



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI TORINO



Titolo dello studio: Monitoring air pollution effects on children for supporting public health policy

Acronimo del progetto: MAPEC_LIFE

Codice protocollo: LIFE 12 ENV/IT/000614

Razionale

Gli effetti nocivi sulla salute dell'inquinamento atmosferico sono ben documentati. I bambini sono più vulnerabili degli adulti agli effetti degli agenti aerodispersi, per diverse ragioni: maggiore attività fisica, più tempo all'aperto, maggiore quantità di aria inalata per unità di peso, immaturità di alcuni organi, tra cui i polmoni, e dei meccanismi di riparazione cellulare. Vi è quindi uno spiccato interesse nello studio degli effetti dell'inquinamento atmosferico nei bambini, con l'obiettivo di individuare marcatori di danno biologico predittivi dell'insorgenza di patologie croniche in età adulta. Alcuni fattori possono influenzare gli effetti dell'inquinamento atmosferico, modulando la risposta dell'organismo, sia in termini di aggravamento che di attenuazione del danno, tra cui l'alimentazione, l'attività fisica e l'esposizione ad altri inquinanti, come quelli presenti all'interno delle abitazioni. Il progetto si propone di studiare gli effetti biologici precoci da esposizione a inquinanti atmosferici, quali il danno al DNA e la presenza di micronuclei, nelle cellule della mucosa orale e i fattori che possono influenzare tali danni nei bambini in età scolare. Si tratta di uno studio di coorte multicentrico che prevede di includere 1.000 bambini della scuola primaria di primo grado (6-8 anni) in 5 città italiane (Brescia, Lecce, Perugia, Pisa e Torino) a diverso grado di inquinamento. Stimando una perdita del 20% circa, verranno reclutati in totale 1.300 bambini. Per studiare la relazione dose-effetto tra esposizione a inquinanti ed effetti biologici, i campioni di aria e i campioni biologici verranno raccolti sia nella stagione invernale che in tarda primavera (prima della chiusura delle scuole). Inoltre, per valutare la variabilità biologica intra-soggetto, solo sui bambini reclutati a Brescia sarà effettuato un terzo prelievo di materiale biologico nella stagione invernale, a distanza di un anno dal precedente.

Saranno esclusi i bambini con patologie gravi e/o sottoposti negli ultimi 12 mesi a radioterapia, chemioterapia ed esami radiografici, i bambini affetti da sindromi genetiche e i portatori di apparecchi ortodontici.

I dati verranno analizzati mediante modelli di analisi multivariata, per tenere conto di possibili fattori di confondimento. La relazione dose-effetto tra esposizione a inquinanti atmosferici, mutagenicità dell'aria ed effetti biologici precoci sarà valutata mediante diversi modelli di regressione. L'analisi dei questionari alimentari sarà condotta in modo da costruire pattern alimentari compositi. Sarà quindi valutato il ruolo di fattori di interazione nella relazione tra esposizione a inquinanti ed effetti biologici mediante modelli statistici. Infine sarà costruito un modello di rischio globale di avere un effetto biologico precoce in età infantile in relazione ai diversi tipi di esposizione considerata. La ricerca consentirà di ottenere dati riferibili all'intero territorio nazionale, sia per quanto concerne le misure di esposizione che per quelle di effetto biologico. L'integrazione dei dati ottenuti dalle varie parti dello studio porterà ad una migliore caratterizzazione del possibile ruolo degli inquinanti aerodispersi nel determinare effetti mutageni e genotossici nei bambini. Se questi indicatori di effetto biologico mostreranno una buona associazione con i parametri di inquinamento atmosferico, essi potranno essere proposti quali test rapidi, di semplice esecuzione e di costo contenuto, per la valutazione e il monitoraggio di specifiche situazioni ambientali e dell'impatto di interventi atti a contrastare gli effetti dell'inquinamento atmosferico sulla salute.

Obiettivi dello studio

Gli obiettivi generali dello studio:

1) Valutare la distribuzione di indicatori di effetto biologico precoce, quali il danno al DNA e la presenza di micronuclei, nelle cellule della mucosa orale di bambini in età scolare nell'intero campione e in relazione a:

a) concentrazione di alcuni inquinanti aerodispersi;

- b) attività mutagena dell'aria, misurata con test in vitro;
- c) variabili demografiche e socio-economiche, esposizione ad altri inquinanti e fattori legati allo stile di vita, incluse le abitudini alimentari.
- 2) Costruire un modello di rischio di avere un danno biologico precoce da esposizione a inquinanti atmosferici e ad altri fattori. Questo tipo di approccio, che va considerato del tutto sperimentale in questo ambito, è in linea con altri modelli di rischio globale già validati e usati da anni, come quello del rischio cardiovascolare (www.cuore.iss.it), o quello del rischio di broncopneumopatie cronico ostruttive sulla base di diversi fattori, tra cui anche l'esposizione a inquinanti aerei, come proposto dall'Istituto Superiore di Sanità (ISS) (<http://www.iss.it/fumo/publ/cont.php?id=153&lang=1&tipo=19>).
- 3) Fornire informazioni utili per orientare interventi e policy intese a proteggere la salute dei bambini dai possibili danni degli inquinanti atmosferici, sia a livello collettivo che individuale. *Gli obiettivi specifici*, da considerare come passi successivi necessari alla realizzazione del progetto e al raggiungimento degli obiettivi generali, sono:
- misurare la concentrazione di alcuni composti organici (IPA e nitroIPA) nell'aria di diverse città italiane (Brescia, Lecce, Perugia, Pisa e Torino) che presentano sostanziali differenze nel livello medio annuo di alcuni parametri di inquinamento atmosferico (PM 10, PM 2,5, NOx e altri);
 - misurare la genotossicità dell'aria nelle aree in cui risiedono i bambini mediante test di mutagenesi in vitro su estratti di particolato fine (PM 0,5) quali il test di Ames su batteri, il Comet test e il test dei micronuclei in una linea cellulare di epitelio alveolare polmonare umano (cellule A594);
 - misurare la tossicità dei campioni di particolato fine (PM 0,5) dell'aria atmosferica su linee cellulari polmonari (cellule A594);
 - studiare la relazione tra concentrazione degli inquinanti atmosferici misurati e la mutagenicità dell'aria valutata mediante i test impiegati nella ricerca;
 - rilevare la presenza di esposizioni a inquinanti aerodispersi indoor e outdoor e di altri aspetti dello stile di vita dei bambini, tra cui l'indice di massa corporea, l'attività fisica e l'alimentazione, mediante somministrazione di un questionario auto compilato ai genitori;
 - valutare il danno genotossico nei bambini di 6-8 anni reclutati nelle medesime aree utilizzando marcatori di effetto biologico precoce nelle cellule della mucosa orale, quali il danno al DNA e la formazione di micronuclei;
 - effettuare l'analisi del rischio cancerogeno inserendo nel modello i dati ambientali relativi a parametri standard (PM 10, PM 2,5, NOx e altri) e a IPA e nitroIPA, rilevati nell'aria delle città in studio;
 - confrontare i risultati del modello di Analisi del Rischio basato su dati ambientali con i marker di effetto biologico precoce nei bambini.

Materiali e metodi

1. Disegno dello studio

Si tratta di uno studio epidemiologico di coorte, multicentrico che prevede di includere 1.000 bambini della scuola primaria di primo grado (età compresa tra 6 e 8 anni), residenti in 5 città italiane (Brescia, Lecce, Perugia, Pisa e Torino) caratterizzate da diversi livelli di inquinamento atmosferico (200 per ogni area).

Saranno effettuate le seguenti misurazioni per ogni area sede di reclutamento:

a) esposizione a inquinanti atmosferici:

- analisi chimiche sulla componente organica (IPA e nitroIPA) dei campioni di particolato fine (PM 0,5) dell'aria atmosferica raccolti mediante un campionatore ad alto volume;
- test di mutagenesi in vitro (test di Ames su batteri, Comet test e test dei micronuclei (MN) su linee cellulari polmonari) sui medesimi campioni;
- test di tossicità dei campioni di particolato fine (PM 0,5) dell'aria atmosferica su linee cellulari polmonari (A549) sui medesimi campioni;
- raccolta dati dei parametri chimici dell'aria urbana più comunemente rilevati dall'ARPA;

b) possibili fattori di interazione:

- somministrazione ai genitori dei bambini di un questionario concernente aspetti demografici e socio-economici, presenza di disturbi e malattie respiratorie, esposizioni ambientali indoor e outdoor, alimentazione, attività fisica ed altri aspetti dello stile di vita dei loro figli;

c) effetti biologici precoci:

- prelievo di un campione di cellule della mucosa orale con valutazione del danno al DNA mediante Comet test (protocollo a pH>13 e protocollo con per il danno ossidativo) e test dei MN.

Nessun tipo di indagine genetica verrà effettuata sulle cellule prelevate ai bambini.

Infine si procederà all'impiego di due modelli per il calcolo del rischio di effetti biologici precoci nei bambini. Il primo consiste in un programma di analisi impiegato per la valutazione dell'impatto sanitario da esposizione all'inquinamento (analisi di rischio) che porta a quantificare un eccesso di eventi indesiderabili, rispetto alla norma, correlabili con la situazione di esposizione ad una matrice ambientale contaminata.

Il confronto tra le stime del rischio di effetti cancerogeni prodotte dal modello e i risultati dei test di danno al DNA sulle cellule della mucosa orale consentiranno di valutare la bontà del modello per la predizione di effetti biologici nei bambini. Inoltre, si procederà alla costruzione, in via sperimentale, di un modello globale per il calcolo del rischio di avere un effetto biologico precoce da esposizione a inquinanti atmosferici, che includa non solo le variabili ambientali, ma anche gli altri fattori presi in esame.

Dimensione del campione. La numerosità dei bambini da reclutare nelle 5 città, 1.000, è stata determinata per poter osservare differenze significative nei parametri considerati (danno al DNA e MN in cellule della mucosa orale) tra i bambini residenti nelle aree a maggiore esposizione a inquinanti atmosferici e quelli residenti in aree a livello inferiore di inquinamento. Sulla base di alcuni studi recenti ci si può aspettare di rilevare con il Comet test un danno al DNA, espresso come percentuale di DNA migrato nella coda della cometa (tail intensity, TI) di circa 10%, in media, nei soggetti a maggiore esposizione vs 7% in quelli a minore esposizione, con una deviazione standard massima di 10%. Il campione di 1.000 bambini inclusi nella ricerca sarà dicotomizzato sulla base della mediana della distribuzione dei parametri di qualità dell'aria considerati.

Assumendo una distribuzione log-normale della variabile in studio, si potrà quindi osservare una differenza statisticamente significativa tra i due gruppi, al di sopra e al di sotto della mediana, rispettivamente, con un errore alfa di 0,05 e una potenza superiore al 95% effettuando un test t di Student per gruppi indipendenti a due code.

Periodo di reclutamento. Dall'ottobre 2014 al marzo 2016. Per analizzare la possibile relazione dose-effetto tra esposizione a inquinanti ed effetti biologici i campioni di aria e i campioni biologici verranno raccolti negli stessi bambini e nelle stesse aree in momenti caratterizzati da livelli di inquinamento atmosferico differenti: la stagione invernale 2014-2015 e la tarda primavera del 2015. Inoltre, per valutare la variabilità biologica intra-soggetto, sui soli bambini reclutati a Brescia sarà effettuato un terzo prelievo di materiale biologico nella successiva stagione invernale (2015-2016), a distanza di un anno dal primo.

Reclutamento. In ogni città, verranno individuate 2 o 3 scuole situate in diverse zone del territorio cittadino; verranno presi i contatti con la dirigenza scolastica e gli insegnanti, con l'aiuto dei quali si organizzeranno incontri con i genitori degli alunni, per illustrare il progetto e invitare alla partecipazione. Un totale di 200 bambini verranno inclusi nella ricerca in ogni città; stimando una perdita del 20% circa di campioni biologici e di questionari perché inadeguati o incompleti, verranno reclutati, nel campione iniziale, 50 bambini in più a Lecce, Perugia, Pisa e Torino (250 bambini in totale per ciascuna città) e 100 bambini in più a Brescia (300 bambini in totale), per un numero complessivo di 1.300 bambini reclutati per l'intero studio.

Saranno esclusi dalla ricerca i bambini con patologie gravi e/o sottoposti negli ultimi 12 mesi a radioterapia, chemioterapia, esami radiografici e che usano apparecchi ortodontici. Per partecipare allo studio sarà raccolto il consenso informato da parte dei genitori ai quali sarà somministrato il questionario. Sarà garantita la riservatezza dei dati raccolti che saranno trattati ai sensi delle normative vigenti (privacy).

Aspetti etici. Il progetto sarà sottoposto, per l'approvazione, al parere del Comitato Etico a all'ASL della Provincia di Brescia, competenti per l'area cui afferisce il responsabile della ricerca (Brescia) e successivamente in ciascuna delle altre 4 città (Lecce, Perugia, Pisa e Torino) in cui verrà effettuato il reclutamento dei bambini. Sarà fornita ai genitori l'informativa dello studio e raccolto il consenso al trattamento dei dati personali, firmato dai genitori dei bambini ed il modulo di assenso del minore alla partecipazione allo studio. Tutti i dati saranno raccolti ed analizzati secondo quanto

disciplinato dal Decreto Legislativo n. 196 del 30/6/2003 "Codice in materia di protezione dei dati personali" e successive integrazioni, per gli scopi della ricerca.

2. Misurazioni

Questionario. Sarà utilizzato un questionario ad hoc per raccogliere informazioni sull'esposizione ambientale outdoor e indoor, altezza e peso, alimentazione, attività fisica ed altri aspetti dello stile di vita dei bambini. Si valuterà l'affidabilità del questionario nelle sue diverse parti, mediante la tecnica del test-retest su un campione di circa 100 soggetti.

Prelievo del campione biologico. Per la raccolta delle cellule della mucosa orale, sarà chiesto ai bambini di sciacquare due volte la bocca con una soluzione salina (NaCl 0,45%) e la saliva sarà raccolta in tubi contenenti 15 ml di soluzione fisiologica (NaCl 0,9%) in modo da ottenere i leucociti da destinare al Comet test. Successivamente, le cellule epiteliali della mucosa orale, da destinare al test del micronucleo, saranno prelevate mediante spazzolamento dell'interno della guancia con uno spazzolino interdentale, che sarà poi immerso in tubi contenenti 15 ml di Buccal Cell Buffer (BCB) pH=7,0. Questo metodo di campionamento è semplice e non invasivo e quindi accettabile sia dai bambini sia dai genitori.

Il Comet test e il test dei MN sulle cellule della mucosa orale devono essere effettuati su materiale fresco per evitare il deterioramento delle cellule. Pertanto ogni Unità reclutante entro 2-3 ore dal prelievo provvederà alla preparazione dei vetrini permanenti che verranno poi inviati alle Unità di Messina e Perugia per la lettura rispettivamente del Comet test e del test del micronucleo.

Comet test. La sospensione cellulare in soluzione fisiologica sarà centrifugata 10 minuti, 1100g, 4°C) e le cellule risospese in 1 ml di PBS. La sopravvivenza cellulare dei leucociti sarà determinata usando la metodica di esclusione con Trypan blue oppure con colorazione di Hoechst. Il Comet test sui leucociti della bocca sarà condotto in accordo con il metodo di Singh et al. (*A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. Exper Cell Res. 1988;175:184-191*).

Test del micronucleo. Dopo aver agitato e rimosso lo spazzolino, le cellule della mucosa orale in PBS verranno trattate secondo il metodo di Thomas et al. (*Buccal micronucleus cytome assay Nat Protoc. 2009;4(6):825-837*).

Prelievo dei campioni ambientali. Al fine di valutare la qualità dell'aria di tutte le città coinvolte nella ricerca, un campionatore ad alto volume, caratterizzato da un flusso di 1,1- 1,2 m³/min, sarà posizionato nei pressi delle scuole in cui saranno reclutati bambini e raccoglierà il PM 0,5 su membrane in fibra di vetro, per 48-72 ore, nei medesimi giorni in cui vengono effettuati i prelievi di cellule della mucosa orale. Tutte le membrane, dopo la determinazione gravimetrica, verranno inviate all'Unità di Brescia, dove, mediante estrazione organica, saranno preparati i campioni per le analisi chimiche e di mutagenesi in vitro.

Estrazione delle membrane. L'estrazione delle membrane sarà condotta mediante sonicazione con diversi solventi organici che verranno successivamente fatti evaporare e l'estratto così ottenuto sarà destinato alle successive analisi.

Analisi chimica. Sarà determinata la concentrazione di IPA e nitroIPA, composti ad attività mutagena e quindi potenzialmente correlabili col danno genotossico evidenziato nei test di mutagenesi in vitro sull'aria e nei test in vivo nei bambini. Sugli estratti organici sarà condotta la determinazione di IPA e nitroIPA tramite HPLC (High Pressure Liquid Chromatography).

Test di Ames. Sugli estratti organici del PM 0,5 raccolto nelle diverse città sarà condotto, il test di Ames, secondo la metodica di Maron e Ames (*Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. Mut Res. 1983;113: 173-215*).

Comet test in cellule A549. Un'aliquota dell'estratto organico del PM 0,5 raccolto nelle diverse città sarà inviato all'Università di Torino dove sarà condotto il Comet test su cellule umane dell'apparato respiratorio (linea cellulare A549), che costituiscono il primo sito di contatto con gli inquinanti aerodispersi e che, pertanto, possono rappresentare un utile strumento di valutazione dei rischi associati all'esposizione al PM. Il Comet test su linee cellulari umane A549 sarà condotto in accordo con il metodo di Singh et al. (*A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. Exper Cell Res. 1988;175:184-191*).

Test del micronucleo in cellule A549. Un'aliquota dell'estratto organico del PM 0,5 raccolto nelle diverse città, sarà inviato all'Università di Perugia dove sarà analizzato utilizzando il test del

micronucleo su cellule della linea A549 secondo il metodo di Fenech (*The in vitro micronucleus technique. Mutation Research. 2000;455:81–95*).

Test di tossicità in cellule A549 e HFBE2. Sugli estratti organici del PM 0,5 raccolto nelle diverse città, verranno condotti test di tossicità su due diverse linee cellulari umane (bronchiali e alveolari) per valutare la proliferazione, la vitalità cellulare e gli eventuali effetti sulla comunicazione intercellulare.

Acquisizione dati dei parametri chimici dell'aria misurati di routine. Verranno raccolti i dati dell'ARPA sui principali parametri della qualità dell'aria misurati di routine (CO, NO₂, SO₂, benzene, O₃, PM 10, PM 2,5) relativi ai periodi di campionamento.

Data management, analisi di tutti i dati e costruzione di modelli di rischio

Data management. Sarà predisposto un unico database informatizzato per il caricamento di tutti i dati raccolti nello studio, anonimi e provvisti di un codice identificativo univoco alfanumerico attribuito a ciascun bambino reclutato; un secondo file conterrà solo l'anagrafica dei bambini e il corrispondente codice identificativo. Entrambi i file saranno protetti da password, note ai soli ricercatori e custodite nella documentazione dello studio.

Analisi di rischio e validazione. Sarà effettuata, in collaborazione con l'Università di Lecce, l'analisi di rischio per la valutazione dell'impatto sanitario da esposizione all'inquinamento, utilizzando un modello che stima quantitativamente il rischio cancerogeno da esposizione ad aria inquinata utilizzando sia parametri standard (PM 10, PM 2,5, NO_x, e altri) sia quelli investigati nella ricerca (IPA e nitroIPA). Il confronto tra le stime di rischio di effetti cancerogeni prodotte dal modello (valore "atteso") e i risultati dei test di danno al DNA sulle cellule della mucosa orale (valore "osservato") consentiranno di valutare la bontà del modello per la predizione di effetti biologici nei bambini.

Analisi statistica e costruzione di un modello globale per il calcolo del rischio. Le differenze degli indicatori di effetto biologico nei bambini a maggiore e minore esposizione agli inquinanti atmosferici tradizionali e quelli oggetto della ricerca, sarà effettuato in primo luogo mediante i test, parametrici e non parametrici, di più comune impiego per il confronto tra distribuzioni, medie e proporzioni. Inoltre, verranno utilizzati metodi di analisi multivariata per valutare l'associazione tra indicatori di effetto e parametri ambientali, tenuto conto di eventuali confondenti. In particolare, la relazione dose-effetto tra esposizione a inquinanti atmosferici, mutagenicità dell'aria ed effetti biologici precoci sarà valutata mediante modelli di regressione. Nel solo campione di bambini di Brescia, sarà valutata la stabilità temporale dei marcatori d'effetto biologico precoce mediante il confronto dei test eseguiti, sugli stessi bambini, in due anni successivi, nella stagione invernale.

L'analisi dei questionari alimentari sarà condotta in modo da costruire pattern alimentari compositi. Sarà quindi valutato il ruolo di fattori di interazione nella relazione tra esposizione a inquinanti ed effetti biologici mediante analisi stratificate e modelli statistici. Si procederà poi alla costruzione, in via sperimentale, di un modello globale per il calcolo del rischio di avere un danno biologico precoce da esposizione a inquinanti atmosferici che includa non solo le variabili ambientali ma anche gli altri fattori presi in considerazione (inquinamento atmosferico, esposizioni indoor, alimentazione, attività fisica, indice di massa corporea e altre variabili legate allo stile di vita).

Risultati attesi dalla ricerca e loro interesse per l'avanzamento delle conoscenze

La ricerca presenta diversi aspetti innovativi e originali rispetto alle attuali conoscenze. In primo luogo, essa consente di studiare alcuni indicatori di inquinamento atmosferico che, al di là di quelli tradizionalmente ricercati, potrebbero essere maggiormente correlati ai danni biologici precoci di tipo cronico-degenerativo.

In secondo luogo, la ricerca fornirà informazioni in merito all'entità del danno biologico precoce nei bambini in relazione alla concentrazione di inquinanti aerodispersi, attualmente poco studiata, nonostante vi sia un accordo generale sulla maggior sensibilità dei bambini al danno da inquinanti atmosferici e all'importanza di un danno in giovane età nell'insorgenza di patologie croniche dell'adulto.

In terzo luogo la ricerca consentirà di valutare il possibile ruolo protettivo, o, viceversa, aggravante, di altri fattori, da quelli demografici a quelli legati allo stile di vita, come l'alimentazione, nei confronti del danno biologico da esposizione ad inquinanti atmosferici nei bambini. Su quest'ultimo punto basti ricordare che, nonostante la comune raccomandazione di consumare alimenti ricchi di

vitamine e di composti ad attività anti-ossidante, e di evitare sovrappeso e obesità, non vi sono studi, a nostra conoscenza, sull'effetto che le abitudini alimentari del bambino possano avere nel modificare il danno biologico a livello cellulare da esposizione a inquinanti aerodispersi.

Infine si procederà all'impiego di due modelli per il calcolo del rischio di effetti biologici precoci nei bambini. Il primo consiste in un programma di analisi impiegato per la valutazione degli impatti sanitari da esposizione all'inquinamento (Analisi di Rischio). Questa procedura porta al calcolo del rischio, ossia della probabilità che si verifichi un effetto sanitario indesiderato in seguito ad esposizione ad una fonte di pericolo, attraverso il prodotto tra la potenzialità di causare un danno alla salute da parte degli agenti chimici identificati (pericolo) e "l'intake" di tali agenti in seguito ad esposizione e successiva assimilazione per inalazione, ingestione o contatto. La valutazione del risultato porta a quantificare un eccesso di eventi indesiderabili, rispetto alla norma, correlabili con la situazione di esposizione ad una matrice ambientale contaminata. L'Analisi di Rischio ha l'obiettivo di stimare quantitativamente il rischio cancerogeno da esposizione ad aria inquinata utilizzando sia parametri standard (PM 10, PM 2,5, NOx, e altri) sia quelli da noi investigati (IPA e nitroIPA). Il confronto tra le stime del rischio di effetti cancerogeni prodotte dal modello e i risultati dei test di danno al DNA sulle cellule della mucosa orale consentiranno di valutare la bontà del modello per la predizione di effetti biologici nei bambini. Inoltre per superare i limiti di questi modelli, basati solo su misure ambientali, si procederà alla costruzione, in via sperimentale, di un modello globale del rischio di avere un effetto biologico precoce da esposizione a inquinanti atmosferici che includa non solo le variabili ambientali ma anche gli altri fattori presi in considerazione in questa ricerca.