

# Inducción de micronúcleos por la fracción orgánica asociada a aeropartículas de una zona de la ciudad de Puebla, México

María Teresa Abad-Camacho<sup>1,3</sup>, Lilia Cedillo-Ramírez<sup>1</sup>, Antonio Yañez-Santos<sup>1,2</sup>, J. Antonio Valdez-García<sup>3</sup>  
Instituto de Ciencias<sup>1</sup>, Facultad de Estomatología<sup>2</sup>, Facultad de Medicina<sup>3</sup>  
Benemérita Universidad Autónoma de Puebla  
Puebla, Pue., México

mtabad83@yahoo.com.mx, cedil9@gmail.com, j\_antonio\_yanez@yahoo.com, antoniovgar@hotmail.com

**Abstract**— The objective of the present job was to evaluate mutagenic capacity of the organic fraction associated to the total suspended particles in an area of the city of Puebla, by erythrocyte micronucleus test of peripheral blood cells of rodent. The test results showed an increase ( $p < 0.05$ ) in the frequency of micronucleated reticulocytes at the concentrations tested (160, 320 and 640 mg/kg) mainly in 24 h. The highest micronuclei frequency ( $8.8 \times 10^{-3}$ ) was found with 320 mg/kg, equivalent to  $667.2 \mu\text{g}/\text{m}^3$  of organic matter tested after 24 h. Gas chromatography and mass spectrometry analysis of the organic matter revealed the presence of de Benzo (g, h, i) perileno > coroneno > Indeno (1, 2, 3 - cd) pireno

**Keyword**— *Micronucleus, polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHS), aeroparticles.*

**Resumen**— El objetivo del presente trabajo fue evaluar la capacidad mutagénica de la materia orgánica asociada a partículas suspendidas totales de una zona de la ciudad de Puebla, mediante la prueba de micronúcleos en sangre periférica de roedor. Los resultados mostraron elevación ( $p < 0.05$ ) en la frecuencia de reticulocitos micronucleados con las concentraciones probadas (160, 320 y 640 mg/kg) principalmente a las 24 h; La mayor frecuencia de micronúcleos ( $8.8 \times 10^{-3}$ ) se encontró con 320 mg/kg, equivalentes a  $667.2 \mu\text{g}/\text{m}^3$  de partículas suspendidas totales. El análisis de cromatografía de gases-espectrometría de masas en la materia orgánica mostró la presencia de Benzo (g, h, i) perileno > coroneno > Indeno (1, 2, 3 - cd) pireno.

**Palabras claves**—: *micronúcleos, hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs), aeropartículas.*

## I. INTRODUCCIÓN

La contaminación atmosférica es un problema de salud pública mundial, motivo de preocupación creciente en muchas áreas de investigación alrededor del mundo ya que se ha demostrado su importancia en materia de salud y economía [Environment protection Agency (EPA), 2010; European Environment Agency (EEA), 2013; Stevens, Dias y Ezzati, 2008; World Health Organization (WHO), 2013;]. En México es un problema generalizado de las grandes zonas metropolitanas y ciudades medias como la ciudad de Puebla que es la cuarta en importancia por su influencia económica y por tener una de las áreas urbanas más grandes del país, su zona metropolitana está integrada por 14 municipios conurbados, 13 corredores industriales [Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática (INEGI), 2003], albergando 1.5 millones de habitantes que corresponden al 36% de la población total del estado [INEGI, 2011b]. Según la Red de Monitoreo Ambiental de la ciudad de Puebla, en 2003 se emitieron 426151 toneladas de contaminantes a la atmósfera, de los cuales 6283 toneladas fueron de partículas suspendidas totales, ocupando el primer lugar debido entre otras al escaso equipamiento de sistemas de control y combustibles de baja calidad [Gobierno del Estado de Puebla (GEP), 2012].

La materia particulada (PM, por sus siglas en inglés), es una mezcla de partículas (sólidas y líquidas) suspendidas en el aire, con amplio rango de talla y composición química. Las PM<sub>2.5</sub>, son partículas finas con diámetro de 2.5 micrómetros o menos; PM<sub>10</sub>, tienen diámetro de 10 micrómetros o menos, partículas suspendidas totales (PST), son aquellas de más de 10 micrómetros e incluyen a todas las

anteriores [Nemmar, Holme, Rosas, Schwarze y Alfaro-Moreno, 2013]. La PM puede tener un origen primario o secundario según ingrese a la atmosfera directamente o sea formada en ella debido a la oxidación y transformación de gases precursores: SO<sub>2</sub>, NO<sub>x</sub>, NH<sub>3</sub> y COVs (Compuestos Orgánicos Volátiles,) los cuales reaccionan para formar compuestos amonio, sulfato y nitrato, que si se condensan forman nuevas partículas llamadas aerosoles inorgánicos secundarios (AISs). Ciertos COVs, se oxidan en compuestos menos volátiles formando aerosoles orgánicos secundarios (AOSs) [Lippmann, Chen, Gordon, Ito y Thurston, 2013]. La formación de estos aerosoles depende de factores químicos como la concentración de precursores y físicos como la reactividad de la atmosfera, que depende a su vez de la concentración de sustancias reactivas que tenga en determinado momento, como el ozono, y el radical hidroxilo; además y no menos importantemente, de las condiciones meteorológicas como la radiación solar, la humedad relativa y la nubosidad. Cuando todos estos componentes químicos de un aerosol son medidos cuantifican hasta el 70% o más de la masa de las PM<sub>10</sub> y PM<sub>2.5</sub> [EEA, 2013]. La PM<sub>10</sub> corresponde al 55% de PST [EPA, 2006].

Los problemas que originan en la salud van desde irritación ocular a la irritación de vías aéreas, agravamiento de enfermedades del aparato respiratorio y cardiovascular y con la exposición crónica hay evidencia de asociación con diabetes [Brook, Jerrett, Brook, Bard y Finkelstein, 2008; Brook, Rajagopalan, Pope, Brook y Bhatnagar, 2010], enfermedades neurológicas [Rückerl, Schneider, Breitner, Cyrus y Peters, 2011] y aumento de mortalidad de causa natural [Beelen et al. 2008<sup>a</sup>]. Algunos autores mencionan aumento del Cáncer de Pulmón [Pope et al. 2002].

Las partículas presentes en suspensión en la atmosfera, constituyen un elemento de importancia para el Valle de Puebla, ya que más de la mitad de la población se encuentra expuesta a concentraciones superiores a la norma en más del 50% de los días del año y el impacto de la exposición a estos contaminantes en la ciudad se desconoce [Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales del Gobierno Fedral (SEMARNAT), Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales del Estado de Puebla (SMRN), 2006]. La exposición a estos agentes potencialmente riesgosos es identificada generalmente a través de técnicas analíticas o investigaciones epidemiológicas; Sin embargo otras formas de evaluar las posibles consecuencias de la contaminación es mediante el estudio de daño genotóxico o citotóxico en organismos centinela.

La prueba de micronúcleos es un sistema de prueba in vivo en mamíferos para la detección de aberraciones cromosómicas [Organisation for Economic Cooperation and Development (OECD), 1997]. Los micronúcleos son fragmentos cromosómicos acéntricos o cromosomas completos asociados a rompimientos cromosómicos o a daño del aparato mitótico por el tratamiento administrado y que no fueron incorporados en los núcleos hijos durante los últimos estados de la mitosis. Los eritroblastos en medula ósea de ratón son utilizados como células blanco. Cualquier micronúcleo que se haya formado por el tratamiento administrado puede permanecer en el citoplasma detectándose fácilmente en el eritrocito policromático dentro de la médula ósea o en el reticulocito en sangre periférica. Un aumento de reticulocitos micronucleados en animales prueba es indicador del daño cromosómico inducido [Heddle J.A. et al 1983].

El objetivo del presente trabajo fue evaluar la actividad mutagénica de la materia orgánica asociada a las PST de una zona de la ciudad de Puebla, mediante la prueba de micronúcleos en sangre periférica de roedor.

## II. MATERIALES Y MÉTODOS

La Secretaria del Medio Ambiente y Recursos Naturales, proporcionó los filtros de fibra de vidrio que fueron expuestos al ambiente durante 24 h en muestreadores (Andersen Samplers Inc.) de grandes volúmenes para PST de acuerdo a las Normas Oficiales Mexicanas [SEMARNAT, 1993].

#### A. *Obtención y condensación del extracto de materia orgánica (MOE)*

Los filtros con PST correspondientes a la zona centro de la ciudad (01/07/2002) fueron pesados, fraccionados y lavados en limpiador ultrasónico por 4 ciclos de 30 minutos, con 70 ml de diclorometano los 3 primeros y 50 ml el último, obteniéndose el “extracto”, el cual fue condensado a 20 ml, en un aparato Kuderma-Danish a 60° C. Se hicieron alícuotas de éste para determinar la materia orgánica extraída (MOE), realizar la prueba de micronúcleos y la determinación de hidrocarburos aromáticos policíclicos mediante cromatografía de gases acoplada a espectrofotometría de masas (CG-EM).

#### B. *Obtención del peso de la materia orgánica extraída.*

Se pesó en una balanza analítica, un vial ámbar de 4 ml, limpio y seco antes y después de colocar 0.5 ml del condensado y haber esperado hasta la evaporación total del disolvente; La diferencia entre los dos pesos extrapolada al aforo representó la concentración en mg/ml de la MOE. Se le adicionó 0.5 ml de Tolueno (HPLC) para análisis en cromatógrafo. Las muestras de MOE suspendidas en diclorometano se evaporaron hasta sequedad total para adicionar aceite de maíz y realizar la prueba de micronúcleos previo al tratamiento.

#### C. *Prueba de micronúcleos en sangre periférica de ratón.*

Para determinar el tiempo de muestreo y concentraciones apropiadas se realizó una prueba piloto de micronúcleos utilizando 2 ratones machos de la línea NH1, de 6 a 8 semanas de edad y pesos de 23.6 gr (DS  $\pm$ 1.5), para cada concentración, de acuerdo con Hayashi, et al. [1994] y OECD [1997]. Se dió tratamiento agudo por vía oral en dosis única a las 0 horas. Los testigos negativos recibieron aceite de maíz (10 ml/kg de peso) como vehículo. Los testigos positivos recibieron Benzo(a)Pireno en concentración de 100 mg/kg.

La prueba de MN se realizó con 6 ratones macho NH1, con pesos promedio de 22.2 g., (DE  $\pm$  1.6); se aplicaron 640 mg/kg, 320 mg/kg y 160 mg/kg de MOE (equivalentes a 1507.2  $\mu$ g/m<sup>3</sup>, 667.2  $\mu$ g/m<sup>3</sup> y 333.6  $\mu$ g/m<sup>3</sup> de PST respectivamente); obteniéndose los frotis a las 24, 48 y 72 h, postratamiento. La tinción fue supravital con naranja de acridina, codificando las laminillas para hacer el análisis inmediato y de manera ciega en microscopio de fluorescencia. Se leyeron 1000 reticulocitos (RET) I, II o III, buscando la incidencia de reticulocitos micronucleados (RETMN), y la proporción de RET I entre 1000 RET II y III [Hayashi M., 1990; The Collaborative Study Group for the Micronucleus Test (CSGMT), 1992; CSGMT/ The Mammalian Mutagenesis Study Group of the Environmental Mutagen Society of Japan (JEMMS.MMS), 1995]. El análisis estadístico para determinar la frecuencia de mutación se basó en la prueba de Kastenbaum y Bowman [1970] y el análisis de correlación de Pearson para estimar concentración-respuesta.

#### D. *Análisis cromatográfico.*

La MOE, fue analizada mediante CG-EM, en el modo de impacto electrónico monitoreando al ión específico de cada hidrocarburo aromático policíclico (HAP) de acuerdo al método TO-13A de la U.S. Environmental Protection Agency (USEPA) [1999].

### III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La masa de partículas colectadas en el filtro estudiado fue de 417  $\mu$ g/m<sup>3</sup> de PST, cifra que casi duplica el límite permitido de 210  $\mu$ g/m<sup>3</sup> de PST en 24 h una vez al año, según la norma oficial mexicana [NOM-024-SSA1-1993]. El peso de la MOE fue 10 mg/ml. Como se aprecia en la Tabla I, la frecuencia de RETMN en el testigo negativo, fue de  $1.3 \times 10^{-3}$ , (a las 24, 48 y 72 h). Con la MOE, la frecuencia de RETMN, aumentó a las 24 h para disminuir a las 48 h y aún más a las 72 h en todas las concentraciones probadas, siendo diferentes significativamente ( $P < 0.05$ ) con respecto a testigos

negativos, salvo a las 48 y 72 h post tratamiento con 160 mg/kg de MOE que no tuvieron diferencia significativa.

El testigo positivo (con Benzo-a-pireno), también fue estadísticamente significativo ( $P < 0.05$ ), con una elevación de RETMN de  $7.7 \times 10^{-3}$  a las 24 h post tratamiento e igual que la concentración de 320 mg/kg de MOE a las 48 h; siendo ésta última con respuesta mayor que la del testigo positivo a la misma hora, ( $7.7 \times 10^{-3}$  Vs  $6.7 \times 10^{-3}$ ); a las 72 h fue mayor la frecuencia en el testigo positivo ( $6.5 \times 10^{-3}$ ) que en los probados. Con 640 mg/kg de MOE, encontramos una frecuencia de  $4.2 \times 10^{-3}$  a las 24 h y a las 48 h una elevación a  $5.6 \times 10^{-3}$ , y a pesar de disminuir la frecuencia a las 72 h ( $3.5 \times 10^{-3}$ ), siguió siendo diferente significativamente con respecto al testigo negativo (Fig. 1).

Existió una correlación concentración-respuesta positiva, no significativa a las 24 h ( $r = .32$ , IC = 95%,  $y = 1$ ). A las 48 h la correlación fue de:  $r = .6079$ , IC = 95%,  $p = .001$ ,  $y = .00747$ . A las 72 h también correlacionó positivo siendo:  $r = .4551$ , (IC = 95%,  $y = .00389$  y significativo estadísticamente ( $p = .025$ ).

En cuanto a los reticulocitos se encontró en el testigo negativo 14.3% a las 24 h, disminuyó a 8.7% a las 48 h, e incrementó a 9.5% a las 72 h. (Tabla I). Con las diferentes concentraciones probadas, vemos una relación inversa de la frecuencia de RET I (Fig. 2), con el tiempo de exposición, semejante a lo observado en el testigo positivo; pareciera que al metabolizarse el compuesto probado aumenta la toxicidad o se retrasa el ciclo celular.

Este es el primer trabajo realizado en Puebla en su tipo, y como se describe, la MOE de PST de su zona centro, elevó la frecuencia de RETMN en roedor. No existen trabajos con los que se pueda hacer la comparación; los estudios realizados por Villalobos-Pietrini, Blanco-Jimenez y Gomez Arrollo. [1995] o por Delgado-Rodríguez, Ortíz-Martelo, Villalobos-Pietrini, Gómez-Arroyo y Graf U [1999], analizan la mutagenicidad de las partículas aéreas en la ciudad de México mediante los ensayos con *Salmonella typhimurium*, y *Drosophila melanogaster* respectivamente, en ambos la materia orgánica asociada a PST tanto como a PM10 fue mutagénica.

Aunque los trabajos no son comparables, en todos esos trabajos, como en otros realizados alrededor del mundo [Viras LG. et al 1990; Finalyson-Pitts BJ. et al 1997; Villalobos Pietrini R et al., 1995] los extractos de materia orgánica asociados a las PST han sido mutagénicos. El ensayo bacteriológico ha mostrado que la MOE es capaz de ocasionar mutaciones tipo “fremeshif” y de cambio de base; con la prueba de micronúcleos vemos que también produce efecto clastogénico en el material genético.

Los análisis cromatográficos de la MOE, mostraron la presencia de 3 HAP: Indeno (1,2,3,cd) pireno: I(c,d)P; benzo (g,h,i) perileno: B(g,h,i)P y coroneno, ( $0.12 \mu\text{g}/\text{ml}$  los dos primeros y  $0.10 \mu\text{g}/\text{m}^3$  el último). El I(c,d)P, de acuerdo con la International Agency for Research and Cancer [IARC,2006], está considerado en el grupo 2b: posiblemente carcinogénico para humanos, iniciador y promotor tumoral, aunque no tan potente como el Benzo (b) Fluoranteno. El B(g,h,i)P y el coroneno, están en el grupo 3: inclasificables como carcinógenos para humanos. El Coroneno es irritante y con riesgo de cáncer. Tanto el indeno (1,2,3,-cd) pireno, como el Benzo (g,h,i) perileno, son indicadores de fuentes vehiculares (gasolina, diesel), de combustión de basura, humo de tabaco y producción de aluminio [IARC 1983, 2010].

Es importante notar que la MOE, aun representa una mezcla compleja, teniendo alrededor de 90 diferentes estructuras HAPs, y o sus metil-derivados en donde pudiera existir un gran potencial de efectos sinérgicos, antagónicos o aditivos entre sus componentes que pudieran modificar el efecto mutagénico de algunos HAP o nitro-derivados [Cerná M. et al., 2000; Has B.S et al. 1981], así como las formas directa o indirecta de generación del daño [Finalyson-Pitts y Pitts. 1997].

Las concentraciones de MOE probadas, equivalentes a 1507.2  $\mu\text{g}/\text{m}^3$ , 667.2  $\mu\text{g}/\text{m}^3$  y 333.6  $\mu\text{g}/\text{m}^3$  de PST respectivamente, elevaron la frecuencia de RETMN de manera estadísticamente significativa con respecto a los testigos negativos, y aunque se encontraron tres HAP, es posible que algunos se hayan degradado o evaporado durante la manipulación o almacenamiento de los filtros por lo que serían necesarios estudios posteriores que permitan identificar mejor los compuestos químicos presentes en la fracción orgánica de las aeropartículas en la ciudad de Puebla.

Las partículas suspendidas, son una mezcla de materia particulada de varios orígenes y objeto de continuas variaciones en su composición a lo largo del día y de las estaciones del año [Brook JR. 1997; Pitts, 1985; Villalobos-Pietrini, 1999]. Las partículas menores de 10 micrómetros a diferencia de las PST, tienen mayor capacidad de adsorción de compuestos orgánicos [John et al 1990; Salazar et al 1993; Wilson y Suh 1996] y diferencias en su capacidad mutagénica [Villalobos-Pietrini, 1995; Abad-Camacho, 1998; Delgado-Rodriguez, 1999; Amador Muñoz, 2001] entre otras muchas diferencias; Según algunos investigadores [Wendy Hsiao, Mo, Fang, Shi y Wang, 2000] casi todos los HAP, residían en las partículas finas y no en las gruesas, sin embargo aunque adsorban menos compuestos orgánicos y pudieran ser menos tóxicas, el hecho de que también adsorban HAP y sean capaces de generar efectos como los observados en este trabajo, sugiere que no debemos dejar de investigarlas, pues la exposición repetida a bajas dosis podría inducir daño al DNA, irreversible en células expuestas y de potencial impacto para la salud

Varios carcinógenos conocidos HAPs, y aminas aromáticas han sido identificadas entre los cientos de compuestos químicos adsorbidos a la materia particulada colectada de áreas contaminadas [Pellizzari ED. 1978]. Sin embargo cuáles son las concentraciones de los contaminantes aéreos que poseen riesgo significativo para los humanos aun está en estudio.

La prueba de micronúcleos en sangre periférica de roedor estaría justificada en el monitoreo de la calidad del aire por su remarcable sensibilidad a carcinógenos químicos con fuerte evidencia de carcinogenicidad en humanos [CSGMT/JEM-MMS, 1997] y porque la mayoría de compuestos que se ha probado ser mutagénicos, también son carcinogénicos, aunque no ocurra lo mismo a la inversa. [Haseman, Margolin, Shelby, Zeiger, y Tennant, 1988]

La evaluación biológica de la exposición a la contaminación aérea es una tarea ardua por las características de la mezcla en las exposiciones, que podrían actuar con diferentes interacciones entre carcinógenos, promotores, cocarcinógenos, e inhibidores de manera impredecible. [Hass, 1981; Helmes, 1982; Saffiotti, 1983]. Dilucidar cuáles son los compuestos en la MOE y cómo actúan es una tarea importante ya que permitiría buscar estrategias para disminuir aquellos que producen mayor genotoxicidad, por lo que sería importante conocer la variación de estos compuestos adsorbidos a las aeropartículas mayores y menores a lo largo del año y tener un sistema de monitoreo biológico permanente como la prueba de micronúcleos en roedor, que nos oriente en la toma de decisiones para en el control de la exposición a contaminantes críticos.

#### IV. CONCLUSIÓN

La fracción orgánica asociada a PST de la zona céntrica de la Cd. Puebla es clastogénica ya que induce micronúcleos en eritrocitos de sangre periférica de roedor en concentraciones de 320 y 640 mg/kg de peso (equivalentes a 667.2  $\mu\text{g}/\text{m}^3$  y 1507.2  $\mu\text{g}/\text{m}^3$  de PST).

Tabla 1. Resultados de la prueba de micronúcleos con materia orgánica extraída de pst

Concentración	h	RET I	RETMN
		%	X 10 <sup>-3</sup>
0 mg/kg	24	14,3	1,3
MOE	48	8,7	1,3
(Aceite maíz)	72	9,5	1,3
160 mg/Kg	24	11,5	4,8
MOE	48**	7,9	2,5
	72**	5,4	2,3
320 mg/Kg	24	12,5	8,8
MOE	48	6,7	7,7
	72	3,1	5,5
640 mg/Kg	24	11,3	4,2
MOE	48	7,7	5,6
	72	3,7	3,5
100 mg/Kg	24	12,3	7,7
B (a) P	48	6,2	6,7
	72	3,1	6,5

RETMN= Reticulocitos micronucleados. RET I = Reticulocitos tipo I. \*\* = no significativo (P<0.05). MOE: Materia orgánica extraída

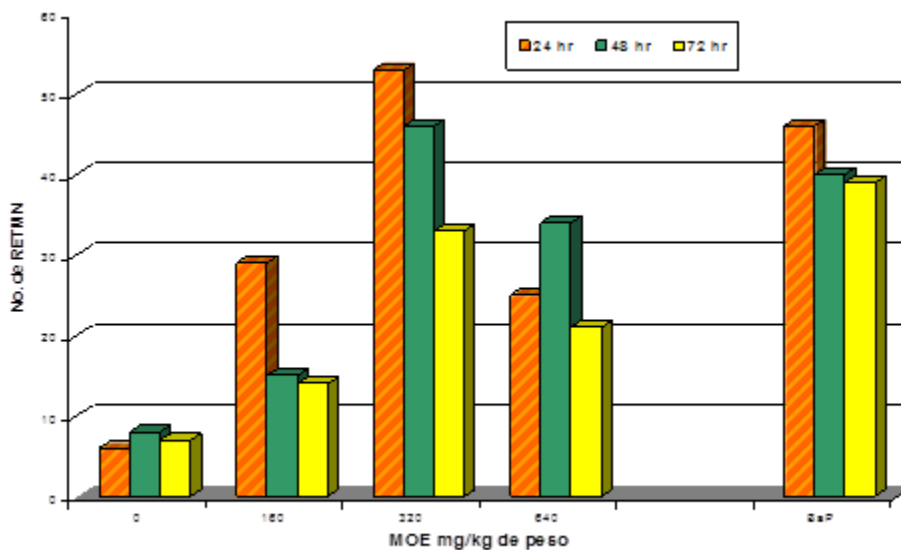


Fig. 1. Frecuencia RET MN.



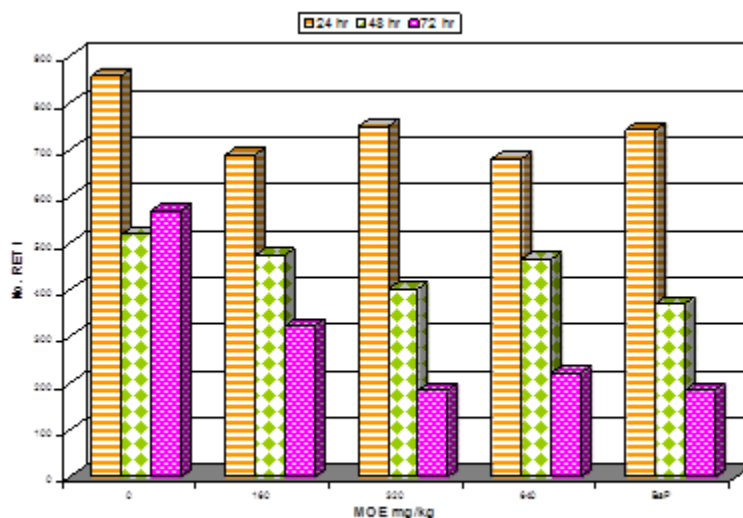


Fig. 2. Frecuencia de RETI.

## RECONOCIMIENTOS

Los autores agradecen a los ingenieros Francisco David López Cabrera y Obdulia Pérez Riviera de la PROFEPA y SEMARNAP, por haber facilitado los filtros con los que se trabajó; al Dr. Alfredo Delgado y a la Química Ema Soto por su apoyo en la extracción de la materia particulada, al Dr. Omar Amador Muñoz por su apoyo en el análisis cromatográfico y especialmente al Dr. Rafael Villaobos-Pietrini; sin ellos hubiera sido imposible realizar el presente trabajo.

## REFERENCIAS

- [1] Abad-Camacho MT. (1998). *Inducción de micronúcleos por la fracción orgánica asociada a aeropartículas* (Tesis inédita de maestría). Universidad Nacional Autónoma México. México.
- [2] Amador-Muñoz O, Delgado Rodríguez A., Villalobos-Pietrini R., Munive-Colín Z., Ortiz Marttelo R., et al. (2001). Partículas suspendidas, hidrocarburos aromáticos policíclicos y mutagenicidad en el suroeste de la ciudad de México. *Rev Int Contam Ambient.* 17(4), 193-204.
- [3] Beelen R, Hoek G, van den Brandt PA, Goldbohm RA, Fischer P, et al. (2008a). Long-term effects of traffic-related air pollution on mortality in a Dutch cohort (NLCS-AIR study). *Environ Health Perspect.* 116(2):196–202. doi: 10.1289/ehp.10767.
- [4] Brauer M, Hoek G, Smit HA, de Jongste JC, Gerritsen J, et al. (2007). Air pollution and development of asthma, allergy and infections in a birth cohort. *Eur Respir J.* 29:879–888. doi: 10.1183/09031936.00083406.
- [5] Bronzetti G, Cini M, Paoli M, Ciacchini G, Giacconi V, et al. (1997). Mutagenicity and chemical analysis of airborne particulate matter collected in Pisa. *Journal of Environmental Pathology, Toxicology and Oncology*, 16(2–3):147–156. PMID: 9275995.

- [6] Brook J.R. Dann T.F., Burnett R.T. (1997). The relationship among TSP, PM10, PM2.5, and inorganic constituents of atmospheric particulate matter at multiple Canadian locations. *J. A. W. M. A.* 47, 2-19.
- [7] Brook RD, Jerrett R, Brook JR, Bard R L, Finkelstein M. (2008). The relationship between diabetes mellitus and traffic-related air pollution. *JOEM.* 50(1):32–38. doi: 10.1097//JOM.0b013e31815dba70.
- [8] Brook RD, Rajagopalan S, Pope CA, Brook JF, Bhatnagar A, et al. (2010). Particulate matter air pollution and cardiovascular disease: An update to the scientific statement from the American Heart Association. *Circulation*, 121:2331–2378. doi: 10.1161/CIR.0b013e3181dbecel.
- [9] Cerná M. Pochmanová D, Pastrorková A, Benes I, Lenicek J, et al. (2000). Genotoxicity of urban air pollutants in the Czech Republic: Part I. Bacterial Mutagenic potencies of organic compounds adsorbed on PM 10 particulates. *Mutat. Res.* 469,71-82 doi: 10.1016/S1383-5718(00)00062-0.
- [10] Delgado-Rodríguez A, Ortíz-Marttelo R, Villalobos-Pietrini R, Gómez-Arroyo S, Graf U. (1999). Genotoxicity of organic extracts of airborne particles in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. *Chemosphere*; 39 (1):33-43.
- [11] Environment protection Agency. (2006). *Regulatory impact analysis national ambient air quality standards for particle pollution*. Recuperado de: <http://www.epa.gov/ttn/ecas/ria.html>. 12/11/2013.
- [12] Environment protection Agency. (2010). *Our Nation's Air -Status and Trends through 2008, EPA Report 454/R-09-002*, United States: Environmental Protection Agency. Recuperado de: <http://www.epa.gov/airtrends/2010/report/fullreport.pdf>. 11/08/2014.
- [13] European Environment Agency. (2013). *Air quality in Europe- 2013*. Copenhagen: European Environment Agency. Recuperado de: <http://www.eea.europa.eu/publications/air-quality-in-europe-2013>. 16/05/2014.
- [14] European Environment Agency. (2013). *Air Quality in Europe- 2013. Report No.9/2013*. Copenhagen: European Environmental Agency.
- [15] Finalyson-Pitts B.J., Pitts J N Jr. (1997). Tropospheric air pollution: ozone, airborne toxics, polycyclic aromatic hydrocarbons, and particles. *Science* 276: 1045-1052.
- [16] Gobierno del estado de Puebla. (2012). *Programa de Gestión de la Calidad del Aire 2012-2020 del Estado de Puebla*. Puebla, México: Gobierno del estado de Puebla.
- [17] Haseman JK, Margolin B.H, Shelby MD, Zeiger E, Tennant RW. (1988). Response do short term tests predict rodent carcinogenicity?. *Science* ;2,241(4870):1233.
- [18] Hass B.S., Brooks E., Schumann K., Dornfels S. (1981). Synergistic, aditive and antagonistic mutagenic responses to binary mixtures of benzo(a)pyrene as detected by strains TA 98 and TA100 in the Salmonella microsome assay. *Environ. Mutagen.* 3: 159-166.
- [19] Hayashi M., Morita T., Kodama Y., Sofuni T., Ishidate M Jr. (1990). The Micronucleus Assay with Mouse Peripheral Blood Reticulocytes Using Acridine Orange-Coated Slides. *Mutat. Res.* 245: 245-249.
- [20] Hayashi M., Tice R.R., MacGregor J.T., Anderson D., Blakey D.H., et al. (1994). *In Vivo* Rodent Erythrocyte Micronucleus Assay. *Mutat. Res.* 321:293-304.
- [21] Heddle J.A, Hite M, Kirkhart B, Mavournin K, MacGregor J.T, et al. (1983). The Induction of Micronuclei as a Measure of Genotoxicity. *Mutat. Res.* 123:61-118. doi: 10.1016/0165-1110(83)90047-7.



- [22] Helmes, C.T., Atkinson D.L., Jaffer J., Sigman C.C., Thompson K.L., et al. (1982). Evaluation and classification of the potential carcinogenicity of organic air pollutants. *J. Environ. Sci. Health*, A17, 321-389).
- [23] International Agency for Research and Cancer. (1983). *Monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans*. Vol 32, *Polynuclear aromatic compounds, Part I*. Chemical, Environmental and Experimental Data. Lyon.
- [24] IARC (International Agency for Research of Cancer). (2010). *Monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans*. Vol 92 *Some Non heterocyclic Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and Some Related Exposures*. Lyon France. Recuperado de: <http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol92/mono92.pdf>. 23/07/2014.
- [25] Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática (2003). Recuperado de: <http://www.inegi.gob.mx>. 13/03/2011.
- [26] Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática (2011b). Recuperado de: <http://www.inegi.gob.mx>. 24/03/2011.
- [27] John W., Wall S.M, Ondo J.L. Winklmayr W. (1990). Modes in the size distributions of atmospheric inorganic aerosol. *Atmos. Environ.* 24,2349-2359.
- [28] Kastenbaum M. A., Bowman K.O. (1970). Tables for determining the statistical significance of mutation frequencies. *Mutat Res.* 9: 527-549.
- [29] Lippmann M., Chen LC., Gordon T., Ito K., Thurston GD. (2013). National Particle Component Toxicity (NPACT) initiative: integrated epidemiologic and toxicologic studies of the health effects of particulate matter components. *Res Rep Health Eff Inst.* 177:5-13.
- [30] Nemmar A, Holme J.A, Rosas I, Schwarze PE, Alfaro-Moreno E. (2013). Recent Advances in Particulate matter and nanoparticle toxicology: A review of the *In vivo* and *In vitro* studies. *BioMed Research International*. doi: 10.1155/2013/279371.
- [31] Norma Oficial Mexicana-024-SSA1. (1993). México, Secretaría de Salud. Diario Oficial de la Federación, 26 de septiembre del 2005.
- [32] Organisation for Economic Cooperation and Development. (1997). *OECD 474; mammalian erythrocyte micronucleus test*; Guideline for the Testing of Chemicals, Section 4. doi: 10.1787/20745788.
- [33] Pellizzari E.D. (1978). State-of-the art analytical techniques for ambient vapor phase organics and volatile organics in aqueous samples from energy- related activities, in: Application of Short-term Bioassays in the Fractionation and Analysis of Complex Environmental Mixtures. *EPA Publ.* 600/9-78-027, 195-227.
- [34] Pitts Jr. J.N. Sweetman JA., Harger W., Ditz DR. (1985). Diurnal mutagenicity of airborne particulate organic matter adjacent to a heavily traveled west Los Angeles freeway. *J. Air Pollut. Control Assoc.* 35,638-643.
- [35] Pope CA 3rd, Burnett RT, Thun MJ, Calle EE, Crewski D. et al. (2002). Lung cancer, cardiopulmonary mortality, and long-term exposure to fine particulate air pollution. *JAMA.* 287(9):1132-1141.
- [36] R ckerl R, Schneider A, Breitner S, Cyrus J, Peters A. (2011). Health effects of particulate air pollution: A review of epidemiological evidence. *Inhalation Toxicology*, 23(10):555-592.
- [37] Salazar S., Manríquez F., Carrera L.M. Bravo J.L. (1993). Elemental and morphological analyses of atmospheric particles from Southwestern part of Mexico City. *Bull Environ. Contam. Toxicol.* 51,247-254.

- [38] Secretaria del Medio Ambiente y Recursos Naturales del Gobierno Federal- Norma Oficial Mexicana-35 (SEMARNAT-NOM-035). (1993). Norma oficial Mexicana. « Que establece los métodos de medición para determinar la concentración de partículas suspendidas totales en el aire ambiente y el procedimiento para la calibración de los equipos de medición ». Diario Oficial de la Federación 1993. Recuperado de: <http://www.semarnat.gob.mx/leyes-y-normas/nom-concentraciones> . 11/04/2014.
- [39] Secretaria del Medio Ambiente y Recursos Naturales del Gobierno Federal, Secretaria del Medio Ambiente y Recursos Naturales del Estado de Puebla. (2006). *Programa de Gestión de Calidad del Aire en la Zona Metropolitana del Valle de Puebla* 2006-2011. Puebla: Gobierno del Estado de Puebla.
- [40] Saffiotti U. (1983). Evaluation of mixed exposure to carcinogens and correlations of in vivo and in vitro systems. *Environ. Health Perspect.* 47, 319-324.
- [41] Stevens, G.A. R.H. Dias, M. Ezzati. (2008). The effects of 3 environmental risks on mortality disparities across Mexican communities. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 105 (44):16860-16865. doi:10.1073/pnas.0808927105.
- [42] The Collaborative Study Group for the Micronucleus Test. CSGMT. (1992). Micronucleus Test with Mouse Peripheral Blood Erythrocytes by Acridine Orange Supravital Staining: The Summary Report of the 5<sup>th</sup> Collaborative Study by CSGMT/JEMS.MMS. *Mutat. Res.* 227:83-98.
- [43] The Collaborative Study Group for the Micronucleus Test. (CSGMT/JEMMS.MMS, The Mammalian Mutagenesis Study Group of the Environmental Mutagen Society of Japan). (1995). Protocol recommended for the short-term mouse peripheral blood micronucleus test. *Mutagenesis.* 10:153-159.
- [44] U.S. Environmental Protection Agency (1999). *Compendium of Methods for the Determination of Toxic Organic Compounds in Ambient Air.* 2<sup>o</sup> Ed. Compendium method TO-13A. *Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in ambient air using gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS).* Cincinnati OH: Center for Environmental Protection Agency. EPA/625/R-96/010b Recuperado de: <http://www.epa.gov/ttnamti1/files/ambient/airtox/to-13arr.pdf>. 23/07/2014.
- [45] Villalobos-Pietrini R., Blanco-Jimenez S., Gomez Arrollo S. (1995). Mutagenicity assessment of airborne particles in México City. *Atmos. Environ* 29: 517-524.
- [46] Viras L.G., Athanasiou K., Siskos P. (1990). Determination of mutagenic activity of airborne particulates and of the benzo(a)pyrene concentration in Athens atmosphere. *Atmospheric Environment* 24: 267-274.
- [47] Wendy Hsiao WL., Mo Z-Y., Fang M, Shi M., Wang F. (2000). Cytotoxicity of PM<sub>2.5</sub> and PM<sub>2.5-10</sub> ambient air pollutants assessed by the MTT and the Comet assays. *Mutat Res.* 471,45-55.
- [48] Wilson W.E., Suh H.H. (1996). Fine and coarse particles concentration relationships relevant to epidemiological studies. *J Air Waste Man. Assoc.* 47,1238-1249.
- [49] World Health Organization. (2013). *Review of evidence on health aspects of air pollution - REVIHAAP Project Technical report, World Health Organization.* Copenhagen, Denmark: Regional Office for Europe.