



“MAPEC_LIFE”, un progetto per valutare gli effetti dell'inquinamento sui bambini di cinque città italiane

Francesco Bagordo^a

^aLaboratorio di Igiene, Dipartimento di Scienze e Tecnologie Biologiche ed Ambientali Università del Salento

Dopo tre anni di intense attività, il 31 dicembre 2016 si è concluso il progetto MAPEC_LIFE “Monitoring Air Pollution Effects on Children for supporting public health policy” [1], a cui ha partecipato l'Università del Salento insieme alle Università di Brescia (capofila), Torino, Pisa e Perugia, il Comune di Brescia ed il Centro Servizi Multisetoriale e Tecnologico (CSMT Gestione) di Brescia.

Lo studio, approvato nel 2013 dalla Commissione Europea nell'ambito del Programma LIFE+2012, Environment Policy and Governance, ha avuto l'obiettivo di valutare la frequenza di alcuni biomarcatori di danno precoce nelle cellule della mucosa orale dei bambini di 6-8 anni, residenti in 5 città italiane (Brescia, Lecce, Perugia, Pisa e Torino), in relazione alla concentrazione di alcuni inquinanti atmosferici, alle caratteristiche socio-demografiche e agli stili di vita dei bambini.

È stato il primo grande studio multicentrico sugli effetti biologici precoci degli inquinanti aerei nei bambini e nel 2015 è stato scelto dall'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) come “case study” per rappresentare l'Italia al meeting dell'Ufficio Regionale Europeo dell'OMS. Il progetto, inoltre, è stato inserito sia sul sito dell'OMS (www.euro.who.int/en/media-centre/events/events/2015/04/ehp-mid-term-review/case-studies/biomonitoring) che sul sito “ResearchItaly” del Ministero della Salute (www.researchitaly.it/progetti/inquinamento-bambini-protagonisti-con-il-progetto-europeo-mapec-life/).

L'Unità di Ricerca dell'Università del Salento, coordinata dalla professoressa Antonella De Donno, comprendeva professori, giovani ricercatori e personale tecnico afferente al Laboratorio di Igiene del Dipartimento di Scienze e Tecnologie Biologiche ed Ambientali.

Background

La base di partenza per lo studio è stata la consapevolezza che le politiche progettate per prevenire le malattie legate all'ambiente richiedono nuovi approcci metodologici per l'identificazione precoce dei rischi derivanti dall'esposizione alle sostanze inquinanti.

L'inquinamento atmosferico è il principale fattore di rischio ambientale per la salute in Europa: riduce la durata di vita e contribuisce alla diffusione di gravi patologie quali malattie cardiache, problemi respiratori e cancro. Nel 2013 l'Agenzia Internazionale per la Ricerca sul Cancro (IARC) ha dichiarato che l'inquinamento atmosferico ed il particolato sono cancerogeni per l'uomo e causano il tumore al polmone [2].

Ma come si fa a capire se l'esposizione attuale di una popolazione a una certa condizione ambientale può essere causa in futuro di danni alla salute dei cittadini?

Molti tumori, prima della comparsa dei sintomi riconoscono una fase di latenza più o meno lunga che comincia con l'esposizione ai contaminanti ambientali. Durante questa fase si susseguono una serie di eventi degenerativi che hanno inizio con alterazioni sub-cellulari, come i danni al DNA, per poi proseguire a livello di organi e di funzioni. Queste modificazioni, che possono essere accelerate o contrastate da fattori individuali e comportamentali, sono inizialmente reversibili. Per poter individuare condizioni ambientali “critiche” ed intraprendere azioni correttive efficaci diventa fondamentale riconoscere questi cambiamenti biologici prima che possano tradursi in danni irreversibili per la salute. Uno dei metodi più efficaci per riconoscere le situazioni di rischio per la salute è la determinazione dei biomarcatori di effetto biologico precoce [3], come i micronuclei. In particolare, l'individuazione di questi indicatori nei bambini può essere predittiva dell'insorgenza di patologie croniche in età adulta.

Metodi

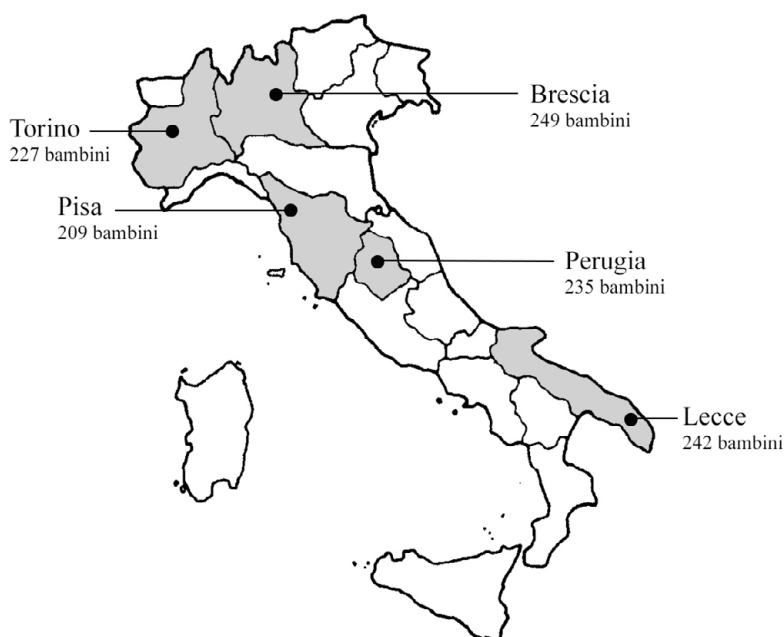
Reclutamento

Nelle cinque città coinvolte nello studio sono state selezionate le scuole primarie in cui svolgere le attività. I genitori di tutti i bambini frequentanti le prime tre classi sono stati informati dello studio ed invitati alla partecipazione chiedendo loro di firmare il modulo di consenso appositamente predisposto, dopo aver verificato che i loro figli non rientravano nei criteri di esclusione (bambini residenti in altri comuni, con patologie gravi e/o sottoposti negli ultimi mesi a radioterapia, chemioterapia, esami radiografici e che usavano apparecchi ortodontici).

A tutti i genitori che avevano espresso consenso favorevole alla partecipazione è stato somministrato un questionario [4] per raccogliere informazioni su alcune variabili individuali e comportamentali, esposizioni outdoor e indoor, caratteristiche socio-economiche. Il questionario era composto da 148 domande suddivise in varie sezioni: informazioni demografiche, dati antropometrici, stato di salute, stili di vita ed abitudini alimentari del bambino, ambiente domestico, caratteristiche dei genitori.

Monitoraggio ambientale

Per valutare l'effettiva esposizione dei bambini all'inquinamento atmosferico, si è proceduto al campionamento di particolato atmosferico (PM₁₀ e PM_{0,5}), mediante campionatori d'aria ad alto volume posizionati nei cortili delle scuole frequentate dai bambini reclutati. Il PM_{0,5} così raccolto è stato analizzato per valutare la concentrazione di idrocarburi policiclici aromatici (IPA) e di loro nitro-composti (nitroIPA), la tossicità su cellule polmonari umane in coltura (cellule A549), la genotossicità mediante il



La coorte MAPEC_LIFE: 1162 bambini reclutati nelle cinque città coinvolte nello studio (Torino, Brescia, Pisa, Perugia e Lecce).



Il campionatore ad alto volume utilizzato per raccogliere il particolato atmosferico nei pressi delle scuole coinvolte nello studio MAPEC_LIFE

test del micronucleo e il comet assay sullo stesso tipo cellulare (cellule A549) e la mutagenicità mediante il test di Ames su cellule batteriche.

Per una più completa valutazione della qualità dell'aria a cui i bambini sono stati esposti, i dati delle Agenzie Regionali per la Protezione dell'Ambiente relativi ai livelli dei principali inquinanti aerodispersi (PM₁₀, PM_{2,5}, NO, NO₂, CO, SO₂, O₃ e benzene) sono stati raccolti per tutto il periodo di campionamento.

Monitoraggio biologico

Gli effetti dell'esposizione ai contaminanti ambientali in tutti i bambini reclutati sono stati valutati verificando eventuali danni al DNA delle cellule della mucosa buccale. Tali cellule sono state raccolte, negli stessi giorni in cui veniva effettuato il campionamento ambientale, mediante un leggero strofinamento dell'interno della guancia con uno spazzolino da denti a setole morbide ed analizzate in laboratorio per valutare la presenza di micronuclei, quale indicatore di danno al DNA cellulare. Questo biomarcatore di effetto precoce rappresenta un danno biologico non direttamente correlato ad un rischio individuale, ma indicativo dell'esposizione di una popolazione a fattori di rischio [5].

Per studiare la relazione tra esposizione a inquinanti ed effetti biologici, i campioni biologici ed ambientali sono stati raccolti sia in inverno che in tarda primavera, periodi caratterizzati, nella realtà urbana del nostro paese, rispettivamente da alti e bassi livelli di diversi inquinanti aerei. Inoltre, per valutare la variabilità biologica intra-soggetto, nei bambini reclutati a Brescia è stato effettuato un terzo prelievo biologico nella stagione invernale, a distanza di un anno dal precedente.

I dati così raccolti sono stati analizzati mediante l'impiego di modelli di analisi statistica multivariata per valutare le associazioni tra danno al DNA, livelli di inquinanti e gli altri fattori indagati.

Risultati

Popolazione indagata

I campionamenti ambientali e biologici si sono conclusi a gennaio 2016. Nelle 5 città sono state coinvolte 26 scuole primarie, per un totale di 139 classi. In totale, 1162 bambini sono stati inclusi nello studio di cui 1149 sono stati esaminati in entrambe le stagioni: inverno (novembre 2014-marzo 2015) e primavera (aprile-giugno 2015). A Brescia, 191 bambini sono stati esaminati anche una terza volta (novembre 2015-gennaio 2016).

A Lecce hanno partecipato al progetto 31 classi di 5 scuole facenti capo a tre Istituti: il IV circolo "S. Castromediano" (sedi di via Cantobelli e in via Valzani), il V circolo "L. Tempesta" (sedi di via A. da Taranto e di via Ofanto) e l'Istituto paritario delle "Suore Discepole di Gesù Eucaristico" in via De Pace per un totale di 272 bambini reclutati, 270 campionati nella prima stagione e 241 bambini campionati nella seconda.

Complessivamente, i bambini coinvolti sono per metà maschi e metà femmine e mediamente hanno un elevato livello socio-economico.

Nel complesso i dati dei questionari compilati dai genitori mostrano che lo stato ponderale dei loro figli è sovrapponibile a quello di altri studi [6] condotti sui bambini italiani della stessa età (un bambino su 3 è in sovrappeso o obeso) e confermano una quota più elevata di bambini in sovrappeso nelle regioni del centro e sud Italia [7]. Molti bambini sono risultati esposti a fattori di inquinamento indoor, spesso attribuibili a comportamenti sbagliati da parte dei genitori (un bambino su 8 è esposto a fumo passivo in casa).

La maggior parte dei bambini, inoltre, ha mostrato abitudini alimentari spesso poco salutari con un frequente consumo di cibi considerati "a rischio" ed una bassa aderenza alla dieta mediterranea [8]. Questo regime alimentare, invece, rappresenta un modello dietetico altamente raccomandato in quanto equilibrato e ricco di sostanze (antiossidanti) in grado di contrastare i danni al DNA compresa la formazione di micronuclei [9].

Qualità dell'aria

I dati raccolti dalle Agenzie Regionali per la Protezione dell'Ambiente mostrano livelli di inquinamento urbano più elevati in inverno rispetto alla primavera

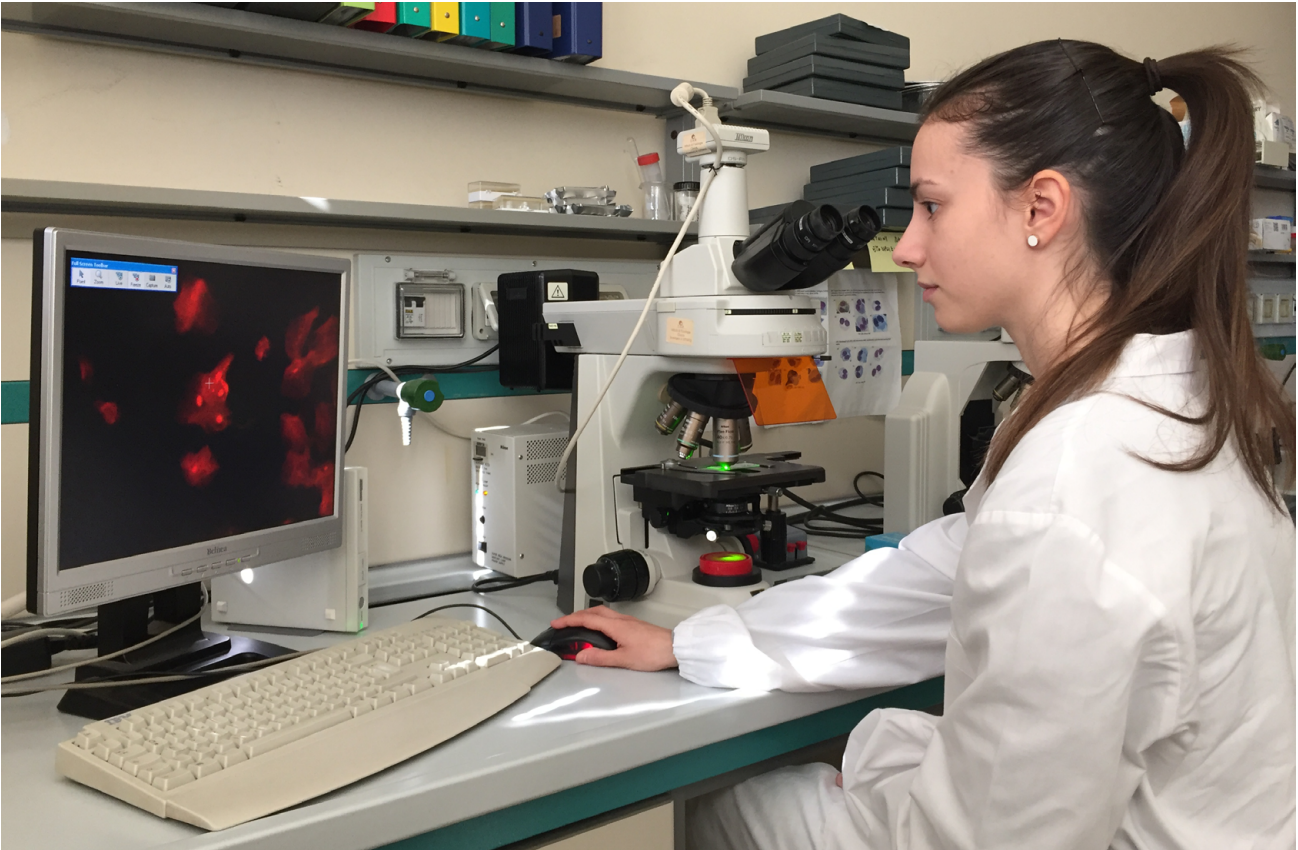
e nelle città del nord Italia (Torino e Brescia) rispetto a quelle del centro-sud (Pisa, Perugia e Lecce). In particolare, i livelli medi di PM10 rilevati nel periodo di campionamento invernale (novembre 2014-marzo 2015) sono: 50 µg/m³ a Torino, 45 µg/m³ a Brescia, 29 µg/m³ a Pisa e Perugia, 27 µg/m³ a Lecce. Tali livelli si abbassano sensibilmente nella stagione primaverile. Le concentrazioni di PM10 registrate nel periodo aprile-giugno 2015, durante la seconda stagione di campionamento, sono: 24 µg/m³ a Torino, 26 µg/m³ a Brescia, 22 µg/m³ a Pisa, 17 µg/m³ a Perugia e 20 µg/m³ a Lecce.

Lo stesso andamento stagionale e geografico caratterizza tutti gli inquinanti indagati, ad eccezione dell'ozono che, invece, è più concentrato nella stagione primaverile e molto simile nelle diverse città.

Anche le concentrazioni di IPA e nitroIPA rilevate nel particolato atmosferico PM_{10,5} campionato presso le scuole coinvolte nel progetto mostrano tale andamento: i livelli primaverili sono fino a 10 volte inferiori a quelli invernali e le città del nord Italia sono quelle in cui si sono registrate le concentrazioni più alte, in entrambe le stagioni.



Un momento del prelievo delle cellule della mucosa buccale da una bambina.



Osservazione dei vetrini al microscopio a fluorescenza per individuare la presenza di micronuclei nelle cellule prelevate.

Attività tossica e genotossica dei campioni di particolato atmosferico

I risultati dei test di laboratorio effettuati dal progetto MAPEC_LIFE hanno mostrato che i campioni di particolato atmosferico inducono effetti tossici, genotossici e cancerogeni, se pur modesti, nelle cellule in coltura associati alla stagione, alla città e alla concentrazione di Idrocarburi Policiclici Aromatici. I campioni prelevati in inverno inducono effetti maggiori rispetto a quelli raccolti in primavera. Per quanto riguarda la tossicità aspecifica e la promozione della cancerogenicità, il particolato atmosferico di Brescia è quello che ha dato gli effetti maggiori. Nel test di mutagenicità, invece, quello di Torino è risultato essere il particolato più attivo, seguito da quello di Brescia, Pisa, Perugia e infine Lecce.

Effetti genotossici nelle cellule buccali dei bambini

Nella stagione invernale, il 52,7% dei bambini ha mostrato di avere almeno un micronucleo nelle cellule della mucosa buccale (valore medio: 0,44 MN/1000 cellule). Si osserva tuttavia una bassa correlazione tra i livelli di micronuclei rilevati nella stagione invernale e quelli rilevati in primavera negli stessi bambini.

Confrontando i bambini delle 5 città, si nota che quelli di Brescia hanno in media un maggior numero di micronuclei rispetto agli altri (0,56 MN/1000 cellule). Seguono i bambini di Pisa (0,50 MN/1000 cellule),

Perugia, Torino e Lecce (0,41, 0,39 e 0,32 MN/1000 cellule, rispettivamente). In primavera, si osserva una generale riduzione dell'effetto biologico (valore medio: 0,22 MN/1000 cellule) con una diminuzione anche della percentuale di bambini con almeno un micronucleo nelle cellule buccali (35,9%) senza differenze significative fra le varie città.

Applicando modelli avanzati di analisi statistica multivariata, si è visto che i livelli di alcuni inquinanti (benzene, PM_{2,5}, ozono, SO₂ e IPA) sono associati alla frequenza di micronuclei nelle cellule dei bambini. In particolare, l'incremento del rischio di avere micronuclei nelle cellule buccali per l'aumento di una unità di inquinante è: 20,1% per il benzene (1 µg/m³), 1,1% per il PM_{2,5} (1 µg/m³), 1,3% per l'ozono (1 µg/m³), 4,2% per l'SO₂ (1 µg/m³) e 1,7% per gli IPA nel PM_{0,5} (1 ng/m³), pur nei limiti di incertezza delle stime dovute alla elevata variabilità del fenomeno. L'importanza relativa di questi inquinanti dipende, inoltre, dalla variabilità delle concentrazioni nelle diverse città.

Infine, si è visto che l'esposizione a fumo passivo e il sovrappeso nei bambini tendono ad aumentare il rischio di avere micronuclei, mentre l'alimentazione sana tende a diminuirlo.

Lo studio ha confermato la sensibilità del test del micronucleo, che è risultato in grado di evidenziare effetti biologici in associazione ai livelli di alcuni inquinanti aerodispersi. In particolare, si è osservato

un livello sensibilmente maggiore di micronuclei nella stagione invernale rispetto a quella primaverile, e sostanziali differenze tra le diverse realtà geografiche.

Attività educative

Il progetto MAPEC_LIFE è stato anche l'occasione per parlare nelle scuole dell'inquinamento atmosferico, dei suoi effetti sulla salute e degli stili di vita sani, con un progetto didattico che ha prodotto schede per gli insegnanti e un cartone animato e tre videogames per i bambini. Tutto questo materiale è scaricabile liberamente dal sito internet del progetto (www.mapec-life.eu). L'interesse suscitato e l'efficacia delle attività intraprese dimostrano l'importanza dell'educazione su questi temi fin dalla scuola primaria [10].

Conclusioni

Lo studio MAPEC_LIFE ha evidenziato la capacità della frazione ultrafine del particolato atmosferico (PM_{0,5}) di indurre effetti tossici, mutageni e cancerogeni, se pur modesti, nelle cellule trattate in laboratorio.

L'effetto biologico precoce, evidenziato nelle cellule buccali dei bambini come presenza di micronuclei, è risultato essere associato a:

- stagione: l'effetto biologico misurato in inverno è sensibilmente maggiore rispetto alla primavera;
- città: in media i bambini di Brescia hanno mostrato l'effetto maggiore, seguiti da quelli di Pisa, Perugia, Torino e Lecce, nell'ordine;
- concentrazione di benzene, PM_{2,5}, ozono, SO₂ e IPA: l'aumento di questi inquinanti è risultato moderatamente associato ad un aumento di micronuclei nelle cellule dei bambini;
- caratteristiche dei bambini: l'alimentazione sana ha mostrato di attenuare l'effetto, mentre l'esposizione a fumo passivo e il sovrappeso di aggravarlo.

Nel considerare questi risultati, va tenuto presente che la stagione invernale 2014-2015 è stata caratterizzata da un livello medio di inquinanti aerodispersi relativamente basso, rispetto agli anni precedenti, probabilmente a causa di temperature miti ed elevata piovosità. Pertanto, è possibile che l'effetto biologico presente in altre stagioni invernali sia superiore rispetto a quello misurato nel presente studio.

In conclusione il livello dei marcatori biologici studiati è risultato associato alle concentrazioni di alcuni inquinanti aerei e ad altri fattori individuali e comportamentali e può essere un indicatore di possibili, futuri, effetti nocivi alla salute. È doveroso ricordare che tali effetti, alla luce delle attuali conoscenze, sono evidenziabili a livello di popolazione, ma non sono predittivi di insorgenza di patologie nel singolo individuo.

The MAPEC_LIFE study group

Università di Brescia: Elisabetta Ceretti, Loredana Covolo, Francesco Donato, Donatella Feretti, Andrea Festa, Umberto Gelatti, Rosa Maria Limina, Gaia Claudia Viviana Viola, Claudia Zani, Ilaria Zerbini.

Università di Perugia: Cristina Fatigoni, Sara Levorato, Silvano Monarca, Massimo Moretti, Tania Salvadori, Samuele Vannini, Milena Villarini.

Università di Pisa: Beatrice Bruni, Elisa Caponi, Annalaura Carducci, Beatrice Casini, Gabriele Donzelli, Marco Verani.

Università del Salento: Francesco Bagordo, Antonella De Donno, Mattia De Giorgi, Gabriele Devoti, Tiziana Grassi, Marcello Guido, Adele Idolo, Francesca Serio, Tiziano Verri.

Università di Torino: Sara Bonetta, Silvia Bonetta, Elisabetta Carraro, Giorgio Gilli, Cristina Pignata, Tiziana Schilirò, Valeria Romanazzi.



Il MAPEC_LIFE study group in un meeting tenutosi a Lecce nel novembre 2014.

Comune di Brescia: Silvia Bonizzoni, Camilla Furia.

Centro Servizi Multisetoriale e Tecnologico – CSMT Gestione S.c.a.r.l., Brescia: Alberto Bonetti, Roberta Codenotti, Paolo Colombi, Stefano Crottini, Laura Gaffurini, Licia Zagni.

Bibliografia

[1] FERETTI D, CERETTI E, DE DONNO A, MORETTI M, CARDUCCI A, BONETTA S, ET AL. *Monitoring air pollution effects on children for supporting public health policy: the protocol of the prospective cohort MAPEC study.* *BMJ Open* 2014;4(9) e006096.

[2] IARC. *Outdoor air pollution. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans.* Volume 109. Lyon: International Agency for Research on Cancer 2015.

[3] BONASSI S, UGOLINI D, KIRSCH-VOLDERS M, STRÖMBERG U, VERMEULEN R, TUCKER JD. *Human population studies with cytogenetic biomarkers: review of the literature and future prospective.* *Environ Mol Mutagen* 2005;45(2-3):258-70.

[4] ZANI C, DONATO F, GRIONI S, VIOLA GCV, CERETTI E, FERETTI D, ET AL. *Feasibility and reliability of a questionnaire for evaluation of the exposure to indoor and outdoor air pollutants, diet and physical activity in 6-8-year-old children.* *Ann Ig* 2015;27(4):646-56.

[5] HOLLAND N, BOLOGNESI C, KIRSCH-VOLDERS M, BONASSI S, ZEIGER E, KNASMUELLER S, FENECH M. *The micronucleus assay in human buccal cells as a tool for biomonitoring DNA*

damage. The HUMN project perspective on current status and knowledge gaps. *Mut Res* 2008;659:93-108.

[6] NARDONE P, SPINELLI A, LAURIA L, BUONCRISTIANO M, BUCCIARELLI M, ANDREZZI S AND GRUPPO OKKIO ALLA SALUTE 2008-09, 2010, 2012 e 2014. *Lo stato ponderale dei bambini.* In NARDONE P, SPINELLI A, BUONCRISTIANO M, LAURIA L, PIZZI E, ANDREZZI S, GALEONE D (Eds). *Il Sistema di sorveglianza OKKio alla SALUTE: risultati 2014.* Istituto Superiore di Sanità, Roma, 2016;13-18.

[7] GRASSI T, DE DONNO A, BAGORDO F, SERIO F, PISCITELLI P, CERETTI E, ET AL. *Socio-Economic and Environmental Factors Associated with Overweight and Obesity in Children Aged 6–8 Years Living in Five Italian Cities (the MAPEC_LIFE Cohort).* *Int J Environ Res Public Health* 2016;13:1002.

[8] ZANI C, CERETTI E, GRIONI S, VIOLA GCV, DONATO F, FERETTI D, ET AL. *Are 6-8 year old Italian children moving away from the Mediterranean diet?* *Ann Ig* 2016;28(5):339-48.

[9] SOFI F, MACCHI C, ABBATE R, GENSINI GF, CASINI A. *Mediterranean diet and health status: an updated meta-analysis and a proposal for a literature-based adherence score.* *Public Health Nutr* 2014; 17: 2769-82.

[10] CARDUCCI A, CASINI B, DONZELLI G, VERANI M, BRUNI B, CERETTI E, ET AL. *Improving awareness of health hazards associated with air pollution in primary school children: design and test of didactic tools.* *Appl Environ Educ Commun* 2016; 15:247-260.



I ricercatori dell'Unità di Lecce affrontano con i bambini delle scuole coinvolte nel progetto il tema dell'inquinamento spiegando il funzionamento del campionatore usato nello studio MAPEC_LIFE.