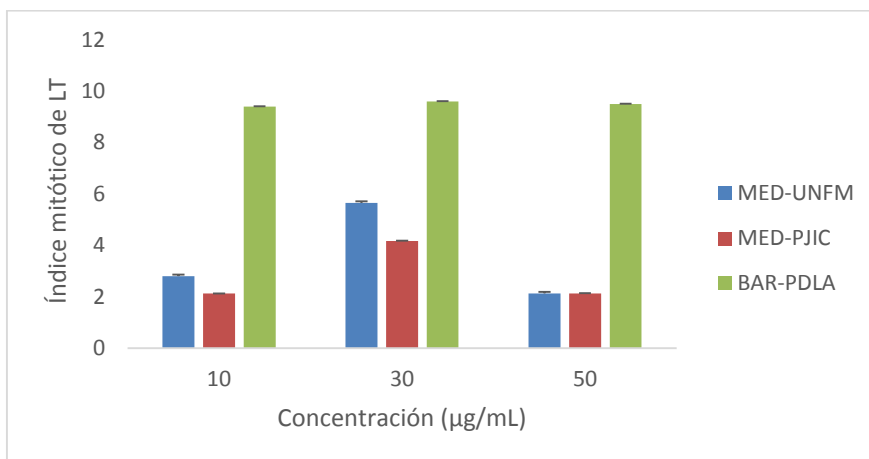


**Figura 5-5** Número de ICH en linfocitos de sangre periférica tratadas con PM<sub>2.5</sub> de filtros de tres estaciones del Valle de Aburrá.

Es posible que una persona que esté expuesta al MP de las estaciones de alto flujo vehicular presenten alteraciones en su sistema de reparación de ADN, para ello es necesario tener una población de muestra más amplia y que se comparen sus resultados con los de este ensayo.

## 5.6 Aberraciones cromosómicas

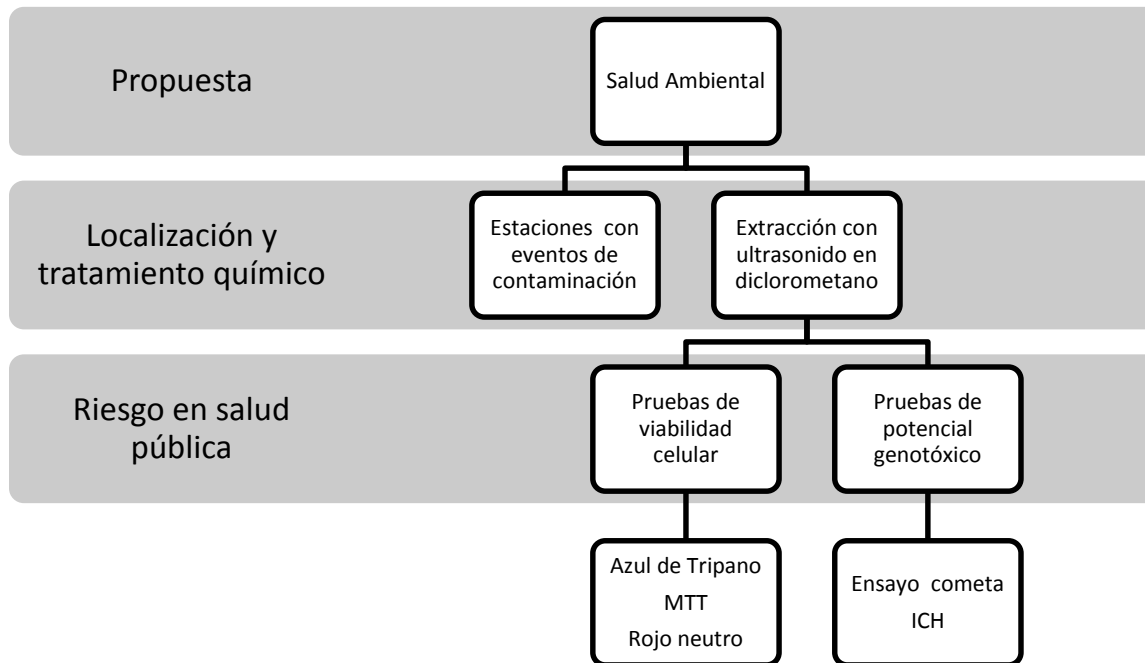
En esta prueba no se evidenciaron daños cromosómicos. Sin embargo, se determinó el índice mitótico de los tratamientos para obtener una estimación preliminar del efecto del MP sobre la proliferación celular. De los datos obtenidos, se observa que el valor de 9% de la estación BAR-PDLA es un índice mitótico mayor (2%) del control no tratado. El resultado de esta estación podría explicarse teniendo en cuenta su condición rural la cual podría inducir la proliferación de linfocitos por la presencia de alérgenos de origen natural tales como polen, etc.



**Figura 5-6** Índice mitótico en linfocitos de sangre periférica tratadas con PM<sub>2.5</sub> de filtros de tres estaciones del Valle de Aburrá.

## 5.7. Propuesta protocolo de salud ambiental

Estudios previos, han mostrado evidencia de la relación del material particulado PM<sub>2.5</sub> con posibles riesgos en salud pública. De los resultados obtenidos en este estudio, es posible proponer un protocolo de salud ambiental, resumido así:



**Figura 5-7.** Propuesta de protocolo de salud ambiental para monitoreo de contaminación de PM<sub>2.5</sub>.

1. **Localización y muestreo del material particulado:** El sitio de muestreo de cada estación es importante para la evaluación, por tal razón es importante clasificar su funcionalidad, por ejemplo, si es una estación de tráfico, de fondo, urbana o suburbana, lo cual permitirá correlacionar los posibles contaminantes presentes en la mezcla compleja y sugerir los posibles manejos. Además, es importante considerar tener consideraciones climáticas y meteorológicas del día de muestreo.
2. **Tratamiento químico de los filtros:** los procedimientos de extracción realizados en este trabajo, sugieren que el más eficiente, amigable con el medio ambiente y más seguro, es el ultrasonido, el cual evita que los compuestos extraídos no se sometan a altas temperaturas, que puedan alterar la composición de la mezcla. Se sugiere como solvente de extracción acetona o diclorometano, aunque se pueden usar proporciones 1:1 de ambos solventes como lo sugiere Meléndez et al. (2012) filtración, rotaevaporación a 160rpm y 25°C, desecación por una noche, y dilución en DMSO puro.
3. **Evaluación citotóxica:** la evaluación citotóxica se puede realizar mediante ensayo de Azul de Tripano ó MTT y finalmente con hemólisis y rojo neutro.



4. **Evaluación genotóxica:** las pruebas de aberraciones cromosómicas, ensayo cometa estiman daños directos sobre las cadenas del ADN y la prueba de ICH pueden estimar daños totales sobre el genoma. Es necesario evaluar el efecto que pueda ocasionar el material particulado en el ADN, porque este tipo de daños son los que ocasionan diferentes tipos de cáncer y lesiones más agudas a lo largo del tiempo, que incluso podrían afectar a las generaciones posteriores.
5. **Estrategias preventivas y terapéuticas:** se deben realizar campañas educativas y pedagógicas que generen conciencia en la población acerca de la calidad del aire. Es importante informar a las autoridades ambientales y a los diferentes Ministerios, y promover campañas en pro del ambiente que contribuyan a mantener una atmósfera limpia. Una estrategia adecuada sería evaluar de manera permanente la calidad de los combustibles utilizados y determinar los límites máximos de emisión permisibles y velar por la calidad de vida de la población de manera permanente.

## 6. Conclusiones y recomendaciones

### 6.3. Conclusiones

- Las pruebas de viabilidad realizadas evidencian puntos críticos en la sobrevivencia de células CHO-K1 y Jurkat tratadas con PM<sub>2.5</sub> obtenido de las estaciones del Valle de Aburrá para medir la calidad del aire.
- Se encontraron quiebres del ADN inducidas por PM<sub>2.5</sub> en las tres estaciones de monitoreo evaluadas. La concentración 30 µg/mL mostró mayor daño genotóxico (65%) en el ensayo cometa, mientras las pruebas de ICH y aberraciones cromosómicas no mostraron resultados significativos en las tres estaciones de monitoreo.
- Las concentraciones de PM<sub>2.5</sub> evaluadas mostraron un efecto dosis-respuesta en los tratamientos evaluados en las tres estaciones de monitoreo.

### 6.4. Recomendaciones

- Las concentraciones de PM<sub>2.5</sub> evaluadas podrían considerarse como criterio de contaminación en la normativa ambiental de la región y del país.
- Identificar los compuestos presentes en PM<sub>2.5</sub>, analizar el efecto sobre la viabilidad celular y el potencial genotóxico de cada compuesto y compararlos con los resultados obtenidos con la mezcla compleja de la cual fueron aislados.
- Evaluar el efecto sobre el ciclo celular de células tumorales y no tumorales tratadas con PM<sub>2.5</sub> y otras partículas como PM<sub>10</sub> por medio de eficiencia de clonación.
- Evaluar otros puntos de monitoreo que han presentado mediana y alta contaminación en los últimos años, para estimar adecuadamente el riesgo sobre la salud pública ocasionado por el MP.
- Realizar pruebas citotóxicas con el ensayo de glutatión para estimar el daño oxidativo que puede generar el MP.
- Evaluar efecto mutagénico con el Test de Ames, con y sin activación metabólica y con el ensayo HGPRT.

## Bibliografía

Ahn, W. S., & Antoniewicz, M. R. (2013). Parallel labeling experiments with [1, 2-<sup>13</sup>C] glucose and [U-<sup>13</sup>C] glutamine provide new insights into CHO cell metabolism. *Metabolic engineering*, 15, 34-47.

Air quality guidelines for Europe. (2000). Copenhagen: World Health Organization, Regional Office for Europe. Retrieved from <http://site.ebrary.com/id/10040321>

Akhtar, U. S., Rastogi, N., McWhinney, R. D., Urch, B., Chow, C. W., Evans, G. J., & Scott, J. A. (2014). The combined effects of physicochemical properties of size-fractionated ambient particulate matter on in vitro toxicity in human A549 lung epithelial cells. *Toxicology Reports*, 1, 145-156.

Arbex, M. A., Cançado, J. E. D., Pereira, L. A. A., Braga, A. L. F., & Saldiva, P. H. D. N. (2004). Queima de biomassa e efeitos sobre a saúde. *J bras pneumol*, 30(2), 158-75.

Área Metropolitana del Valle de Aburrá (AMVA), 2015. Análisis de tendencias de material particulado PM10 y PM2.5 en el Valle de Aburrá. Convenio 326 de 2014 AMVA – Universidad Nacional de Colombia sede Medellín.

Área Metropolitana del Valle de Aburrá (AMVA). (2013). Evaluar y Monitorear la Calidad del Aire en el Valle De Aburrá. Convenio 243 de 2012.

Arencibia, D. F., Vidal, A., Rosario, L. A., Suárez, Y. E., & Delgado, L. (2011). Biomodelos para la inducción de micronúcleos en células de la médula ósea por ciclofosfamida y bleomicina. *VacciMonitor*, 20(1), 28-33.

Arzoumanian, L.(12 de Octubre de 2003). BD Global Technical Services. [http://www.bd.com/vacutainer/pdfs/techtalk/TechTalk\\_Jan2004\\_VS7167.pdf](http://www.bd.com/vacutainer/pdfs/techtalk/TechTalk_Jan2004_VS7167.pdf). Recuperado 15 de diciembre de 2013.

Azqueta, A., Gutzkow, K. B., Brunborg, G., & Collins, A. R. (2011). Towards a more reliable comet assay: Optimising agarose concentration, unwinding time and electrophoresis conditions. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 724(1-2), 41–45.

Bailey, S.M., & Bedford, J. S. (2006). Studies on chromosome aberration induction: what can they tell us about DNA repair?. *DNA repair*, 5(9), 1171-1181.

Baldacci, S., Maio, S., Cerrai, S., Sarno, G., Baiz, N., Simoni, M., & Study, H. E. A. L. S. (2015). Allergy and asthma: Effects of the exposure to particulate matter and biological allergens. *Respiratory medicine*, 109(9), 1089-1104.

Bellinger, D.C. (2005). Teratogen update: lead and pregnancy. *Birth Defects Research Part A: Clinical and Molecular Teratology*, 73(6), 409-420.

Biggeri, A., Bellini, P., & Terracini, B. (2000). [Meta-analysis of the Italian studies on short-term effects of air pollution]. *Epidemiologia e prevenzione*, 25(2 Suppl), 1-71.

Billet, S., Garçon, G., Dagher, Z., Verdin, A., Ledoux, F., Cazier, F., & Shirali, P. (2007). Ambient particulate matter (PM<sub>2.5</sub>): physicochemical characterization and metabolic activation of the organic fraction in human lung epithelial cells (A549). *Environmental research*, 105 (2), 212-223.

Cai, X., Xing, X., Cai, J., Chen, Q., Wu, S., & Huang, F. (2010). Connection between biomechanics and cytoskeleton structure of lymphocyte and Jurkat cells: An AFM study. *Micron*, 41(3), 257-262.

Chakra, O. R. A., Joyeux, M., Nerriere, E., Strub, M. P., & Zmirou-Navier, D. (2007). Genotoxicity of organic extracts of urban airborne particulate matter: an assessment within a personal exposure study. *Chemosphere*, 66(7), 1375-1381.

Chen, L. C., Hwang, J. S., Lall, R., Thurston, G., Lippmann, M. (2010). Alteration of cardiac function in ApoE<sup>-/-</sup> mice by subchronic urban and regional inhalation exposure to concentrated ambient PM<sub>2.5</sub>. *Inhalation toxicology*, 22(7), 580-592.

Cisneros, R., Oré, R., Arnao, I., & Suárez, S. (2011, April). Relación de glutatión reducido/oxidado (GSH/GSSG) en ratas diabéticas tratadas con maca (*Lepidium meyenii walp*). In *Anales de la Facultad de Medicina* (Vol. 72, No. 2, pp. 107-111). UNMSM. Facultad de Medicina.

CONPES 3344 de 2005. Lineamientos Para La Formulación de la Política de Prevención y Control de la Contaminación del Aire. Bogotá, Colombia. 14 de marzo de 2005

CONPES 3550 de 2008. Lineamientos para la formulación de la política integral de salud ambiental con énfasis en los componentes de calidad de aire, calidad de agua y seguridad química. Bogotá, Colombia. 24 de noviembre de 2008.

Coronas, M. V., Pereira, T. S., Rocha, J. A. V., Lemos, A. T., Fachel, J. M. G., Salvadori, D. M. F., & Vargas, V. M. F. (2009). Genetic biomonitoring of an urban population exposed to mutagenic airborne pollutants. *Environment International*, 35(7), 1023–1029.

de Kok, T. M., Drieste, H. A., Hogervorst, J. G., Briedé, J. J. (2006). Toxicological assessment of ambient and traffic-related particulate matter: a review of recent studies. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 613(2), 103-122.

Du Four, V. A., Van Larebeke, N., & Janssen, C. R. (2004). Genotoxic and mutagenic activity of environmental air samples in Flanders, Belgium. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 558 (1), 155-167.

Enkerlin E. C., Cano, G., Garza Cuevas, R. A., Vogel Martínez, E. (1997). Ciencia ambiental y desarrollo sostenible. In *Ciencia ambiental y desarrollo sostenible*. International Thomson.

EPA. (2004). Air Quality Criteria for Particulate Matter. U.S. Environmental Protection Agency, 99.

Franken, N. A., Rodermond, H. M., Stap, J., Haveman, J., & Van Bree, C. (2006). Clonogenic assay of cells in vitro. *Nature protocols*, 1(5), 2315-2319.

Gao, M., & Liu, C. Z. (2005). Comparison of techniques for the extraction of flavonoids from cultured cells of *Saussurea medusa* Maxim. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 21(8-9), 1461-1463.

GenPharmTox.2015.HPRT-Forward-Mutation-Assay.

[http://www.genpharmtox.de/downloads/AssaySheetsHPRT .pdf](http://www.genpharmtox.de/downloads/AssaySheetsHPRT.pdf)

Gentile, N., Mañas, F., Bosch, B., Peralta, L., Gorla, N., & Aiassa, D. (2012). Micronucleus assay as a biomarker of genotoxicity in the occupational exposure to agrochemicals in rural workers. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, 88(6), 816-822.

Georgakopoulos, D.G., Després, V., Fröhlich-Nowoisky, J., Psenner, R., Ariya, P. A., Pósfai, M., Hill, T.C.J. (2008). Microbiology and atmospheric processes: biological, physical and chemical characterization of aerosol particles. *Biogeosciences Discussions*, 5(2), 1469–1510.

Gillespie, P., Tajuba, J., Lippmann, M., Chen, L. C., Veronesi, B. (2013). Particulate matter neurotoxicity in culture is size-dependent. *Neurotoxicology*, 36, 112-117.

Golub, E. (2014). Environmental health costs in Colombia: The changes from 2002 to 2010.

Hadnagy, W., Seemayer, N. H., Tomingas, R., & Ivanfy, K. (1989). Comparative study of sister-chromatid exchanges and chromosomal aberrations induced by airborne particulates from an urban and a highly industrialized location in human lymphocyte cultures. *Mutation Research Letters*, 225 (1), 27-32.

Hamers, T., van Schaardenburg, M. D., Felzel, E. C., Murk, A. J., & Koeman, J. H. (2000). The application of reporter gene assays for the determination of the toxic potency of diffuse air pollution. *Science of the total environment*, 262 (1), 159-174.

Hamra, G. B., Guha, N., Cohen, A., Laden, F., Raaschou-Nielsen, O., Samet, J. M., & Loomis, D. (2014). Outdoor particulate matter exposure and lung cancer: a systematic review and meta-analysis.

Herrera A., Echeverri C., Maya G., Ordóñez J. 2011. Patologías respiratorias en niños preescolares y su relación con la concentración de contaminantes en el aire en la ciudad de Medellín (Colombia). *Revista Ingenierías Universidad de Medellín* 10 (19): 21-32.

Ho, S. M. (2010). Environmental epigenetics of asthma: an update. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 126(3), 453-465.

Hoek, G., Brunekreef, B., Goldbohm, S., Fischer, P., van den Brandt, P. A. (2002). Association between mortality and indicators of traffic-related air pollution in the Netherlands: a cohort study. *The lancet*, 360 (9341), 1203-1209.

Hornberg, C., Maciuleviciute, L., Seemayer, N. H., & Kainka, E. (1998). Induction of sister chromatid exchanges (SCE) in human tracheal epithelial cells by the fractions PM-10 and PM-2.5 of airborne particulates. *Toxicology letters*, 96, 215-220.

---

Hsiao, W. W., Mo, Z. Y., Fang, M., Shi, X. M., & Wang, F. (2000). Cytotoxicity of PM 2.5 and PM 2.5–10 ambient air pollutants assessed by the MTT and the Comet assays. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 471(1), 45-55.

Jayasekher, T. (2009). Aerosols near by a coal fired thermal power plant: Chemical composition and toxic evaluation. *Chemosphere*, 75(11), 1525-1530.

Ji, H., & Hershey, G. K. K. (2012). Genetic and epigenetic influence on the response to environmental particulate matter. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 129(1), 33-41.

Jiménez, S. (2007). Mecanismos de regulación del receptor de glutamato tipo NMDA en citotoxicidad e isquemia cerebral. (Tesis de doctorado). Universidad Autónoma de Madrid.

Junger, W. L., Leon, A. P., & Mendonça, G. A. S. (2005). Associação entre mortalidade diária por câncer de pulmão e poluição do ar no município do Rio de Janeiro: um estudo ecológico de séries temporais. *Rev Bras Cancerol*, 51, 111-5.

Kampa, M., & Castanas, E. (2008). Human health effects of air pollution. *Environmental pollution*, 151(2), 362-367.

Laden, F., Schwartz, J., Speizer, F. E., & Dockery, D. W. (2006). Reduction in fine particulate air pollution and mortality: extended follow-up of the Harvard Six Cities study. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 173(6), 667-672.

Larsen, B. (2004). Colombia Cost of Environmental Damage: A Socio-Economic and Environmental Health Risk Assessment. Report Prepared for Ministry of Environment, Housing and Land Development, Republic of Colombia. Washington, DC. July. Laumbach, R.J. (2010). Outdoor air pollutants and patient health. *American family physician*, 81(2), 175.

Lewtas, J. (2007). Air pollution combustion emissions: characterization of causative agents and mechanisms associated with cancer, reproductive, and cardiovascular effects. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 636(1), 95-133.

Li, N., Sioutas, C., Cho, A., Schmitz, D., Misra, C., Sempf, J., Nel, A. (2003). Ultrafine particulate pollutants induce oxidative stress and mitochondrial damage. *Environmental health perspectives*, 111(4), 455.

Lippmann, M. (2003). Air pollution and health—studies in the Americas and Europe. *Air Pollution and Health in Rapidly Developing Countries. Bull World Health Organ*, 81(10), 771.

Meléndez Gélvez, I., Martínez Montañez, M. L., Quijano Parra, A. (2012). Actividad mutagénica y genotóxica en el material particulado fracción respirable MP2, 5 en Pamplona, Norte de Santander, Colombia. *Iatreia*, 25(4), 347-356.

Miller, K. A., Siscovick, D. S., Sheppard, L., Shepherd, K., Sullivan, J. H., Anderson, G. L., & Kaufman, J. D. (2007). Long-term exposure to air pollution and incidence of cardiovascular events in women. *New England Journal of Medicine*, 356(5), 447-458.

Møller, P., Folkmann, J. K., Forchhammer, L., Bräuner, E. V., Danielsen, P. H., Risom, L., & Loft, S. (2008). Air pollution, oxidative damage to DNA, and carcinogenesis. *Cancer letters*, 266(1), 84-97.

Monarca, S., Feretti, D., Zanardini, A., Falistocco, E., & Nardi, G. (1999). Monitoring of mutagens in urban air samples. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 426(2), 189-192.

Moore, C. M., & Best, R. G. (2001). Chromosomal genetic disease: structural aberrations. *eLS*.

Natarajan, A. T. (2002). Chromosome aberrations: past, present and future. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 504 (1), 3-16.

Nemmar, A., Hoet, P. M., Vanquickenborne, B., Dinsdale, D., Thomeer, M., Hoylaerts, M. F., & Nemery, B. (2002). Passage of inhaled particles into the blood circulation in humans. *Circulation*, 105 (4), 411-414.

Novotna, B., Topinka, J., Solansky, I., Chvatalova, I., Lnenickova, Z., Sram, R. J. (2007). Impact of air pollution and genotype variability on DNA damage in Prague policemen. *Toxicology letters*, 172 (1), 37-47.



---

Obe, G., Pfeiffer, P., Savage, J. R. K., Johannes, C., Goedecke, W., Jeppesen, P & Drets, M.E. (2002). Chromosomal aberrations: formation, identification and distribution. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 504 (1), 17-36.

Oliva, P., García, K., & Cortez, R. (2001). *Manual de Laboratorio de Monitoreo del Aire*. Panamá: COSUDE-Swisscontact.

Orona, N. S., Astort, F., Maglione, G. A., Saldiva, P. H. N., Yakisich, J. S., Tasat, D. R. (2014). Direct and indirect air particle cytotoxicity in human alveolar epithelial cells. *Toxicology in Vitro*, 28(5), 796-802.

Orta, M. L., Mateos, S., Cantero, G., Wolff, L. J., & Cortés, F. (2008). Protection of halogenated DNA from strand breakage and sister-chromatid exchange induced by the topoisomerase I inhibitor camptothecin. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 637(1), 40-48.

Pereira, T. S., Gotor, G. N., Beltrami, L. S., Nolla, C. G., Rocha, J. A., Broto, F. P., Vargas, V. M. (2010). Salmonella mutagenicity assessment of airborne particulate matter collected from urban areas of Rio Grande do Sul State, Brazil, differing in anthropogenic influences and polycyclic aromatic hydrocarbon levels. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 702(1), 78-85.

Piraino, F., Aina, R., Palin, L., Prato, N., Sgorbati, S., Santagostino, A., Citterio, S. (2006). Air quality biomonitoring: Assessment of air pollution genotoxicity in the Province of Novara (North Italy) by using *Trifolium repens* L. and molecular markers. *Science of the Total Environment*, 372(1), 350-359.

Poma, A., Limongi, T., Pisani, C., Granato, V., & Picozzi, P. (2006). Genotoxicity induced by fine urban air particulate matter in the macrophages cell line RAW 264.7. *Toxicology in vitro*, 20(6), 1023-1029.

Pope III, C. A., Burnett, R. T., Thun, M. J., Calle, E. E., Krewski, D., Ito, K., & Thurston, G. D. (2002). Lung cancer, cardiopulmonary mortality, and long-term exposure to fine particulate air pollution. *Jama*, 287(9), 1132-1141.

Pope, C. A. (2004). Air pollution and health-good news and bad. *New England Journal of Medicine*, 351, 1132-1133.

Quintero, M. Z., Ruiz, A. M. V., Trujillo, I. C. O. (2009). Efecto genotóxico y mutagénico de contaminantes atmosféricos. *Medicina UPB*, 28(1), 33-41.

Reinecke, S. A., Helling, B., & Reinecke, A. J. (2002). Lysosomal response of earthworm (*Eisenia fetida*) coelomocytes to the fungicide copper oxychloride and relation to life-cycle parameters. *Environmental toxicology and chemistry*, 21(5), 1026-1031.

Repetto, G., del Peso, A., & Zurita, J. L. (2008). Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity. *Nature protocols*, 3(7), 1125-1131.

Riediker, M., Cascio, W. E., Griggs, T. R., Herbst, M. C., Bromberg, P. A., Neas, L., Devlin, R. B. (2004). Particulate matter exposure in cars is associated with cardiovascular effects in healthy young men. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 169(8), 934-940.

Roig, N., Sierra, J., Rovira, J., Schuhmacher, M., Domingo, J. L., Nadal, M. (2013). In vitro tests to assess toxic effects of airborne PM<sub>10</sub> samples. Correlation with metals and chlorinated dioxins and furans. *Science of the Total Environment*, 443, 791-797.

Salah, G. B., Kamoun, H., Rebai, A., Youssef, A. B., Ayadi, H., Belghith-Mahfoudh, N., ... & Fakhfakh, F. (2011). Sister chromatid exchange (SCE) and high-frequency cells (HFC) in peripheral blood lymphocytes of healthy Tunisian smokers. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 719(1), 1-6.

Sato, M. I. Z., Valent, G. U., Coimbrão, C. A., Coelho, M. C. L., Sanchez, P. S., Alonso, C. D., & Martins, M. T. (1995). Mutagenicity of airborne particulate organic material from urban and industrial areas of São Paulo, Brazil. *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects*, 335(3), 317-330.

Schell, L. M., Gallo, M. V., Denham, M., Ravenscroft, J. (2006). Effects of pollution on human growth and development: an introduction. *Journal of Physiological Anthropology*, 25(1), 103-112.

Speit, G., Vasquez, M., & Hartmann, A. (2009). The comet assay as an indicator test for germ cell genotoxicity. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 681(1), 3-12.

Šrám, R. J., Binková, B., Rössner, P., Rubeš, J., Topinka, J., & Dejmek, J. (1999). Adverse reproductive outcomes from exposure to environmental mutagens. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 428(1), 203-215.

Stetzenbach, L. D. (2002). Introduction to aerobiology. In *Manual of Environmental Microbiology* (2nd Edition., pp. 801–813). Washington: Ed: C. J. Hurst.

Sun, Q., Hong, X., Wold, L. E. (2010). Cardiovascular effects of ambient particulate air pollution exposure. *Circulation*, 121(25), 2755-2765.

Suwa, T., Hogg, J. C., Quinlan, K. B., Ohgami, A., Vincent, R., & van Eeden, S. F. (2002). Particulate air pollution induces progression of atherosclerosis. *Journal of the American College of Cardiology*, 39(6), 935-942.

Tejs, S. (2008). The Ames test: a methodological short review. *Environmental Biotechnology*, 4, 7-14.

Tice, R. R., Agurell, E., Anderson, D., Burlinson, B., Hartmann, A., Kobayashi, H., ... & Sasaki, Y. F. (2000). Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environmental and molecular mutagenesis*, 35(3), 206-221.

Timblin, C. R., Shukla, A., Berlanger, I., BeruBe, K. A., Churg, A., & Mossman, B. T. (2002). Ultrafine airborne particles cause increases in protooncogene expression and proliferation in alveolar epithelial cells. *Toxicology and applied pharmacology*, 179(2), 98-104.

Torres, A. M. H., Londoño, C. A. E., Vasco, G. J. M., & Molina, J. E. O. (2011). Patologías respiratorias en niños preescolares y su relación con la concentración de contaminantes en el aire en la ciudad de Medellín (Colombia). *Revista Ingenierías Universidad de Medellín*, 10(19), 21-31.

Uhlmann, K., Brinckmann, A., Toliat, M. R., Ritter, H., & Nürnberg, P. (2002). Evaluation of a potential epigenetic biomarker by quantitative methyl-single nucleotide polymorphism analysis. *Electrophoresis*, 23(24), 4072-4079.

UAH. (2008). Citotoxicidad celular. Disponible en:  
[http://www.uah.es/tejedor\\_bio/bioquimica\\_ambiental/quion-citotoxicidad.pdf](http://www.uah.es/tejedor_bio/bioquimica_ambiental/quion-citotoxicidad.pdf)

USEPA. (1993). Selecting exposure routes and contaminants of concern by risk-based screening, 903.

Vaccari, M., Mascolo, M. G., Rotondo, F., Morandi, E., Quercioli, D., Perdichizzi, S., & Grilli, S. (2015). Identification of pathway-based toxicity in the BALB/c 3T3 cell model. *Toxicology in vitro*, 29(6), 1240-1253.

Valenciano, G. G. (1995). Micronúcleos (MN) e intercambio de cromátides hermanas (ICH) como pruebas indicadoras de la acción mutagénica de diazepam y del difenilhidantoinato de sodio (Doctoral dissertation, Universidad Autónoma de Nuevo León).

Vargas, F. (2005). La contaminación ambiental como factor determinante de la salud. *Revista española de salud pública*, 79(2), 117-127.

Vargas, M., Parra, A., Gelvez, I. (2014). Genotoxicidad en el aire de Cúcuta-Colombia en muestras del PM 2.5. *Revista Ambiental Agua, Aire Y Suelo*, 5(1).

Vineis, P., & Husgafvel-Pursiainen, K. (2005). Air pollution and cancer: biomarker studies in human populations. *Carcinogenesis*, 26(11), 1846-1855.

Wan, H., Williams, R., Doherty, P., & Williams, D. F. (1994). A study of the reproducibility of the MTT test. *Journal of materials science: Materials in medicine*, 5(3), 154-159.

Wang, S. L., Lin, C. Y., Guo, Y. L., Lin, L. Y., Chou, W. L., Chang, L. W. (2004). Infant exposure to polychlorinated dibenzo-p-dioxins, dibenzofurans and biphenyls (PCDD/Fs, PCBs)—correlation between prenatal and postnatal exposure. *Chemosphere*, 54(10), 1459-1473.

Wang, T., Garcia, J. G., & Zhang, W. (2012). Epigenetic regulation in particulate matter-mediated cardiopulmonary toxicities: a systems biology perspective. *Current pharmacogenomics and personalized medicine*, 10(4), 314.

WHO. (2013). Health effects of particulate matter. Policy implications for countries in eastern Europe, Caucasus and central Asia.

WHO. (2014). Calidad del aire (exterior) y salud. Nota descriptiva N°313. Retrieved from <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs313/es/>

Wichmann, H. E., & Peters, A. (2000). Epidemiological evidence of the effects of ultrafine particle exposure. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences*, 358 (1775), 2751-2769.

Xue, W., & Warshawsky, D. (2005). Metabolic activation of polycyclic and heterocyclic aromatic hydrocarbons and DNA damage: a review. *Toxicology and applied pharmacology*, 206 (1), 73-93.

Zhang, R., Wang, G., Guo, S., Zamora, M. L., Ying, Q., Lin, Y., & Wang, Y. (2015). Formation of urban fine particulate matter. *Chemical Reviews*, 115 (10), 3803-3855.

Zuluaga, M., Valencia, A. M., & Ortiz, I. C. (2009). Efecto genotóxico y mutagénico de contaminantes atmosféricos. *Medicina UPB* 28(1), 33–41.