

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI MILANO  
DIPARTIMENTO DI SCIENZE BIOMEDICHE PER LA SALUTE

Corso di Dottorato di Ricerca in Sanità Pubblica  
Ciclo XXVIII



Tesi di Dottorato di Ricerca

EFFETTI BIOLOGICI PRECOCI DELL'INQUINAMENTO ATMOSFERICO  
NEI BAMBINI:

LO STUDIO RESPIRA E IL PROGETTO MAPEC\_LIFE

Dottoranda:

ELISABETTA CERETTI

Matricola n. R09972

Tutor:

Ch.ma Prof.ssa SILVANA CASTALDI

Coordinatore del Dottorato:

Ch.ma Prof.ssa ELISABETTA TANZI

Anno Accademico 2014-2015

# INDICE

<b>Abstract</b> .....	3
<b>Capitolo 1. INTRODUZIONE</b> .....	6
1.1 Effetti dell'inquinamento sulla salute umana .....	6
1.2 Genotossicità dell'aria .....	7
1.3 Indicatori di effetto biologico precoce .....	7
1.4 Analisi del rischio .....	9
<b>Capitolo 2. SCOPO DELLA TESI</b> .....	11
<b>Capitolo 3. MATERIALI E METODI</b> .....	12
3.1 Studio RESPIRA .....	12
3.2 Progetto MAPEC_LIFE .....	22
<b>Capitolo 4. RISULTATI</b> .....	24
4.1 Studio RESPIRA .....	24
4.2 Progetto MAPEC_LIFE .....	30
<b>Capitolo 5. DISCUSSIONE E CONCLUSIONI</b> .....	36
<b>BIBLIOGRAFIA</b> .....	39
<b>TABELLE E FIGURE</b> .....	45
<b>ALLEGATI</b> .....	67

## **Abstract**

### **EARLY BIOLOGICAL EFFECTS OF AIR POLLUTION ON CHILDREN: THE RESPIRA STUDY AND THE MAPEC\_LIFE PROJECT**

#### **Background**

Air pollution is a global problem: airborne or deposited pollutants can be found worldwide, from highly polluted to remote areas. Epidemiological studies attribute the most severe effects from air pollution to particulate matter, which has been associated with cardiovascular diseases, lung cancer and other chronic diseases. In 2013, the International Agency for Research on Cancer (IARC) classified air pollution and particulate matter as carcinogenic to human. Among the whole population, children are at higher risk of suffering the health consequences of airborne chemicals, for various reasons. First, children have a higher level of physical activity, spend more time outside and have a higher air intake than adults. Second, children are more vulnerable to the adverse effects of air pollution due to their small body size, fast growth rate and relatively immature organs (lungs, in particular), body function, immune system and cell repair mechanisms. Lastly, some data suggest that genetic damage, caused by environmental pollutants, viruses or lifestyle factors, occurring early in life can increase the risk of carcinogenesis in adulthood. Various studies have analyzed the genotoxic effects of urban air pollution exposure in the general population and in highly exposed subjects. In particular, a significant association was found between high levels of urban pollution (PM10 and ozone) and DNA damage detected by the comet assay in human blood lymphocytes and leukocytes and nasal mucosa cells. As regards children, very few data are available on biomarkers of early effects of air pollution.

#### **Methods**

In this research work, some results of two molecular epidemiology cross-sectional projects are presented. Both of them had the objective of evaluating the associations between air pollution and early biological effects in children.

The first is the RESPIRA study (Italian acronym for “Rischio ESposizione Inquinamento aRia Atmosferica”), a small pilot study performed on pre-school children living and attending pre-school in Brescia, a highly polluted town in Northern Italy. The children were recruited in 6 pre-schools located in different areas of the town and their buccal cells were collected to evaluate two biomarkers of early effects: primary DNA damage, detected by

comet assay in salivary leukocytes, and micronucleus frequency, investigated in epithelial buccal cells. Child exposure to air pollution was assessed analyzing PM<sub>0.5</sub> samples collected near each school in the same days of biological sampling, and retrieving air quality data from the Regional Agency for Environmental Protection. Furthermore, information about some confounding factors was collected by means of a questionnaire filled in by children's parents.

The second study is the MAPEC\_LIFE project (Monitoring Air Pollution Effects on Children for supporting public health policy), funded by EU Life+ Programme (LIFE12 ENV/IT/000614) which, in addition to the evaluation of the associations between air pollution and early biological effects in children, aims to propose a model for estimating the global risk of early biological effects due to air pollutants and other factors in children. The MAPEC\_LIFE project was carried out on 6-8-year-old children living in five Italian towns in two different seasons. Two biomarkers of early biological effects, primary DNA damage detected with the comet assay and frequency of micronuclei, were investigated in buccal cells of children. Details of children diseases, socio-economic status, exposures to other pollutants and life-style were collected using a questionnaire administered to children's parents. Child exposure to urban air pollution was assessed by analysing PM<sub>0.5</sub> samples collected in the school areas for PAHs and nitro-PAHs concentration, lung toxicity and *in vitro* genotoxicity on bacterial and human cells. Data on the chemical features of the urban air during the study period were obtained from the Regional Agency for Environmental Protection. The project created also the opportunity to approach the issue of air pollution with the children, trying to raise their awareness on air quality, its health effects and some healthy behaviors by means of an educational intervention in the schools.

## **Results**

The RESPIRA study involved six pre-schools in Brescia, in two consecutive winter seasons. During the sampling months, PM<sub>10</sub>, PM<sub>2.5</sub> and NO<sub>2</sub> were very often over the EU limit values for daily means. Organic extracts of PM<sub>0.5</sub> collected near schools induced genotoxic effects in bacterial and human cells in *in vitro* tests. Regarding DNA damage in children cells, mean micronucleus frequency in epithelial buccal cells of children was  $0.29 \pm 0.13\%$ , higher than usually found among children living in areas with low or medium-high levels of air pollution, and significantly associated with the concentration of PM<sub>10</sub>, PM<sub>2.5</sub> and NO<sub>2</sub>. On the other hand, the preliminary results of the comet assay showed some differences between primary DNA damage detected in children attending schools in the different areas of the town. This difference was not detected with the micronucleus test.

However, the level of damage resulted from the comet assay on salivary leukocytes of children was not comparable with other literature data, due to the lack of similar studies. The MAPEC\_LIFE project involved 26 primary schools in the five Italian towns. Environmental and biological samplings were repeated in the same schools and on the same children for two different seasons, winter and late spring. A total of 1125 children were recruited and sampled for two times. The results of the various *in vitro* and *in vivo* tests are still ongoing. Some preliminary results about the samples of the first season in Brescia were presented here. PM<sub>10</sub>, PM<sub>2,5</sub> and NO<sub>2</sub> levels remained high for all the winter period, even if they were lower than those registered in the RESPIRA seasons. The organic extracts of PM<sub>0.5</sub> collected near each school induced point mutation in *Salmonella typhimurium*, particularly in the YG1021 strain, but the number of net revertants per cubic meter seem to be slightly lower than other data found in literature. As regard genotoxicity tests on buccal cells of the 283 children recruited in Brescia, no data were available so far for the comet assay, which encountered some reading difficulties. On the other hand, micronucleus frequency detected in MAPEC\_LIFE children ( $0.06 \pm 0.08\%$ ) was very lower than micronucleus levels found in the RESPIRA study. Statistical analysis of the results is still ongoing, but at the end they will show if the differences in micronucleus frequency between the two studies are due to the level of exposure to air pollution experienced by the children or to other factors.

## **Conclusions**

The associations between levels of air pollutants, air mutagenicity and biomarkers of early effects will be investigated. A tentative model to calculate the global absolute risk of having early biological effects for air pollution and other variables together will be proposed and may be useful to support policy-making and community interventions to protect children from possible health effects of air pollutants.

# Capitolo 1

## INTRODUZIONE

### 1.1 EFFETTI DELL'INQUINAMENTO SULLA SALUTE UMANA

L'inquinamento dell'aria è un problema globale (EEA, 2015). Numerose indagini epidemiologiche hanno stabilito l'associazione tra esposizione ad inquinamento atmosferico e mortalità e morbosità nell'uomo (Samet et al., 2000; Borja-Aburto et al., 1998; Dockery et al., 1993; Michelozzi et al., 1998; Pope et al., 2002; Schwarze et al., 2006; Thurston et al., 1994; Kim et al., 2007). L'inquinamento urbano, originato dal traffico, dagli insediamenti industriali, dai sistemi di riscaldamento o di produzione di energia, è costituito da una complessa miscela di varie specie chimiche, alcune delle quali genotossiche (Belpomme et al., 2007; Claxton and Woodall, 2007; Lewtas, 2007). In particolare grande attenzione è stata data al particolato atmosferico (PM) e ai suoi potenziali effetti sulla salute (WHO, 2005; Binkova et al., 2003). Il PM è costituito da particelle inalabili cui possono essere adsorbiti vari composti (metalli pesanti, idrocarburi policiclici aromatici, composti volatili). Un'associazione significativa è stata dimostrata tra esposizione a PM e incidenza e mortalità per patologie cardiovascolari, cancro al polmone e malattie respiratorie (WHO, 2005; Anderson et al., 2012; Raaschou-Nielsen et al., 2013; Shah et al., 2013; Silva et al., 2013; WHO, 2013; Beelen et al., 2014; Cesaroni et al., 2014) e anche, secondo dati recenti, altre malattie cronico degenerative legate a condizioni di stress ossidativo, infiammazione e insulino-resistenza, come il diabete mellito (Dijkema et al., 2011; Puett et al., 2011). Le frazioni fine e ultrafine del particolato sembrano avere un ruolo preponderante nell'insorgenza di queste patologie, poiché grazie alle ridotte dimensioni ( $<2,5\mu\text{m}$ ), esse penetrano profondamente nel polmone; le frazioni ultrafini ( $<0,5\mu\text{m}$ ) raggiungono le regioni alveolari e passano nel torrente circolatorio, inducendo effetti infiammatori, stress ossidativo e incremento della coagulazione (Soerensen et al., 2003). La pericolosità di queste particelle consiste nel fatto che veicolano sulla loro superficie sostanze tossiche e mutagene in un rapporto inversamente proporzionale al loro volume (Schwarze et al., 2006).

La conferma di questo importante impatto, economico e sanitario, si può riscontrare nella decisione della Agenzia Internazionale di Ricerca sul Cancro (IARC), che definisce l'inquinamento atmosferico (e in particolare il PM<sub>2,5</sub>) come agente cancerogeno di gruppo 1 (Raaschou-Nielsen O. et al., 2013; IARC, 2013).

Sebbene tutta la popolazione sia esposta all'inquinamento atmosferico, alcuni soggetti sono a rischio maggiore di subire le conseguenze negative dell'esposizione ai composti

chimici aerodispersi, in particolare i bambini, per vari motivi: hanno un livello maggiore di attività fisica, passano più tempo all'aperto e inalano una maggiore quantità di aria, e quindi di inquinanti, per unità di peso (WHO, 2004). Inoltre i bambini sono più vulnerabili agli effetti dell'inquinamento atmosferico per le loro dimensioni, lo sviluppo e l'immaturità dei loro organi (in particolare i polmoni) e funzioni corporee (Dieter et al., 2000), del sistema immunitario e dei meccanismi di riparazione cellulare (Chance and Harmsen, 1998; Rössner et al., 2002). Alcuni studi epidemiologici infatti hanno evidenziato che il danno genetico in età precoce, causato da inquinanti ambientali, virus o fattori legati allo stile di vita, influenza maggiormente il rischio di cancerogenesi in età adulta rispetto ad un'esposizione più tardiva (Wild and Kleinjans, 2003).

## **1.2 GENOTOSSICITÀ DELL'ARIA**

Il sistema aria è costituito da una complessa miscela di varie specie chimiche (USEPA, 1996); gli effetti dell'esposizione a tali miscele non sono facili da misurare sulla base delle azioni dei singoli composti, in quanto essi possono interagire tra di loro in modo sinergico o antagonistico, mediante meccanismi differenti, e avere molteplici bersagli cellulari (Carpenter et al., 2002). Per una valutazione completa del rischio cui la popolazione è esposta, è utile analizzare l'effetto biologico globale degli inquinanti. A tal fine, un utile contributo è fornito dai test di mutagenesi che rilevano direttamente il potenziale danno genotossico indotto dall'aria, nel suo complesso, su organismi esposti.

I test di mutagenesi sono stati utilizzati in numerosi studi che hanno dimostrato la genotossicità degli estratti organici del PM urbano e la relazione tra esposizione a PM e effetti dannosi per la salute umana (USEPA, 1997; WHO, 2000). La genotossicità del PM urbano è stata analizzata attraverso numerosi test, su organismi procariotici e eucariotici: *Salmonella typhimurium*, *Saccaromyces cerevisiae*, *Tradescantia* e cellule umane (Claxton and Woodall, 2007; Ceretti et al., 2015). Queste ricerche nel loro insieme hanno dimostrato che i composti adsorbiti alle particelle atmosferiche sono in grado di indurre effetti genotossici.

## **1.3 INDICATORI DI EFFETTO BIOLOGICO PRECOCE**

Gli studi in vitro della genotossicità delle miscele forniscono informazioni sui loro effetti potenziali, ma non sul loro effetto reale sull'organismo umano. Per valutare il rischio effettivo cui l'uomo è esposto è necessario analizzare anche la loro genotossicità in vivo. A tal fine, sempre più spesso vengono utilizzati test in vivo in studi di monitoraggio biologico di popolazione, in quanto permettono di individuare effetti precoci di esposizioni croniche

ad agenti tossici (Angerer et al., 2007). Contrariamente agli studi epidemiologici che evidenziano solo l'outcome finale dell'effetto dell'esposizione ambientale, quale la malattia, gli studi che utilizzano i biomarcatori di effetto precoce individuano nei soggetti esposti un danno biologico prima della comparsa della patologia. Per questo motivo sono indicatori utili in condizioni difficili da studiare, come esposizioni a basse dosi e/o a miscele di sostanze tossiche, e consentono di evidenziare possibili effetti in tempi più brevi, su di un numero di soggetti inferiore e utilizzando misure oggettive, superando così molti limiti degli studi epidemiologici classici (Neri et al., 2006).

L'uso di test che evidenziano danni genotossici si basa sull'osservazione che molti cancerogeni sono capaci di causare questo tipo di danno. In studi prospettici, si è visto un aumento del rischio di cancro in presenza di un elevato livello di aberrazioni cromosomiche e di micronuclei negli adulti (Bonassi et al., 1995, 2007; Hagmar et al., 1994). Questi biomarcatori possono essere analizzati in diversi tessuti, organi e fluidi biologici, come i leucociti o i linfociti da sangue periferico (Moller, 2006; Hoffmann and Speit, 2005). In generale, però, è opportuno utilizzare cellule derivate da tessuti direttamente coinvolti nel tipo di esposizione che si vuole studiare, per cui nei monitoraggi biologici di popolazioni esposte ad inquinanti aerodispersi sono state utilizzate cellule della mucosa orale e nasale (Cavallo et al., 2006; Coronas et al., 2009; Szeto et al., 2005; Pacini et al., 2003; Valverde et al., 1997), che si possono ottenere più facilmente e con prelievi non invasivi rispetto alle altre parti dell'apparato respiratorio.

Tra i test di mutagenesi, il comet test è un metodo rapido per misurare il danno al DNA nelle cellule eucariotiche, rilevando rotture a singolo e doppio filamento del DNA, siti alcalo-labili, siti di riparazione incompleta e cross-link (Fairbairn et al., 1995; Speit and Hartmann, 2006; Burlinson et al., 2007; Collins et al., 2008; Dhawan et al., 2009). Il comet test rileva un danno precoce e reversibile che rappresenta un indicatore di effetto biologico precoce.

Il test dei micronuclei è un altro test di mutagenesi molto diffuso per la capacità di rilevare agenti clastogeni e aneuploidi (Kirsch-Volders et al., 1997, 2000). I micronuclei sono corpi extranucleari, più piccoli del nucleo principale della cellula, che si formano durante la mitosi cellulare; sono costituiti da cromosomi interi o da frammenti di cromosomi. I micronuclei sono anch'essi un indicatore di effetto precoce, ma rappresentano alterazioni citogenetiche più stabili rispetto al danno al DNA rilevato mediante il comet test.

Diversi studi hanno analizzato gli effetti genotossici dell'esposizione a inquinamento atmosferico urbano nella popolazione generale e in soggetti a maggiore esposizione (Claxton et al., 2004). Una correlazione significativa è stata riscontrata tra elevati livelli di



inquinamento urbano e danno al DNA misurato con il comet test in linfociti (Hoffmann and Speit, 2005) e in cellule della mucosa nasale (Pacini et al., 2003). Sono stati trovati livelli di danno al DNA significativamente maggiori nei leucociti di lavoratori che stanno all'aria aperta (taxisti, venditori, autisti di autobus) rispetto a lavoratori in ambienti confinati (impiegati) (Tovalin et al., 2006), mentre si è visto che il personale di volo di un aeroporto aveva, in linfociti e in cellule della mucosa orale, un danno al DNA maggiore rispetto al personale amministrativo (Cavallo et al., 2006).

Anche nei bambini è ormai ben nota la relazione causale tra esposizione a inquinamento atmosferico e insorgenza di patologie, soprattutto del tratto respiratorio (Schwartz, 2004; Grigg, 2009; Kim et al., 2004). Pochi studi, tuttavia, hanno valutato biomarcatori di danno genetico nei bambini esposti agli inquinanti ambientali. In alcune ricerche, le aberrazioni cromosomiche e i micronuclei sono risultati aumentati nei bambini esposti a inquinanti ambientali, così come il danno al DNA misurato con il comet test, in situazioni di elevato inquinamento atmosferico, come Città del Messico (Neri et al., 2006I). La maggior parte di questi studi, tuttavia, ha preso in considerazione un numero limitato di soggetti e i risultati non sono concordi (Neri et al., 2006II).

#### **1.4 ANALISI DEL RISCHIO**

L'entità e la gravità dei rischi ambientali legati all'inquinamento atmosferico e l'impatto sulla popolazione esposta costituiscono uno degli aspetti fondamentali nelle policy ambientali e sanitarie che considerino la tutela della salute come obiettivo primario. L'impatto dell'inquinamento può essere valutato sia a posteriori, attraverso la misura diretta degli eventi, con studi epidemiologici, sia precocemente attraverso la stima degli eventi attesi sulla base dei dati ambientali e degli scenari di esposizione in genere già disponibili. In particolare, la stima dell'impatto dell'inquinamento sulla popolazione bersaglio prevede l'applicazione dell'analisi di rischio. Questo è un calcolo probabilistico effettuato utilizzando i dati ambientali relativi alla caratterizzazione del sito e i fattori di esposizione sito-specifici, e stima quanti soggetti si ammaleranno in conseguenza dell'inquinamento di una determinata area.

Vi sono però altri fattori da considerare nella relazione tra inquinanti atmosferici e salute. Alcune ricerche evidenziano lo stress ossidativo come centrale nel determinare un danno biologico da esposizione a inquinamento atmosferico e rilevano il ruolo protettivo della dieta e in particolare di alcuni nutrienti e integratori alimentari nel contrastare questo effetto (Romieu et al., 2008). In quest'ottica si sta iniziando, solo ora, a valutare il ruolo di fattori legati agli stili di vita, come protettivi del danno da esposizione all'inquinamento

atmosferico, in particolare l'alimentazione (Rössner et al., 2002; Emmanouil et al., 2010; Thomas et al., 2011). Per valutare il rischio di avere effetti biologici in modo completo è quindi necessario integrare i dati ambientali con quelli relativi ad altri fattori di rischio e alle loro interazioni. Infatti diversi studi italiani e internazionali hanno considerato anche fattori demografici, socio-economici, familiari e di stili di vita per valutare la relazione tra malattie respiratorie e inquinamento nei bambini, come lo studio SIDRIA- Studi Italiani sui Disturbi Respiratori dell'Infanzia e l'Ambiente (Galassi et al., 2005), e ISAAC -International Study on Asthma and Allergy in Children (Asher et al., 2006). Attualmente, tuttavia, non vi sono ricerche che abbiano valutato compiutamente il ruolo degli altri fattori come possibili modificatori dell'effetto degli inquinanti sulla salute umana e che abbiano proposto modelli globali del rischio, come quelli attualmente in uso per il calcolo del rischio cardiovascolare o del rischio di broncopneumopatie cronico ostruttive.

## **Capitolo 2**

### **SCOPO DELLA TESI**

Scopo di questo lavoro è quello di indagare l'associazione tra esposizione a inquinanti atmosferici in ambiente urbano ed effetti biologici precoci nelle cellule della mucosa orale dei bambini, tenendo in considerazione alcuni fattori che possono essere di confondimento in questa valutazione. Tali fattori comprendono esposizioni outdoor e indoor ad agenti genotossici, stato di salute e uso di farmaci, attività fisica, abitudini di vita e fumo passivo che possono in qualche modo influenzare i livelli di danno al DNA rilevati nelle cellule dei bambini mediante i test di laboratorio utilizzati. Inoltre, si cercherà di valutare come l'alimentazione dei bambini, espressa in particolare come apporto calorico e dei principali nutrienti, possa influire sulla risposta dell'organismo all'esposizione a inquinanti aerei.

Si presentano in questa tesi di dottorato i risultati, definitivi e preliminari, di due progetti di ricerca condotti dalla Sezione di Igiene, Epidemiologia e Sanità Pubblica dell'Università degli Studi di Brescia negli ultimi quattro anni.

Il primo è uno studio pilota, svoltosi a Brescia, su un numero limitato di bambini della scuola dell'infanzia. Lo studio RESPIRA, nonostante presenti alcuni limiti, è stato il punto di partenza per l'ideazione del progetto MAPEC\_LIFE, un progetto di più ampio respiro, finanziato dall'Unione Europea nell'ambito del Programma Life+ (LIFE2012 ENV/IT/000614), che vede coinvolte sette Unità in cinque città italiane. Il progetto MAPEC\_LIFE condivide con lo studio RESPIRA l'obiettivo principale di valutare l'associazione tra esposizione a inquinanti aerei e effetti biologici precoci nei bambini, ma si pone un secondo obiettivo che cerca di superare il confine tra ricerca e applicazione pratica. Il progetto MAPEC\_LIFE, infatti, ha lo scopo finale di creare un modello di rischio globale di avere effetti biologici precoci in età infantile dovuti all'esposizione a inquinanti aerei urbani. Tale modello sarà messo a disposizione di stakeholders istituzionali e potrà essere utilizzato per valutare situazioni preesistenti e nuovi interventi che tentano di agire sui livelli di inquinamento atmosferico, in particolare negli ambienti urbani.

## **Capitolo 3**

### **MATERIALI E METODI**

#### **3.1 STUDIO RESPIRA**

##### **3.1.1 Disegno dello studio**

Lo studio RESPIRA (Rischio ESposizione Inquinamento aRia Atmosferica), il cui obiettivo era di valutare l'associazione tra l'esposizione a inquinanti atmosferici e la presenza di danno genotossico nelle cellule della mucosa orale della popolazione infantile, è uno studio osservazionale di tipo trasversale (cross-sectional), condotto su un campione di circa 200 bambini della scuola dell'infanzia (3-6 anni), residenti a Brescia, città altamente inquinata del nord Italia. Al fine di valutare gli effetti biologici precoci nelle cellule della mucosa orale dei bambini reclutati è stata valutata la presenza di due biomarcatori di danno precoce al DNA: il danno primario al DNA rilevato mediante il comet test nei leucociti della saliva (marcatore di dose biologica efficace) e la frequenza di micronuclei (MN) nelle cellule epiteliali esfoliate della mucosa orale (marcatore di effetto biologico precoce).

L'esposizione dei bambini all'inquinamento atmosferico urbano è stata valutata mediante la raccolta di campioni di particolato atmosferico ultrafine (PM<sub>0,5</sub>) nei pressi delle scuole coinvolte, nei medesimi giorni di campionamento biologico. Gli estratti di particolato atmosferico sono stati successivamente sottoposti ad analisi chimica, per valutare la composizione in idrocarburi policiclici aromatici (IPA) e metalli, e indagine genotossica, per valutare la capacità dei campioni di indurre danni al DNA in vitro. Nello specifico, sono stati condotti tre test: 1) il Salmonella/microsome assay, o test di Ames, su cellule batteriche; 2) il comet test su leucociti umani da sangue periferico; 3) il test del micronucleo in radici di *Allium cepa*. Inoltre, i dati relativi ai livelli dei principali inquinanti, misurati giornalmente dall'Agenzia Regionale per la Protezione dell'Ambiente (ARPA), sono stati raccolti per tutto il periodo di campionamento.

Infine, informazioni relative ad altre esposizioni ambientali, outdoor e indoor, alle malattie respiratorie dei bambini e al loro utilizzo di farmaci sono state raccolte mediante un questionario somministrato ai genitori.

##### **3.1.2 Dimensione del campione**

La dimensione del campione (200 soggetti) è stata determinata in modo da poter rilevare differenze statisticamente significative dei parametri misurati (danno primario al DNA e frequenza di MN) tra gruppi di bambini esposti a livelli differenti di inquinanti aerei.

Sulla base di recenti dati relativi al danno primario al DNA rilevato mediante il comet assay in gruppi di soggetti esposti a differenti livelli di inquinanti aerei (Coronas et al., 2009), reclutando un totale di 200 bambini, con una possibile perdita del 10%, di cui circa la metà frequentanti scuole localizzate in aree a maggior inquinamento, e assumendo una distribuzione log-normale della variabile in studio (Lovell and Omori, 2008), si può osservare una differenza statisticamente significativa tra i due gruppi, con un errore alfa di 0,05 e una potenza dell'85%, effettuando un test t di Student per gruppi indipendenti a due code. Questa dimensione del campione consente di osservare differenze statisticamente significative tra i due gruppi anche per le altre variabili in studio, applicando il medesimo test, con una potenza uguale o superiore.

### **3.1.3 Periodo dello studio**

Lo studio RESPIRA ha avuto inizio l'1 gennaio 2011 e si è chiuso ufficialmente il 31 dicembre 2013, anche se alcune analisi dei risultati sono tutt'ora in corso.

Dato che i livelli più elevati di PM10 e PM2,5 vengono generalmente registrati durante la stagione invernale, in particolare a Brescia, i campionamenti biologici e ambientali sono stati effettuati durante i mesi invernali di due anni successivi: gennaio-marzo 2012 per le prime tre scuole, gennaio-marzo 2013 per le seconde tre scuole.

Dopo aver raccolto il consenso firmato e il questionario compilato dai genitori dei bambini, in ogni scuola i campionamenti ambientale e biologico hanno proceduto parallelamente: il campione di aria è stato raccolto in continuo per 48 ore (con sostituzione delle membrane ogni 24 ore), mentre il prelievo biologico è stato condotto su tutti i bambini eleggibili, campionando 12 soggetti al giorno, fino a un massimo di 50 soggetti per scuola e al raggiungimento della dimensione campionaria prevista (200 bambini).

Il campionamento ambientale non è stato effettuato in caso di pioggia insistente, neve o vento forte, in quanto queste condizioni meteorologiche causano un rapido abbassamento dei livelli di PM e altri inquinanti aerei.

### **3.1.4 Partecipanti allo studio**

#### *Selezione delle scuole*

Con la collaborazione delle autorità locali e scolastiche, sono state individuate 6 scuole dell'infanzia collocate nelle cinque differenti circoscrizioni cittadine, in modo da rappresentare l'intero territorio urbano e tenere in considerazione le eventuali differenze di esposizione dovute a peculiarità locali (sorgenti specifiche di inquinamento, diverse intensità di traffico, diverse tipologie di traffico, ecc).

Dopo aver ottenuto l'approvazione del progetto da parte della dirigenza scolastica di ogni istituto coinvolto, in ciascuna scuola con la collaborazione delle insegnanti, è stato organizzato un incontro per i genitori, durante il quale sono stati illustrati i motivi, gli obiettivi e i metodi dello studio per invitare alla partecipazione.

#### *Criteria di inclusione/esclusione*

Per la selezione dei bambini eleggibili, sono stati individuati dei precisi criteri di esclusione, necessari ad eliminare possibili cause di confondimento dei risultati della ricerca: ognuno di questi fattori infatti può influenzare la risposta cellulare agli insulti ambientali, l'efficienza di riparazione del DNA o il livello basale di danno al DNA (Holland et al., 2011; Watters et al., 2007). Pertanto, non sono stati inclusi nello studio i bambini che:

- non fossero residenti nel Comune di Brescia nell'anno scolastico in corso al momento del prelievo;
- non fossero nati da genitori entrambi europei;
- avessero (o avessero avuto) tumori maligni e/o fossero stati sottoposti a radioterapia e/o chemioterapia nei 12 mesi precedenti il reclutamento;
- fossero stati sottoposti a esami radiografici nei 3 mesi precedenti l'indagine.

Sono stati inclusi nello studio tutti i bambini i cui genitori abbiano deciso di partecipare alla ricerca e abbiano restituito il consenso informato firmato e il questionario adeguatamente compilato.

#### *Aspetti etici*

Il progetto è stato sottoposto al parere del Comitato Etico dell'ASL di Brescia, che si è espresso positivamente, dando la sua approvazione in data 10/08/2011.

Il consenso dei genitori alla partecipazione dei bambini allo studio è stato ottenuto per tutti i soggetti coinvolti. Tutte le informazioni raccolte durante la ricerca sono state trattate secondo quanto disciplinato dal Decreto Legislativo n. 196 del 30/6/2003 "Codice in materia di protezione dei dati personali" e successive integrazioni. I campioni biologici e il questionario compilato sono stati identificati con il medesimo codice alfanumerico, ricollegabile all'identità del bambino soltanto dai ricercatori coinvolti nella ricerca.

### **3.1.5 Misurazioni**

#### **3.1.5.1 Questionario**

Per la raccolta di informazioni relative alle esposizioni outdoor e indoor a cui i bambini sono stati soggetti e ad alcune caratteristiche socio-demografiche, è stato predisposto un

questionario da somministrare ai genitori (Allegato 1). Tale questionario comprendeva 40 domande relative alla residenza dei bambini, al traffico nella zona di residenza e nei pressi della scuola, alla presenza e utilizzo di stufe o caminetti all'interno dell'abitazione, all'abitudine al fumo dei genitori e conviventi, alle eventuali patologie pregresse o in corso e all'uso di farmaci, alle abitudini di vita e al livello d'istruzione dei genitori.

Il questionario, illustrato in occasione degli incontri organizzati nelle scuole, è stato distribuito insieme al modulo di consenso informato a tutti i genitori dei bambini frequentanti le scuole selezionate.

### **3.1.5.2 Valutazione dell'esposizione**

#### *Raccolta di campioni di particolato*

Un campionatore d'aria ad alto volume (flusso: 1,13 m<sup>3</sup>/min) è stato posizionato nel cortile delle scuole coinvolte durante i giorni di campionamento biologico e ha campionato il particolato atmosferico per 48 ore consecutive. Il PM<sub>0,5</sub> è stato raccolto su membrane in fibra di vetro, condizionate prima dell'utilizzo per 24 ore in ambiente privo di umidità. Dopo il campionamento, le membrane sono state mantenute nelle medesime condizioni per altre 24 ore, prima di effettuare le determinazioni gravimetriche.

#### *Estrazione delle membrane*

Una porzione di ogni membrana (8/12), destinata alle analisi del contenuto di IPA, al test di Ames e al comet test su leucociti umani, è stata sottoposta a estrazione organica mediante sonicazione, con due cicli successivi da 30 minuti in una miscela di esano:acetone:metanolo (1:1:1) (Christensen et al., 2005, con minori modifiche). Con la successiva evaporazione dei solventi in evaporatore rotante, i campioni sono stati portati prima a piccolo volume e poi a secco sotto flusso di azoto.

Una seconda porzione di membrana (3/12), destinata al test del micronucleo in *Allium cepa*, è stata sottoposta a sonicazione per due cicli consecutivi di 30 minuti in acqua distillata (Carvalho-Oliveira et al., 2005, con minori modifiche). L'estratto acquoso ottenuto è stato successivamente filtrato su carta (filtro Whatmann n. 2).

Infine, una terza porzione di membrana (1/12) è stata utilizzata per la determinazione della concentrazione di metalli.

#### *Analisi chimiche*

Il contenuto di IPA è stato determinato mediante gas-cromatografica abbinata a un rilevatore a spettrometria di massa (GC/MS). Il metodo di riferimento è il metodo EPA method TO-13A 1999 "Determination of PAH in ambient air using GC/MS".

L'estratto organico di PM<sub>0,5</sub> è stato risospeso in n-esano. La soluzione è stata purificata su colonne di silice neutra in modo da eliminare le possibili interferenze che possono inficiare la successiva analisi strumentale.

Dopo opportuna concentrazione, sono stati aggiunti alla soluzione gli standard interni deuterati (D10-fenantrene, D12-crisene e D12-perilene). I campioni sono stati analizzati in GC/MS in modalità single ion monitoring (SIM), utilizzando come colonna separativa gascromatografica una VF17-MS 30m x 0,25mm x 0,25µm.

Gli IPA determinati sono: fenantrene, antracene, fluorantene, pirene, benzo(a)antracene, crisene, benzo(b)fluorantene, benzo(k)fluorantene, benzo(j)fluorantene, benzo(e)pirene, benzo(a)pirene, perilene indeno(1,2,3-cd)pirene, dibenzo(a,h)antracene, benzo(g,h,i)perilene, dibenzo(a,l)pirene, dibenzo(a,e)pirene, dibenzo(a,i)pirene, dibenzo(a,h)pirene.

L'analisi per la determinazione dei metalli è stata condotta seguendo il metodo EPA 6020A, che prevede l'utilizzo della spettrometria di massa al plasma accoppiato induttivamente (ICP-MS). Prima dell'analisi strumentale il campione è stato sottoposto ad una fase di pretrattamento di mineralizzazione acida, per provocare la distruzione della materia organica adsorbita sulla membrana e la solubilizzazione di tutte le specie metalliche presenti nella matrice di interesse. La porzione di membrana da analizzare è stata, quindi, posta all'interno di un vessel contenente 12 ml di HNO<sub>3</sub> al 65%, 1 ml di HCl e mineralizzata in forno a microonde. Il forno è stato programmato per raggiungere 250°C in 15 minuti. Le soluzioni sono state filtrate su carta (filtri Whatman n. 41) ed analizzate mediante ICP-MS.

I metalli (e semimetalli) misurati sono i seguenti: vanadio, cromo, ferro, cobalto, nichel, arsenico, stronzio, manganese, argento, rame, molibdeno, cadmio, stagno, antimonio, bario e piombo.

### *Test di Ames*

Gli estratti organici di PM<sub>0,5</sub>, risospesi in dimetil solfossido (DMSO), sono stati testati in duplicato, a dosi crescenti (5, 10, 25, 50 m<sup>3</sup> equivalenti) mediante il Salmonella/microsome assay, o test di Ames. Sono stati utilizzati due ceppi di *Salmonella typhimurium*: il ceppo TA 98, che rileva mutazioni frameshift, e il ceppo TA100 che risponde a mutazioni di



sostituzione di basi. Entrambi i ceppi sono stati utilizzati sia in assenza che in presenza di attivazione microsomale (S9 mix, 4%), per rilevare la presenza di mutageni sia diretti che indiretti. In ognuno dei test, sono stati preparate anche delle piastre di controlli negativi (DMSO) e positivi (2-nitrofluorene per il TA98 senza S9, sodio azide per il TA100 senza S9 e 2-aminofluorene per entrambi i ceppi in presenza di S9).

I dati ottenuti sono stati espressi sia come rapporto di mutagenicità, dividendo i revertenti/piastra per il tasso di mutazione spontanea, sia come revertenti netti/m<sup>3</sup>. I risultati sono considerati positivi quando due dosi successive o la più alta dose non tossica induce una risposta che sia almeno il doppio rispetto a quella indotta dal solvente di controllo e solo se almeno due dosi successive mostrano una relazione dose-risposta (Maron and Ames, 1983).

#### *Comet assay*

Il Single Cell Gel Electrophoresis (SCGE) assay, o comet assay, è stato condotto in accordo con il metodo di Singh et al. (1988). Leucociti umani, isolati da sangue periferico di donatore sano (soluzione di isolamento, 155 mM NH<sub>4</sub>Cl, 5 mM KHCO<sub>3</sub>, 50 µM Na<sub>2</sub>EDTA) e risospesi in tampone fosfato (PBS, 0.01 M), sono stati trattati con dosi crescenti (5, 10, 25, 50 m<sup>3</sup> equivalenti) di estratto organico di PM0,5 per 1 ora a 37°C. In ogni test condotto, sono stati inseriti un controllo negativo (leucociti trattati con DMSO) e un controllo positivo (etilmetansulfonato, EMS, 2mM). Dopo il trattamento, è stata valutata la sopravvivenza cellulare e i passaggi successivi del test sono stati condotti solo sui campioni con sopravvivenza maggiore del 70%, come raccomandato nella procedura di Tice et al. (2000). Dopo il trattamento con gli estratti organici, le cellule sono state risospese in 400 µl di LMA (low melting point agarose, 0.7%) e stratificate su due vetrini pre-agarizzati con NMA (normal melting point agarose, 1%). Dopo un trattamento di lisi overnight (2.5 M NaCl, 100 mM Na<sub>2</sub>EDTA, 8 mM TrisHCl, 10% DMSO, 1% Tryton X-100, pH 10, 4°C) delle membrane cellulari e nucleari, i vetrini sono stati posizionati in una cella elettroforetica orizzontale e lasciati in buffer alcalino (10 mM Na<sub>2</sub>EDTA, 300 mM NaOH, 10% DMSO, pH>13) per 20 minuti. Dopo questo periodo di unwinding, è stato applicato un campo elettrico (0,8 V/cm, 300 mA), per 20 minuti, che ha permesso alle molecole di DNA di migrare. Al termine dell'elettroforesi, i vetrini sono stati neutralizzati (0.4M TrisHCl, pH 7.5) e fissati in etanolo assoluto (-20°C).

Per la valutazione del danno al DNA, i vetrini sono stati colorati con etidio bromuro (EtBr, 10µg/ml) e analizzati al microscopio a fluorescenza (Olympus CX 41RF) dotato di filtri di eccitazione (BP 515-560 nm excitation filter) e emissione (LP 580 nm barrier filter) specifici

per l'EtBr e di una videocamera (high-sensitivity charge-coupled device, CCD, camera) collegata a un sistema di analisi dell'immagine (Komet 5, Kinetic Imaging Ltd). Per ogni vetrino, sono stati analizzati 50 nucleotidi. L'entità della migrazione è stata valutata mediante due parametri: uno score visivo (visual score), calcolato sulla base della classificazione visiva delle comete in 4 classi di danno, e la percentuale di DNA nella coda (tail intensity), calcolata dal software sulla base dell'intensità luminosa rilevata. La significatività statistica della differenza di effetto tra trattato e controllo negativo è stata valutata con il test di Dunnett.

#### *Test del micronucleo in Allium cepa*

Il test del MN in radici di *Allium cepa* (Ma et al., 1995) è stato condotto sugli estratti acquosi del PM<sub>0,5</sub> raccolto. Dopo 72 ore di pre-germinazione in acqua minerale, le radici sono state esposte agli estratti acquosi per 24 ore (6 bulbi per ogni campione) e successivamente rimesse in acqua minerale per altre 44 ore (recovery time). Alla fine di questo periodo, le radici sono state tagliate, fissate in soluzione di acido acetico:etanolo (1:3) per 24 ore e infine stoccate in etanolo (70%). In ogni test condotto, sono stati inseriti un controllo negativo (radici esposte per 24 ore a acqua distillata) e un controllo positivo (radici trattate con idrazide maleica 1 mg/l per 6 ore).

Per l'analisi al microscopio, le radici sono state colorate con la metodica di Fielgen: idrolisi acida (HCl 1N, 60°C) per 10 minuti, seguita da colorazione con Reagente di Schiff per 24 ore a 4°C. In 5 radici per ogni campione sono stati valutati due parametri: l'indice mitotico su 1000 cellule per radice (5000 cellule per campione), quale misura di divisione cellulare e quindi indice di tossicità del campione, e la frequenza di MN su 2000 cellule per radice (10000 cellule per campione). I risultati sono espressi come numero di MN per 100 cellule e sono stati analizzati usando il test  $\chi^2$  e il test di Dunnett.

#### *Raccolta dei dati ambientali*

Per tutta la durata del progetto, e in particolare durante i periodi di campionamento ambientale e biologico, sono stati raccolti i dati relativi ai livelli dei principali inquinanti aerei misurati giornalmente dalle stazioni di rilevamento dell'ARPA Lombardia collocate nell'area urbana di Brescia (2 centraline): PM<sub>10</sub>, PM<sub>2,5</sub>, O<sub>3</sub>, CO, NO<sub>2</sub>, SO<sub>2</sub>, benzene.

#### **3.1.5.3 Valutazione degli effetti biologici precoci nei bambini**

I due biomarcatori considerati nello studio sono stati valutati nelle cellule della mucosa orale dei bambini reclutati. Queste cellule, oltre ad essere direttamente esposte al

passaggio degli inquinanti aerei, hanno il grande vantaggio di essere facilmente prelevabili, con un metodica di semplice esecuzione e assolutamente non invasivo, che non spaventa né i bambini né i genitori.

#### *Raccolta dei campioni biologici*

La raccolta delle cellule della mucosa orale è avvenuta nei locali della scuola, in presenza delle insegnanti e da parte di personale addestrato. A causa di tempistiche e capacità operative legate alle procedure di laboratorio, sono stati prelevati al massimo 12 campioni al giorno.

Per la raccolta dei leucociti salivari, in cui valutare il danno primario al DNA mediante il comet test (Osswald et al., 2003), i bambini hanno sciacquato la bocca due volte con acqua minerale naturale e lo sputo è stato raccolto in provette contenenti 25 ml di soluzione salina (NaCl 0.9%). Successivamente, sono state prelevate le cellule epiteliali esfoliate, da destinare al test del MN, spazzolando l'interno della guancia con uno spazzolino interdentale, immerso subito dopo in provette contenenti 15 ml di tampone fosfato (PBS, Phosphate Buffer Saline Solution, 0,01M) (Holland et al., 2008).

I campioni così raccolti sono stati immediatamente trasferiti in laboratorio per l'esecuzione dei due test.

#### *Comet assay sui leucociti salivari*

La sospensione cellulare ottenuta dai soggetti campionati è stata centrifugata per 10 minuti a 1100g (4°C) e il pellet risospeso in 1 ml di PBS. La sopravvivenza cellulare dei soli leucociti (le cellule epiteliali presenti nei campioni non sono state considerate) è stata valutata in tutti i campioni mediante la tecnica di esclusione del Trypan Blue e i passaggi successivi del test sono stati eseguiti solo per i campioni con una sopravvivenza maggiore del 70% (Tice et al., 2000).

Il comet assay è stato condotto seguendo il metodo di Singh et al. (1988) sulle cellule del sangue, con piccole modifiche dovute all'utilizzo di un diverso tipo di campione. Dopo centrifuga della sospensione cellulare in PBS (4 min, 8700g), le cellule sono state risospese in 200 µl di LMA (0.7%) e stratificate su due vetrini pre-agarizzati con NMA (1%). Dopo il trattamento di lisi overnight delle membrane cellulari e nucleari, i vetrini sono stati posizionati nella cella elettroforetica orizzontale e coperti dal buffer alcalino (pH>13). Dopo un periodo di unwinding di 20 minuti, è stata condotta la corsa elettroforetica (0,8 V/cm, 300 mA) per 20 minuti. Al termine dell'elettroforesi, i vetrini sono stati neutralizzati e fissati in etanolo assoluto (-20°C). Per ogni elettroforesi, due vetrini preparati con leucociti

umani da sangue periferico di donatore sano trattati con EMS (2mM, 1h, 37°C) sono stati aggiunti nella celle come controllo interno.

Per la valutazione del danno al DNA, i vetrini sono stati colorati con etidio bromuro (EtBr, 10µg/ml) e analizzati in cieco al microscopio a fluorescenza. Per ogni vetrino, sono stati analizzati 100 nucleotidi (2 vetrini per soggetto). Anche in questo caso, l'entità della migrazione è stata valutata sia mediante il visual score, sia come percentuale di DNA nella coda (tail intensity).

#### *Test del micronucleo sulle cellule epiteliali esfoliate*

Dopo aver agitato e rimosso lo spazzolino utilizzato per il prelievo, la sospensione cellulare in PBS è stata centrifugata (10 min, 1100g, 4°C) e il pellet risospeso in PBS caldo (37°C). 10 µl di questa sospensione sono stati utilizzati per determinare la concentrazione cellulare al fine di stabilire se i campioni avessero una quantità di materiale sufficiente alla esecuzione del test. La restante sospensione è stata poi nuovamente centrifugata (4 min, 8700g) e le cellule risospese in 700 µl di soluzione ipotonica (KCl 0.56%, 37°C). Dopo 1 minuto, sono stati aggiunti 700 µl di soluzione fissativa di metanolo:acido acetico (14:1, -20°C). Dopo ulteriore centrifuga (4 min, 8700g), le cellule risospese in 40 µl di PBS (37°C) sono state distribuite su due vetrini freddi, lasciate asciugare e colorate con Giemsa (0,4% w/v in soluzione di metanolo, 5 min). Infine, i vetrini sono stati lavati con acqua distillata, asciugati e coperti con uno strato di Eukitt per renderli permanenti.

Per l'analisi al microscopio (400X), prima di valutare la frequenza di MN, è stato necessario classificare le cellule buccali in "normali" e "anormali" sulla base della morfologia di citoplasma e nucleo, indice di danni al DNA, difetti nella divisione cellulare o morte cellulare. La frequenza di MN è stata successivamente valutata su almeno 2000 cellule differenziate "normali" per vetrino (2 vetrini per soggetto) (Thomas et al., 2009; Tolbert et al., 1992).

#### **3.1.6 Analisi dei dati**

I dati sono stati caricati su database elettronico creato con il pacchetto informatico Access 2010.

Una prima analisi delle caratteristiche demografiche e comportamentali e dei risultati di laboratorio è stata effettuata applicando la statistica descrittiva. Per rappresentare le variabili quantitative non normalmente distribuite sono stati utilizzati i valori della mediana e gli intervalli di distribuzione della stessa (range e differenza interquartile).

Per analizzare le associazioni tra le diverse variabili prese in considerazione (sesso, età, livello di istruzione dei genitori, valori di PM10, PM2,5 e altri inquinanti) sono stati impiegati metodi di analisi statistica univariata e multivariata. I dati sono stati elaborati allo scopo di indagare le associazioni tra i parametri relativi all'inquinamento atmosferico e la frequenza di MN e tra inquinamento atmosferico e danno al DNA rilevato mediante comet test.

Tutte le analisi sono state eseguite utilizzando il pacchetto statistico Stata TM 12.0 (Stata Statistical Software Release 12.0, 2012; Stata Corporation, College Station, Texas, USA). In particolare sono stati utilizzati il test non parametrico di Mann-Whitney per le variabili non normalmente distribuite e il test non parametrico di Kruskal-Wallis per le variabili non dicotomiche. Tutti i test statistici sono stati condotti usando la soglia del 5% ( $p = 0,05$ ) per rifiutare l'ipotesi nulla con i test a due code.

### **3.2 PROGETTO MAPEC\_LIFE**

Il progetto MAPEC\_LIFE (LIFE12 ENV/IT/000614) è un progetto triennale, finanziato dall'Unione Europea nell'ambito del Programma Life+, che si propone di studiare gli effetti biologici precoci dovuti all'esposizione a inquinanti atmosferici 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 coinvolge sette Unità: le Università di Brescia (coordinatrice del progetto), Perugia, Pisa, Salento e Torino, il Comune di Brescia e il Centro Servizi Multisetoriale e Tecnologico, CSMT Gestione s.c.a.r.l., di Brescia. Il progetto prevede di includere almeno 1000 bambini della scuola primaria (6-8 anni) in 5 città italiane (Brescia, Lecce, Perugia, Pisa e Torino) a diverso grado di inquinamento. Per studiare la relazione dose-effetto tra esposizione a inquinanti ed effetti biologici, i campioni di aria e i campioni biologici sono stati raccolti sia nella stagione invernale che in tarda primavera (prima della chiusura delle scuole). I risultati ottenuti verranno integrati e utilizzati per costruire un modello statistico per la stima del rischio globale di avere effetti biologici precoci dovuti agli inquinanti atmosferici e ad altri fattori (fattori socio-economici e demografici, esposizioni indoor, dieta, attività fisica, BMI) che possa essere utile alle istituzioni e ai decisori politici per valutare interventi e politiche ambientali.

I due principali obiettivi del progetto sono:

- valutare gli effetti biologici precoci dell'esposizione a inquinamento atmosferico e i fattori che possono influenzare tali danni nei bambini della scuola primaria;
- costruire un modello di rischio globale di avere effetti biologici precoci dovuti agli inquinanti atmosferici e ad altri fattori.

Il protocollo dello studio è descritto in Feretti et al., 2014 (Allegato 2), a cui si rimanda per i dettagli del disegno dello studio e dei metodi applicati. In Zani et al., 2015 (Allegato 3), inoltre, è riportato lo studio di fattibilità e ripetibilità condotto per validare il questionario creato e utilizzato nel progetto per raccogliere informazioni relative alle esposizioni outdoor e indoor, allo stato di salute, agli stili di vita e alle abitudini alimentari dei bambini reclutati (Allegato 4).

#### **3.2.1 Strumenti didattici**

Coinvolgendo i bambini per il prelievo biologico all'interno dell'ambiente scolastico, il progetto MAPEC\_LIFE ha creato un'occasione unica di dialogo con gli insegnanti sulla possibilità e modalità di approccio ai temi ambientali nelle scuole. L'Unità di Pisa, con la collaborazione degli altri partner, ha creato un pacchetto didattico sul tema dell'inquinamento atmosferico e dei suoi effetti sulla salute destinato agli insegnanti e ai

bambini di 6-8 anni. Gli strumenti comprendono cinque schede didattiche per gli insegnanti (o i genitori), un cartone animato introduttivo e tre videogiochi didattici per i bambini.

Il pacchetto didattico così costruito è stato valutato, prima, per la comprensibilità su un piccolissimo campione a Pisa e, successivamente, per l'efficacia con uno studio pilota su un campione di 223 bambini di 4 città.

Infine, il pacchetto didattico è stato inserito sul sito del progetto (<http://www.mapec-life.eu>), su cui è accessibile gratuitamente, previa registrazione.

## **Capitolo 4**

### **RISULTATI**

#### **4.1 STUDIO RESPIRA**

Lo studio RESPIRA ha coinvolto 6 scuole dell'infanzia nel territorio urbano di Brescia. Durante le due stagioni di reclutamento, sono stati raccolti 6 campioni ambientali di PM<sub>0,5</sub>, 222 questionari completi e 222 campioni biologici dai bambini reclutati. Il test del micronucleo è stato condotto sulle cellule esfoliate della mucosa orale di tutti i soggetti reclutati, ma i risultati sono stati ottenuti solo su 181 campioni, in quanto i vetrini dei restanti 41 campioni non avevano una quantità sufficiente di cellule. Invece, il comet test è stato condotto sui leucociti salivari di 215 bambini, per motivi di non idoneità del campione.

##### **4.1.1 Questionario**

La Tabella 1 riporta la distribuzione di alcune delle caratteristiche socio-demografiche dei bambini reclutati nello studio, raccolte mediante la somministrazione del questionario ai genitori.

I bambini partecipanti all'indagine sono maschi e femmine circa in egual misura (55,9% maschi) e la fascia d'età più rappresentata è quella dei 5-6 anni (46%). La maggior parte dei bambini sono nati a Brescia (88,7%) e risiedono nella stessa abitazione dalla nascita. Il livello d'istruzione dei genitori è mediamente elevato, infatti più della metà dei bambini ha almeno un genitore laureato.

Per quanto riguarda il tempo passato all'aperto, risulta che solo il 20,3% dei bambini fa attività di gioco all'esterno per più di 3 ore alla settimana, dato sicuramente influenzato dalla stagione in cui è avvenuta la ricerca.

L'esposizione a inquinanti indoor è stata valutata attraverso domande riguardanti le modalità di riscaldamento dell'abitazione e di cottura dei cibi che possono potenzialmente sviluppare sostanze in grado di danneggiare il DNA. Dalle risposte dei genitori, risulta che il caminetto è presente nel 22,1% delle abitazioni e il tipo di fornello utilizzato per cucinare è a gas nell'88,8% dei casi; il 22,1% dei bambini sta in cucina durante la cottura dei cibi. Per quanto riguarda il fumo passivo, invece, dalle risposte risulta che il 15,8% delle madri e il 19,8% dei padri sono fumatori.

##### **4.1.2 Valutazione dell'esposizione**

L'esposizione dei bambini agli inquinanti atmosferici è stata valutata secondo due modalità: da una parte, una valutazione generale dei livelli dei principali inquinanti aerei,



rilevati giornalmente dall'ARPA; dall'altra parte, una misura più specifica e più vicina alla reale esposizione dei bambini (campionamento nel cortile della scuola), ma puntuale e quindi limitata nel tempo.

#### *Raccolta dei dati ambientali rilevati dalle centraline ARPA*

La qualità dell'aria nel territorio di Brescia è monitorata quotidianamente dall'ARPA Lombardia in 5 punti. Per lo studio RESPIRA, sono stati presi in considerazione solo i dati rilevati dalle due centraline localizzate nel territorio urbano, di cui è stata poi calcolata la media per ogni inquinante. Gli inquinanti presi in considerazione sono: PM10, PM2,5, NO<sub>2</sub>, CO, SO<sub>2</sub>, O<sub>3</sub> e benzene.

I due periodi di campionamento, gennaio-marzo 2012 e gennaio-marzo 2013, sono stati caratterizzati da livelli di PM10, PM2,5 e NO<sub>2</sub> spesso sopra i limiti previsti dalla normativa (D.Lgs. 155/2010): limite giornaliero di 50 µg/m<sup>3</sup> (da non oltrepassare per più di 35 giorni all'anno) per il PM10, media annuale di 25 µg/m<sup>3</sup> per il PM2,5 e 40 µg/m<sup>3</sup> per l'NO<sub>2</sub>. I due grafici sotto riportati (Figura 1) mostrano l'andamento dei tre inquinanti, mentre le frecce indicano i giorni durante i quali i campioni biologici e ambientali sono stati raccolti nelle 6 scuole. Ampiamente entro i limiti sono rimasti, invece, CO, O<sub>3</sub> e SO<sub>2</sub>.

#### *Raccolta di PM0,5*

Durante le due stagioni di reclutamento, sono stati raccolti 6 campioni di PM0,5. In Tabella 2 sono riportate: volume di aria e quantità di PM0,5 campionati per ogni scuola (48 ore) e la relativa concentrazione di PM0,5. Osservando la tabella, bisogna ricordare che i campionamenti sono stati effettuati in giornate differenti e quindi questi dati non possono essere utilizzati per confrontare la qualità dell'aria nelle diverse zone della città in cui sono localizzate le scuole, ma piuttosto tra le diverse giornate di campionamento.

#### *Analisi chimiche del PM0,5*

La ricerca degli IPA è stata effettuata sull'estratto organico di PM0,5; le concentrazioni di IPA rilevate sono riportate nella Tabella 3, come livelli dei singoli IPA ricercati e come quantità di IPA totali sia per m<sup>3</sup> di aria che per mg di PM0,5. Come si può vedere, non ci sono differenze sostanziali nella concentrazione di IPA totali dei sei campioni.

L'unico tra gli IPA le cui concentrazioni siano regolamentate dalla legislazione italiana è il benzo(a)pirene, che non deve superare il valore di 1 ng/m<sup>3</sup> (Direttiva Europea 2008/50/EC); nessuna delle scuole esaminate oltrepassa questo limite.

Anche la ricerca dei metalli è stata effettuata sul PM<sub>0,5</sub>. La legislazione italiana impone dei limiti solamente per alcuni metalli pesanti, ovvero nichel, arsenico e cadmio, mentre per il piombo fornisce un valore obiettivo (Tabella 4). Analizzando i valori ottenuti, si può osservare come le concentrazioni di metalli misurate siano sempre al di sotto dei limiti imposti dalla legge, ad eccezione del nichel nella Scuola 1, che supera di molto il limite di 20 ng/m<sup>3</sup>. È interessante notare che nel PM<sub>0,5</sub> di questa scuola sono stati rilevati valori molto più elevati rispetto alle altre anche per quanto riguarda cromo, ferro, manganese e cobalto. Questi livelli sono spiegabili con la vicinanza di questa scuola ad una acciaieria molto grande.

#### *Test di Ames sugli estratti organici di PM<sub>0,5</sub>*

Tutti i risultati del test di Ames condotto sugli estratti organici del PM<sub>0,5</sub> raccolto nelle vicinanze delle sei scuole coinvolte nello studio sono riportati nelle Tabelle 5 e 6. Le dosi testate sono espresse come m<sup>3</sup> di aria e come mg di estratto. Per i diversi campioni i m<sup>3</sup> di aria testati non corrispondono alla stessa quantità di estratto, che è funzione del particolato raccolto.

Tutti i campioni di PM<sub>0,5</sub> hanno mostrato attività mutagena nei batteri, con rapporti di mutagenicità superiori a 2 e un andamento dose-risposta. Tale effetto è stato osservato però solo con il ceppo TA98, e in particolare senza l'attivazione metabolica (-S9), indicando soprattutto la presenza di mutageni diretti, che agiscono dando luogo a mutazioni frameshift (inserzione e delezione di basi). L'aggiunta di S9 sembra detossificare il campione, riducendo l'attività mutagena sui batteri, che permane solo alla dose più alta testata (50 m<sup>3</sup>) nei campioni 1, 2, 4, 5 e 6. In presenza di attivazione metabolica solo il campione prelevato nei pressi della scuola 3 mostra una curva dose-risposta.

Non è stato osservato nessun effetto mutageno col ceppo TA100, con e senza S9, indicando quindi l'assenza di sostanze in grado di indurre mutazioni per sostituzione di basi.

#### *Comet test sugli estratti organici di PM<sub>0,5</sub>*

I risultati del test della cometa condotto sugli estratti organici di PM<sub>0,5</sub> raccolto nei pressi delle sei scuole della città, espressi come "visual score" e "tail intensity" sono mostrati nelle Figure 2 e 3. Tutti i campioni hanno mostrato attività genotossica sui leucociti umani, inducendo un significativo aumento del danno al DNA in funzione della dose.

### *Test del micronucleo in Allium cepa su estratti acquosi di PM0,5*

Nel test del micronucleo in *Allium cepa*, al fine di valutare la tossicità dei campioni in esame, sono dapprima stati considerati alcuni parametri macroscopici delle radici. Le radici di *Allium cepa* al termine dell'esposizione non hanno mostrato alcun segno di tossicità. Non si sono infatti osservate differenze significative nell'allungamento radicale tra i bulbi immersi nei campioni e quelli immersi nel controllo negativo, rappresentato dall'acqua distillata, né si sono osservate alterazioni nel colore, nella forma e nella consistenza delle radici.

I risultati del test del micronucleo in *Allium cepa*, condotto sugli estratti acquosi del PM0,5 sono mostrati in Tabella 7. In entrambi gli esperimenti condotti non sono stati osservati effetti genotossici nelle cellule delle radici di cipolla: nessun campione ha mostrato incrementi di micronuclei rispetto al controllo negativo, evidenziando quindi l'assenza di effetti mutageni in questo organismo. Non sono state osservate neppure alterazioni significative nell'indice mitotico.

#### **4.1.3 Valutazione degli effetti biologici precoci nei bambini**

Nello studio RESPIRA, sono stati reclutati 222 bambini a cui è stato effettuato il prelievo di cellule della mucosa orale. Il test del micronucleo è stato condotto sulle cellule esfoliate della mucosa orale di tutti i soggetti reclutati, mentre il comet test è stato condotto sui leucociti salivari di 215 bambini, per motivi di non idoneità del campione. I dati relativi al reclutamento e al campionamento biologico in ogni scuola sono riportati in Tabella 8.

#### *Comet assay sui leucociti salivari*

L'analisi dei risultati del comet test si è dimostrata essere molto lunga e impegnativa, per due principali ragioni: in molti campioni, i leucociti salivari erano veramente poco numerosi e questo ha allungato in modo significativo i tempi di lettura dei vetrini; in secondo luogo, la concomitante presenza di cellule epiteliali ha reso molto più difficoltosa l'individuazione e la selezione delle immagini da esaminare mediante il software. Ad oggi, i dati disponibili riguardano i soggetti delle prime tre scuole: su un totale di 152 bambini reclutati in queste scuole, 147 campioni salivari sono stati sottoposti al test della cometa e di questi, solo 100 hanno dato risultati utilizzabili per l'analisi finale. Infatti, per molti campioni non è stato possibile considerare, per l'analisi microscopica, i previsti 100 nucleoidi per vetrino, ma è stato stabilito di includere nell'analisi solo quei campioni che arrivavano ad almeno 30 nucleoidi per vetrino (60 nucleoidi per soggetto).

Sui 100 soggetti analizzati, la media dei valori di TI (tail intensity, percentuale di DNA nella coda) è risultata pari a  $6,14 \pm 4,76\%$ , il valore della mediana è di  $5,65\%$  e il range di distribuzione è compreso tra  $0,59\%$  e  $30,80\%$ . Esprimendo i risultati come VS (visual score), invece, la media ottenuta è  $183,61 \pm 30,00$ , la mediana  $183,50$  e il range compreso tra  $123,70$  e  $300,00$ . I dati sono riportati in Tabella 9.

I risultati sono stati successivamente analizzati in relazione alle variabili socio-demografiche indagate mediante il questionario somministrato ai genitori. Nella Tabella 10, sono riportati i valori di danno al DNA, espressi sia come TI sia come VS, in funzione di alcune di queste caratteristiche, tra cui sesso, età, livello di istruzione dei genitori, traffico nelle vicinanze dell'abitazione e della scuola, abitudini dei bambini e fumo passivo. L'unica associazione statisticamente significativa con il danno al DNA è risultata essere quella con il traffico di mezzi pesanti in prossimità dell'abitazione ( $p = 0,04$ )

Considerando separatamente le scuole, è stata trovata una differenza significativa tra i livelli di danno primario al DNA nei leucociti salivari dei bambini: come si può vedere nella Figura 4, l'entità della migrazione del DNA è statisticamente maggiore nei leucociti dei bambini della scuola 3 rispetto a quelli della scuola 2 e ancor più della scuola 1, sia come tail intensity ( $p = 0,038$ ), sia come visual score ( $p = 0,1$ ). I dati di media e mediana delle tre scuole sono riportati in Tabella 11.

A questo punto, si è provato a indagare la possibile correlazione tra danno primario al DNA nei leucociti salivari e esposizione agli inquinanti atmosferici: nessuna associazione è stata trovata con nessuno degli inquinanti misurati dall'ARPA, considerando sia i livelli misurati nelle giornate di campionamento, sia le medie delle settimane precedenti.

Nella Tabella 12 sono riportate le concentrazioni di PM<sub>10</sub>, PM<sub>2,5</sub> e NO<sub>2</sub> misurate lo stesso giorno del prelievo e nei giorni precedenti (una settimana e due settimane prima del prelievo), considerando che il comet test rileva un danno recente e quindi non attribuibile a esposizioni troppo lontane nel tempo. Nella tabella, sono riportati anche i valori di PM<sub>0,5</sub> raccolto in prossimità delle 3 scuole. Anche in questo caso, non si è osservata nessuna associazione con il danno al DNA nelle cellule dei bambini: l'analisi della regressione lineare tra livelli di PM<sub>0,5</sub> e danno primario al DNA ha dato valori solo vicini alla significatività statistica, sia per il TI ( $p = 0,076$ ), sia per il VS ( $p = 0,096$ ). Tuttavia, confrontando i campioni delle tre scuole, è stata rilevata una differenza significativa ( $p = 0,0001$ ) nella concentrazione di PM<sub>0,5</sub>, che risulta più elevata nella scuola 3 (Figura 5), seguendo esattamente il trend del valore di TI e VS nei leucociti dei bambini.

### *Test del micronucleo sulle cellule epiteliali esfoliate*

Su 222 campioni di cellule esfoliate della mucosa orale prelevati e sottoposti al test del micronucleo, solo per 181 è stato ottenuto un risultato affidabile, in quanto i vetrini di 41 campioni non avevano una quantità sufficiente di cellule.

La frequenza media dei MN nelle cellule esfoliate è risultato di  $0,29 \pm 0,13\%$ , con valore mediano di  $0,28\%$  e un range compreso tra  $0,085\%$  e  $0,990\%$ . Nessuna differenza significativa è stata riscontrata nella frequenza di MN rilevata nelle cellule dei bambini delle 6 scuole e nessuna associazione è stata rilevata con le caratteristiche socio-demografiche dei bambini. Un'associazione statisticamente significativa è stata, invece, osservata tra la frequenza di MN nelle cellule dei bambini e i livelli di PM10, PM2,5 e NO2 misurati nei giorni di prelievo e nelle tre settimane precedenti.

I risultati del test del micronucleo sono stati oggetto di una recente pubblicazione (Ceretti et al., 2014, Allegato 5), a cui si rimanda per ulteriori dettagli.

## **4.2 PROGETTO MAPEC\_LIFE**

Il progetto MAPEC\_LIFE, iniziato l'1 gennaio 2014, è ora alla fine del secondo anno di attività. Le due stagioni di campionamento comuni a tutte e cinque le città coinvolte (inverno 2014-2015 e primavera 2015) sono ormai terminate. La terza stagione (inverno 2015-2016), da effettuare solo a Brescia, è cominciata alla fine di novembre 2015 e terminerà a gennaio-febbraio 2016.

Nella Tabella 13 sono riportati il numero di scuole coinvolte, di campioni ambientali e di campioni biologici raccolti nelle due stagioni nelle cinque città.

Alla fine della seconda stagione sono stati campionati per due volte (nelle due stagioni) 1125 bambini, rispettando ampiamente la dimensione del campione prefissata di 1000 soggetti.

In questa tesi di dottorato, verranno presentati i risultati preliminari relativi alla prima stagione invernale che si è svolta a Brescia.

### **4.2.1 Questionario**

Come già accennato in precedenza, nei primi mesi di progetto è stato creato un questionario per raccogliere informazioni relative alle esposizioni outdoor e indoor, allo stato di salute, agli stili di vita e alle abitudini alimentari dei bambini reclutati. Prima di essere somministrato ai genitori dei bambini, tale questionario è stato testato per valutarne la fattibilità e la ripetibilità, dimostrandosi uno strumento efficace nel raccogliere le informazioni necessarie allo studio, come riportato in Zani et al. (2015).

Durante la stagione invernale (novembre 2014-febbraio 2015), nelle 5 scuole primarie coinvolte a Brescia, sono stati distribuiti 600 consensi informati, a tutti i bambini delle classi prime, seconde e terze. 407 di questi sono stati restituiti firmati da entrambi i genitori, che in questo modo hanno acconsentito alla partecipazione del figlio allo studio. A tutti questi genitori è stato somministrato il questionario, ma solo 325 l'hanno restituito compilato. Due modalità di compilazione sono state proposte ai genitori: la compilazione classica del questionario cartaceo e la compilazione online. Tra i 325 questionari raccolti sono stati individuati 289 bambini eleggibili per la ricerca, mentre 36 sono stati esclusi in quanto avevano almeno un criterio di esclusione.

Nella Tabella 14, è riportata la frequenza di alcune delle caratteristiche socio-demografiche e di esposizione raccolte mediante il questionario. Circa la metà dei 289 bambini inclusi nello studio sono maschi e il 74,2% sono stati classificati normopeso in base al valore calcolato di BMI (body mass index).

La maggior parte dei genitori valuta il traffico veicolare in prossimità dell'abitazione e della scuola frequentata dal figlio come scarso o moderato. Il 58,6% delle abitazioni è riscaldato con il teleriscaldamento e il 78,2% delle famiglie usa il gas come combustibile per cucinare. Nel 7,6% delle abitazioni è presente una stufa, usata in media 8,2 giorni al mese, mentre nel 23,6% viene utilizzato il caminetto per 3,1 giorni al mese in media. Per quanto riguarda il fumo passivo, è stato rilevato che il 12,4% dei bambini vive con almeno un fumatore e di questi il 3,2 soggiorna in sua presenza. Infine, il 42% dei bambini svolge per almeno 3 volte alla settimana un'attività sportiva, che nel 31,6% dei casi viene effettuata all'aperto. Solo l'1,02% dei bambini, invece, gioca all'aperto per più di 3 ore al giorno.

#### **4.2.2 Valutazione dell'esposizione**

##### *Raccolta dei dati ambientali rilevati dalle centraline ARPA*

I dati sulle concentrazioni giornaliere di PM10, PM2,5, NO<sub>2</sub>, CO, SO<sub>2</sub>, O<sub>3</sub>, azoto totale e benzene misurati a Brescia e relativi al periodo di campionamento invernale sono stati ricavati dal sito di ARPA Lombardia e sono riportati nella Tabella 15. I valori per i singoli parametri sono il risultato dalla media dei valori rilevati nelle due centraline urbane operative nella città di Brescia.

Si osserva che le concentrazioni medie di PM10 e di PM2,5 si sono mantenute a livelli elevati, spesso al di sopra dei limiti di legge (50 µg/m<sup>3</sup> come limite giornaliero e 40 µg/m<sup>3</sup> come limite annuale per il PM10; 25 µg/m<sup>3</sup> come limite annuale per il PM2,5).

Per il biossido di azoto, un inquinante tipicamente correlato con il traffico veicolare, si evidenziano elevati livelli, considerando il limite di legge di 40 µg/m<sup>3</sup> come limite medio annuale. Anche i livelli di azoto totale risultano essere alti. Per gli altri inquinanti misurati, invece, si evidenziano concentrazioni basse e generalmente al di sotto dei limiti di legge, considerando che il D.Lgs. 155/2010 fissa:

- CO < 10 mg/m<sup>3</sup> come media giornaliera
- SO<sub>2</sub> < 125 µg/m<sup>3</sup> come limite giornaliero
- O<sub>3</sub> < 120 µg/m<sup>3</sup> come media annua
- Benzene < 5 µg/m<sup>3</sup> come media annua

La Figura 6 indica graficamente l'andamento giornaliero delle concentrazioni medie di PM10 e di PM2,5 relative al periodo di campionamento tra il primo settembre 2014 e il primo maggio 2015, per cogliere le oscillazioni di concentrazioni e il rapporto quantitativo tra le due frazioni di particolato atmosferico. Si osserva che le concentrazioni misurate

superano ripetutamente i limiti di legge, sia durante le giornate di campionamento del particolato ultrafine, sia durante tutto il periodo considerato.

La Figura 7, invece, mostra l'andamento giornaliero delle concentrazioni medie di ozono e di biossido di azoto. Si osserva che i valori di NO<sub>2</sub> restano costantemente elevati, con dei picchi nel periodo invernale, giustificati dal fatto che le fonti di produzione principali sono gli impianti di riscaldamento e il traffico autoveicolare. Le concentrazioni di O<sub>3</sub>, invece, inquinante tipicamente stagionale e dipendente dalla temperatura e dalla radiazione solare, presenta i livelli più bassi nel periodo invernale.

Per quanto riguarda gli altri inquinanti aerei misurati dalle centraline, i dati mostrano picchi di concentrazioni durante il periodo invernale per benzene e monossido di carbonio, entrambi prodotti di scarto tipici del traffico automobilistico. Tuttavia non vengono mai superati i limiti ambientali di legge. Anche i livelli di anidride solforosa, prodotta dalla combustione di combustibili fossili e durante processi industriali minori, rimangono molto al di sotto del limite di legge per tutto il periodo considerato.

#### *Raccolta di PM<sub>0,5</sub>*

I campionamenti ambientali in prossimità delle scuole coinvolte nello studio sono durati 72 ore (con sostituzione di membrana ogni 24 ore). Nonostante le scuole reclutate fossero cinque, sono stati effettuati quattro campioni di particolato atmosferico, in quanto due scuole erano distanti meno di 500 m l'una dall'altra e i relativi campionamenti biologici sono stati effettuati entro due settimane dal campionamento ambientale.

Nella Tabella 16, sono riportati i dati relativi ai campionamenti ambientali effettuati: volume di aria campionata, quantità di PM<sub>0,5</sub> e PM<sub>10</sub> raccolti, concentrazione di PM<sub>0,5</sub> e PM<sub>10</sub> dei quattro campioni ambientali.

Sui quattro campioni di PM<sub>0,5</sub> sono state effettuate le analisi chimiche per determinare il contenuto di idrocarburi policiclici aromatici e di alcuni loro nitro-composti (IPA e nitroIPA) e tre test di genotossicità per valutarne il potenziale genotossico: il test di Ames su quattro ceppi di *Salmonella typhimurium*, e il comet assay e il test del MN su cellule A549 in coltura. I risultati ad oggi disponibili, e qui discussi, riguardano le analisi chimiche e il test di Ames.

#### *Analisi chimiche del PM<sub>0,5</sub>*

L'analisi chimica dei quattro campioni di PM<sub>0,5</sub> raccolti a Brescia nel periodo invernale ha rilevato concentrazioni di IPA simili nei campioni 1, 3 e 4, mentre il campione 2 mostra una concentrazione molto più alta (Tabella 17). L'unico valore limite previsto dalla normativa



per quanto riguarda gli IPA è relativo ai livelli di benzo(a)pirene nel PM10 che è stabilito pari a 1 ng/m<sup>3</sup> di media annuale. Non ci sono valori di riferimento per gli altri IPA o per la sommatoria degli IPA, tantomeno nella frazione più fine del particolato, qui considerata. Come si può vedere dai valori riportati in tabella, il benzo(a)pirene supera il valore del limite annuale nel campione 2, quello che ha mostrato la quantità maggiore di IPA totali. Un altro aspetto interessante riguarda la concentrazione di IPA classificati come cancerogeni dalla IARC, che riflette l'andamento degli IPA totali.

Nella Tabella 18, invece, sono riportati i livelli di nitroIPA, i composti azotati degli idrocarburi policiclici aromatici, che mostrano un andamento diverso rispetto agli IPA, risultando più concentrati nei campioni 3 e 4, con livelli circa doppi rispetto ai campioni 1 e 2.

#### *Test di Ames sugli estratti organici di PM0,5*

Tutti i risultati del test di Ames condotto sugli estratti organici dei campioni di PM0,5 raccolti a Brescia sono riportati nelle Tabelle 19, 20, 21 e 22. Le dosi testate sono espresse in m<sup>3</sup> di aria.

Tutti i campioni hanno mostrato attività mutagena nei batteri, con rapporti di mutagenicità superiori a 2 e un andamento dose-risposta, indicando quindi la presenza di sostanze mutagene nell'aria di Brescia. Tale effetto è stato osservato con i ceppi TA98, YG1021 per tutti i campioni, e con il ceppo TA98NR per i campioni delle scuole 2 e 4. L'attività mutagena è stata osservata sia in assenza che in presenza di attivazione metabolica indicando quindi la presenza nel particolato fine di mutageni diretti e indiretti, che agiscono dando luogo a mutazioni frameshift (inserzione e delezione di basi).

Non è stato invece osservato nessun effetto mutageno con il ceppo TA100, sia con che senza attivazione metabolica, indicando quindi l'assenza di sostanze in grado di indurre mutazioni per sostituzione di basi.

In Tabella 23, infine, sono riportati i valori dei revertenti netti per m<sup>3</sup> di aria testata. Il valore ottenuto rappresenta il numero di revertenti che si sono sviluppati in più rispetto al controllo per ogni m<sup>3</sup> di aria. Non essendo legato alla dose, permette un rapido e chiaro confronto tra i diversi campioni.

#### **4.2.3 Valutazione degli effetti biologici precoci nei bambini**

Durante il primo periodo di campionamento, la stagione invernale 2014-2015, sono stati campionati 283 bambini dei 289 inclusi nello studio. Sulle loro cellule, sono stati effettuati il

test della cometa e il test del micronucleo, di cui di seguito sono riportati i risultati preliminari.

#### *Comet assay sui leucociti salivari*

Il comet test effettuato sui leucociti salivari dei bambini inclusi nello studio ha dato molti problemi di lettura, che non hanno permesso di ottenere, per ora, dei risultati sul livello di danno primario al DNA in queste cellule. Come già successo per lo stesso test effettuato nello studio RESPIRA, il principale problema è stato sicuramente la quantità di leucociti nei campioni salivari: la concentrazione leucocitaria è molto variabile nella saliva e in molti soggetti era veramente bassa. Inoltre, i campioni salivari presentavano spesso impurità che hanno reso ancor più difficoltosa la lettura al microscopio. Entrambi questi fattori, scarsità di cellule e presenza di impurità di fondo, sono stati ulteriormente complicati dall'utilizzo di vetrini multispot per effettuare il test: questa modalità è stata scelta per ottimizzare i tempi di effettuazione del test, in modo da accorciare le tempistiche di laboratorio e poter prelevare e processare un maggiore numero di campioni biologici al giorno. Tuttavia, tale metodica si è dimostrata non efficace con questo tipo di campione, in cui le cellule "utili", i leucociti, non possono essere isolate in modo efficiente dalle altre cellule presenti nella saliva, le cellule epiteliali, spesso presenti in grandi quantità e quindi di ostacolo alla lettura dei preparati.

Per ora, quindi, non sono disponibili dati relativi al livello di danno primario al DNA nelle cellule dei bambini. Tuttavia, per ovviare il problema, si sta procedendo a rileggere tutti i vetrini con una modalità non automatica, la quale sembra dare maggiori risultati.

#### *Test del micronucleo sulle cellule epiteliali esfoliate*

A differenza del test precedente, il test del micronucleo effettuato sulle cellule epiteliali esfoliate dei bambini reclutati ha permesso di rilevare la frequenza di micronuclei in tutti i 283 campioni raccolti a Brescia. La frequenza media di MN è risultata essere  $0,56 \pm 0,81$  MN/1000 cellule, con un range che va da 0 a 4 MN/1000 cellule. Le analisi complete di questi dati non sono ancora state condotte, ma sono state valutate alcune associazioni con le informazioni raccolte mediante il questionario: la frequenza di MN nelle cellule dei bambini non è risultata significativamente associata al livello di traffico percepito dai genitori in prossimità dell'abitazione o della scuola. La presenza di almeno un genitore fumatore non è associata al livello di MN, ma la presenza di un familiare fumatore (come per esempio il nonno o la nonna del bambino) comporta una frequenza di MN statisticamente maggiore rispetto a chi non ne ha. Anche per quanto riguarda le abitudini

dei bambini, sembra che giocare all'aperto per almeno 1 ora al giorno non influisca sulla presenza di MN nelle cellule, mentre frequentare la piscina per 2/3 volte a settimana fa aumentare significativamente la frequenza di MN. Infine, è risultata significativa l'associazione tra titolo di studio dei genitori e livello di MN nelle cellule della mucosa orale dei bambini; in particolare, sembra che un titolo di studio basso sia significativamente associato a una frequenza di MN più elevata. I risultati di queste analisi sono del tutto preliminari e devono essere rivalutati in modo più accurato, indagando il ruolo di altri fattori ancora non considerati, come l'apporto calorico, l'assunzione di nutrienti, l'aderenza alla dieta mediterranea. Inoltre, devono ancora essere indagate le associazioni tra i livelli di MN e le concentrazioni dei principali inquinanti aerei misurati dall'ARPA, da una parte, e i risultati dei test sul PM<sub>0,5</sub> raccolto dal campionatore ad alto volume nelle vicinanze delle scuole, dall'altra.

L'obiettivo finale del progetto MAPEC\_LIFE è quello di creare un modello di rischio globale di avere effetti biologici precoci. Tale obiettivo verrà portato a termine nell'ultimo periodo di progetto, quando saranno disponibili i risultati di tutti i test condotti in entrambe le stagioni di campionamento, sia sui campioni ambientali, sia su quelli biologici di tutte e cinque le città coinvolte. Per la creazione del modello verranno inoltre considerate le informazioni raccolte con i questionari e relative ai principali fattori confondenti e modificatori.

## Capitolo 5

### DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

I risultati dello studio RESPIRA evidenziano che i bambini residenti a Brescia, città della Pianura Padana, sono esposti, in particolare nella stagione invernale, ad elevati livelli di inquinanti aerei. Tra quelli monitorati, i più preoccupanti risultano essere il particolato atmosferico e l'NO<sub>2</sub>, i cui livelli sono costantemente elevati e superano molto spesso i limiti di legge.

Il PM<sub>0,5</sub> raccolto mediante il campionatore ad alto volume posizionato in prossimità delle scuole coinvolte ha indotto mutazioni puntiformi nelle cellule batteriche di *Salmonella typhimurium* (test di Ames) e rotture del filamento del DNA in leucociti umani di sangue periferico (comet test), dimostrando la sua capacità di interagire con il DNA, provocando danni all'assetto genetico delle cellule.

Gli effetti biologici precoci rilevati nelle cellule della mucosa orale dei bambini sono, invece, di difficile interpretazione. Per quanto riguarda il comet test nei leucociti salivari, i risultati sono ancora preliminari e riferiti a tre delle sei scuole coinvolte. Tuttavia, la valutazione di questi risultati è molto difficile, in quanto pochissimi studi hanno valutato il danno primario al DNA con questo test nelle cellule di bambini in relazione alla loro esposizione a inquinamento atmosferico. Di questi, la maggior parte ha utilizzato altri tipi cellulari (leucociti o linfociti da sangue periferico, cellule della mucosa nasale) e non c'è alcun lavoro che permetta di confrontare il danno nelle diverse cellule. Oltretutto, i risultati del comet test possono essere espressi in diversi modi, utilizzando i numerosi parametri calcolati dal software di analisi dell'immagine utilizzato per la lettura dei vetrini. Tra le sette pubblicazioni trovate in letteratura, che hanno valutato il danno primario al DNA nelle cellule di bambini esposti a inquinamento aereo, l'unico studio che riporta la percentuale di DNA nella coda (tail intensity) è quello condotto da Sram et al. (1998). Questo lavoro, nel quale i livelli di danno al DNA in neonati residenti in aree ad alto e basso inquinamento non risultano significativamente differenti, riporta un valore di tail intensity per i bambini esposti ad elevate concentrazioni di SO<sub>2</sub> e NO<sub>2</sub> pari a 5,26%, del tutto simile al 6,14% dello studio RESPIRA. Le cellule considerate sono però leucociti del sangue periferico e non leucociti della saliva.

Il test del micronucleo, invece, ci dà alcune informazioni in più. Innanzi tutto, i risultati sono definitivi e completi. In secondo luogo, questo test è più diffuso e i suoi risultati più facilmente confrontabili, anche se non sono molti i lavori pubblicati con caratteristiche paragonabili allo studio RESPIRA. Il confronto con questi pochi studi mette in evidenza

che il livello medio di MN nelle cellule della mucosa orale dei bambini di Brescia (0,29 MN/100 cellule) è elevato. Esso, infatti, è:

- maggiore della frequenza di MN riportata in una recente pooled analysis e relativa ad un gruppo di 321 bambini di 0-9 anni, senza importanti esposizioni (0,108 MN/100 cellule) (Bonassi et al., 2011);
- maggiore della frequenza di MN descritta in adolescenti e giovani adulti occupazionalmente esposti a IPA (0,07 MN /100 cellule) (Karahalil et al., 1999);
- maggiore della frequenza di MN rilevata nelle cellule di bambini di 6-17 anni residenti a Calcutta (0,22 MN/100 cellule) (Lahiri et al., 2000);
- maggiore dei livelli di MN misurati in bambini di 7 anni esposti a inquinamento generato dalla combustione di biomasse in Brasile (0,12 MN/100 cellule) (Sisenando et al., 2012);
- maggiore del range che definisce la frequenza spontanea di MN nelle cellule della mucosa orale di bambini "non esposti" (0,05-0,18 MN/100 cellule) (Bonassi et al., 2011);
- simile o leggermente inferiore ai livelli di MN rilevati in bambini esposti a elevate concentrazioni di inquinamento atmosferico urbano in alcune zone dell'Est Europa, riportati in alcune pubblicazioni incluse in una revisione del 2011 di Holland et al.

Per quanto riguarda le differenze all'interno della città, i risultati per ora disponibili danno informazioni contrastanti. Infatti, mentre le frequenze medie di MN sono simili nei bambini frequentanti le diverse scuole considerate, i livelli di danno primario al DNA rilevato mediante il comet assay sono statisticamente differenti nelle tre scuole per le quali i dati sono ad oggi disponibili. D'altro canto, anche la valutazione dell'associazione tra esposizione a inquinanti aerei ed effetti biologici precoci è risultata statisticamente significativa per i livelli di MN (in particolare per PM10, PM2,5 e NO<sub>2</sub>), ma negativa per il danno primario al DNA misurato con il comet assay. Il confronto tra i due test, in effetti, non è del tutto intraprendibile, in quanto essi misurano due tipi diversi di danno, prodotti da sostanze con meccanismi d'azione differenti e in cellule diverse. Danno quindi informazioni molto differenti e questo è uno dei motivi per i quali vengono utilizzati parallelamente nella valutazione degli effetti dannosi delle esposizioni ad agenti genotossici e, ancor più, a miscele di tali composti.

Tutti questi risultati e queste prime conclusioni sono, in ogni caso, ancora da valutare nel loro insieme, quando tutti i dati saranno disponibili.

Lo studio RESPIRA presenta, inoltre, alcune limitazioni importanti. La prima è sicuramente quella di aver considerato solo bambini esposti ad elevati livelli di inquinamento

atmosferico, senza prevedere un campione di controllo, ovvero un gruppo di bambini esposti a bassi livelli di inquinanti oppure lo stesso campione di soggetti campionati in un periodo caratterizzato da minore inquinamento. Questo ci costringe a cercare un confronto al di fuori dello studio per interpretare i risultati, con le difficoltà già in precedenza elencate. Un secondo limite è rappresentato dall'aver effettuato un solo prelievo biologico e quindi una sola misura di effetto per ogni soggetto, il che comporta la impossibilità di valutare la variabilità intra-soggetto di questi biomarcatori.

Nonostante le limitazioni citate, lo studio RESPIRA ha anche dei punti di forza, tra cui sicuramente il numero di soggetti inclusi, relativamente alto rispetto ad altri studi simili, l'età dei soggetti considerati, libera da alcuni fattori confondenti tipici di studi epidemiologici su popolazioni adulte (abitudine al fumo, esposizioni lavorative) e le cellule utilizzate, direttamente esposte al passaggio degli inquinanti ambientali e facilmente reperibili. Inoltre, il disegno dello studio utilizzato nel RESPIRA e i suoi risultati devono essere considerati la base e lo stimolo che hanno portato alla progettazione dello studio MAPEC\_LIFE, nel quale alcune caratteristiche sono state modificate e implementate proprio per superarne i limiti.

I risultati del progetto MAPEC\_LIFE sono ancora pochi, in quanto la ricerca si trova al termine del suo secondo anno di attività e la maggior parte dei risultati non è ancora stata analizzata. I dati disponibili sull'esposizione dei bambini agli inquinanti atmosferici sembrano confermare la situazione della città di Brescia descritta nello studio RESPIRA, anche se i livelli di inquinanti sono risultati leggermente inferiori, a causa di una stagione invernale più calda e piovosa. Forse anche per questo motivo, i primi dati relativi alla frequenza di MN nelle cellule della mucosa orale dei bambini sono più bassi: 0,29 MN/100 cellule nel RESPIRA, 0,06 MN/100 cellule nel MAPEC\_LIFE.

Gli aspetti più interessanti del progetto MAPEC\_LIFE sono, tuttavia, ancora da considerare. Innanzi tutto, il confronto tra i livelli di danno genotossico nelle cellule dei bambini residenti nelle diverse città italiane partecipanti allo studio e caratterizzate da livelli anche molto differenti di inquinanti aerei. In secondo luogo, il confronto tra gli effetti biologici precoci rilevati nelle cellule dei medesimi bambini in situazioni estremamente differenti di inquinamento (inverno e tarda primavera). Infine, la valutazione della variabilità intra-soggetto, ovvero la misura degli effetti negli stessi bambini esposti alle medesime condizioni di inquinamento (inverno a distanza di un anno), che permetterà di investigare anche l'affidabilità e ripetibilità di questi test.

## BIBLIOGRAFIA

Anderson JO, Thundiyil JG, Stolbach A. 2012. Clearing the air: a review of the effects of particulate matter air pollution on human health. *Journal of Medical Toxicology*, 8:166–175.

Angerer J, Ewers U, Wilhelm M. 2007. Human biomonitoring: state of the art. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 210:201-228.

Asher MI, Montefort S, Björkstén B, Lai CK, Strachan DP, et al.; ISAAC Phase Three Study Group. 2006. Worldwide time trends in the prevalence of symptoms of asthma, allergic rhinoconjunctivitis, and eczema in childhood: ISAAC Phases One and Three repeat multicountry cross-sectional surveys. *Lancet*, 368:733-743.

Beelen R, Raaschou-Nielsen O, Stafoggia M, Andersen ZJ, Weinmayr G, et al. 2014. Effects of long-term exposure to air pollution on natural-cause mortality: an analysis of 22 European cohorts within the multicentre ESCAPE project. *Lancet*, 383:785–795.

Belpomme D, Irigaray P, Hardell L, Clapp R, Montagnier L, et al. 2007. The multitude and diversity of environmental carcinogens. *Environmental Research*, 105:414-429.

Binková B, Cerná M, Pastorková A, Jelínek R, Benes I, et al. 2003. Biological activities of organic compounds adsorbed onto ambient air particles: comparison between the cities of Teplice and Prague during the summer and winter seasons 2000-2001. *Mutation Research*, 525:43-59.

Bonassi S, Abbondandolo A, Camurri L, Dal Prá L, De Ferrari M, et al. 1995. Are chromosome aberrations in circulating lymphocytes predictive of future cancer onset in humans? Preliminary results of an Italian cohort study. *Cancer Genetics and Cytogenetics*, 79:133-135.

Bonassi S, Coskun E, Ceppi M, Lando C, Bolognesi C, et al. 2011. The HUman MicroNucleus project on exFoliated buccal cells (HUMN(XL)): the role of life-style, host factors, occupational exposures, health status, and assay protocol. *Mutation Research*, 728:88–97.

Bonassi S, Znaor A, Ceppi M, Lando C, Chang WP, et al. 2007. An increased micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes predicts the risk of cancer in humans. *Carcinogenesis*, 28:625-631.

Borja-Aburto VH, Castillejos M, Gold DR, Bierzwinski S, Loomis D. 1998. Mortality and ambient fine particles in southwest Mexico City, 1993-1995. *Environmental Health Perspectives*, 106:849-855.

Burlinson B, Tice RR, Speit G, Agurell E, Brendler-Schwaab SY, et al; In Vivo Comet Assay Workgroup, part of the Fourth International Workgroup on Genotoxicity Testing. 2007. Fourth International Workgroup on Genotoxicity testing: results of the in vivo Comet assay workgroup. *Mutation Research*, 627:31-35.

Carpenter DO, Arcaro K, Spink DC. 2002. Understanding the human health effects of chemical mixtures. *Environmental Health Perspectives*, 110:25-42.

Carvalho-Oliveira R, Pozo RMK, Lobo DJA, Lichtenfels AJFC, Martins-Junior HA, et al. 2005. Diesel emissions significantly influence composition and mutagenicity of ambient particles: a case study in São Paulo, Brazil. *Environmental Research*, 98:1–7.

Cavallo D, Ursini CL, Carelli G, Iavicoli I, Ciervo A, et al. 2006. Occupational exposure in airport personnel: characterization and evaluation of genotoxic and oxidative effects. *Toxicology*, 223:26-35.

Ceretti E, Feretti D, Viola GCV, Zerbini I, Limina RM, et al. 2014. DNA Damage in Buccal Mucosa Cells of Pre-School Children Exposed to High Levels of Urban Air Pollutants. *PLoS ONE*, 9(5):e96524.

Ceretti E, Zani C, Zerbini I, Viola G, Moretti M, et al. 2015. Monitoring of volatile and non-volatile urban air genotoxins using bacteria, human cells and plants. *Chemosphere*, 120:221-229.

Cesaroni G, Forastiere F, Stafoggia M, Andersen ZJ, Badaloni C, et al. 2014. Long term exposure to ambient air pollution and incidence of acute coronary events: prospective cohort study and meta-analysis in 11 European cohorts from the ESCAPE Project. *BMJ*, 348:f7412.

Chance GW and Harmsen E. 1998. Children are different: environmental contaminants and children's health. *Canadian Journal of Public Health*, 89 S1:S9-13, S10-15.

Christensen A, Östman C, Westerholm R. 2005. Ultrasound-assisted extraction and on-line LC–GC–MS for determination of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) in urban dust and diesel particulate matter . *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 381:1206–1216.

Claxton LD and Woodall GM Jr. 2007. A review of the mutagenicity and rodent carcinogenicity of ambient air. *Mutation Research*, 636:36-94.

Claxton LD, Matthews PP, Warren SH. 2004. The genotoxicity of ambient outdoor air, a review: Salmonella mutagenicity. *Mutation Research*, 567:347-399.

Collins AR, Oscoz AA, Brunborg G, Gaivão I, Giovannelli L, et al. 2008. The comet assay: topical issues. *Mutagenesis*, 23:143-151.

Coronas MV, Pereira TS, Rocha JA, Lemos AT, Fachel JM, et al. 2009. Genetic biomonitoring of an urban population exposed to mutagenic airborne pollutants. *Environment International*, 35:1023-1029.

Dhawan A, Bajpayee M, Parmar D. 2009. Comet assay: a reliable tool for the assessment of DNA damage in different models. *Cell Biology and Toxicology*, 25:5-32.

Dietert RR, Etzel RA, Chen D, Halonen M, Holladay SD, et al. 2000. Workshop to identify critical windows of exposure for children's health: immune and respiratory systems work group summary. *Environmental Health Perspectives*, 108:483-490.

Dijkema MB, Mallant SF, Gehring U, van den Hurk K, Alsema M, et al. 2011. Long-term exposure to traffic-related air pollution and type 2 diabetes prevalence in a cross-sectional screening-study in the Netherlands. *Environmental Health*, 10:76.

Dockery DW, Pope CA 3rd, Xu X, Spengler JD, Ware JH, et al. 1993. An association between air pollution and mortality in six U.S. cities. *The New England Journal of Medicine*, 329:1753-1759.

EEA. Air quality in Europe, 2015 report. European Environment Agency, 2015

Emmanouil E, Manios Y, Grammatikaki E, Kondaki K, Oikonomou E, et al. 2010. Association of nutrient intake and wheeze or asthma in a Greek pre-school population. *Pediatric Allergy Immunology*, 2:90-95.

Fairbairn DW, Olive PL, O'Neill KL. 1995. The comet assay: a comprehensive review. *Mutation Research*, 339:37-59.



Feretti D, Ceretti E, De Donno A, Moretti M, Carducci A, et al.; and the MAPEC\_LIFE Study Group. 2014. Monitoring air pollution effects on children for supporting public health policy: the protocol of the prospective cohort MAPEC study. *BMJ Open*, 4: e006096.

Galassi C, Forastiere F, Biggeri A, Gabellini C, De Sario M, et al. 2005. SIDRIA second phase: objectives, study design and methods. *Epidemiologia e Prevenzione*, 29:1-96.

Grigg J. 2009. Particulate matter exposure in children: relevance to chronic obstructive pulmonary disease. *Proceedings of the American Thoracic Society*, 6:564-569.

Hagmar L, Brøgger A, Hansteen IL, Heim S, Högstedt B, et al. 1994. Cancer risk in humans predicted by increased levels of chromosomal aberrations in lymphocytes: Nordic study group on the health risk of chromosome damage. *Cancer Research*, 54:2919-2922.

Hoffmann H and Speit G. 2005. Assessment of DNA damage in peripheral blood of heavy smokers with the comet assay and the micronucleus test. *Mutation Research*, 581:105-114.

Holland N, Bolognesi C, Kirsch-Volders M, Bonassi S, Zeiger E, et al. 2008. The micronucleus assay in human buccal cells as a tool for biomonitoring DNA damage: The HUMN project perspective on current status and knowledge gaps. *Mutation Research*, 659:93-108.

Holland N, Fucic A, Merlo DF, Sram R, Kirsch-Volders M. 2011. Micronuclei in neonates and children: effects of environmental, genetic, demographic and disease variables. *Mutagenesis*, 26:51-56.

IARC, press release n° 221, 17 Ottobre 2013.

Karahalil B, Karakaya AE, Burgaz S. 1999. The micronucleus assay in exfoliated buccal cells: application to occupational exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Mutation Research*, 442:29-35.

Kim JJ, American Academy of Pediatrics Committee on Environmental Health. 2004. Ambient air pollution: health hazards to children. *Pediatrics*, 114:1699-1707.

Kim JY, Burnett RT, Neas L, Thurston GD, Schwartz J, et al. 2007. Panel discussion review: session two-- interpretation of observed associations between multiple ambient air pollutants and health effects in epidemiologic analyses. *Journal of Exposure Science & Environmental Epidemiology*, 17:S83-89

Kirsch-Volders M, Elhajouji A, Cundari E, Van Hummelen P. 1997. The in vitro micronucleus test: a multi-endpoint assay to detect simultaneously mitotic delay, apoptosis, chromosome breakage, chromosome loss and non-disjunction. *Mutation Research*, 392:19-30.

Kirsch-Volders M, Sofuni T, Aardema M, Albertini S, Eastmond D, Fenech M, Ishidate M Jr, Lorge E, Norppa H, Surrallés J, von der Hude W, Wakata A. 2000. Report from the In Vitro Micronucleus Assay Working Group. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 35:167-172.

Lahiri T, Roy S, Basu C, Ganguly S, Ray MR, et al. 2000. Air pollution in Calcutta elicits adverse pulmonary reaction in children. *Indian Journal of Medical Research*, 112: 21-26.

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

Lovell DP and Omori T. 2008. Statistical issues in the use of the comet assay. *Mutagenesis*, 23:171-182.

Ma TH, Xu Z, Xu C, McConnell H, Rabago EV, et al. 1995. The improved Allium/Vicia root tip micronucleus assay for clastogenicity of environmental pollutants. *Mutation Research*, 334:185-195.

Maron DM and Ames BN. 1983. Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. *Mutation Research*, 113:173-215.

Michelozzi P, Forastiere F, Fusco D, Perucci CA, Ostro B, et al. 1998. Air pollution and daily mortality in Rome, Italy. *Occupational and Environmental Medicine*, 55:605-610.

Møller P. 2006. The alkaline comet assay: towards validation in biomonitoring of DNA damaging exposures. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, 98:336-345.

Neri M, Bonassi S, Knudsen LE, Sram RJ, Holland N, et al. 2006. Children's exposure to environmental pollutants and biomarkers of genetic damage. I. Overview and critical issues. *Mutation Research*, 612:1-13.

Neri M, Ugolini D, Bonassi S, Fucic A, Holland N, et al. 2006. Children's exposure to environmental pollutants and biomarkers of genetic damage. II. Results of a comprehensive literature search and meta-analysis. *Mutation Research*, 612:14-39.

Osswald K, Mittas A, Gleis M, Pool-Zobel BL. 2003. New revival of an old biomarker: characterisation of buccal cells and determination of genetic damage in the isolated fraction of viable leucocytes. *Mutation Research*, 544:321-329.

Pacini S, Giovannelli L, Gulisano M, Peruzzi B, Polli G, et al. 2003. Association between atmospheric ozone levels and damage to human nasal mucosa in Florence, Italy. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 42:127-135.

Pope CA 3rd, Burnett RT, Thun MJ, Calle EE, Krewski D, et al. 2002. Lung cancer, cardiopulmonary mortality, and long-term exposure to fine particulate air pollution. *JAMA*, 287:1132-1141.

Puett RC, Hart JE, Schwartz J, Hu FB, Liese AD, Laden F. 2011. Are particulate matter exposures associated with risk of type 2 diabetes? *Environmental Health Perspectives*, 119:384-389.

Raaschou-Nielsen O, Andersen ZJ, Beelen R, Samoli E, Stafoggia M, et al. 2013. Air pollution and lung cancer incidence in 17 European cohorts: prospective analyses from the European Study of Cohorts for Air Pollution Effects (ESCAPE). *Lancet Oncology*, 14:813-822.

Romieu I, Castro-Giner F, Kunzli N, Sunyer J. 2008. Air pollution, oxidative stress and dietary supplementation: a review. *The European Respiratory Journal*, 31:179-197.

Rössner P, Bavorova H, Ocadlikova D, Svandova E, Sram RJ. 2002. Chromosomal aberrations in peripheral lymphocytes of children as biomarkers of environmental exposure and life style. *Toxicology Letters*, 134:79-85.

Samet JM, Dominici F, Currier FC, Coursac I, Zeger SL. 2000. Fine particulate air pollution and mortality in 20 U.S. cities, 1987-1994. *The New England Journal of Medicine*, 343:1742-1749.

Schwartz J. 2004. Air pollution and children's health. *Pediatrics*, 113:1037-1043.

Schwarze PE, Ovreivik J, Låg M, Refsnes M, Nafstad P, et al. 2006. Particulate matter properties and health effects: consistency of epidemiological and toxicological studies. *Human & Experimental Toxicology*, 25:559-579.

Shah ASV, Langrish JP, Nair H, McAllister DA, Hunter AL, et al. 2013. Global association of air pollution and heart failure: a systematic review and meta-analysis. *Lancet*, 382:1039–1048.

Silva RA, West JJ, Zhang Y, Anenberg SC, Lamarque JF, et al. 2013. Global premature mortality due to anthropogenic outdoor air pollution and the contribution of past climate change. *Environmental Research Letters*, 8:034005.

Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL. 1988. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental Cell Research*, 175:184-191.

Sisenando HA, Batistuzzo de Medeiros SR, Artaxo P, Saldiva PH, Hacon Sde S. 2012. Micronucleus frequency in children exposed to biomass burning in the Brazilian Legal Amazon region: a control case study. *BMC Oral Health*, 12: 6.

Soerensen M, Autrup H, Møller P, Hertel O, Jensen SS, et al. 2003. Linking exposure to environmental pollutants with biological effects. *Mutation Research*, 544:255–271.

Speit G and Hartmann A. 2006. In: D.S. Henderson (Ed.), *Methods in Molecular Biology*, vol. 113, *DNA Repair Protocols: Eucaryotic Systems*, 2nd ed., Humana Press Inc., Totowa, NJ, p. 275.

Srám R.J., Podrazilová K., Dejmek J., Mracková G., Pilčík T. 1998. Single cell gel electrophoresis assay: sensitivity of peripheral white blood cells in human population studies. *Mutagenesis*, 13:99-103.

Szeto YT, Benzie IF, Collins AR, Choi SW, Cheng CY, et al. 2005. A buccal cell model comet assay: development and evaluation for human biomonitoring and nutritional studies. *Mutation Research*, 578:371-381.

Thomas P, Holland N, Bolognesi C, Kirsch-Volders M, Bonassi S, et al. 2009. Buccal micronucleus cytome assay. *Nature Protocols*, 4:825-837.

Thomas P, Wu J, Dhillon V, Fenech M. 2011. Effect of dietary intervention on human micronucleus frequency in lymphocytes and buccal cells. *Mutagenesis*, 26:69-76.

Thurston GD, Ito K, Hayes CG, Bates DV, Lippmann M. 1994. Respiratory hospital admissions and summertime haze air pollution in Toronto, Ontario: consideration of the role of acid aerosols. *Environmental Research*, 65:271-290.

Tice RR, Agurell E, Anderson D, Burlinson B, Hartmann A, et al. 2000. Single cell gel/Comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 35:206-221.

Tolbert PE, Shy CM, Allen JW. 1992. Micronuclei and other nuclear anomalies in buccal smears: methods development. *Mutation Research*, 271:69-77.

Tovalin H, Valverde M, Morandi MT, Blanco S, Whitehead L, Rojas E. 2006. DNA damage in outdoor workers occupationally exposed to environmental air pollutants. *Occupational and Environmental Medicine*, 63:230-236.

US Environmental Protection Agency 1996. Air quality criteria for particulate matter.

US Environmental Protection Agency 1997. Health and environmental effects of particulate matter.

Valverde M, del Carmen López M, López I, Sánchez I, Fortoul TI, et al. 1997. DNA damage in leukocytes and buccal and nasal epithelial cells of individuals exposed to air pollution in Mexico City. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 30:147-152.

Watters JL, Satia JA, Kupper LL, Swenberg JA, Schroeder JC, Switzer BR. 2007. Associations of antioxidant nutrients and oxidative DNA damage in healthy African-American and White adults. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, 16:1428-1436.

WHO. 2000. Air Quality Guidelines for Europe. World Health Organisation European Office for Europe.

WHO. 2004. Health aspects of air pollution. Results from the WHO project "Systematic review of health aspects of air pollution in Europe". World Health Organisation.

WHO. 2005. Particulate matter air pollution: how it harms health. World Health Organisation.

WHO. 2005. Particulate matter air pollution: how it harms health. World Health Organisation.

WHO. 2013. Review of evidence on health aspects of air pollution—REVIHAAP Project. First results. WHO Regional Office for Europe, World Health Organisation.

Wild CP and Kleinjans J. 2003. Children and increased susceptibility to environmental carcinogens: evidence or empathy? *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, 12:1389-1394.

Zani C, Donato F, Grioni S, Viola GCV, Ceretti E, et al.; and the MAPEC\_LIFE Study Group. 2015. 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. *Annali di Igiene*, 27:646-656.

## TABELLE E FIGURE

**Tabella 1. Studio RESPIRA.** Distribuzione di alcune delle caratteristiche socio-demografiche dei bambini reclutati.

Caratteristiche socio-demografiche	N (%)
Scuole	
1	51 (22,9)
2	59 (26,5)
3	42 (18,8)
4	15 (6,7)
5	30 (13,5)
6	25 (11,2)
Sesso	
M	124 (55,9)
F	98 (44,1)
Età	
3 anni	51 (23,0)
4 anni	69 (31,1)
5-6 anni	102 (46,0)
Luogo di nascita	
Brescia	197 (88,7)
Altro	25 (11,3)
Educazione della madre	
Scuola primaria o inferiore	38 (17,1)
Scuola secondaria	78 (35,1)
Diploma o laurea	106 (47,8)
Educazione del padre	
Scuola primaria o inferiore	56 (25,2)
Scuola secondaria	76 (34,2)
Diploma o laurea	87 (39,2)
Caratteristiche dell'abitazione	
Traffico nella zona di residenza	24 (18,6)
Traffico pesante nella zona di residenza	12 (5,4)
Industrie, centrali elettriche o inceneritori di rifiuti vicino all'abitazione	6 (4,7)
Fornello a gas nell'abitazione	197 (88,8)
Caminetto nell'abitazione	49 (22,1)
Presenza di fumatori nell'abitazione	34 (15,3)
Caratteristiche della scuola	
Traffico nell'area della scuola	45 (20,3)
Traffico pesante nell'area della scuola	6 (2,7)
Industrie, centrali elettriche o inceneritori di rifiuti vicino alla scuola	0
Abitudini dei bambini	
Gioco all'aperto (più di 3 ore al giorno)	45 (20,3)
Attività fisica 3 o più volte alla settimana	11 (5,0)
Nuoto 3 o più volte alla settimana	4 (1,8)
Presenza in cucina durante la cottura dei cibi	49 (22,1)
Abitudini dei genitori	
Madre fumatrice	35 (15,8)
Madre fumatrice in gravidanza	45 (20,3)
Madre ex fumatrice	36 (16,2)
Padre fumatore	60 (27,0)
Padre ex fumatore	44 (19,8)

**Tabella 2. Studio RESPIRA.** Volume di aria (m<sup>3</sup>), quantità di PM0,5 (mg) e concentrazione di PM0,5 (µg/m<sup>3</sup>) campionati nelle vicinanze delle 6 scuole dello studio.

	<b>Scuola 1</b>	<b>Scuola 2</b>	<b>Scuola 3</b>	<b>Scuola 4</b>	<b>Scuola 5</b>	<b>Scuola 6</b>
<b>Quantità di aria (m<sup>3</sup>)</b>	3170,3	3023,2	3022,5	3230,6	3231,0	3172,0
<b>Quantità di PM0,5 (mg)</b>	44,3	53,3	63,7	58,5	62,6	59,4
<b>Concentrazione di PM0,5 (µg/m<sup>3</sup>)</b>	14,0	17,6	21,1	18,1	19,4	18,7

**Tabella 3. Studio RESPIRA.** Concentrazioni di idrocarburi policiclici aromatici (IPA) misurate nei campioni di PM0,5 raccolti nelle vicinanze delle scuole incluse nello studio.

<b>IPA (ng/m<sup>3</sup>)</b>	<b>Scuola 1</b>	<b>Scuola 2</b>	<b>Scuola 3</b>	<b>Scuola 4</b>	<b>Scuola 5</b>	<b>Scuola 6</b>
<b>Fenantrene</b>	0,14	0,12	0,11	0,23	0,18	0,19
<b>Antracene</b>	0,02	0,01	0,02	0,04	0,02	0,03
<b>Fluorantene</b>	0,69	0,58	0,45	0,54	0,47	0,37
<b>Pirene</b>	0,84	0,61	0,53	0,60	0,54	0,40
<b>Benzo(a)antracene</b>	0,63	0,39	0,36	0,48	0,47	0,28
<b>Crisene</b>	0,89	0,64	0,55	1,03	0,97	0,64
<b>Benzo(b)fluorantene</b>	0,76	0,68	0,72	1,00	0,94	0,56
<b>Benzo(k)fluorantene</b>	0,28	0,24	0,27	0,42	0,42	0,24
<b>Benzo(j)fluorantene</b>	0,34	0,28	0,31	0,59	0,61	0,34
<b>Benzo(e)pirene</b>	0,54	0,44	0,51	0,81	0,77	0,44
<b>Benzo(a)pirene</b>	0,54	0,36	0,46	0,58	0,71	0,34
<b>Perilene</b>	0,09	0,06	0,08	0,09	0,12	0,05
<b>Indeno(1,2,3-cd)pirene</b>	0,36	0,32	0,36	0,36	0,55	0,32
<b>Dibenzo(a,h)antracene</b>	0,06	0,05	0,06	0,04	0,07	0,04
<b>Benzo(g,h,i)perilene</b>	0,50	0,41	0,51	0,77	0,89	0,51
<b>Dibenzo(a,l)pirene</b>	0,03	0,03	0,03	0,00	0,00	0,00
<b>Dibenzo(a,e)pirene</b>	0,04	0,04	0,04	0,00	0,00	0,00

<b>Dibenzo(a,i)pirene</b>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<b>Dibenzo(a,h)pirene</b>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<b>IPA totali (ng/m<sup>3</sup>)</b>	<b>6,76</b>	<b>5,28</b>	<b>5,38</b>	<b>7,60</b>	<b>7,74</b>	<b>4,77</b>
<b>IPA totali (ng IPA/mg PM)</b>	<b>484,13</b>	<b>299,77</b>	<b>255,39</b>	<b>419,92</b>	<b>399,67</b>	<b>254,66</b>

**Tabella 4. Studio RESPIRA.** Concentrazioni di metalli misurate nei campioni di PM0,5 raccolti nelle vicinanze delle scuole incluse nello studio.

<b>Metalli (ng/m<sup>3</sup>)</b>	<b>Scuola 1</b>	<b>Scuola 2</b>	<b>Scuola 3</b>	<b>Scuola 4</b>	<b>Scuola 5</b>	<b>Scuola 6</b>	<b>Valore limite/obiettivo</b>
<b>Litio</b>	3,0319	3,7232	3,8512	10,036	7,3464	8,2018	
<b>Berillio</b>	0,0053	0,1151	0,1032	0,3120	0,2600	0,3064	
<b>Boro</b>	2433,9	3794,7	3485,9	13543	13077	15394	
<b>Alluminio</b>	1080,5	1275,4	1252,4	4367,8	2695,6	2950,4	
<b>Vanadio</b>	4,6747	0,7343	0,6670	1,1515	1,4856	2,1148	
<b>Cromo</b>	920,43	7,180	11,899	9,9436	8,2378	14,03	
<b>Ferro</b>	4042,5	142,1	258,1	371,4	297,6	346,4	
<b>Manganese</b>	96,06	9,8042	14,57	37,47	24,38	28,80	
<b>Cobalto</b>	13,63	0,1389	0,2620	0,3232	0,3454	0,3329	
<b>Nichel</b>	425,38	3,2032	6,2492	6,2812	4,4420	8,5575	20 ng/m <sup>3</sup>
<b>Rame</b>	22,71	7,9386	11,91	29,72	14,86	15,13	
<b>Zinco</b>	225,61	237,46	215,90	823,41	716,65	783,60	
<b>Arsenico</b>	2,1235	0,7304	0,9211	1,4301	1,4299	0,6923	20 ng/m <sup>3</sup>
<b>Selenio</b>	0,2536	0,3136	0,2859	0,4495	0,5125	0,4729	
<b>Stronzio</b>	19,282	29,345	26,962	137,22	91,611	106,34	
<b>Cadmio</b>	0,2006	0,2143	0,1985	0,6760	0,6500	0,5183	5 ng/m <sup>3</sup>
<b>Argento</b>	0,2839	0,3533	0,6154	0,4420	0,4234	3,2724	
<b>Stagno</b>	3,8344	2,6872	2,4536	7,2989	10,351	10,101	
<b>Antimonio</b>	0,5526	0,3969	0,4089	0,9732	2,4364	4,2296	
<b>Bario</b>	117,05	244,59	161,04	1093,0	942,60	1045,0	
<b>Mercurio</b>	0,2687	0,3374	0,3573	0,8878	0,6388	1,9181	
<b>Tallio</b>	0,0719	0,0714	0,0834	0,1189	0,0780	0,0681	
<b>Piombo</b>	12,264	11,162	18,958	33,337	25,675	23,660	500 ng/m <sup>3</sup>

**Tabella 5. Studio RESPIRA.** Risultati del test di Ames, espressi come revertenti/piastra e rapporto di mutagenicità (RM), relativi al PM0,5 raccolto nelle vicinanze delle scuole 1, 2 e 3.

	Dose		TA98 - S9		TA98 + S9	
	m <sup>3</sup> aria/piastra	mg estratto/piastra	Revertenti/piastra (media ± DS)	RM	Revertenti/piastra (media ± DS)	RM
Scuola 1	5	0,07	18,0 ± 5,7	1,2	49,5 ± 13,4	1,6
	10	0,14	23,0 ± 10,4	1,6	40,0 ± 1,4	1,3
	25	0,35	36,5 ± 1,9	<b>2,5</b>	50,0 ± 5,7	1,6
	50	0,70	54,5 ± 12,8	<b>3,7</b>	76,0 ± 14,1	<b>2,5</b>
			TA100 - S9		TA100 + S9	
	10	0,14	96,0 ± 9,9	1,1	87,5 ± 6,4	0,9
	25	0,35	80,0 ± 4,2	0,9	87,5 ± 16,3	0,9
	50	0,70	84,5 ± 9,2	0,9	88,0 ± 8,5	0,9
	Scuola 2	Dose		TA98 - S9		TA98 + S9
m <sup>3</sup> aria/piastra		mg estratto/piastra	Revertenti/piastra (media ± DS)	RM	Revertenti/piastra (media ± DS)	RM
5		0,09	22,0 ± 5,7	1,5	34,5 ± 6,4	1,1
10		0,18	35,0 ± 22,7	<b>2,4</b>	31,5 ± 4,9	1,0
25		0,45	28,8 ± 22,3	<b>2,0</b>	54,0 ± 9,9	1,7
50		0,90	37,0 ± 7,6	<b>2,5</b>	67,0 ± 14,1	<b>2,2</b>
		TA100 - S9		TA100 + S9		
10		0,18	73,0 ± 2,8	0,8	96,5 ± 14,8	1,0
25		0,45	73,0 ± 8,5	0,8	89,0 ± 7,1	0,9
50	0,90	96,0 ± 9,9	1,1	95,0 ± 14,1	1,0	
Scuola 3	Dose		TA98 - S9		TA98 + S9	
	m <sup>3</sup> aria/piastra	mg estratto/piastra	Revertenti/piastra (media ± DS)	RM	Revertenti/piastra (media ± DS)	RM
	5	0,11	14,0 ± 11,3	1,0	46,0 ± 4,2	1,5
	10	0,22	34,8 ± 5,7	<b>2,4</b>	56,0 ± 9,9	1,8
	25	0,55	47,0 ± 7,1	<b>3,2</b>	68,0 ± 9,9	<b>2,2</b>
	50	1,10	72,0 ± 22,0	<b>4,9</b>	97,0 ± 2,8	<b>3,1</b>
			TA100 - S9		TA100 + S9	
	10	0,22	66,5 ± 13,4	0,7	95,0 ± 1,4	1,0
	25	0,55	86,0 ± 22,6	1,0	105,5 ± 19,1	1,1
50	1,10	114,0 ± 9,9	1,3	105,5 ± 4,9	1,1	

Controllo negativo (revertenti/piastra): TA98-S9 = 14,7 ± 5,4; TA98+S9 = 31,0 ± 7,2; TA100-S9 = 90,0 ± 20,4; TA100+S9 = 96,0 ± 9,1. Controllo positivo (revertenti/piastra): TA98±S9 >1000; TA100±S9 > 1000.



**Tabella 6. Studio RESPIRA.** Risultati del test di Ames, espressi come revertenti/piastra e rapporto di mutagenicità (RM), relativi al PM0,5 raccolto nelle vicinanze delle scuole 4, 5 e 6.

	Dose		TA98 - S9		TA98 + S9	
	m <sup>3</sup> aria/piastra	mg estratto/piastra	Revertenti/piastra (media ± DS)	RM	Revertenti/piastra (media ± DS)	RM
Scuola 4	5	0,09	25,5 ± 2,1	1,6	37,5 ± 4,9	1,4
	10	0,18	33,5 ± 4,9	<b>2,1</b>	38,5 ± 2,1	1,5
	25	0,45	36,0 ± 9,9	<b>2,3</b>	43,0 ± 5,7	1,6
	50	0,91	70,5 ± 13,4	<b>4,5</b>	62,5 ± 6,4	<b>2,4</b>
			TA100 - S9		TA100 + S9	
	5	0,9	140,5 ± 9,2	1,1	122,5 ± 6,4	1,0
	10	0,18	147,5 ± 7,8	1,2	142,0 ± 18,4	1,0
	25	0,45	143,0 ± 7,1	1,1	155,5 ± 19,1	1,1
	50	0,91	171,0 ± 8,5	1,4	153,0 ± 24,0	1,1
	Scuola 5	Dose		TA98 - S9		TA98 + S9
m <sup>3</sup> aria/piastra		mg estratto/piastra	Revertenti/piastra (media ± DS)	RM	Revertenti/piastra (media ± DS)	RM
5		0,10	20,5 ± 6,4	1,3	37,0 ± 4,2	1,4
10		0,19	32,0 ± 4,2	<b>2,0</b>	45,0 ± 2,8	1,7
25		0,48	46,0 ± 17,0	<b>2,9</b>	44,0 ± 1,4	1,7
50		0,97	69,0 ± 2,8	<b>4,4</b>	59,5 ± 16,3	<b>2,3</b>
		TA100 - S9		TA100 + S9		
5		0,10	137,0 ± 7,1	1,1	151,5 ± 7,8	1,1
10		0,19	139,0 ± 12,7	1,1	148,0 ± 1,4	1,0
25		0,48	156,5 ± 3,5	1,2	145,0 ± 14,1	1,0
50	0,97	165,5 ± 19,1	1,3	179,5 ± 30,4	1,2	
Scuola 6	Dose		TA98 - S9		TA98 + S9	
	m <sup>3</sup> aria/piastra	mg estratto/piastra	Revertenti/piastra (media ± DS)	RM	Revertenti/piastra (media ± DS)	RM
	5	0,09	25,0 ± 8,5	1,3	29,5 ± 3,5	1,0
	10	0,19	30,0 ± 8,5	1,5	30,5 ± 3,5	1,1
	25	0,47	36,0 ± 4,2	1,8	45,0 ± 1,4	1,6
	50	0,95	59,0 ± 11,3	<b>3,0</b>	57,0 ± 4,2	<b>2,0</b>
			TA100 - S9		TA100 + S9	
	5	0,09	108,5 ± 9,2	1,0	127,5 ± 4,9	0,9
	10	0,19	136,5 ± 14,8	1,2	131,5 ± 10,6	0,9
	25	0,47	120,5 ± 19,1	1,1	142,5 ± 34,6	1,0
50	0,95	142,0 ± 17,0	1,3	157,0 ± 15,6	1,1	

Controllo negativo (revertenti/piastra): TA98-S9 = 15,7 ± 4,0; TA98+S9 = 28,5 ± 4,6; TA100-S9 = 126,2 ± 10,7; TA100+S9 = 144,5 ± 4,4. Controllo positivo (revertenti/piastra): TA98±S9 >1000; TA100±S9 > 1000.

**Tabella 7. Studio RESPIRA.** Risultati del test del micronucleo in *Allium cepa* sugli estratti acquosi di PM0,5, espressi come % di micronuclei (%MCN, media  $\pm$  deviazione standard) e indice mitotico (IM, %).

Campioni	1° ESPOSIZIONE		2° ESPOSIZIONE	
	% MCN (media $\pm$ DS)	IM (%)	% MCN (media $\pm$ DS)	IM (%)
<b>Scuola 1</b>	0,21 $\pm$ 0,07	13,3	0,42 $\pm$ 0,28	11,5
<b>Scuola 2</b>	0,14 $\pm$ 0,04	13,8	0,21 $\pm$ 0,12	13,9
<b>Scuola 3</b>	0,22 $\pm$ 0,17	12,7	0,25 $\pm$ 0,20	13,4
<b>Bianco membrana 1</b>	0,12 $\pm$ 0,08	13,9	0,12 $\pm$ 0,04	12,3
<b>C-</b>	0,07 $\pm$ 0,13	14,9	0,07 $\pm$ 0,13	14,9
<b>Scuola 4</b>	0,05 $\pm$ 0,09	14,3	0,06 $\pm$ 0,04	15,7
<b>Scuola 5</b>	0,02 $\pm$ 0,04	15,8	0,11 $\pm$ 0,19	14,0
<b>Scuola 6</b>	0,04 $\pm$ 0,04	14,6	0,05 $\pm$ 0,05	15,9
<b>Bianco membrana 2</b>	0,01 $\pm$ 0,02	16,0	0,05 $\pm$ 0,04	16,9
<b>C-</b>	0,03 $\pm$ 0,04	14,9	0,04 $\pm$ 0,02	15,1

**Tabella 8. Studio RESPIRA.** Dati relativi al reclutamento e al campionamento biologico nelle 6 scuole coinvolte nello studio.

	Scuola 1	Scuola 2	Scuola 3	Scuola 4	Scuola 5	Scuola 6	Totale
<b>Bambini reclutati</b>	51	59	42	15	30	25	222
<b>Campioni di saliva</b>	49	56	42	14	30	24	215
<b>Campioni di cellule esfoliate</b>	51	59	42	15	30	25	222
<b>Periodo di campionamento</b>	24-31/01/2012	13-23/02/2012	28/02-05/03/2012	29/01-04/02/2013	18-25/02/2013	04-05/03/2013	01-03/2012 01-03/2013

**Tabella 9. Studio RESPIRA.** Livelli di danno primario al DNA rilevato con il comet test nei leucociti salivari dei bambini inclusi nello studio I risultati sono espressi come tail intensity (TI) e visual score (VS).

	TI (%)	VS (unità arbitrarie)
<b>Media <math>\pm</math> ds</b>	6,14 $\pm$ 4,76	183,61 $\pm$ 30,00
<b>Mediana</b>	5,65	183,50
<b>Range di distribuzione</b>	0,59 – 30,80	123,70 – 300,00

**Tabella 10. Studio RESPIRA.** Valori di danno al DNA, espressi sia come TI sia come VS, in funzione di alcune caratteristiche socio-demografiche dei bambini reclutati.

Caratteristiche socio-demografiche	N (%)	TI (%) (media $\pm$ DS)	VS (unità arbitrarie) (media $\pm$ DS)
<b>Sesso</b>			
M	58	6,2 $\pm$ 5,3	182,7 $\pm$ 31,6
F	42	6,1 $\pm$ 3,8	184,9 $\pm$ 27,9
<b>Età dei bambini</b>			
3 anni	14	6,7 $\pm$ 4,2	191,0 $\pm$ 32,3
4 anni	32	5,5 $\pm$ 5,8	179,5 $\pm$ 32,4
5-6 anni	54	6,3 $\pm$ 4,2	184,1 $\pm$ 28,0
<b>Livello di istruzione dei genitori</b>			
Scuola secondaria inferiore	12	5,8 $\pm$ 4,1	180,9 $\pm$ 25,3
Scuola secondaria superiore	33	6,3 $\pm$ 4,1	184,3 $\pm$ 29,3
Laurea	55	6,1 $\pm$ 5,3	183,8 $\pm$ 31,8
<b>Caratteristiche dell'abitazione</b>			
<u>Traffico in prossimità dell'abitazione</u>			
Intenso	11	6,1 $\pm$ 5,1	184,9 $\pm$ 34,8
Moderato	36	6,9 $\pm$ 5,8	188,4 $\pm$ 32,0
Scarso o assente	53	5,6 $\pm$ 3,9	180,1 $\pm$ 27,6
<b><u>Traffico pesante in prossimità dell'abitazione</u></b>			
<b>Intenso</b>	<b>47</b>	<b>7,2<math>\pm</math>5,3</b>	<b>190,6<math>\pm</math>31,5</b>
<b>Moderato</b>	<b>35</b>	<b>5,7<math>\pm</math>4,2</b>	<b>180,3<math>\pm</math>27,0</b>
<b>Scarso o assente</b>	<b>18</b>	<b>4,2<math>\pm</math>3,8</b>	<b>171,7<math>\pm</math>28,2</b>
<u>Esposizioni indoor</u>			
Fornello a gas	90	6,3 $\pm$ 4,9	184,6 $\pm$ 30,0
Caminetto	23	5,7 $\pm$ 4,2	181,7 $\pm$ 31,7
Presenza di fumatori	44	5,3 $\pm$ 3,6	179,1 $\pm$ 25,7
<b>Caratteristiche della scuola</b>			
<u>Traffico in prossimità della scuola</u>			
Intenso	6	5,6 $\pm$ 4,8	180,7 $\pm$ 33,9
Moderato	36	7,7 $\pm$ 5,8	192,9 $\pm$ 30,6
Scarso o assente	58	5,2 $\pm$ 3,8	178,1 $\pm$ 28,2
<b><u>Traffico pesante in prossimità della scuola</u></b>			
Intenso	42	6,9 $\pm$ 5,6	187,9 $\pm$ 33,1
Moderato	37	6,3 $\pm$ 3,9	185,5 $\pm$ 26,2
Scarso o assente	19	4,2 $\pm$ 3,8	171,7 $\pm$ 28,7

Abitudini dei bambini			
<u>Ore di gioco all'aperto</u>			
Meno di 1 ora	47	6,2±5,3	183,1±33,9
Più di 1 ora e meno di 3	34	6,1±4,5	183,1±25,0
3 ore o più	17	6,5±3,8	189,2±29,3
<u>Presenza in cucina durante la cottura dei cibi</u>			
Mai	13	5,8±4,0	184,3±23,9
Talvolta	68	6,1±4,2	183,2±27,7
Spesso/sempr	19	6,6±7,0	184,6±41,3
<u>Consumo di cibi fritti, grigliati o affumicati</u>			
Mai	12	4,4±3,1	173,8±23,9
Più di 1 volta al mese	88	6,4±4,9	184,9±30,6
<u>Abitudini fumatorie dei genitori</u>			
Nessun genitore fumatore	56	6,7±5,4	187,2±32,8
La madre ha fumato durante la gravidanza	23	6,1±3,5	185,9±26,0
Solo la madre fumatrice	9	5,6±3,6	184,5±26,9
Solo il padre fumatore	22	5,7±4,1	179,7±29,5
Entrambi i genitori fumatori	13	4,5±2,8	174,2±17,2

**Tabella 11. Studio RESPIRA.** Media ( $\pm$  deviazione standard) e mediana dei livelli di danno primario al DNA rilevato nei leuciti salivari dei bambini delle prime 3 scuole.

	Scuola 1		Scuola 2		Scuola 3	
	TI (%)	VS (unità arbitrarie)	TI (%)	VS (unità arbitrarie)	TI (%)	VS (unità arbitrarie)
<b>Media <math>\pm</math> ds</b>	5,01 $\pm$ 5,92	175,3 $\pm$ 33,7	6,08 $\pm$ 3,91	185,7 $\pm$ 28,4	7,19 $\pm$ 4,51	188,3 $\pm$ 27,9
<b>Mediana</b>	3,62	169,7	6,35	189,6	8,32	189,9

**Tabella 12. Studio RESPIRA.** Livelli di danno al DNA misurati mediante il comet assay (espressi come TI e come VS) nei leucociti dei bambini, concentrazioni di PM10, PM2,5 e NO<sub>2</sub> misurate lo stesso giorno del prelievo e nei giorni precedenti e concentrazioni di PM0,5 misurate con il campionatore ad alto volume.

Giorno di campionamento	N° bambini	TI (%) (Mediatds)	VS (unità arbitrarie) (Mediatds)	Giorno del prelievo					Settimane precedenti al campionamento biologico					
				1 settimana					2 settimane					
				PM0,5 (µg/m <sup>3</sup> )	PM10 (µg/m <sup>3</sup> )	PM2,5 (µg/m <sup>3</sup> )	NO <sub>2</sub> (µg/m <sup>3</sup> )	PM10 (µg/m <sup>3</sup> )	PM2,5 (µg/m <sup>3</sup> )	NO <sub>2</sub> (µg/m <sup>3</sup> )	PM10 (µg/m <sup>3</sup> )	PM2,5 (µg/m <sup>3</sup> )	NO <sub>2</sub> (µg/m <sup>3</sup> )	
2012-01-24	11	4,4±3,3	174,5±25,9	14,0	52,0	44	70,3	110,2	82,6	84,5	92,9	73,8	80,0	
2012-01-25	4	10,7±13,8	206,0±66,3	-	31	24	73,9	99,8	78,1	82,0	93,0	74,4	79,3	
2012-01-26	3	2,7±3,5	147,6±27,1	-	45,5	43	71,8	84,7	68,7	78,9	90,8	72,4	78,4	
2012-01-30	5	1,9±1,2	160,7±14,4	-	62,0	50	76,1	50,9	42,0	65,4	80,7	62,4	74,6	
2012-01-31	5	6,2±2,7	183,7±15,7	-	43,0	32	71,9	46,8	37,9	64,5	78,5	60,2	74,5	
2012-02-13	8	5,6±3,4	181,6±35,2	17,2	106,5	92	87,2	97,1	72,0	77,4	77,1	58,1	72,5	
2012-02-14	7	3,4±2,7	170,1±17,7	-	113,0	96	107,1	100,1	75,0	80,1	80,3	61,1	73,3	
2012-02-20	6	8,8±3,8	204,5±34,2	-	57,0	53	61,3	112,3	93,1	87,0	104,7	82,6	82,2	
2012-02-22	11	5,9±4,0	186,2±26,3	-	57,5	nd	65,4	95,9	79,0	76,6	98,2	67,3	79,0	
2012-02-23	8	7,1±4,2	188,5±24,0	-	93,5	83	84,4	94,6	71,7	74,4	94,3	72,9	77,2	
2012-02-28	11	7,9±3,4	194,3±20,0	21,1	67,5	36	50,5	68,7	44,3	65,0	87,0	65,9	74,2	
2012-02-29	5	11,4±1,1	217,9±11,5	-	77,5	46	60,8	71,5	44,3	63,7	83,7	61,6	70,1	
2012-03-01	11	5,7±4,1	179,7±27,5	-	92,0	65	69,7	74,4	50,9	63,3	84,5	61,3	68,7	
2012-03-05	5	4,5±6,6	164,6±30,2	-	51,0	38	34,5	78,8	50,7	55,6	74,6	49,8	61,2	

**Tabella 13. Progetto MAPEC\_LIFE.** I numeri del progetto: scuole coinvolte, campioni ambientali e campioni biologici raccolti nelle cinque città.

Città	Scuole	Campioni ambientali	Campioni biologici
Brescia	5	4	247
Lecce	5	3	241
Perugia	4	4	213
Pisa	5	4	208
Torino	7	3	216
<b>TOTALE</b>	26	18	1125

**Tabella 14. Progetto MAPEC\_LIFE.** Frequenza di alcune caratteristiche socio-demografiche e di esposizione raccolte mediante il questionario somministrato ai genitori dei bambini inclusi nel progetto a Brescia.

Caratteristiche socio-demografiche	%
Sesso	
M	47,2
F	52,8
Stato ponderale	
Sottopeso	5,8
Normopeso	74,2
Sovrappeso	12,2
Obeso	7,8
Traffico in prossimità dell'abitazione	
Scarso/moderato	58,0
intenso	42,0
Traffico in prossimità della scuola	
Scarso/moderato	58,5
Intenso	41,5
Tipologia di riscaldamento domestico	
Legna/pellet	7,2
Gasolio/kerosene	0,4
Gas	30,8
Elettrico	3,0
teleriscaldamento	58,6
Combustibile per cucinare	
Elettricità/induzione	21,1
Gas	78,2
Legna/carbone	0,8
Presenza di stufa nell'abitazione	7,6
Legna/pellet	78,3
Gas	4,3
Altro	17,4
Presenza di caminetto nell'abitazione	23,6
Legna/pellet	98,3
Altro	1,7

Fumo passivo	
Fumatori nell'abitazione	12,4
Soggiorno in ambienti chiusi con fumatori	3,2
Abitudini dei bambini	
Attività sportive 3 o più volte/settimana	42,0
Piscine 3 o più volte/settimana	3,6
Gioco all'aperto più di 3h/giorno	1,0

**Tabella 15. Progetto MAPEC\_LIFE.** Concentrazioni medie giornaliere di PM<sub>10</sub>, PM<sub>2.5</sub>, NO<sub>2</sub>, N totale, CO, SO<sub>2</sub>, O<sub>3</sub> e benzene rilevate a Brescia dalle centraline ARPA Lombardia, nei giorni di campionamento ambientale. In grassetto sono evidenziati i valori superiori ai limiti giornalieri o annuali di legge.

Data	PM10 µg/m <sup>3</sup>	PM2,5 µg/m <sup>3</sup>	NO <sub>2</sub> µg/m <sup>3</sup>	N tot µg/m <sup>3</sup>	CO mg/m <sup>3</sup>	SO <sub>2</sub> µg/m <sup>3</sup>	O <sub>3</sub> µg/m <sup>3</sup>	Benz. µg/m <sup>3</sup>
18/11/2014	16	8	<b>47,91</b>	78,35	0,62	3,05	18,98	0,71
20/11/2014	32	<b>32</b>	<b>50,54</b>	161,57	0,86	3,20	4,36	1,82
21/11/2014	38,5	<b>33</b>	<b>52,09</b>	126,64	0,89	4,33	5,19	1,62
24/11/2014	<b>77</b>	<b>63</b>	<b>59,11</b>	216,00	1,28	5,53	3,86	2,4
25/11/2014	<b>71</b>	<b>67</b>	<b>54,10</b>	237,60	1,23	6,24	1,9	2,42
26/11/2014	35,5	<b>31</b>	<b>49,97</b>	70,80	0,94	5,41	4,85	1,29
26/01/2015	20	16	<b>58,34</b>	105,21	0,74	3,68	24,48	0,70
27/01/2015	<b>67</b>	<b>52</b>	<b>71,80</b>	211,26	0,96	4,80	6,44	1,55
28/01/2015	<b>64</b>	<b>58</b>	<b>78,95</b>	270,88	1,12	5,68	12,34	2,41
09/02/2015	<b>60</b>	--	<b>63,98</b>	136,26	0,95	0,93	18,10	0,55
11/02/2015	<b>103</b>	<b>90</b>	<b>91,32</b>	255,71	1,34	2,21	7,97	2,73
12/02/2015	<b>103</b>	<b>87</b>	<b>97,81</b>	313,44	1,41	2,71	8,01	3,14

**Tabella 16. Progetto MAPEC\_LIFE.** Volume di aria campionata (m<sup>3</sup>), quantità (mg) e concentrazione (µg/m<sup>3</sup>) di PM0,5 e PM10 raccolti con campionatore ad alto volume nei pressi delle scuole coinvolte nel progetto.

	Data	Aria campionata (m <sup>3</sup> )	PM0,5 (mg)	PM10 (mg)	PM0,5 (µg/m <sup>3</sup> )	PM10 (µg/m <sup>3</sup> )
Campione 1	19-20-21/11/2014	4846,987	31,3	113,3	6,5	23,4
Campione 2	24-25-26/11/2015	4847,979	69,7	257,8	14,4	53,2
Campione 3	26-27-28/01/2015	4849,153	48,8	114,4	10,1	23,6
Campione 4	09-11-12/02/2015	4844,240	94,3	283,2	58,4	58,5

**Tabella 17. Progetto MAPEC\_LIFE.** Concentrazione degli IPA nei quattro campioni di PM0,5 raccolti mediante campionatore ad alto volume. In grassetto sono evidenziati i composti classificati cancerogeni per l'uomo (Gruppo 1, IARC).

IPA		Campione 1	Campione 2	Campione 3	Campione 4
Naftalene	ng/m <sup>3</sup>	0,0541	0,0564	0,0490	0,0458
Acenaftilene	ng/m <sup>3</sup>	< 0,0100	< 0,0100	< 0,0100	< 0,0100
Acenaftene	ng/m <sup>3</sup>	0,0139	0,0113	0,0119	0,0110
Fluorene	ng/m <sup>3</sup>	0,0104	0,0145	0,0106	0,0123
Fenantrene	ng/m <sup>3</sup>	0,0708	0,2414	0,1168	0,1389
Antracene	ng/m <sup>3</sup>	0,0133	0,0578	0,0175	0,0192
Fluorantene	ng/m <sup>3</sup>	0,1211	1,2176	0,3368	0,3664
Pirene	ng/m <sup>3</sup>	0,1589	1,4196	0,3667	0,4059
<b>Benzo(a)antracene</b>	ng/m <sup>3</sup>	0,1947	1,0877	0,2532	0,3935
<b>Crisene</b>	ng/m <sup>3</sup>	0,2935	1,2741	0,4121	0,6431
<b>Benzo(b)fluorantene</b>	ng/m <sup>3</sup>	0,4600	1,3351	0,4356	0,6217
Benzo(j)fluorantene	ng/m <sup>3</sup>	0,3196	0,9940	0,2922	0,4176
<b>Benzo(k)fluorantene</b>	ng/m <sup>3</sup>	0,2180	0,7223	0,1995	0,2818
<b>Benzo(a)pirene</b>	ng/m <sup>3</sup>	0,4829	1,5172	0,3829	0,5647
Benzo(e)pirene	ng/m <sup>3</sup>	0,3524	1,0100	0,3156	0,4471
Perilene	ng/m <sup>3</sup>	0,0793	0,2827	0,0626	0,0917
Dibenzo(a,h)acridina	ng/m <sup>3</sup>	< 0,0100	< 0,0100	< 0,0100	< 0,0100
Dibenzo(a,j)acridina	ng/m <sup>3</sup>	< 0,0100	< 0,0100	< 0,0100	< 0,0100
<b>Indeno(1,2,3-c,d)pirene</b>	ng/m <sup>3</sup>	0,4728	1,6290	0,4088	0,6498
<b>Dibenzo(a,h)antracene</b>	ng/m <sup>3</sup>	0,0347	0,1241	0,0313	0,0437
Benzo(g,h,i)perilene	ng/m <sup>3</sup>	0,2856	0,9116	0,2590	0,3672
Dibenzo(a,e)pirene	ng/m <sup>3</sup>	0,0256	0,0864	0,0223	0,0309
Dibenzo(a,h)pirene	ng/m <sup>3</sup>	< 0,0100	0,0160	< 0,0100	< 0,0100
Dibenzo(a,i)pirene	ng/m <sup>3</sup>	< 0,0100	0,0238	< 0,0100	< 0,0100
Dibenzo(a,l)pirene	ng/m <sup>3</sup>	< 0,0100	< 0,0100	< 0,0100	< 0,0100
7H-benzo(c)fluorene	ng/m <sup>3</sup>	0,0139	0,1831	0,0327	0,0391
5-metilcrisene	ng/m <sup>3</sup>	< 0,0100	0,0152	< 0,0100	< 0,0100



7,12-dimetilbenzo(a)antracene	ng/m <sup>3</sup>	< 0,0100	< 0,0100	< 0,0100	< 0,0100
3-metilcolantrene	ng/m <sup>3</sup>	< 0,0100	< 0,0100	< 0,0100	< 0,0100
Antantrene	ng/m <sup>3</sup>	0,1002	0,3512	0,0728	0,1107
Dibenzo(a,e)fluorantene	ng/m <sup>3</sup>	0,0288	0,0985	0,0260	0,0362
7H-dibenzo(c,g)carbazolo	ng/m <sup>3</sup>	< 0,0100	< 0,0100	< 0,0100	< 0,0100
<b>TOT IPA</b>	<b>ng/m<sup>3</sup></b>	<b>3,9045</b>	<b>14,6806</b>	<b>4,1159</b>	<b>5,7383</b>
<b>TOT IPA cancerogeni</b>	<b>ng/m<sup>3</sup></b>	<b>2,1566</b>	<b>7,6895</b>	<b>2,1234</b>	<b>3,1983</b>

**Tabella 18. Progetto MAPEC\_LIFE.** Concentrazione dei nitroIPA nei quattro campioni di PM<sub>0,5</sub> raccolti mediante campionatore ad alto volume.

<b>NITRO IPA</b>		<b>Campione 1</b>	<b>Campione 2</b>	<b>Campione 3</b>	<b>Campione 4</b>
1-nitronaftalene	ng/m <sup>3</sup>	< 0,0050	< 0,0050	< 0,0050	< 0,0050
2-nitronaftalene	ng/m <sup>3</sup>	< 0,0050	< 0,0050	< 0,0050	< 0,0050
5-nitroacenaftene	ng/m <sup>3</sup>	< 0,0050	< 0,0050	< 0,0050	< 0,0050
2-nitrofluorene	ng/m <sup>3</sup>	< 0,0050	< 0,0050	< 0,0050	< 0,0050
9-nitroantracene	ng/m <sup>3</sup>	0,0273	0,0270	0,0905	0,0993
1-nitropirene	ng/m <sup>3</sup>	0,0136	0,0137	0,0086	0,0164
6-nitrocisene	ng/m <sup>3</sup>	< 0,0050	< 0,0050	< 0,0050	< 0,0050
<b>TOTALE NITRO IPA</b>		<b>0,0409</b>	<b>0,0407</b>	<b>0,0991</b>	<b>0,1157</b>

**Tabella 19. Progetto MAPEC\_LIFE.** Risultati del test di Ames, espressi come revertenti/piastra e rapporto di mutagenicità (RM), relativi al Campione 1 di PM0,5.

Campione 1	<b>Dose</b>	<b>TA100 – S9</b>		<b>TA100 + S9</b>	
	<b>m<sup>3</sup> aria/piastra</b>	<b>Revertenti/piastra (media ± DS)</b>	<b>RM</b>	<b>Revertenti/piastra (media ± DS)</b>	<b>RM</b>
	10	120,0 ± 9,5	1,15	146,3 ± 20,0	1,27
	25	147,3 ± 9,8	1,41	145,7 ± 3,2	1,26
	50	139,0 ± 6,2	1,33	177,0 ± 20,8	1,53
	Controllo negativo	104,8 ± 12,8	--	115,5	--
	Controllo positivo	> 1000	--	587,0	--
		<b>TA98 – S9</b>		<b>TA98 + S9</b>	
	10	26,7 ± 5,5	1,3	35,3 ± 6,0	1,24
	25	37,0 ± 2,6	1,8	44,3 ± 6,0	1,56
	50	46,3 ± 11,2	<b>2,26</b>	71,7 ± 1,2	<b>2,51</b>
	75	58,0 ± 9,9	<b>2,83</b>	60,5 ± 7,8	<b>2,12</b>
	Controllo negativo	20,5 ± 5,6	--	28,5 ± 2,0	--
	Controllo positivo	> 1000	--	> 1000	--
		<b>YG1021 – S9</b>		<b>YG1021 + S9</b>	
	10	71,7 ± 13,9	<b>9,1</b>	145,3 ± 22,3	<b>9,53</b>
	25	163,7 ± 12,9	<b>20,78</b>	335,3 ± 60,9	<b>21,99</b>
	50	334,0 ± 27,1	<b>42,41</b>	589,3 ± 58,2	<b>38,64</b>
	75	563,5 ± 58,7	<b>71,56</b>	1091,0 ± 0,0	<b>71,54</b>
	Controllo negativo	7,9 ± 2,8	--	15,3 ± 3,6	--
	Controllo positivo	> 1000	--	> 1000	--
		<b>TA98NR – S9</b>		<b>TA98NR + S9</b>	
	10	27,7 ± 6,7	1,2	38,3 ± 5,0	1,29
	25	30,7 ± 5,5	1,33	49,3 ± 9,9	1,66
	50	32,7 ± 4,0	1,41	48,3 ± 9,5	1,62
	75	39,5 ± 3,5	1,71	54,0 ± 4,2	1,82
	Controllo negativo	23,1 ± 5,1	--	29,8 ± 4,3	--
	Controllo positivo	244,0 ± 45,3	--	807,7 ± 45,0	--

**Tabella 20. Progetto MAPEC\_LIFE.** Risultati del test di Ames, espressi come revertenti/piastra e rapporto di mutagenicità (RM), relativi al Campione 2 di PM0,5.

Campione 2	Dose	TA100 – S9		TA100 + S9	
	m <sup>3</sup> aria/piastra	Revertenti/piastra (media ± DS)	RM	Revertenti/piastra (media ± DS)	RM
	10	137,3 ± 11,9	1,31	153,0 ± 15,5	1,32
	25	133,0 ± 27,9	1,27	183,7 ± 10,4	1,59
	50	151,3 ± 20,1	1,44	203,7 ± 9,0	1,76
	Controllo negativo	104,8 ± 12,8	--	115,5 ± 10,6	--
	Controllo positivo	> 1000	--	587,0 ± 185,3	--
		TA98 – S9		TA98 + S9	
	10	36,7 ± 2,9	1,79	41,3 ± 12,4	1,45
	25	35,7 ± 7,2	1,74	57,3 ± 5,9	<b>2,01</b>
	50	41,3 ± 1,5	<b>2,02</b>	62,3 ± 10,4	<b>2,19</b>
	75	52,0 ± 11,3	<b>2,54</b>	78,0 ± 17,0	<b>2,74</b>
	Controllo negativo	20,5 ± 5,6	nd	28,5 ± 2,0	nd
	Controllo positivo	> 1000	nd	> 1000	nd
		YG1021 – S9		YG1021 + S9	
	10	109,3 ± 6,1	<b>13,88</b>	182,3 ± 24,9	<b>11,96</b>
	25	279,3 ± 29,1	<b>35,47</b>	492,3 ± 99,4	<b>32,28</b>
	50	560,3 ± 181,0	<b>71,15</b>	1034,7 ± 266,8	<b>67,85</b>
	75	799,5 ± 303,3	<b>101,52</b>	994,0 ± 0,0	<b>65,18</b>
	Controllo negativo	7,9 ± 2,8	--	15,3 ± 3,6	--
	Controllo positivo	> 1000	--	> 1000	--
		TA98NR – S9		TA98NR + S9	
	10	25,3 ± 4,2	1,1	38,3 ± 7,0	1,29
	25	35,7 ± 8,1	1,54	36,0 ± 3,0	1,21
	50	46,7 ± 4,5	<b>2,02</b>	52,3 ± 4,0	1,76
	75	45,5 ± 10,6	1,97	60,5 ± 0,7	<b>2,03</b>
	Controllo negativo	23,1 ± 5,1	--	29,8 ± 4,3	--
	Controllo positivo	244,0 ± 45,3	--	807,7 ± 45,0	--

**Tabella 21. Progetto MAPEC\_LIFE.** Risultati del test di Ames, espressi come revertenti/piastra e rapporto di mutagenicità (RM), relativi al Campione 3 di PM0,5.

Campione 3	<b>Dose</b>	<b>TA100 – S9</b>		<b>TA100 + S9</b>	
	<b>m<sup>3</sup> aria/piastra</b>	<b>Revertenti/piastra (media ± DS)</b>	<b>RM</b>	<b>Revertenti/piastra (media ± DS)</b>	<b>RM</b>
	10	123,3 ± 10,0	1,18	163,7 ± 10,7	1,42
	25	141,0 ± 13,5	1,35	168,3 ± 14,4	1,46
	50	157,7 ± 12,3	1,51	184,7 ± 29,7	1,60
	Controllo negativo	104,8 ± 12,8	--	115,5 ± 10,6	--
	Controllo positivo	> 1000	--	587,0 ± 185,3	--
		<b>TA98 – S9</b>		<b>TA98 + S9</b>	
	10	31,0 ± 3,6	1,51	41,3 ± 12,4	1,45
	25	31,7 ± 4,0	1,54	57,3 ± 5,9	<b>2,01</b>
	50	51,3 ± 3,5	<b>2,5</b>	62,3 ± 10,4	<b>2,19</b>
	75	48,5 ± 4,9	<b>2,37</b>	78,0 ± 17,0	<b>2,74</b>
	Controllo negativo	20,5 ± 5,6	--	28,5 ± 2,0	--
	Controllo positivo	> 1000	--	> 1000	--
		<b>YG1021 – S9</b>		<b>YG1021 + S9</b>	
	10	83,3 ± 6,4	<b>10,58</b>	121,3 ± 17,0	<b>7,96</b>
	25	180,7 ± 17,2	<b>22,94</b>	375,0 ± 91,5	<b>24,59</b>
	50	351,7 ± 11,2	<b>44,66</b>	720,0 ± 44,7	<b>47,21</b>
	75	822,0 ± 161,2	<b>104,38</b>	1112,0 ± 0,0	<b>72,92</b>
	Controllo negativo	7,9 ± 2,8	--	15,3 ± 3,6	--
	Controllo positivo	> 1000	--	> 1000	--
		<b>TA98NR – S9</b>		<b>TA98NR + S9</b>	
	10	25,0 ± 3,0	1,08	32,7 ± 2,1	1,1
	25	37,3 ± 8,7	1,61	42,0 ± 10,5	1,41
	50	43,0 ± 1,7	1,86	40,3 ± 3,2	1,36
	75	46,0 ± 0,0	1,99	57,5 ± 4,9	1,93
	Controllo negativo	23,1 ± 5,1	--	29,8 ± 4,3	--
	Controllo positivo	244,0 ± 45,3	--	807,7 ± 45,0	--

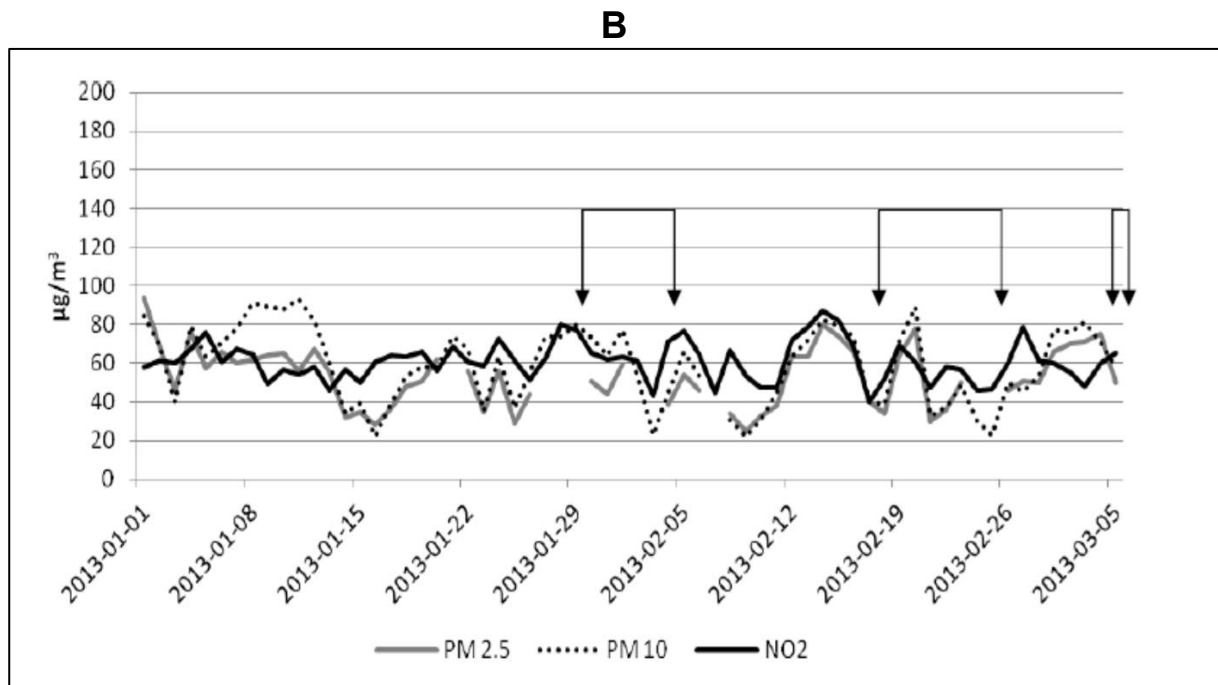
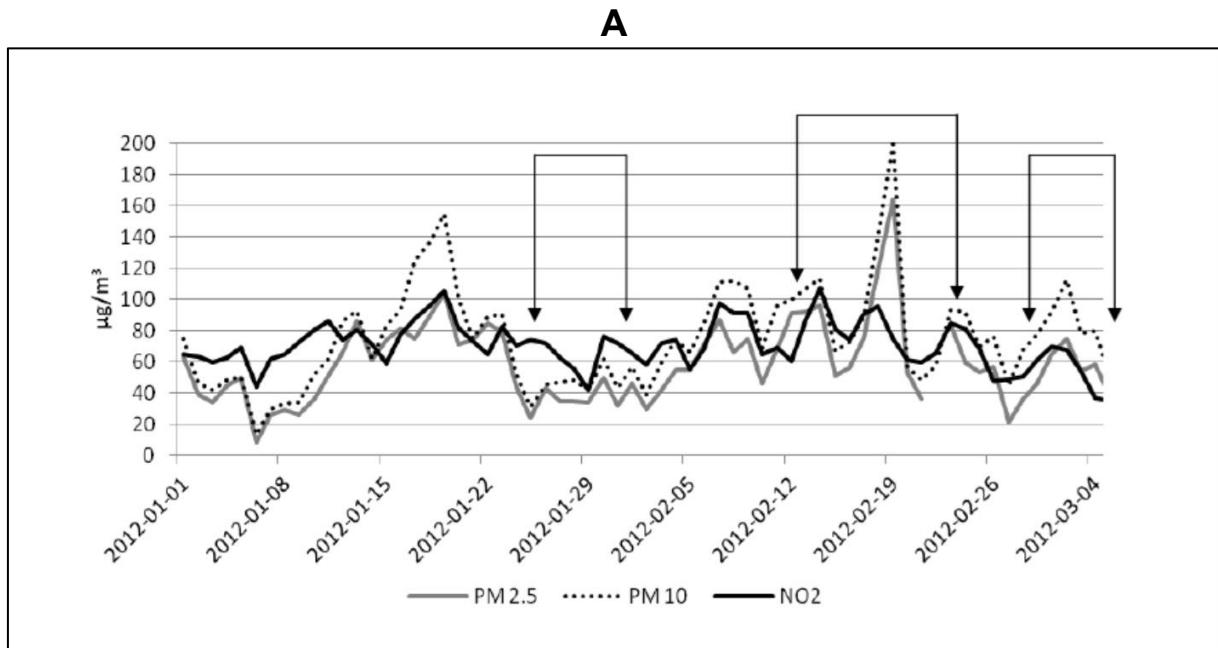
**Tabella 22. Progetto MAPEC\_LIFE.** Risultati del test di Ames, espressi come revertenti/piastra e rapporto di mutagenicità (RM), relativi al Campione 4 di PM0,5.

Campione 4	Dose	TA100 – S9		TA100 + S9	
	m <sup>3</sup> aria/piastra	Revertenti/piastra (media ± DS)	RM	Revertenti/piastra (media ± DS)	RM
	10	113,3 ± 9,1	1,08	147,0 ± 1,7	1,27
	25	126,3 ± 6,8	1,21	156,3 ± 25,4	1,35
	50	169,7 ± 6,0	1,62	202,0 ± 19,0	1,75
	Controllo negativo	104,8 ± 12,8	--	115,5 ± 10,6	--
	Controllo positivo	> 1000	--	587,0 ± 185,3	--
		TA98 – S9		TA98 + S9	
	10	26,0 ± 2,0	1,27	40,0 ± ,87	1,4
	25	39,0 ± 9,8	1,9	54,3 ± 5,0	1,91
	50	50,3 ± 1,5	<b>2,46</b>	79,3 ± 11,6	<b>2,78</b>
	75	67,0 ± 1,4	<b>3,27</b>	103,0 ± 2,8	<b>3,61</b>
	Controllo negativo	20,5 ± 5,6	--	28,5 ± 2,0	--
	Controllo positivo	> 1000	--	> 1000	--
		YG1021 – S9		YG1021 + S9	
	10	88,0 ± 3,6	<b>11,17</b>	130,3 ± 20,6	<b>8,55</b>
	25	245,3 ± 22,2	<b>31,15</b>	429,0 ± 74,6	<b>28,13</b>
	50	434,3 ± 41,9	<b>55,15</b>	775,0 ± 192,8	<b>50,82</b>
	75	554,0 ± 21,2	<b>70,35</b>	1832,0 ± 0,0	<b>120,13</b>
	Controllo negativo	7,9 ± 2,8	--	15,3 ± 3,6	--
	Controllo positivo	> 1000	--	> 1000	--
		TA98NR – S9		TA98NR + S9	
	10	31,0 ± 7,5	1,34	33,7 ± 2,1	1,13
	25	31,0 ± 5,3	1,34	47,3 ± 6,1	1,59
	50	35,7 ± 6,7	1,54	49,0 ± 1,7	1,65
	75	51,0 ± 0,0	<b>2,21</b>	71,5 ± 7,8	<b>2,4</b>
	Controllo negativo	23,1 ± 5,1	--	29,8 ± 4,3	--
	Controllo positivo	244,0 ± 45,3	--	807,7 ± 45,0	--

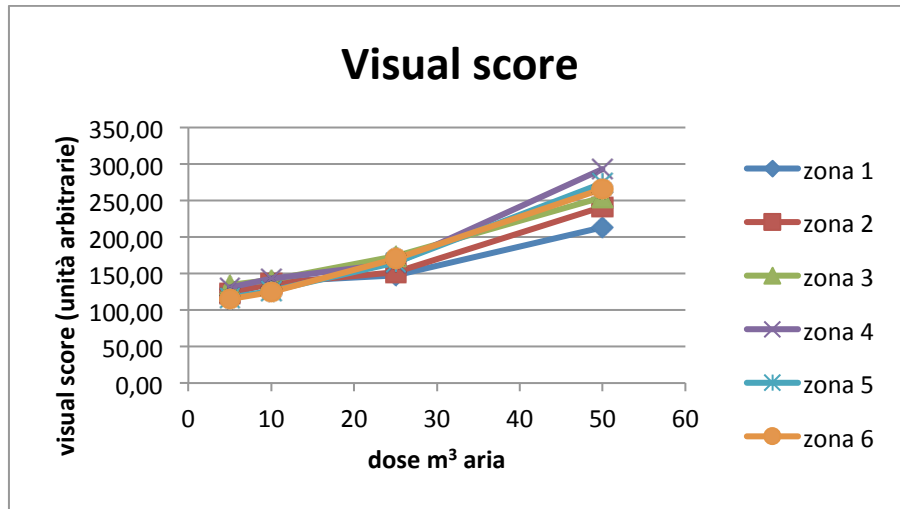
**Tabella 23. Progetto MAPEC\_LIFE.** Risultati del test di Ames, espressi come revertenti netti per m<sup>3</sup> di aria.

	Revertenti netti/m <sup>3</sup>							
	Senza S9				Con S9			
	TA100	TA98	YG1021	TA98NR	TA100	TA98	YG1021	TA98NR
Campione 1	-	0,5	7,7	-	-	-	12,9	-
Campione 2	-	0,4	10,7	-	-	0,9	16,8	-
Campione 3	-	-	9,7	-	-	0,6	14,6	-
Campione 4	-	0,6	7,6	-	-	1,0	20,0	-

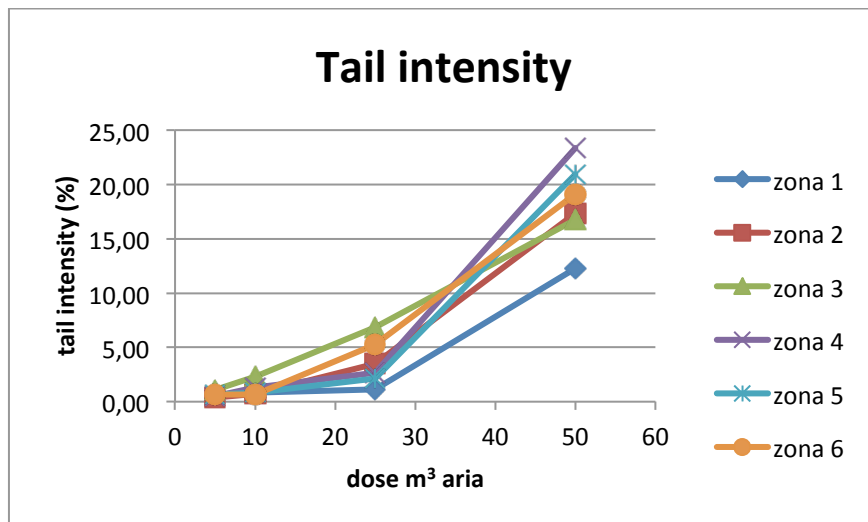
**Figura 1. Studio RESPIRA.** Andamento delle concentrazioni di PM10, PM2,5 e NO<sub>2</sub> durante i due periodi di campionamento dello studio: gennaio-marzo 2012 (A) e gennaio-marzo 2013 (B).



**Figura 2. Studio RESPIRA.** Risultati del comet test sugli estratti organici dei campioni di PM0,5 espressi come visual score.

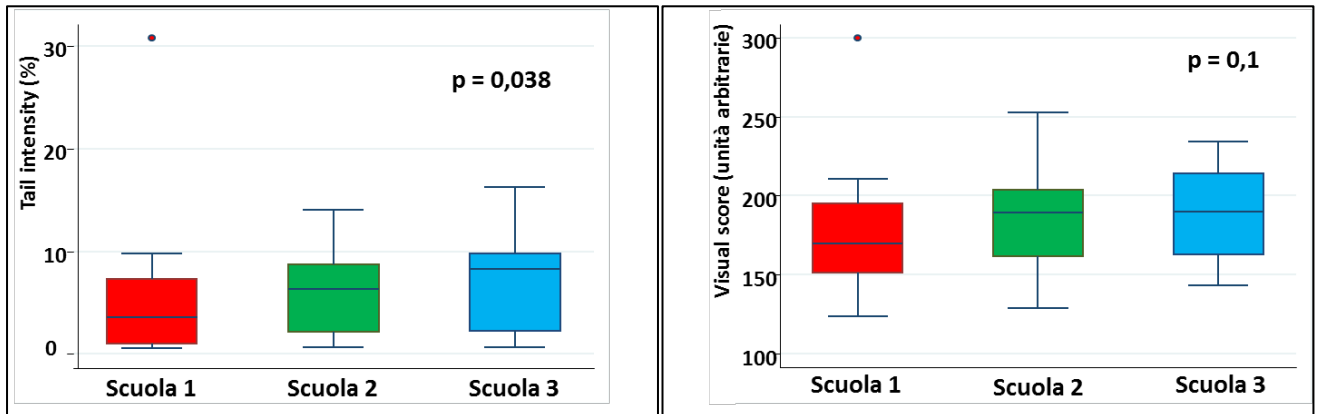


**Figura 3. Studio RESPIRA.** Risultati del comet test sugli estratti organici dei campioni di PM0,5 espressi come tail intensity.

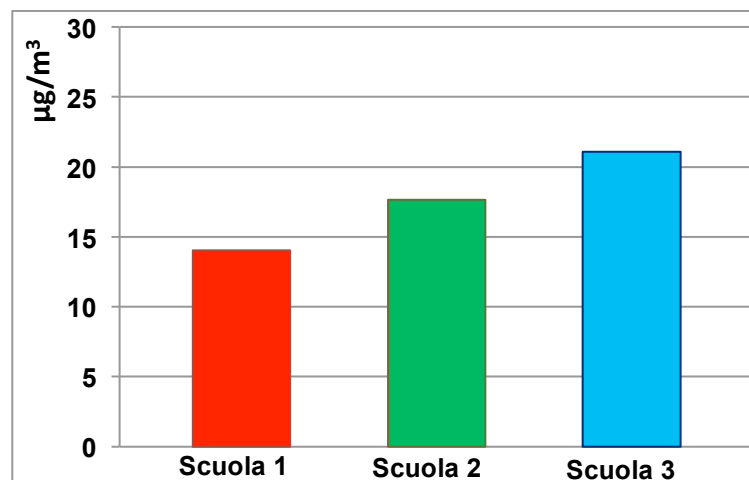




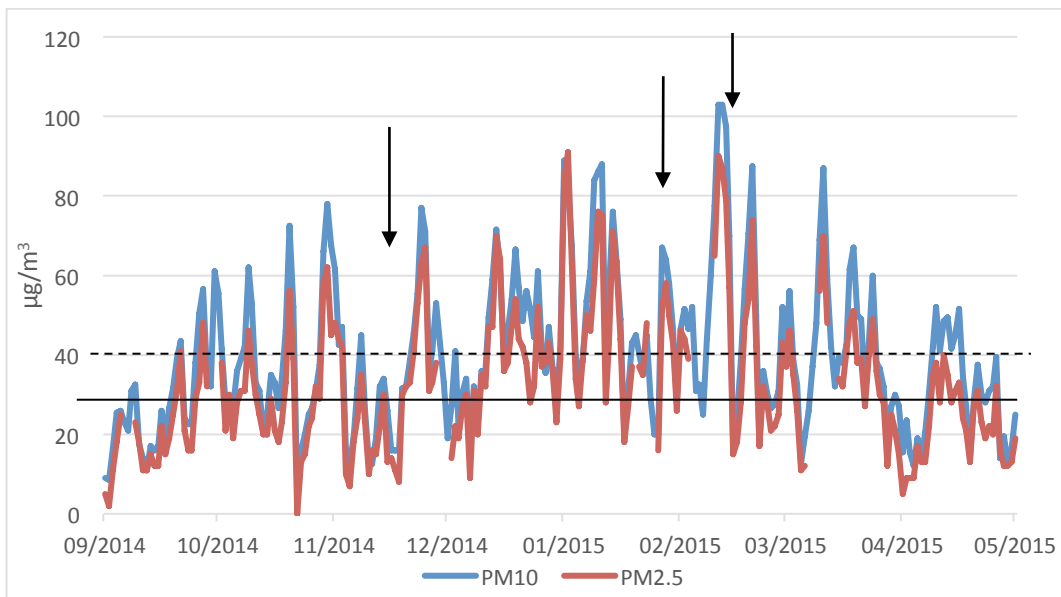
**Figura 4. Studio RESPIRA.** Entità della migrazione del DNA nei leucociti salivari dei bambini delle 3 scuole, espressi sia come tail intensity (a sinistra), sia come visual score (a destra).



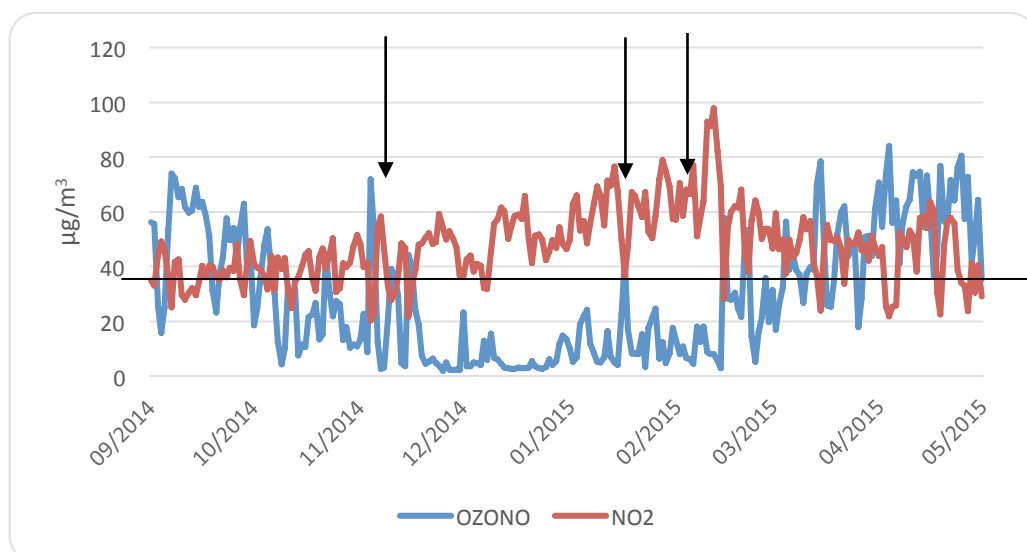
**Figura 5. Studio RESPIRA.** Concentrazione di PM0,5 raccolto nelle vicinanze delle 3 scuole mediante il campionario ad alto volume.



**Figura 6. Progetto MAPEC\_LIFE.** Concentrazioni medie giornaliere di PM10 e PM2,5 rilevate a Brescia dal primo settembre 2014 al primo maggio 2015. Le frecce rappresentano i periodi in cui sono stati effettuati i campionamento di PM0,5 nelle scuole di Brescia. La linea orizzontale continua rappresenta il limite di legge per le concentrazioni di PM2,5, mentre la linea orizzontale tratteggiata rappresenta il limite di legge per le concentrazioni di PM10.



**Figura 7. Progetto MAPEC\_LIFE.** Concentrazioni medie giornaliere di ozono e biossido di azoto rilevate a Brescia dal primo settembre 2014 al primo maggio 2015. Le frecce indicano i giorni nei quali sono stati svolti i prelievi del particolato ultrafine. La linea orizzontale indica il limite di legge annuale per NO<sub>2</sub>.



## **ALLEGATI**

**Allegato 1.** Questionario somministrato ai genitori dei bambini dello studio RESPIRA.



Università degli Studi di Brescia  
Sezione di Igiene,  
Epidemiologia e Sanità Pubblica



## RESPIRA

(Rischio **ES**posizione **I**nquinamento a**R**ia **A**tmosferica)

**Valutazione del rischio da esposizione ad inquinanti aerodispersi  
mediante lo studio di danno genotossico nelle cellule della mucosa  
orale nei bambini della scuola dell'infanzia in ambito urbano**

### QUESTIONARIO PER I GENITORI



---

Gentili genitori,

nel questionario vengono chieste informazioni sulla SALUTE DI VOSTRO FIGLIO/A.

Vi sono, inoltre, domande sulle abitudini di vita, sull'ambiente domestico, sulla residenza, sull'uso di farmaci, sulla scuola e sulla famiglia. Queste domande mirano a individuare esposizioni diverse dall'inquinamento atmosferico, per poter definire meglio lo specifico ruolo di ciascun fattore.

Vi preghiamo di rispondere con molta attenzione alle domande, seguendo le istruzioni riportate all'interno.

Il questionario compilato deve essere riportato a scuola, chiuso nella busta predisposta.

Nel questionario viene chiesto di scrivere nome e cognome dell'alunno al solo fine di poter appaiare le risposte fornite ai risultati dei test sulle cellule della mucosa della bocca. Tutte le informazioni raccolte saranno trattate con le opportune garanzie di riservatezza, in ottemperanza alla normativa vigente (Legge 196 del 2003). Ad esse avranno accesso solo gli operatori a ciò delegati dai responsabili dell'indagine, ed esse verranno utilizzate, in modo anonimo e aggregato, esclusivamente a fini di ricerca. Lo studio è svolto dalla Sezione di Igiene, Epidemiologia e Sanità Pubblica, dell'Università degli Studi di Brescia.

VI RINGRAZIAMO MOLTO PER LA COLLABORAZIONE.

---



CODICE QUESTIONARIO  
(Campo da non compilare.  
Riservato ai ricercatori)

□□□□□

DATA DI COMPILAZIONE DEL QUESTIONARIO □□ GIORNO □□ MESE □□□□ ANNO

**Sezione 1**

**DATI PERSONALI**

COGNOME DI SUO FIGLIO \_\_\_\_\_

NOME DI SUO FIGLIO \_\_\_\_\_

SCUOLA \_\_\_\_\_

DATA DI NASCITA □□ GIORNO □□ MESE □□□□ ANNO

SESSO  MASCHIO  FEMMINA

ALTEZZA □□□ CM PESO □□ KG

COMUNE DI NASCITA DI SUO FIGLIO \_\_\_\_\_

INDIRIZZO DELL'ATTUALE ABITAZIONE DI SUO FIGLIO \_\_\_\_\_

COMUNE \_\_\_\_\_

VIA / PIAZZA \_\_\_\_\_ N. \_\_\_\_\_

*(Questa informazione verrà utilizzata unicamente per risalire  
alle condizioni di inquinamento ambientale della zona di residenza)*

SUO FIGLIO VIVE NELL'ATTUALE ABITAZIONE FIN DALLA NASCITA?  NO  SI

SE NO, DA QUANTI ANNI O MESI VIVE NELL'ATTUALE ABITAZIONE? □□ ANNI OPPURE □□ MESI

SE NO, DOVE VIVEVA PRECEDENTEMENTE?

COMUNE \_\_\_\_\_

VIA \_\_\_\_\_ N. \_\_\_\_\_

## Sezione 2

## ABITAZIONE

### 1. Come giudica il traffico nella zona dove si trova la sua abitazione?

- Intenso e continuo, per buona parte del giorno
- Intenso e intermittente (ad es. solo nelle ore di punta)
- Moderato
- Scarso o assente

### 2. Nella zona dove si trova la sua abitazione c'è traffico di camion nei giorni lavorativi?

- Sì, intenso e continuo, per buona parte del giorno
- Sì, intenso e intermittente (ad es. solo nelle ore di punta)
- Moderato
- Scarso o assente

### 3. La sua abitazione è vicina (entro 500 metri) ad insediamenti industriali, impianti di produzione di energia, impianti di incenerimento dei rifiuti? NO SI

se SI, quale tipo di industria/impianto? \_\_\_\_\_

### 4. Il riscaldamento della sua abitazione è a:

- legna  carbone  gasolio/kerosene  gas  elettricità  teleriscaldamento  altro

### 5. Ha stufe nella sua abitazione? NO SI

se SI, indicare il numero

|\_\_|

se SI, che tipo di combustibile usano? legna/pellet  gas

### 6. Ha il caminetto in casa ?

- NO  SI

se SI, indicare il numero

|\_\_|

se SI, **nell'ultimo mese** quante volte ha usato il caminetto sia per riscaldare che per cucinare?

Mai

N. volte / Settimana |\_\_|\_\_| oppure

N. volte / Mese |\_\_|\_\_|

se SI, che tipo di combustibile ha usato?

legna/pellet  carbonella  altro

### 7. Quale combustibile viene generalmente usato per cucinare? (è possibile barrare più di una casella)

- elettricità, induzione
- gas
- legna o carbone

### 8. C'è uno scaldabagno (boiler) a gas all'interno dei locali dell'abitazione? NO SI

### Sezione 3

### SCUOLA

**9. Come giudica il traffico nella zona dove si trova la scuola?**

- Intenso e continuo, per buona parte del giorno
- Intenso e intermittente (ad es. solo nelle ore di punta)
- Moderato
- Scarso o assente

**10. Nella zona dove si trova la scuola c'è traffico di camion nei giorni lavorativi?**

- Sì, intenso, per buona parte del giorno
- Sì, intenso e intermittente (ad es. solo nelle ore di punta)
- Moderato
- Scarso o assente

**11. La scuola frequentata da suo figlio è vicina (entro 500 metri) ad insediamenti industriali, impianti di produzione di energia, impianti di incenerimento dei rifiuti?**  NO  SI

se SI, quale tipo di industria/impianto? \_\_\_\_\_

**12. Prima di questa, suo figlio ha frequentato altre scuole dell'infanzia / asilo nido?**

- NO  SI

↓  
*passi alla  
sezione 4*

se SI, quando?  l'anno scorso

2 anni fa

se SI, quale? nome della scuola \_\_\_\_\_

se SI, dove è situata? comune \_\_\_\_\_  
via \_\_\_\_\_

**13. Come giudica il traffico nella zona dove si trova la scuola dell'infanzia / asilo nido precedente?**

- Intenso e continuo, per buona parte del giorno
- Intenso e intermittente (ad es. solo nelle ore di punta)
- Moderato
- Scarso o assente

**14. La scuola /asilo nido precedentemente frequentata da suo figlio è vicina (entro 500 metri)**

**ad insediamenti industriali, impianti di produzione di energia, impianti di incenerimento dei rifiuti?**

- NO  SI

se SI, quale tipo di industria/impianto? \_\_\_\_\_



**Sezione 4****STATO DI SALUTE DI SUO FIGLIO**

15. Suo figlio ha un **importante problema di salute**?  NO  SI

se SI, indicare quale: \_\_\_\_\_

16. Suo figlio attualmente sta assumendo farmaci?

NO  SI

se SI, quale/quali? (anche non prescritti dal medico)

	Farmaco	Dose	Da quanto tempo	Quando è stata l'ultima assunzione
1				
2				
3				
4				
5				
6				

17. Suo figlio ha assunto farmaci negli ultimi 6 mesi?

NO  SI

se SI, quale/quali? (anche non prescritti dal medico)

	Farmaco	Dose	Per quanto tempo	Quando è stata l'ultima assunzione
1				
2				
3				
4				
5				
6				

18. Negli **ultimi 3 mesi** suo figlio è stato sottoposto a radiografie?

NO  SI

se SI, indicare in quale parte del corpo:

- arti inferiori
- arti superiori
- torace
- addome / bacino
- testa / collo
- bocca / denti

## Sezione 5

## ABITUDINI DI VITA

19. Suo figlio pratica attività sportiva almeno tre volte alla settimana?  NO  SI

20. Suo figlio frequenta una piscina tre o più volte alla settimana?  NO  SI

21. Durante una normale settimana, quante ore al giorno, suo figlio, mediamente, gioca all'aria aperta?

meno di 1 ora

fra 1 e 3 ore

fra 3 e 5 ore

più di 5 ore

22. Attualmente qualcuno fuma nella sua abitazione?

NO  SI



se SI, quante persone, in totale, fumano nell'abitazione? |\_|\_| NUMERO

*passi alla  
domanda  
numero 24*

23. Suo figlio condivide lo spazio in casa o ambienti chiusi con persone che fumano?  NO  SI

se SI, approssimativamente quante ore al giorno in media? |\_|\_| NUMERO

24. Suo figlio sta in cucina durante la cottura dei cibi?

mai

talvolta

spesso / sempre

25. Indicativamente, quante volte al mese sono stati cotti in casa cibi alla piastra (bistecchiera o superficie rovente) o alla griglia (legna, carbonella)?

mai  oppure N. volte / mese |\_|\_|

26. Facendo riferimento all'ultimo mese, può indicare la frequenza con cui suo figlio ha mangiato i seguenti alimenti? (escludendo il cibo consumato presso la scuola)

cibi fritti                      mai  oppure N. volte / mese |\_|\_|

cibi alla griglia\*              mai  oppure N. volte / mese |\_|\_|

cibi alla piastra\*\*            mai  oppure N. volte / mese |\_|\_|

pane tostato                    mai  oppure N. volte / mese |\_|\_|

pizza cotta a legna            mai  oppure N. volte / mese |\_|\_|

cibi affumicati                mai  oppure N. volte / mese |\_|\_|

\* griglia con legna o carbonella, NO elettrica

\*\* piastra o bistecchiera o altra superficie rovente

27. In casa qualcuno ha hobby che prevedono l'uso di solventi (colle, vernici, coloranti, ecc.)?  NO  SI  
se SI, indicare approssimativamente quante ore vengono usati alla settimana oppure al mese

N. volte / settimana |\_|\_| oppure N. volte / mese |\_|\_|

28. Con quale frequenza vengono utilizzati i seguenti prodotti per la pulizia della casa?  
(barrare tutte le caselle necessarie)

	mai o qualche volta al mese	1 - 2 volte alla settimana o più
- candeggina	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
- prodotti contenenti ammoniaca	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
- prodotti contenenti lisofornio	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
- prodotti contenenti anticalcare	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
- alcool	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
- cere per pavimenti	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>



36. La sua abitazione era vicina (entro 500 metri) ad insediamenti industriali, impianti di produzione di energia, impianti di incenerimento dei rifiuti?  NO  SI

se SI, quale tipo di industria/impianto? \_\_\_\_\_

## IL PAPÀ

37. In quale anno è nato il papà del bambino? 19 |\_\_|\_\_|

38. Il papà è nato: in Italia  in un altro Paese

39. Qual è il livello di istruzione del papà?

- Non ha titoli di studio
- Licenza elementare
- Diploma di scuola media inferiore/avviamento/istituto professionale
- Diploma di scuola media superiore
- Laurea

40. Il papà ha mai fumato sigarette?

- NO, non ha mai fumato       SI, ma ha smesso nell'anno |\_\_|\_\_|\_\_|       SI, fuma attualmente

se ha fumato o fuma attualmente:



- Quante sigarette fuma o fumava al giorno? |\_\_|\_\_| SIGARETTE

**GRAZIE PER LA GENTILE COLLABORAZIONE**

**OSSERVAZIONI E COMMENTI**



---

---

---

---

---

---

---

**Allegato 2.** Protocollo del progetto MAPEC\_LIFE pubblicato sulla rivista BMJ Open (Feretti et al., 2014).

# BMJ Open Monitoring air pollution effects on children for supporting public health policy: the protocol of the prospective cohort MAPEC study

D Feretti,<sup>1</sup> E Ceretti,<sup>1</sup> A De Donno,<sup>2</sup> M Moretti,<sup>3</sup> A Carducci,<sup>4</sup> S Bonetta,<sup>5</sup> M R Marrese,<sup>6</sup> A Bonetti,<sup>7</sup> L Covolo,<sup>1</sup> F Bagordo,<sup>2</sup> M Villarini,<sup>3</sup> M Verani,<sup>4</sup> T Schilirò,<sup>5</sup> R M Limina,<sup>1</sup> T Grassi,<sup>2</sup> S Monarca,<sup>3</sup> B Casini,<sup>8</sup> E Carraro,<sup>5</sup> C Zani,<sup>1</sup> G Mazzoleni,<sup>9</sup> R Levaggi,<sup>10</sup> U Gelatti,<sup>1</sup> the MAPEC\_LIFE Study Group

**To cite:** Feretti D, Ceretti E, De Donno A, *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:e006096. doi:10.1136/bmjopen-2014-006096

► Prepublication history for this paper is available online. To view these files please visit the journal online (<http://dx.doi.org/10.1136/bmjopen-2014-006096>).

Received 11 July 2014  
Revised 8 August 2014  
Accepted 11 August 2014



CrossMark

For numbered affiliations see end of article.

**Correspondence to**  
Dr D Feretti; donatella.feretti@unibs.it

## ABSTRACT

**Introduction:** Genotoxic biomarkers have been studied largely in adult population, but few studies so far have investigated them in children exposed to air pollution. Children are a high-risk group as regards the health effects of air pollution and some studies suggest that early exposure during childhood can play an important role in the development of chronic diseases in adulthood. The objective of the project is to evaluate the associations between the concentration of urban air pollutants and biomarkers of early biological effect in children, and to propose a model for estimating the global risk of early biological effects due to air pollutants and other factors in children.

**Methods and analysis:** Two biomarkers of early biological effects, DNA damage by the comet assay and the micronuclei (MN) test, will be investigated in oral mucosa cells of 6–8-year-old children. Concurrently, some toxic airborne pollutants (polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) and nitro-PAH) and in vitro air mutagenicity and toxicity in ultra-fine air particulates (PM<sub>0.5</sub>) will be evaluated. Furthermore, demographic and socioeconomic variables, other sources of exposures to air pollutants and lifestyle variables will be assessed by a structured questionnaire. The associations between sociodemographic, environmental and other exposure variables and biomarkers of early biological effect using univariate and multivariate models will be analysed. A tentative model for calculating the global absolute risk of having early biological effects caused by air pollution and other variables will be proposed.

**Ethics and dissemination:** The project has been approved by the Ethics Committees of the local Health Authorities. The results will be communicated to local Public Health Agencies, for supporting educational programmes and health policy strategies. LIFE+2012 Environment Policy and Governance. LIFE12 ENV/IT/000614.

## INTRODUCTION

Air pollution is a global problem, especially in urban areas.<sup>1</sup> In particular, particulate matter (PM) has been studied intensely as

## Strengths and limitations of this study

This project has some strengths compared with previous studies on the effects of air pollution on human health:

- Direct measures of air pollution exposure using data on daily concentration of fine particulate matter, including PM<sub>10</sub> and PM<sub>2.5</sub>, nitrogen dioxide, ozone, carbon monoxide, sulfur dioxide and benzene and evaluation of toxicity and mutagenicity of urban air using in vitro mutagenicity and toxicity tests on PM<sub>0.5</sub> extracts;
  - Direct measures of biological effect in buccal mucosa cells of 1000 children enrolled in various areas and in two different seasons, that is, MN frequency and DNA damage, which have been shown to be predictive of cancer development later in life.
- The main limitations of this study are:
- The biomarkers examined are not specific, as DNA damage can be caused by numerous environmental and individual (genetic and metabolic) factors;
  - Weather conditions not suitable for air sampling (rain, snow, strong wind) may be a limit but there is nothing that can be done about it.

regards its effects on human health. PM consists of breathable particles to which several compounds, such as heavy metals, polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and some volatile compounds, may adhere. Epidemiological studies have found a consistent association between exposure to airborne PM and incidence and mortality for cardiovascular disease and lung cancer and natural-cause mortality.<sup>2–9</sup> Recently, also diabetes and other chronic diseases have been associated with PM exposure, possibly through oxidative stress and inflammation.<sup>10</sup>

The finest fractions of PM (PM with aerodynamic diameter <2.5 µm and less) play a



major role in causing chronic diseases because they are retained in the alveolar regions of the lung and diffuse into the blood stream, inducing inflammation, oxidative stress and blood coagulation.<sup>7 11–13</sup> Extracts of urban air particles can induce cancer in animals,<sup>14 15</sup> and are mutagenic in bacteria, plant and mammalian cells in *in vitro* tests.<sup>16–22</sup>

Urban air is a complex and variable mixture of many different chemical species.<sup>1 23</sup> The effects of exposure to such a mixture are not merely the sum of the effects of each compound, because they can interact with synergistic effects; moreover, one or more chemicals can cause different effects and have multiple cellular targets.<sup>24</sup> It has been reported that even moderate or low levels of air pollution can contribute to carcinogenesis.<sup>7 23</sup> Indeed, due to the very large number of people exposed to air pollutants, even a small increase in the risk of disease is a relevant public health issue.

Among the several adverse health effects associated with exposure to air pollutants, genetic damage has received a particular interest, especially because a high frequency of markers of chromosomal damage, such as chromosomal aberrations and micronuclei (MN) in peripheral blood lymphocytes, has been found to predict cancer occurrence in cohort studies.<sup>25–27</sup>

Genetic biomarkers have been studied largely in adult population, but only few studies so far have investigated genetic damage in children exposed to air pollution.<sup>27–31</sup>

In recent years MN frequency in buccal mucosa (BM) cells of children or young adults has been studied showing cytogenetic damage in participants who lived in areas with high concentration of PM or oxidant pollutants.<sup>32–37</sup>

Recently, Ceretti *et al*<sup>37</sup> found a higher MN frequency than that observed in a pooled general population of the same age<sup>27</sup> in exfoliated buccal cells of preschool children living in a highly polluted town in the Po Valley in Italy.

On the other hand, studies of genetic damage in children are of the utmost interest because children are a high-risk group as regards the short-term and long-term health effects of air pollution.<sup>38–43</sup> Indeed, some studies suggest that early exposure during childhood can play an important role in the development of chronic diseases in adulthood: the earlier the exposure, the greater the risk of chronic disease, including cancer.<sup>44</sup>

The MN test is a mutagenicity test widely used as a marker of early biological effects due to its ability to detect both clastogens and aneuploidy-inducing chemicals.<sup>45</sup> MN appear in the cytoplasm of interphasic cells as small additional nuclei, smaller than main nuclei. They are formed of acentric chromosomal fragments or whole chromosomes that are not included in the main daughter nuclei during nuclear division. MN induction therefore reflects clastogenic and/or aneugenic events.

The primary DNA damage may be studied also using the comet assay (single cell gel electrophoresis test), which is one of the genotoxicity tests that rapidly detects

DNA damage in eukaryotic cells. In alkaline conditions, it detects single-stranded and double-stranded breaks, alkali labile sites, incomplete repair sites and possibly also DNA–DNA and DNA–protein cross-links. The comet test shows very early, reversible DNA damage that represents a marker of early biological effect.<sup>46–49</sup>

The MN frequency and the primary DNA damage, as markers of early biological effect, may be studied in different types of cells, such as lymphocytes and exfoliated cells from nasal and BM, and from urine.<sup>30 49</sup> Buccal cells are certainly easier to collect than blood and do not require highly trained personnel. Moreover, collection of BM cells is considered more acceptable to children and therefore more useful in studies on the paediatric population.

The main objective of the project is to analyse the associations between some air pollution parameters (PM<sub>10</sub>, PM<sub>2.5</sub>, PM<sub>0.5</sub>, NO<sub>x</sub>, PAHs and nitro-PAHs) and two biomarkers of early effect, and to propose a model for estimating the global risk of early biological effects due to air pollutants and other factors including demographic and socioeconomic factors, indoor exposures, diet, physical activity, body mass index (BMI) in school children. These data will provide information valuable for guiding policy-making and planning individual and community interventions to protect children from possible health effects of air pollutants. This objective will be achieved studying two biomarkers of DNA damage, the comet assay and the frequency of MN, in oral mucosa cells of 6–8-year-old children, and the following exposure variables, as possible risk factors: airborne pollutants, *in vitro* air mutagenicity and toxicity, exposures to other indoor/outdoor pollutants, demographic and socioeconomic variables, and lifestyle variables. The project will also be useful for increasing the sensitivity of people to air pollution concerns and promote the local authorities' involvement in efforts to reduce urban air pollutants.

## METHODS AND ANALYSIS

### Study design

The MAPEC project runs 3 years (2014–2016). The core of the study is a prospective epidemiological cohort study to evaluate and disseminate a method for monitoring biological effects of air pollution on children, with regard to biological parameters that can predict the occurrence of chronic diseases in adult age. Markers of early biological effect, such as primary DNA damage evaluated with the comet assay and presence of MN, will be investigated in BM cells taken from 6–8-year-old children living in five Italian towns (Brescia, Turin, Pisa, Perugia and Lecce), with different levels of airborne particulates (PM<sub>10</sub> annual average from 44 µg/m<sup>3</sup> measured in Torino to 20 µg/m<sup>3</sup> measured in Lecce).<sup>50</sup> Child exposure to urban air pollution will be evaluated by collecting ultra-fine PM (PM<sub>0.5</sub>) samples in the school areas, on the same day of biological sampling.



The particulate samples will be analysed for PAH and nitro-PAH concentration and for in vitro toxicity and mutagenicity/genotoxicity. In support of these analyses, data on airborne pollution routinely analysed by local authorities responsible for its control will be collected, referring to the air monitoring units closest to the schools participating in the MAPEC project, in the five cities. Biological and air samples will be repeated in winter and spring, seasons characterised by different type and concentration of air pollutants. Other indoor and outdoor exposures will be investigated using an ad hoc questionnaire administered to children's parents that includes questions on possible confounders and interaction factors, such as demographic and socioeconomic variables, children's lifestyle, with a focus on diet and physical activity. In conclusion, the whole data set will be analysed to investigate the association between air pollution exposure measures (chemical pollutants and PM toxicity and mutagenicity/genotoxicity) and the early effect biomarkers with the aim of developing a model for calculating the global absolute risk of early biological effects of air pollution and other possible exposure data obtained by the questionnaire.

### Sample size

A total of 1000 children (200 children per town) aged 6–8 years will be recruited from first grade schools. Two to four schools in each town will be chosen randomly from the list of schools located in areas without adjacent air pollution emission sources. The teachers, school personnel and children's parents will be involved in meetings where members of the research team will explain the project and promote participation. Participation in the study will be voluntary and no incentive will be offered for this.

The sample size of the study has been determined in order to detect statistically significant differences in the early effect biomarkers, that is, primary DNA damage and MN, between children living in towns with high and low air pollution levels. Based on published studies comparing groups at different levels of exposure to airborne mutagens, we expect to observe DNA damage in the comet test, evaluated as an average of 10% of DNA in comet tail (tail intensity) among participants with higher air pollution exposure levels compared with 7% in those at a lower exposure levels with an SD of 10%. By enrolling a total of 1000 children, about 40% of whom are supposed to live in highly polluted towns (Brescia and Turin which are located in the Po Valley), and assuming a log-normal distribution of the biomarkers of early effect, we expect to observe a statistically significant difference between the two groups, with an  $\alpha$  error of 0.05 and a power higher than 95%, using a Student *t* test for independent groups at two tails.

Estimating a loss of approximately 20%, because of incomplete or incorrectly compiled questionnaires and/or an insufficient number of cells collected through biological sampling, an oversampling of participants will be

necessary, therefore a total of 1300 children will be recruited.

### Inclusion/exclusion criteria

Only children living in the participating towns will be recruited. Children with severe diseases and those who have been exposed to antineoplastic agents, have undergone radiation therapy or X-rays in the previous 12 months or have a dental prosthetic will be excluded.

### Questionnaires

An ad hoc questionnaire will be designed including items on demographic and socioeconomic variables, exposures to indoor and outdoor air pollution sources, characteristics of the area of residence, parents' smoking at home, BMI, children's respiratory symptoms and diseases, diet, physical activity and other aspects of children's lifestyle. The questionnaire will be based on others used in some international studies on children's respiratory diseases performed in recent decades.<sup>51</sup>

After a pretesting phase, the reliability of the questionnaire will be assessed on about 100 participants using the test–retest method.

The questionnaires will be distributed and collected with the help of the school personnel at two separate times, in winter and late spring (before school closing for summer holidays), from the 1000 children enrolled (2 questionnaires per each child), in the weeks in which environmental and biological samplings will be performed.

For children not providing a filled in questionnaire, further attempts will be made on the next days. As biological samplings will go on for some days, the samples for some of the children absent from school on the established day for taking oral mucosa cells will be retrieved during the whole period of biological sampling.

In order to evaluate the intraindividual variability of biomarkers of early effect, a third environmental and biological sampling will be carried out in the following winter, restricted to 200 children recruited in Brescia.

### Collection of environmental samples

Ultra-fine PM (PM<sub>0.5</sub>) will be collected near the schools involved in the research. A high-volume air sampler will be located near the schools for 72 h during the days of biological sampling, both in winter and spring. Furthermore, air and biological samplings will be repeated in the following winter in Brescia. PM<sub>0.5</sub> sampling will be carried out using fibreglass filters. All the filters will be weighed for gravimetric determination of PM<sub>0.5</sub> and then will undergo organic extraction using sonication to prepare the samples for in vitro mutagenicity/genotoxicity and toxicity tests and chemical analysis.

### Chemical analysis

The chemical analysis of PM<sub>0.5</sub> extracts collected in each town for the determination of PAHs and

nitro-PAHs will be performed at a single laboratory using high pressure liquid chromatography.

### Mutagenicity of ultra-fine PM: Ames test

The mutagenicity of PM<sub>0.5</sub> organic extracts collected in all towns will be evaluated using Ames test on bacteria. This test is a short-term mutagenicity test which detects point mutations (base substitution and frameshift mutations) in *Salmonella typhimurium* strains.<sup>52 53</sup> The PM<sub>0.5</sub> organic extracts, dissolved in a compatible solvent (dimethylsulphoxide; DMSO), will be tested in duplicate at increasing doses with *S. typhimurium* TA100 and TA98 strains, which are generally utilised for environmental studies,<sup>18</sup> and NR98 and YG1024 strains, which are particularly able to detect nitrocompound.<sup>20 54</sup> The Ames test will be performed with and without metabolic activation ( $\pm$ S9), adding microsomal enzymes of rat liver to detect direct and indirect mutagens. Plates will be incubated at 37°C in the dark for 72 h, after which revertant colonies will be counted and a dose–response curve will be constructed. The net amount of revertants per cubic metre of air equivalent will be evaluated using a linear regression model. The Ames test will be performed at the same laboratory on all samples.

### Genotoxicity of ultra-fine PM

The genotoxicity of PM<sub>0.5</sub> organic extracts collected in all towns will be evaluated using comet test and MN test on human pulmonary A549 cell line.

#### Comet assay

The comet assay is a sensitive genotoxicity test which detects primary DNA damage in individual eukaryotic cells. This assay will be carried out on human cells of the respiratory system (A549), which represent the first type of tissue in contact with the airborne pollutants.

The organic extracts of PM<sub>0.5</sub> will be transferred to a compatible solvent (DMSO) and tested (24 h at 37°C with 5% CO<sub>2</sub>) in duplicate at increasing doses using A549 cells. The comet assay will be performed in alkaline conditions (pH>13) with the protocol to detect oxidative damage using endonuclease (formamidopyrimidine DNA glycosylase) incubation.<sup>55 56</sup> The comet will be examined using an image analysis system (Comet Assay IV). Results will be expressed as genotoxic parameter per cubic metre of air equivalent. All samples will be analysed at a single laboratory.

#### Cytokinesis-block MN test

The genotoxicity of PM<sub>0.5</sub> organic extracts collected in the five towns will be evaluated using the cytokinesis-block MN (CBMN) test. The CBMN test will be performed in accordance with the original method by Fenech<sup>57</sup> on human A549 cells treated in vitro with air extracts. At the end of the in vitro treatment, the medium will be replaced by fresh medium containing cytochalasin B to inhibit cell division after mitosis. The cells will be harvested by trypsinisation and fixed with

Carnoy's reagent, and the cell suspensions will be poured onto precleaned frosted microscope slides. After drying, the slides will be stained, air dried and mounted with Eukitt. Cells will be examined for MN at 400× magnification according to established criteria.<sup>45</sup> MN will be scored in 1000 binucleated cells for each concentration of each repeated experiment. Two independent evaluations will be performed for each sample. All samples will be analysed at a single laboratory.

### Toxicity of ultra-fine PM

Specific potential lung toxicity of organic extracts of PM<sub>0.5</sub> will be assessed in vitro on a total of 10 unique samples, obtained by mixing the organic extracts from all the samples individually collected from each town and each season. Cell viability will be assessed by the use of two traditional colorimetric assays: the MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2)2,5-difeniltetrazolium bromide) dye-based assay<sup>58</sup> and the neutral red dye-based assay.<sup>59</sup>

Organ-specific toxicity/non-genotoxic, tumour-promoting potential of the samples will be evaluated by testing their influence on the gap junctional function (GJIC) of suitable epithelial cells (eg, primary culture of oral mucosae cells or highly junctionally coupled cell line). According to the cell type selected, the scrape-loading technique<sup>60</sup> or the microinjection/dye-transfer assay<sup>61</sup> will be used. GJIC was chosen as a biological parameter in our study, since its evaluation still represents one of the most promising and sensitive end points for the mechanistic evaluation of organ-specific toxicity and/or tumour-promoting potential of agents.<sup>62 63</sup> This particular form of cell-cell communication is, in fact, a unique cell/tissue-specific cellular function, with an unquestioned role in integrated regulation of growth, differentiation processes and functions of multicellular organisms and in tissue homeostatic control.<sup>64</sup>

Toxicity tests on all PM<sub>0.5</sub> extracts will be performed at a single laboratory.

### Collection of urban air chemical data

Data regarding the main air pollutants for which routine measurements are performed by local authorities (Regional Agency for Environmental Protection, ARPA Italian acronym for Agenzia Regionale per la Protezione dell'Ambiente), such as CO, NO<sub>2</sub>, SO<sub>2</sub>, benzene, O<sub>3</sub>, PM<sub>10</sub> and PM<sub>2.5</sub>, will be retrieved for each town.

### Sampling of oral mucosa cells

Biological samples will be collected from all the children in winter and in late spring (1000×2=2000 samples). Intraindividual variability of early effect biomarkers will be evaluated by collecting further biological samples from 200 children enrolled in Brescia during the following winter. In order to collect BM cells, the children will rinse their mouths twice with mineral water and the mouthwashes will be collected in tubes containing 25 mL of saline solution (NaCl 0.9%) to obtain

leucocytes for the comet assay.<sup>65</sup> Disposable cytobrush cell collectors will then be used to collect exfoliated buccal cells for the MN test by scraping the inside of both cheeks gently and dipping the material into tubes containing 15 mL of phosphate buffered saline solution.

### Early biological effects in children

#### Comet assay

An *in vivo* assessment of primary DNA damage will be performed on leucocytes of the children's BM with the comet assay.<sup>65</sup> In order to evaluate primary DNA damage caused by exposure to air pollutants, the comet assay in alkaline conditions (pH>13) will be performed to show single-strand and double-strand breaks and alkali labile sites.<sup>55</sup> The comet assay will also be performed to detect oxidative damage using endonuclease (formamidopyrimidine DNA glycosylase) incubation.<sup>56</sup> All the slides will be dried and sent to the same laboratory for microscopic analysis. After rehydration and staining with a DNA intercalating fluorochrome (ie, ethidium bromide or SYBR green), the analysis will be performed using a fluorescence microscope at 400× magnification, equipped with a digital camera. An average of 100 randomly selected nuclei per participant will be acquired. The images, acquired in TIFF (tagged image file format) format, will be evaluated and the following damage parameters measured for each nucleoid: comet tail length (TL), percentage of detectable DNA in the tail (%TDNA), tail moment (TM) and Olive TM (OTM).

#### MN test

The MN test will be performed on BM cells from the children. For this purpose, the BM scraped cells suspension will be used to prepare the slides according to Thomas *et al.*<sup>66</sup> The slides will be stained in light green using the Feulgen method. The dried slides will be mounted with Eukitt and sent to a single laboratory for microscopic analysis. For microscope analysis, the slides will be examined under microscope at 400× magnification. According to proposed scoring criteria,<sup>66 67</sup> before MN frequency calculation, BM cells will be gathered into categories (ie, 'normal' or 'abnormal') on the basis of cytological and nuclear features indicating DNA damage, cytotoxic failure or cell death. MN frequency will be then assessed by two well-trained operators in at least 2000 normal cells per participant.

#### Risk analysis based on environmental data

A quantitative estimate of carcinogenic risk will be produced using some risk analysis models, which are based on standard air pollution parameters (PM10, NOx and others) routinely collected by local authorities, and the parameters investigated in this study (PM0.5 content of PAHs and nitro-PAHs). For carcinogenic substances, the risk (R) represents the probability of a rise, with respect to the usual conditions of life, in the number of cases of cancer in a person's lifetime caused by exposure to the substance. The risk analysis will be conducted in

accordance with the RBCA (Risk-Based Corrective Action) procedure proposed by the American Society for Testing and Materials (ASTM) and will lead to an estimate of the carcinogenic risk (R) of exposure to polluted air. Afterwards, the model performance in predicting early biological effects in children will be evaluated by comparing the estimates produced by the risk analysis models based on environmental data ('expected') and the actual level of biological effect detected in the children ('observed').

#### Statistical analysis and construction of a global risk model

The associations between levels of air pollutants, PM mutagenicity/genotoxicity and early effect biomarkers will be investigated using various types of regression models. Questionnaire data will also be analysed, including both demographic and socioeconomic variables and indoor and outdoor exposure variables. Univariate and multivariate analyses will be performed, considering all the variables of interest and confounding factors. Intraindividual variability of early effect biomarkers will be assessed by comparing the results observed in two samples taken from 200 children in two consecutive winter seasons. A comparison of the results of early effect biomarker tests will be performed between winter and summer seasons, among all towns and between those at higher (Brescia and Turin together) and lower (all the others) levels of PM10 in winter, using the common statistical techniques for the analysis of continuous variables, according to their distribution. The role of interaction factors will be assessed using both stratified analysis and statistical models. The associations between the standard (PM10, NOx, etc) and investigated (PM0.5 content of PAHs and nitro-PAHs) parameters of air pollution and early effect biomarkers will be determined in order to evaluate the air pollution parameters as predictors of biological effect on children. Then a tentative model for calculating the global absolute risk of having early biological effects for air pollution and other variables together (demographic and socioeconomic factors, indoor exposures, physical activity, diet, BMI and others) will be proposed.

#### ETHICS AND DISSEMINATION

Participation in the study will be voluntary. Informed consent will be obtained from the children's parents and the children themselves, after an adequate and understandable explanation of the intent of the study, of the possible results and their meaning. Only children with parents' informed consent signed and a complete questionnaire will undergo biological sampling. All the data collected will be treated confidentially in accordance with current Italian legislation on the treatment of sensitive data (privacy law).

An alphanumeric code (6 letter) will be randomly generated to identify both biological samples and questionnaires. In addition to the alphanumeric code, the



questionnaires will include the child's name in order to enroll only the children whose parents decide to participate in the research and return a written signed consent. Then this section with the child's name will be separated from the rest of the questionnaire and will be kept apart in a closed archive. Only the research staff will be allowed to see the children's personal data.

All data will be analysed in an aggregate and anonymous way for the preparation of scientific reports in which the children will be not identifiable in any way.

Communication and dissemination activities are key issues for achieving the main objective of the MAPEC project. For successful dissemination of study results, multiple target audiences will be identified, each of them needs to be addressed in a different manner, using different media and with different messages. The key message to be conveyed by MAPEC will be indications for addressing individual interventions and community policies to protect children from the health effects of air pollutants. A dissemination plan will be designed taking into account the specific language of interest and communication channel of possible stakeholders: health authorities, scientific community, teachers, children, parents, etc.

Scientific meetings and workshops will be periodically organised to show preliminary and final results, which will be presented at national and international conferences and then published in scientific journals. Also community, environmental and health authorities will be involved. MAPEC participatory integrated assessment is an object-oriented approach with the strong engagement of local, national and European Union stakeholders. Furthermore, the results will be communicated to Public Health Agencies, and to the Mayor of each town for supporting health policy decisions. Annual meetings will be organised with representatives of national public health institutions and we will organise an international workshop at the end of the project.

Finally, the general public will be involved. Presentation of the project objectives, information and results will need to be tailored to a public or non-scientific audience in order to ensure effective communication. Lay science articles in local and national newspapers will be produced with the aim to reach out to and create a bridge between scientific and public audiences. Press conferences will be organised with local and national mass media to present the project before all workshops. Moreover, a MAPEC newsletter will be developed and distributed to different stakeholders and a project website will be developed.

Local Public Health Authorities and teachers will be involved in developing information and educational packages, containing lesson plans, enrichment activities and ideas for encouraging students to adopt healthy lifestyles, which can be used by other schools throughout the country.

#### Author affiliations

<sup>1</sup>Department of Medical and Surgical Specialties, Radiological Science and Public Health, University of Brescia, Brescia, Italy

<sup>2</sup>Department of Biological and Environmental Science and Technology, University of Salento, Lecce, Italy

<sup>3</sup>Department of Pharmaceutical Sciences, University of Perugia, Perugia, Italy

<sup>4</sup>Department of Biology, University of Pisa, Pisa, Italy

<sup>5</sup>Department of Public Health and Pediatrics, University of Torino, Torino, Italy

<sup>6</sup>Comune di Brescia, Brescia, Italy

<sup>7</sup>Centro Servizi Multisetoriale e Tecnologico—CSMT Gestione S.c.a.r.l., Brescia, Italy

<sup>8</sup>Department of Translational Research, N.T.M.S., University of Pisa, Pisa, Italy

<sup>9</sup>Department of Clinical and Experimental Sciences, University of Brescia, Brescia, Italy

<sup>10</sup>Department of Economics, University of Brescia, Brescia, Italy

**Collaborators** Components of the MAPEC\_LIFE Study Group: Sara Compiani, Francesco Donato, Andrea Festa, Gaia Claudia Viviana Viola, Ilaria Zerbini, Department of Medical and Surgical Specialties, Radiological Science and Public Health, University of Brescia, 11 Viale Europa, 25123 Brescia, Italy; Marcello Guido, Adele Idolo, Francesca Serio, Maria Rosaria Tumolo, Tiziano Verri, Department of Biological and Environmental Science and Technology, University of Salento, 165 Via Provinciale Lecce-Monteroni, 73100 Lecce, Italy; Luca Dominici, Cristina Fatigoni, Sara Levorato, Manola Peverini, Samuele Vannini, Department of Pharmaceutical Sciences, University of Perugia, Via del Giochetto, 06122 Perugia, Italy; Beatrice Bruni, Elisa Caponi, Gabriele Donzelli, Department of Biology, University of Pisa, 13 Via Ghini, 56126 Pisa, Italy; Giorgio Gilli, Cristina Pignata, Department of Public Health and Pediatrics, University of Torino, 94 Piazza Polonia, 10126 Torino, Italy; Silvia Bonizzoni, Camilla Furia, Comune di Brescia, 1 Piazza Repubblica, 25100 Brescia, Italy; Francesco Braga, Roberta Codenotti, Paolo Colombi, Daniela Lini, Evelyn Mario, Centro Servizi Multisetoriale e Tecnologico—CSMT Gestione S.c.a.r.l., 45 Via Branze, 25123 Brescia, Italy;

**Contributors** All the authors contributed to this work and have taken part in the academic discussion for writing the study protocol, drafting the article and revising it. They have all approved the final version. DF, EC and UG gave substantial contributions to conception and design, acquisition of data, or analysis and interpretation of data; ADD, AC, MRM, AB, SM and EC have drafted the article or revised it critically for important intellectual content; MM, SB, LC, FB, MVi, MVe, TS, RML, TG, BC, CZ, GM and RL gave final approval of the version to be published.

**Funding** This work has been funded by the European Commission Directorate General Environment in the LIFE+ programme for 2012, Environment Policy and Governance (grant number: LIFE12 ENV/IT/000614).

**Competing interests** None.

**Ethics approval** The project has been approved by the local Ethics Committee (Comitato Etico Provinciale della Provincia di Brescia) on 15 January 2014 and the local Health Authorities of each town involved in the study..

**Provenance and peer review** Not commissioned; peer reviewed for ethical and funding approval prior to submission.

**Open Access** This is an Open Access article distributed in accordance with the Creative Commons Attribution Non Commercial (CC BY-NC 4.0) license, which permits others to distribute, remix, adapt, build upon this work non-commercially, and license their derivative works on different terms, provided the original work is properly cited and the use is non-commercial. See: <http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>

#### REFERENCES

1. EEA. *Air quality in Europe—2013 report*. European Environment Agency, 2013.
2. WHO. *Particulate matter air pollution: how it harms health*. World Health Organisation, 2005.
3. Anderson JO, Thundiyil JG, Stolbach A. Clearing the air: a review of the effects of particulate matter air pollution on human health. *J Med Toxicol* 2012;8:166–75.
4. Raaschou-Nielsen O, Andersen ZJ, Beelen R, *et al*. Air pollution and lung cancer incidence in 17 European cohorts: prospective analyses from the European Study of Cohorts for Air Pollution Effects (ESCAPE). *Lancet Oncol* 2013;14:813–22.

5. Shah ASV, Langrish JP, Nair H, *et al.* Global association of air pollution and heart failure: a systematic review and meta-analysis. *Lancet* 2013;382:1039–48.
6. Silva RA, West JJ, Zhang Y, *et al.* Global premature mortality due to anthropogenic outdoor air pollution and the contribution of past climate change. *Environ Res Lett* 2013;8:034005.
7. WHO. *Review of evidence on health aspects of air pollution—REVIHAAP Project. First results.* WHO Regional Office for Europe, World Health Organisation, 2013.
8. Beelen R, Raaschou-Nielsen O, Stafoggia M, *et al.* Effects of long-term exposure to air pollution on natural-cause mortality: an analysis of 22 European cohorts within the multicentre ESCAPE project. *Lancet* 2014;383:785–95.
9. Cesaroni G, Forastiere F, Stafoggia M, *et al.* Long term exposure to ambient air pollution and incidence of acute coronary events: prospective cohort study and meta-analysis in 11 European cohorts from the ESCAPE Project. *BMJ* 2014;348:f7412.
10. Puett RC, Hart JE, Schwartz J, *et al.* Are particulate matter exposures associated with risk of type 2 diabetes? *Environ Health Perspect* 2011;119:384–9.
11. Sørensen M, Autrup H, Møller P, *et al.* Linking exposure to environmental pollutants with biological effects. *Mutat Res* 2003;544:255–71.
12. Lewtas J. Air pollution combustion emissions: characterization of causative agents and mechanisms associated with cancer, reproductive, and cardiovascular effects. *Mutat Res* 2007;636:95–133.
13. Bonetta S, Gianotti V, Bonetta S, *et al.* DNA damage in A549 cells exposed to different extracts of PM2.5 from industrial, urban and highway sites. *Chemosphere* 2009;77:1030–4.
14. Claxton LD, Woodall GM Jr. A review of the mutagenicity and rodent carcinogenicity of ambient air. *Mutat Res* 2007;636:36–94.
15. Møller P, Folkmann JK, Forchhammer L, *et al.* Air pollution, oxidative damage to DNA, and carcinogenesis. *Cancer Lett* 2008;266:84–97.
16. Monarca S, Crebelli R, Feretti D, *et al.* Mutagens and carcinogens in size-classified air particulates of a northern Italian town. *Sci Total Environ* 1997;205:137–44.
17. Monarca S, Feretti D, Zanardini A, *et al.* Monitoring of mutagens in urban air samples. *Mutat Res* 1999;426:189–92.
18. Claxton LD, Matthews PP, Warren SH. The genotoxicity of ambient outdoor air, a review: Salmonella mutagenicity. *Mutat Res* 2004;567:347–99.
19. Coronas MV, Pereira TS, Rocha JA, *et al.* Genetic biomonitoring of an urban population exposed to mutagenic airborne pollutants. *Environ Int* 2009;35:1023–9.
20. Traversi D, Degan R, De Marco R, *et al.* Mutagenic properties of PM2.5 urban pollution in the northern Italy: the nitro-compounds contribution. *Environ Int* 2009;35:905–10.
21. de Brito KC, de Lemos CT, Rocha JA, *et al.* Comparative genotoxicity of airborne particulate matter (PM2.5) using Salmonella, plants and mammalian cells. *Ecotoxicol Environ Saf* 2013;94:14–20.
22. de Rainho CR, Machado Corrêa S, Mazzei JL, *et al.* Genotoxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons and nitro-derived in respirable airborne particulate matter collected from urban areas of Rio de Janeiro (Brazil). *Biomed Res Int* 2013;7:65352.
23. WHO. *Air quality guidelines. Global update 2005. Particulate matter, ozone, nitrogen dioxide and sulfur dioxide.* Copenhagen, Denmark: World Health Organization, Regional Office for Europe, 2006.
24. Carpenter DO, Arcaro K, Spink DC. Understanding the human health effects of chemical mixtures. *Environ Health Perspect* 2002;110:25–42.
25. Bonassi S, Znaor A, Norppa H, *et al.* Chromosomal aberrations and risk of cancer in humans: an epidemiologic perspective. *Cytogenet Genome Res* 2004;104:376–82.
26. Bonassi S, Znaor A, Ceppi M, *et al.* An increased micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes predicts the risk of cancer in humans. *Carcinogenesis* 2007;28:625–31.
27. Bonassi S, El-Zein R, Bolognesi C, *et al.* Micronuclei frequency in peripheral blood lymphocytes and cancer risk: evidence from human studies. *Mutagenesis* 2011;26:93–100.
28. Neri M, Fucic A, Knudsen LE, *et al.* Micronuclei frequency in children exposed to environmental mutagens: a review. *Mutat Res* 2003;544:243–54.
29. Neri M, Bonassi S, Knudsen LE, *et al.* Children's exposure to environmental pollutants and biomarkers of genetic damage. I. Overview and critical issues. *Mutat Res* 2006;612:1–13.
30. Neri M, Ugolini D, Bonassi S, *et al.* Children's exposure to environmental pollutants and biomarkers of genetic damage. II. Results of a comprehensive literature search and meta-analysis. *Mutat Res* 2006;612:14–39.
31. Holland N, Fucic A, Merlo DF, *et al.* Micronuclei in neonates and children: effects of environmental, genetic, demographic and disease variables. *Mutagenesis* 2011;26:51–6.
32. Lahiri T, Roy S, Basu C, *et al.* Air pollution in Calcutta elicits adverse pulmonary reaction in children. *Indian J Med Res* 2000;112:21–6.
33. Montero R, Serrano L, Dávila V, *et al.* Metabolic polymorphisms and the micronucleus frequency in buccal epithelium of adolescents living in an urban environment. *Environ Mol Mutagen* 2003;42:216–22.
34. Chen C, Arjomandi M, Qin H, *et al.* Cytogenetic damage in buccal epithelia and peripheral lymphocytes of young healthy individuals exposed to ozone. *Mutagenesis* 2006;21:131–7.
35. Huen K, Gunn L, Duramad P, *et al.* Application of a geographic information system to explore associations between air pollution and micronucleus frequencies in African American children and adults. *Environ Mol Mutagen* 2006;47:236–46.
36. Sisenando HA, Batistuzzo de Medeiros SR, Artaxo P, *et al.* Micronucleus frequency in children exposed to biomass burning in the Brazilian Legal Amazon region: a control case study. *BMC Oral Health* 2012;12:6.
37. Ceretti E, Feretti D, Viola GCV, *et al.* DNA damage in buccal mucosa cells of pre-school children exposed to high levels of urban air pollutants. *PLoS ONE* 2014;9:e96524.
38. Landrigan PJ, Kimmel CA, Correa A, *et al.* Children's health and the environment: public health issues and challenges for risk assessment. *Environ Health Perspect* 2004;112:257–65.
39. WHO. *Effects of air pollution on children's health and development.* Copenhagen, Denmark: World Health Organization Regional Office for Europe, 2005.
40. WHO. *Children's health and the environment in Europe: a baseline assessment.* Copenhagen, Denmark: World Health Organization Regional Office for Europe, 2007.
41. Bateson TF, Schwartz J. Children's response to air pollutants. *J Toxicol Environ Health A* 2008;71:238–43.
42. Grigg J. Particulate matter exposure in children: relevance to chronic obstructive pulmonary disease. *Proc Am Thorac Soc* 2009;6:564–9.
43. ERS. *Air quality and health.* Lausanne, Switzerland: European Respiratory Society, 2010.
44. Wild CP, Kleinjans J. Children and increased susceptibility to environmental carcinogens: evidence or empathy? *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2003;2:1389–94.
45. Kirsch-Volders M, Plas G, Elhajouji A, *et al.* The in vitro MN assay in 2011: origin and fate, biological significance, protocols, high throughput methodologies and toxicological relevance. *Arch Toxicol* 2011;85:873–99.
46. Fairbairn DW, Olive PL, O'Neill KL, *et al.* The Comet assay: a comprehensive review. *Mutat Res* 1995;339:37–59.
47. Burlinson B, Tice RR, Speit G, *et al.* Fourth International Workgroup on Genotoxicity testing: results of the in vivo comet assay workshop. *Mutat Res* 2007;627:31–5.
48. Collins AR, Oscoz AA, Brunborg G, *et al.* The comet assay: topical issues. *Mutagenesis* 2008;23:143–51.
49. Dhawan A, Anderson D. *The comet assay in toxicology.* RSC Publishing, 2009.
50. ISPRA. *Stato dell'Ambiente 45/13. Qualità dell'ambiente urbano.* IX Rapporto. Roma: Istituto Superiore per la Protezione e la Ricerca Ambientale, 2013.
51. Migliore E, Berti G, Galassi C, *et al.* Respiratory symptoms in children living near busy roads and their relationship to vehicular traffic: results of an Italian multicentre study (SIDRIA 2). *BMC Environ Health* 2009;8:27.
52. Maron DM, Ames BN. Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. *Mutat Res* 1983;113:173–215.
53. APHA. *Standard method for the examination of water and wastewater.* 20th edn. Washington DC: American Public Health Association/American Water Works Association/Water Environmental Federation, 1998.
54. Watanabe M, Sofuni T, Nohmi T. Comparison of sensitivity of Salmonella typhimurium strains YG1024 and YG1012 for detecting the mutagenicity of aromatic amines and nitroarenes. *Mutat Res* 1993;301:7–12.
55. Singh NP, McCoy MT, Tice RR, *et al.* A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res* 1988;175:184–91.
56. Collins AR, Duthie SJ, Dobson VL. Direct enzymic detection of endogenous oxidative base damage in human lymphocyte DNA. *Carcinogenesis* 1993;14:1733–735.
57. Fenech M. The in vitro micronucleus technique. *Mutat Res* 200;455:81–95.



58. Bernard-Beaubois K, Hecquet C, Hayem G, *et al*. In vitro study of cytotoxicity of quinolones on rabbit tenocytes. *Cell Biol Toxicol* 1988;14:283–92.
59. Borenfreud E, Puerner JA. A simple quantitative procedure using monolayer cultures for cytotoxicity assays (HTD/NR-90). *J Tissue Cult Methods* 1984;9:7–9.
60. El-Fouly MH, Trosko JE, Chang CC. Scrape-loading and dye transfer. A rapid and simple technique to study gap junctional intercellular communication. *Exp Cell Res* 1987;168:422–30.
61. Mazzoleni G, Telò P, Camplani A, *et al*. Influence of the herbicide Linuron on growth rate and gap-junctional intercellular communication of cultured endothelial cells. *J Environ Pathol Toxicol Oncol* 1994;13:1–10.
62. Swierenga SH, Yamasaki H. Performance of tests for cell transformation and gap-junction intercellular communication for detecting non-genotoxic carcinogenic activity. In: *Mechanism of Carcinogenesis in Risk Identification*. IARC Scientific Publications No. 116. Lyon: International Agency for Research on Cancer, 1992:165–193.
63. Mazzoleni G, Camplani A, Telò P, *et al*. Effect of tumor-promoting and anti-promoting chemicals on the viability and junctional coupling of human HeLa cells transfected with DNAs coding for various murine connexin proteins. *Comp Biochem Physiol C Pharmacol Toxicol Endocrinol* 1996;113:247–56.
64. Bruzzone R, White TW, Paul DL. Connections with connexins: the molecular basis of direct intercellular signaling. *Eur J Biochem* 1996;38:1–27.
65. Osswald K, Mittas A, Gleis M, *et al*. New revival of an old biomarker: characterisation of buccal cells and determination of genetic damage in the isolated fraction of viable leucocytes. *Mutat Res* 2003;544:321–9.
66. Thomas P, Holland N, Bolognesi C, *et al*. Buccal micronucleus cytome assay. *Nat Protoc* 2009;4:825–37.
67. Tolbert PE, Shy CM, Allen JW. Micronuclei and other nuclear anomalies in buccal smears: methods development. *Mutat Res* 1992;271:69–77.

**BMJ Open**

# Monitoring air pollution effects on children for supporting public health policy: the protocol of the prospective cohort MAPEC study

D Feretti, E Ceretti, A De Donno, et al.

*BMJ Open* 2014 4:

doi: [10.1136/bmjopen-2014-006096](https://doi.org/10.1136/bmjopen-2014-006096)

---

Updated information and services can be found at:

<http://bmjopen.bmj.com/content/4/9/e006096.full.html>

---

*These include:*

**References**

This article cites 54 articles, 6 of which can be accessed free at:

<http://bmjopen.bmj.com/content/4/9/e006096.full.html#ref-list-1>

**Open Access**

This is an Open Access article distributed in accordance with the Creative Commons Attribution Non Commercial (CC BY-NC 4.0) license, which permits others to distribute, remix, adapt, build upon this work non-commercially, and license their derivative works on different terms, provided the original work is properly cited and the use is non-commercial. See: <http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>

**Email alerting service**

Receive free email alerts when new articles cite this article. Sign up in the box at the top right corner of the online article.

---

**Topic Collections**

Articles on similar topics can be found in the following collections

[Epidemiology](#) (813 articles)

[Public health](#) (768 articles)

---

**Notes**

---

To request permissions go to:

<http://group.bmj.com/group/rights-licensing/permissions>

To order reprints go to:

<http://journals.bmj.com/cgi/reprintform>

To subscribe to BMJ go to:

<http://group.bmj.com/subscribe/>

**Allegato 3.** Studio di fattibilità e ripetibilità del questionario creato per il progetto MAPEC\_LIFE e pubblicato sulla rivista “Annali di Igiene” (Zani et al., 2015).



## 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

C. Zani<sup>1</sup>, F. Donato<sup>1</sup>, S. Grioni<sup>2</sup>, G.C.V. Viola<sup>1</sup>, E. Ceretti<sup>1</sup>, D. Feretti<sup>1</sup>, A. Festa<sup>1</sup>, S. Bonizzoni<sup>3</sup>, A. Bonetti<sup>4</sup>, S. Monarca<sup>5</sup>, M. Villarini<sup>5</sup>, S. Levorato<sup>5</sup>, A. Carducci<sup>6</sup>, M. Verani<sup>6</sup>, B. Casini<sup>6</sup>, A. De Donno<sup>7</sup>, T. Grassi<sup>7</sup>, A. Idolo<sup>7</sup>, E. Carraro<sup>8</sup>, G. Gilli<sup>8</sup>, S. Bonetta<sup>8</sup>, U. Gelatti<sup>1</sup> and MAPEC-LIFE study group

*Key words:* Food-frequency questionnaire, repeatability, reliability, children

*Parole chiave:* Questionario sui consumi alimentari, ripetibilità, affidabilità, bambini

### Abstract

**Introduction:** The MAPEC-Life project aims to study the biological effects of early exposure to air pollutants on the oral mucosa cells of school-age children in five Italian cities. A questionnaire was created to evaluate the association between outdoor and indoor airborne pollutants, lifestyle, diet and biomarker effects. The feasibility and reliability of the questionnaire were evaluated.

**Methods:** A questionnaire was drawn up to be filled in by the parents of 6-8-year-old children. It consisted of 148 questions on the children's health, physical activity, environmental exposures and the frequency of food consumption at the main meals.

First we conducted a questionnaire feasibility study involving 53 volunteer parents. We then performed a reliability study by administering the questionnaire to a further 156 parents and again one month later (test/retest method).

The correlations between answers at the first and second administration of the questionnaire were evaluated using the Kappa statistic and Spearman's coefficient.

<sup>1</sup> Department of Medical and Surgical Specialities, Radiological Sciences and Public Health, University of Brescia, Brescia, Italy

<sup>2</sup> IRCCS Foundation, National Cancer Institute, Milan, Italy

<sup>3</sup> Municipality of Brescia, Italy

<sup>4</sup> Centro Servizi Multisetoriale e Tecnologico—CSMT Gestione S.c.a.r.l., Brescia, Italy

<sup>5</sup> Department of Pharmaceutical Sciences, University of Perugia, Perugia, Italy

<sup>6</sup> Department of Biology, University of Pisa, Pisa, Italy

<sup>7</sup> Department of Biological and Environmental Science and Technology, University of Salento, Lecce, Italy

<sup>8</sup> Department of Public Health and Pediatrics, University of Turin, Turin, Italy

#### MAPEC\_LIFE Study Group:

University of Brescia, Italy: L. Covolo, R. Levaggi, R.M. Limina, G. Mazzoleni, I. Zerbini

Municipality of Brescia, Italy: C. Furia, M.R. Marrese

CSMT Gestione S.c.a.r.l., Italy: P. Colombi, E. Mario, F. Braga

University of Perugia, Italy: C. Fatigoni, M. Moretti, S. Vannini

University of Pisa, Italy: B. Bruni, E. Caponi, G. Donzelli

University of Salento, Italy: F. Bagordo, M. Guido, G. Devoti, M.R. Tumolo, F. Serio

University of Turin, Italy: S. Bonetta, V. Romanazzi, C. Pignata, T. Schilirò

**Results:** After verifying the feasibility of the questionnaire, we conducted a reliability analysis on 132 completed questionnaires. The percentage of agreement between the first and the second responses given was over 70%, all *K* values being greater than 0.6. The analysis of calories and macronutrients also showed good agreement.

**Conclusions:** The questionnaire drawn up for the study proved to be sufficiently reliable for gathering information about the factors of interest in our study of the relationship between air pollution and early biological effects in children.

## Introduction

The MAPEC-Life project (Monitoring Air Pollution Effects on Children for Supporting Public Health Policy), which is funded by the European Commission as part of the LIFE+ Program, the EU environment fund, consists of a multicentre cohort study. The study protocol is reported in Feretti et al. (1) and is outlined below. The study lasts for three years, the aim being to evaluate the association between the levels of some air pollutants, such as PM10 and PM0.5, nitrogen oxides, polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and nitro PAH, and early biological effects in buccal cells of children aged 6-8 years. To this end 1000 children will be recruited in 5 Italian towns with different air pollution levels (Brescia, Lecce, Perugia, Pisa and Turin). The environmental and biological samples will be collected in two different seasons (winter and late spring) to allow a better evaluation of seasonal differences in pollution.

Early biological damage to leukocytes of biological samples will be evaluated using the Comet assay (2). Micronuclei frequency will be evaluated in buccal mucosa cells (3). These tests provide data on early genotoxic damage and have been used, *in vivo* and *in vitro*, in various occupational and biomonitoring population studies (2-5).

It is common knowledge that an evaluation of the biological effects of outdoor pollutants requires other sources of exposure, such as secondary smoke and the use of fireplaces and wood stoves in the domestic environment, to be taken into account. Diet also appears

to modulate the organism's response to environmental pollution (2-5). Several studies have shown that diet can influence the response to the biological effects of different biomarkers, such as micronuclei in different cells (6-11).

Bonassi et al. showed that the mean frequency of micronuclei in buccal mucosa cells of subjects with a mean age of  $35.5 \pm 7.7$  years who ate fruit and leafy green vegetables daily was lower than in subjects that did not eat fruit or vegetables (11). One recent study found an inverse correlation between micronuclei frequency in lymphocytes and mucosa cells and the intake of vitamins with redox activity (12).

As far as we know there are no standardized questionnaires for collecting data about air pollution exposures and diet in primary school children enrolled in the MAPEC-Life study, so we created an *ad hoc* questionnaire to evaluate the association between (outdoor and indoor) environmental exposures and other environmental parameters.

The aim of this study was to examine the feasibility and reliability of the questionnaire developed to evaluate exposure to indoor and outdoor air pollutants, diet and physical activity in 6-8-year-old children.

## Methods

### *Creation of the questionnaire*

We created a self-administered questionnaire to be filled in by the parents of the children enrolled in the study. It was designed to include items on demographic

and socio-economic variables, and exposures to indoor and outdoor sources of air pollution, and it was based on a questionnaire used in a previous study performed in Brescia on pre-school children (aged 3-5 years) to evaluate their exposure to air pollution and early biological effects (13).

The first section of the questionnaire listed the study exclusion criteria: residence in a town not included in the study, children not in the age range 6-8 years, serious diseases such as tumours and some genetic diseases, consumption of certain drugs, undergoing radiography during the preceding month and use of orthodontic devices. The child was excluded from the study if a positive response was given to one or more of the questions.

The questionnaire was divided into 6 sections: personal details, characteristics of the home (e.g. traffic situation, heating systems, fireplace and/or wood); traffic near the school, the child's general health, physical activity and other aspects of their lifestyle; second-hand smoke exposure at home; parents' characteristics (education, work, smoking habit) and diet.

The diet section was based on the questionnaire used in the ARCA (Italian acronym: diet in the Campania region) project, which studied the diet and anthropometric index of children aged 5-10 years in Campania (14).

The ARCA questionnaire collected consumption frequencies for different foods and required respondents to rate the amount of each food consumed in one of three categories ("more than", "equal to" or "less than" the standard portion for an adult).

The amount of food consumed was not considered relevant for the purpose of the MAPEC-Life study, so questions on this matter were not included. The section only contained questions on the average frequency of food consumption in a specific season (winter or late spring, corresponding to the biological sampling

periods) (1), the cooking method and the condiments used.

Foods were divided into the following groups: bread; pasta and cereals; pulses; vegetables; fruit; meat; fish; milk and dairy products; desserts and cakes; non-alcoholic beverages and sugar. There was also a short section on the type of fat (butter, olive oil, seed oil, margarine) used for preparing, cooking and dressing the food.

For each item respondents could choose between 7 different categories of consumption frequency, ranging from "1 or 2 times a day" to "less than once a week", and a "never" option was also included. Nine categories for drinks (other than water) were included, since it was assumed that several doses a day could be consumed.

The questions on food consumption frequencies considered all the children's meals throughout the day, those consumed both at home and out, in the school canteen for instance, and refer to the corresponding biological sampling season.

#### *Data analysis*

First, a questionnaire feasibility study was conducted. The questionnaire was administered to an opportunity sample of parents of children aged 6-8 years enrolled in the 5 towns participating in the project. After compilation, the subjects were asked to indicate whether the questions were clear as to their content, whether they had any problems or doubts as to the answers, and whether any questions could be considered offensive or invaded their privacy. Lastly, they were asked to indicate the time taken to complete the questionnaire. A space was provided for respondents to leave comments and/or suggestions concerning the questionnaire. The data collected during this first phase underwent qualitative (descriptive) analysis only.

In order to assess the reliability of the questionnaire, we enrolled another opportunity sample of parents who had

not participated in the feasibility study and asked them to complete the questionnaire on two separate occasions, one month apart.

Agreement between the two interviews was assessed by computing Cohen's Kappa statistic (K) for dichotomous variables.

The data on food consumption frequency enabled us to calculate total energy load and diet composition in terms of micro and macro nutrients using NAF software developed by the Milan Cancer Institute's Unit of Nutritional Epidemiology. This programme allows you to convert consumption frequency into amounts of nutrients in the diet, given a standard amount of food consumed per serving.

We then evaluated the correlation of the two sets of responses, including those to questions on energy intake and macro and micronutrients, as continuous variables, using Spearman's rho coefficient (r) for ordinal or continuous variables.

## Results

### *Feasibility study*

The first section of the questionnaire consisted of 6 questions on the criteria for inclusion. This was followed by a section on personal details, 32 questions on the child's environmental exposures, health condition and physical activity, and 116 questions relating to diet.

The compiling parent could choose to fill in the questionnaire either on-line, by invitation, or on a printed form. All the questions had closed answers.

A feasibility study was conducted after creation of the questionnaire. Fifty-three subjects were enrolled in five cities: 45 subjects provided completed questionnaires; 8 subjects were excluded due to the presence of one or more exclusion criteria (n = 5) or to failure to complete the questionnaire (n = 3).

Table 1 shows the 5 closed questions posed at the end of the questionnaire to

Table 1 - Feasibility study.

Feasibility study's questions	Number	Percentage %
With regard to content, the questions were		
Clear	42	93.3
Not very clear	3	6.7
Not at all clear	0	0
Were there any questions you had difficulty answering?		
no	39	86.7
yes*	6	13.3
Were there any upsetting questions you would have preferred not to answer?		
no	44	97.8
yes*	1	2.2
Did you find the questionnaire particularly long to complete?		
no	33	73.3
yes	12	26.7
Time taken to complete the questionnaire		
<10 minutes	2	4.4
10-20 minutes	25	55.6
21-40 minutes	11	24.4
>40 minutes	7	15.6

\*If so, which questions?

assess their feasibility. In 93% of cases the questions were clear as to their content and 86% of the respondents said they had had no difficulty in answering. 55.6% of parents completed the questionnaire in 10-20 minutes and 24.4% in 21-40 minutes.

Three questions (out of 148) were reported as not being very clear. Therefore, based on the suggestions made, some minor revisions were made to the structure of these questions, some possible answers to the diet questions were expressed more clearly (Table 1) and the inclusion of specific foods under different items was clarified (e.g. it was specified that omelette had to be associated with the frequency of egg consumption).

Only one parent reported being offended by one of the questions, but it could not be changed as it concerned one of the exclusion criteria, namely the presence of genetic diseases in the children.

#### *Reliability study*

The second stage consisted of a questionnaire repeatability study, following the changes made as a result of the feasibility study. We enrolled 156 volunteer parents of children aged 6-8 years who met the inclusion criteria and had correctly completed the questionnaire the first time. Twenty-four of these subjects (15.4%) did not agree to complete the questionnaire re-administered one month later and were therefore excluded from the study. The analysis was therefore conducted on 132 completed questionnaires. Of the participating parents, 50.7% had male children ( $n = 67$ ) and 49.3% had female children ( $n = 65$ ). The majority of the parents were Italian, did not smoke and had at least a high school education (Table 2).

Table 3 shows the main questions in each section of the questionnaire, the percentage of agreement between the answers given the first and the second time, and the K value: agreement between the two interviews was generally high, above 70%, with a K value of over 0.6.

The agreement percentages were lower for responses concerning the frequency of consumption of various foods, probably due to the number of consumption frequency categories (seven) (Table 4). We computed an analysis of the responses regarding frequency of consumption by combining the categories and reducing them to 3 ("never," "sometimes," "every day"). The results showed higher agreement percentages and higher K values. For example, the consumption of breakfast cereals given in Table 4 shows 63.6% agreement between the answers the first and the second time, with a K value of 0.52. When the 7 categories of consumption were reduced to 3, the percentage of agreement increased to 77.2%, with a K value of 0.62, resulting from less data dispersion due to the presence of fewer answer options.

The analysis of calorie intake, carbohydrates and total lipids, and various macronutrients derived from the frequency reported in the responses showed a good agreement between the first and the second set of responses for each item, as shown in Table 5.

## **Discussion**

The aim of the work was, by means of a feasibility and a repeatability study, to create and evaluate a tool for collecting data to analyse the association between environmental (outdoor and indoor) exposures, nutrition and other variables and some early biological effects and to examine the role of these factors confounding the biological effects of air pollutants on children.

Feasibility and repeatability studies were performed on a group of volunteers with children aged 6-8 years recruited in five Italian cities involved in the MAPEC-Life study.

The group of volunteers who took part in

Table 2 - Demographic and socio-economic characteristics and smoking habits of the 132 parents enrolled.

Characteristics	Number	Percentage %
Children		
males	67	50.7
females	65	49.3
Children's age		
6 years	42	31.8
7 years	35	26.5
8 years	20	15.2
9 years	35	26.5
Mother's nationality		
Italian	128	97.0
foreign	4	3.0
Mother's education		
middle school	10	7.6
high school	41	31.0
university	81	61.4
Mother's occupational status		
employed	106	80.3
unemployed	11	8.3
housewife	15	11.4
Mother's smoking habit		
yes	12	9.1
no	120	90.9
Father's nationality		
Italian	119	90.2
foreign	13	9.8
Father's educational status		
primary school	2	1.5
middle school	28	21.4
high school	53	39.7
university	49	37.4
Father's occupational status		
employed	122	92.4
unemployed	4	3.0
retired	6	4.6
Father's smoking habit		
yes	26	19.8
no	104	80.2

Table 3 - Agreement percentages and K values for the answers given to the main questions administered one month apart.

	Agreement between the first and second responses (%)	K value
Home section		
How do you rate the car traffic near your home?	84.9	0.75
Is there truck traffic near your home?	79.5	0.57
School section		
How do you rate the car traffic near the school?	75.0	0.63
Is there truck traffic near the school?	79.5	0.62
Lifestyle section		
Does your child play sport three or more times a week?	89.4	0.78
How many hours a day does your child play outdoors?	59.0	0.26
Does your child stay indoors with people who smoke?	99.2	0.79
Does your child stay in the kitchen while you are cooking?	81.8	0.64
Total consumption of foods that may contain genotoxic substances (e.g. polycyclic aromatic hydrocarbons)	79.5	0.51
Does the mother smoke?	100	1.0
If yes, how many cigarettes a day?	100	1.0
Does the father smoke?	100	1.0
If yes, how many cigarettes a day?	98.4	0.94

the study differed from the Italian general population in terms of demographic and socio-economic characteristics, as can be seen in Table 1.

The average percentage of children born in Italy with at least one foreign parent is 19% (15), while the percentage of foreign fathers in our sample was 9.8%, and the proportion of foreign mothers considerably lower (3.0%). Overall, the percentage of children in our sample with at least one foreign parent (12.8%) was lower than the national average (15). The level of education for both mothers and fathers was well above the national average (61.4% vs 27.2% graduate mothers in our sample and 37.4% vs 17.7% for graduate fathers, respectively). Furthermore, a comparison with the data for Italian female employment (51%) revealed that a much higher percentage of mothers (80%) in our sample were in employment (15).

Lastly, the sample showed a lower

proportion of smokers (9% of mothers, 19.8% of fathers) compared to Italian percentages in the 35-45-year age bracket (24.5% of women, 35.4% of men) (15).

The collection of demographic data was necessary to allow a comparison with other Italian and international studies, such as the SIDRIA study, (acronym for "Italian studies on respiratory disorders of the child and the environment") and ISAAC - International Study on Asthma and Allergy in Children (16-17), which took demographic, socio-economic, family and lifestyle factors into account in their assessment of the relationship between respiratory diseases in children and air pollution.

The section on indoor and outdoor exposures in our questionnaire was based on other questionnaires widely used in similar projects, such as the SIDRIA-2 study (16). We also took into account the tool developed for a previous study conducted in Brescia on pre-school children aged 3-5 years, the purpose of

Table 4 - Percentages of agreement and K values of the answers on the frequency of consumption of the main food categories given in two questionnaires administered one month apart.

	Analysis of consumption in 7 categories (as appearing in the questionnaire)		Analysis of consumption in 3 categories ("never", "sometimes", "often")	
	Agreement between first and second answers	K value	Agreement between first and second answers	K value
	%		%	
Breakfast cereals	63.4	0.52	77.2	0.62
Pasta or rice	44.7	0.29	68.2	0.36
Pizza	68.9	0.44	96.2	0.27
Pulses	63.4	0.47	90.1	0.71
Lettuce and other salad items	56.8	0.43	78.8	0.60
Potatoes	62.8	0.40	94.7	0.60
Carrots	71.9	0.48	81.2	0.62
Oranges, tangerines, etc.	44.7	0.31	75.7	0.48
Apples and pears	51.2	0.38	78.9	0.51
Red meat	67.4	0.47	93.1	0.49
White meat	62.1	0.37	92.4	0.34
Sausages and cold cuts	63.6	0.42	85.6	0.49
Ham, mortadella, speck	62.1	0.44	87.1	0.51
Canned tuna	65.9	0.47	84.9	0.59
Fish fingers	74.2	0.60	87.8	0.71
Red snapper, sole, sea bream, sea bass, mullet, etc.	79.8	0.59	81.0	0.60
Eggs (including omelette)	75.0	0.54	99.2	0.91
Milk	75.0	0.58	84.5	0.73
Parmesan cheese	54.5	0.45	74.2	0.55
Yogurt	59.0	0.45	71.9	0.50
Biscuits	52.3	0.41	73.4	0.57
Buns and cakes	53.8	0.37	75.0	0.52
Packaged sweet snacks	76.5	0.55	76.5	0.55
Chocolate and chocolate-based snacks	46.2	0.30	76.5	0.43
Sweets	79.5	0.60	79.5	0.60
Chips and crisps	77.2	0.33	77.2	0.33
Fizzy drinks (e.g. coca cola)	68.2	0.55	84.8	0.65
Fruit juice	46.2	0.34	75.0	0.55
Do you use oil, butter or margarine in/with the following? *:				
Sauces and gravy	98.4	0.66	-	-
Baked food	93.9	0.65	-	-
Pan-cooked meat, fish and vegetables	98.1	0.37	-	-
Raw vegetables	99.4	-	-	-
Cooked vegetables	99.2	-	-	-
Homemade cakes and desserts	82.5	0.64	-	-

\* Consider your normal use of oil, butter or margarine for cooking various different foods. There are no consumption categories.



Table 5 - Comparison of calorie and macronutrient intake obtained from the frequency reported in the two responses to the questionnaire given one month apart.

	Mean $\pm$ SD first response	Mean $\pm$ SD second response	Spearman's r
Energy intake (kcal/day)	2396.1 $\pm$ 643.1	2337.6 $\pm$ 755.7	0.73
Protein (g/day)	78.5 $\pm$ 21.9	77.3 $\pm$ 28.0	0.75
Sugar (g/day)	125.9 $\pm$ 51.8	120.4 $\pm$ 57.6	0.77
Total carbohydrates (g/day)	335.6 $\pm$ 99.6	323.7 $\pm$ 101.4	0.67
Total lipids (g/day)	95.5 $\pm$ 31.7	94.5 $\pm$ 39.7	0.70
Saturated fatty acids (g/day)	30.2 $\pm$ 10.2	30.5 $\pm$ 14.8	0.75
Fibre (g/day)	23.2 $\pm$ 9.5	21.8 $\pm$ 8.6	0.66
Water (ml/day)	1248.9 $\pm$ 487.0	1184.6 $\pm$ 467.3	0.76

which was to assess the association between air pollution and biological damage in oral mucosa cells (13).

As far as we know, standard questionnaires investigating the food consumption and dietary habits for children our age range (6-8 years) aren't currently available. Numerous studies have investigated the eating habits of children and adolescents, but for purposes other than those of the MAPEC-Life study; the information was normally used to evaluate some specific outcomes strongly correlated with food, such as obesity (14, 18).

In the MAPEC-Life study, food consumption in children has been studied as a possible confounding factor in the body's response to an environmental insult. For this reason, the final analysis considered both specific foods and food groups with a potentially genotoxic effect, such as grilled products, due to the possible presence of polycyclic aromatic hydrocarbons produced during cooking. Some studies have highlighted the protective role of the diet, especially certain nutrients and dietary supplements, in countering the biological effects of oxidative stress induced by exposure to air pollution (19-22).

The results of the feasibility study showed that the respondents found the questions clear, unambiguous and not offensive. Compilation times were also acceptable, about 85% of the subjects taking less than

40 minutes to answer all the questions.

The feasibility study showed an overall high level of comprehension of the questions and acceptable answer options.

The results of the repeatability study showed that all the responses had an acceptable level of repeatability, with high percentages of agreement for most of them.

In the diet questionnaire, the presence of numerous response categories regarding the frequency of food consumption led to a dispersion of the responses, and hence a reduction in the degree of agreement. When we reduced consumption to just three categories ("never", "sometimes", "every day"), the agreement between the responses, as shown by the higher K values, was satisfactory.

The results of our repeatability study are in line with those obtained recently by other food questionnaires (23-25).

The calculation of the amount of intake by food category, considering a standard serving, was also essentially in agreement with data from a national study conducted on children of the same age as those taken into account in this study (26).

The main limitation of the questionnaire is related to the lack of measures of validity. In a validation study, the questionnaire needs to be compared with a reference (gold standard). The validation of food

questionnaires would ideally require other means of measurement, such as a food diary or 24h recall questionnaire, but this would have taken up more time and resources than justified by the main objective of the MAPEC-Life project, namely to evaluate the association between the levels of the main environmental pollutants and some markers of early biological effects in oral mucosa cells of children.

A further consideration is that the good agreement between the two sets of responses given was due to remembering the answers given the first time round. This seems unlikely, however, given the large number of questions and the one-month interval between the first and the second administration. The good agreement obtained from the calculation of energy intake, which does not necessarily depend on the frequencies of consumption of the various foods, backs up the results of the reliability study.

## Conclusions

In conclusion, we believe that the questionnaire created for the study is a useful tool for collecting data on possible confounding factors in the evaluation of the relationship between air pollution and early biological effects in children.

## Riassunto

**Fattibilità e ripetibilità di un questionario per la valutazione dell'esposizione ad inquinanti aerei outdoor e indoor, alimentazione e attività fisica in bambini di 6-8 anni**

**Introduzione:** Il progetto MAPEC-Life si propone di studiare gli effetti biologici precoci da esposizione ad inquinanti atmosferici sulle cellule della mucosa orale di bambini in età scolare in 5 città italiane. Per valutare l'associazione tra esposizioni ad inquinanti aerodispersi, outdoor e indoor, stili di vita, abitudini alimentari e alcuni biomarcatori di effetto è stato costruito un questionario *ad hoc* e ne è stata valutata la fattibilità e l'affidabilità.

**Metodi:** Il questionario autocompilato dai genitori dei bambini comprende 148 domande riguardanti la salute, l'attività fisica dei bambini, le esposizioni ambientali e la frequenza di consumo degli alimenti nei principali pasti della giornata.

È stato *in primis* effettuato uno studio di fattibilità del questionario su 53 genitori volontari; successivamente è stato condotto uno studio di ripetibilità con doppia compilazione del questionario (tecnica del test re-test) a distanza di un mese su 156 soggetti. La concordanza delle risposte date alla 1a ed alla 2a somministrazione è stata valutata con la statistica Kappa e il coefficiente di Spearman.

**Risultati:** La fattibilità del questionario è risultata soddisfacente. L'analisi della ripetibilità è stata condotta su 132 questionari completi. La percentuale di accordo tra le risposte fornite nel 1° e nel 2° questionario è risultata mediamente maggiore al 70%, con kappa superiore a 0.6.

**Conclusioni:** Il questionario preparato è risultato fattibile ed affidabile per la raccolta di informazioni riguardanti diversi fattori di interesse nello studio della relazione tra inquinamento atmosferico ed effetti biologici precoci nei bambini.

Progetto finanziato dal Programma LIFE+2012 Environment Policy and Governance. LIFE12 ENV/IT/000614

## References

1. Feretti D, Ceretti E, De Donno A, 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**: e006096.
2. Szeto YT, Benzie IF, Collins AR, et al. A buccal cell model comet assay: Development and evaluation for human biomonitoring and nutritional studies. *Mutat Res* 2005; **578**(1-2): 371-81.
3. Holland N, Bolognesi C, Kirsch-Volders M, et al. The micronucleus assay in human buccal cell as a tool for biomonitoring DNA damage: the HUMN project perspective on current status and knowledge gaps. *Mutat Res* 2008; **659**(1-2): 93-108.
4. Bonassi S, Znaor A, Ceppi M, et al. An increased micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes predicts the risk of cancer in humans. *Carcinogenesis* 2007; **28**(3): 625-31.

5. Bull CF, Beetstra-Hill S, Benassi-Evans BJ, et al. Application and adaptation of the in vitro micronucleus assay for the assessment of nutritional requirements of cells for DNA damage prevention. *Mutagenesis* 2011; **26**(1): 193-7.
6. Jacobs DR Jr and Steffen LM. Nutrients, foods, and dietary patterns as exposure in research: a framework for food synergy. *Am J Clin Nutr* 2003; **78**(3 Suppl): 508S-13S.
7. Collins AR, Harrington V, Drew J, Melvin R. Nutritional modulation of DNA repair in a human intervention study. *Carcinogenesis* 2003; **24**(3): 511-5.
8. Fenech M, Baghurst P, Luderer W, et al. Low intake of calcium, folate, nicotinic acid, vitamin E, retinol, beta-carotene and high intake of pantothenic acid, biotin and riboflavin are significantly associated with increased genome instability. Results from a dietary intake and micronucleus index survey in South Australia. *Carcinogenesis* 2005; **26**(5): 991-9.
9. Moller P and Loft S. Dietary antioxidants and beneficial effect on oxidatively damaged DNA. *Free Radic Biol Med* 2006; **41**(3): 388-415.
10. Samanta S and Dey P. Micronucleus and Its Application. *Diagn Cytopathol* 2012; **40**(1): 84-90.
11. Bonassi S, Coskun E, Ceppi M, et al. The Human MicroNucleus project on exfoliated buccal cells (HUMNxl): the role of life-style, host factors, occupational exposure, health status, and assay protocol. *Mutat Res* 2011; **728**(3): 88-97.
12. Thomas P, Wu J, Dhillon V, Fenech M. Effect of dietary intervention on human micronucleus frequency in lymphocytes and buccal cells. *Mutagenesis* 2011; **26**(1): 69-76.
13. Ceretti E, Feretti D, Viola GC, et al. DNA damage in buccal mucosa cells of pre-school children exposed to high levels of urban air pollutants. *PLoS One* 2014; **9**(5): e96524.
14. Barba G, Sieri S, Russo MD, et al. Glycaemic index and body fat distribution in children: the results of the ARCA project. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2012; **22**(1): 28-34.
15. Istituto nazionale di statistica (ISTAT). [www.istat.it](http://www.istat.it) [Last access: June 22, 2015].
16. Galassi C, Forastiere F, Biggeri A, et al. SIDRIA second phase: objectives, study design and methods. *Epidemiol Prev* 2005; **29**(2 Suppl): 9-13.
17. Asher MI, Montefort S, Björkstén B, et al. Worldwide time trends in the prevalence of symptoms of asthma, allergic rhinoconjunctivitis, and eczema in childhood: ISAAC Phases One and Three repeat multicountry cross-sectional surveys. *Lancet* 2006; **368**(9537): 733-43.
18. Cade J, Thompson R, Burley V, Warm D. Development, validation and utilisation of food-frequency questionnaires - a review. *Public Health Nutr* 2002; **5**(4): 567-87.
19. Rössner P, Bavorova H, Ocadlikova D, Svandova E, Sram RJ. Chromosomal aberrations in peripheral lymphocytes of children as biomarkers of environmental exposure and life style. *Toxicol Lett* 2002; **134**(1-3): 79-85.
20. Romieu I, Castro-Giner F, Kunzli N, Sunyer J. Air pollution, oxidative stress and dietary supplementation: a review. *Eur Respir J* 2008; **31**(1): 179-97.
21. Emmanouil E, Manios Y, Grammatikaki E, et al. Association of nutrient intake and wheeze or asthma in a Greek pre-school population. *Pediatr Allergy Immunol* 2010; **21**(1 Pt 1):90-5.
22. Thomas P, Wu J, Dhillon V, Fenech M. Effect of dietary intervention on human micronucleus frequency in lymphocytes and buccal cells. *Mutagenesis* 2011; **26**(1): 69-76.
23. Buzzard IM, Stanton CA, Figueiredo M, et al. Development and reproducibility of a brief food frequency questionnaire for assessing the fat, fiber, and fruit and vegetable intakes of rural adolescents. *J Am Diet Assoc* 2001; **101**(12): 1438-46.
24. Domel SB, Baranowski T, Davis H, et al. Fruit and vegetable food frequencies by fourth and fifth grade students: validity and reliability. *J Am Coll Nutr* 1994; **13**(1): 33-9.
25. Kristjansdottir AG, Andersen LF, Haraldsdottir J, de Almeida MD, Thorsdottir I. Validity of a questionnaire to assess fruit and vegetable intake in adults. *Eur J Clin Nutr* 2006; **60**(3): 408-15.
26. Leclercq C, Arcella D, Piccinelli R, et al. The Italian National Food Consumption Survey INRAN-SCAI 2005-06: main results in terms of food consumption. *Public Health Nutr* 2009; **12**(12): 2504-32.

Corresponding author: Dr. Claudia Zani, Department of Medical and Surgical Specialities, Radiological Sciences and Public Health, University of Brescia, Viale Europa 11, I-25123 Brescia.  
e-mail: [claudia.zani@unibs.it](mailto:claudia.zani@unibs.it)

**Allegato 4.** Questionario somministrato ai genitori dei bambini del progetto MAPEC\_LIFE.



# MAPEC\_LIFE

Life12 ENV/IT/000614

Monitoring Air Pollution Effects on Children  
for supporting public health policy

(Monitoraggio degli effetti dell'inquinamento atmosferico  
sui bambini per orientare le politiche di sanità pubblica)



## QUESTIONARIO PER I GENITORI

### Partner del progetto:



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI  
DI BRESCIA



Comune di Brescia



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI  
DI TORINO



UNIVERSITÀ  
DI PISA



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI  
DI PERUGIA



UNIVERSITÀ  
DEL SALENTO

## INFORMATIVA SUL QUESTIONARIO

Gentili Genitori, ringraziamo per la cortese collaborazione nel voler compilare il presente questionario. Nella prima sezione del questionario vengono chieste alcune informazioni sulla salute di vostro figlio/a e sulle sue abitudini di vita, sull'ambiente domestico, sull'area di residenza e sulla famiglia e nella seconda sezione informazioni sull'alimentazione di vostro figlio/a.

Queste domande mirano a individuare esposizioni a sostanze tossiche diverse da inquinanti atmosferici, per poter definire meglio lo specifico ruolo di ciascun fattore di rischio per la salute dei vostri figli.

Vi preghiamo di rispondere con molta attenzione alle domande, seguendo le istruzioni riportate all'interno.

Il questionario potrà essere compilato on-line o in forma cartacea.

Il questionario cartaceo deve essere riportato a scuola, chiuso nella busta predisposta.

Nel questionario viene chiesto di scrivere nome e cognome dell'alunno al solo fine di poter appaiare le risposte fornite ai risultati dei test sul materiale biologico raccolto. Tutte le informazioni saranno trattate con le opportune garanzie di riservatezza, in ottemperanza alla normativa vigente (Legge 196 del 2003). Ad esse avranno accesso solo gli operatori a ciò delegati dai responsabili dell'indagine, ed esse verranno utilizzate, in modo anonimo e aggregato, esclusivamente a fini di ricerca. Lo studio viene condotto dall'Unità di Igiene, Dipartimento di Specialità Medico Chirurgiche, Scienze Radiologiche e Sanità Pubblica dell'Università degli Studi di Brescia.

### DOMANDE DI SELEZIONE/CRITERI DI ESCLUSIONE DALLO STUDIO

**Suo figlio risiede in un Comune diverso da Brescia?**

NO  SI

**Suo figlio ha più di 9 anni?**

NO  SI

**Negli ultimi 12 mesi suo figlio è stato sottoposto a radioterapia o chemioterapia?**

NO  SI

**Negli ultimi 12 mesi suo figlio ha o ha avuto un tumore maligno?**

NO  SI

**Nell'ultimo mese suo figlio è stato sottoposto a radiografie?**

NO  SI

**Suo figlio ha malattie genetiche (es. sindrome di Down)?**

NO  SI

**Suo figlio utilizza un apparecchio ortodontico?**

NO  SI

**Se ha risposto **SI** anche ad una sola di queste domande non può partecipare alla ricerca perché non risponde ai criteri di inclusione che il protocollo dello studio prevede.**

## ISTRUZIONI PER LA COMPILAZIONE

- **A molte domande si risponde mettendo una crocetta nell'apposita casella.**

ESEMPIO:

SESSO     MASCHIO     FEMMINA

- **I numeri, quando richiesto, si scrivono negli appositi spazi.**

ESEMPIO:

DATA DI NASCITA      GIORNO      MESE        ANNO

- **Quando viene richiesto di scrivere, per esteso, su una riga, si prega di scrivere in stampatello.**
- **Nelle domande seguite da un elenco di possibili risposte, si sceglie una sola risposta se non ci sono altre indicazioni.**
- **IN CASO DI ERRORE, cerciate la risposta sbagliata e mettete una crocetta nella casella giusta oppure riscrivete il numero corretto vicino, come da esempio.**

ESEMPLI:    sesso maschile

SESSO     MASCHIO     FEMMINA

data di nascita 29 MARZO 2006

DATA DI NASCITA      GIORNO      MESE        ANNO

CODICE QUESTIONARIO  
(Campo da non compilare.  
Riservato ai ricercatori)

□□□□

DATA DI COMPILAZIONE DEL QUESTIONARIO □□ GIORNO □□ MESE □□□□ ANNO

### DATI PERSONALI DEL FIGLIO

COGNOME DI SUO FIGLIO \_\_\_\_\_

NOME DI SUO FIGLIO \_\_\_\_\_

NOME ISTITUTO \_\_\_\_\_

DATA DI NASCITA □□ GIORNO □□ MESE □□□□ ANNO

SESSO  MASCHIO  FEMMINA

ALTEZZA □□□ CM PESO □□ KG

NAZIONE DI NASCITA DI SUO FIGLIO \_\_\_\_\_

INDIRIZZO ATTUALE DI SUO FIGLIO

COMUNE \_\_\_\_\_

VIA / PIAZZA \_\_\_\_\_ N. \_\_\_\_\_



## ABITAZIONE DEL FIGLIO

### 1. Come giudica il traffico nella zona dove si trova l'abitazione di suo figlio?

- Scarso o assente  
 Moderato  
 Intenso e intermittente (ad es. solo nelle ore di punta)  
 Intenso e continuo, per buona parte del giorno

### 2. Nella zona dove abita suo figlio c'è traffico di camion nei giorni lavorativi?

- Scarso o assente  
 Moderato  
 Intenso e intermittente (ad es. solo nelle ore di punta)  
 Intenso e continuo, per buona parte del giorno

### 3. Il riscaldamento della sua abitazione è a:

- legna/pellet  carbone  gasolio/kerosene  gas  elettricità  teleriscaldamento  
 altro \_\_\_\_\_

### 4. In casa sono presenti delle stufe?

- NO  SI

se SI, **nell'ultimo mese** quante volte ha usato la stufa sia per riscaldare che per cucinare?

Mai

N. volte / Settimana |\_\_|\_\_| oppure

N. volte / Mese |\_\_|\_\_|

se SI, che tipo di combustibile viene usato? legna/pellet  gas  altro  \_\_\_\_\_

### 5. E' presente un caminetto in casa ?

- NO  SI

se SI, **nell'ultimo mese** quante volte è stato usato il caminetto sia per riscaldare che per cucinare?

Mai

N. volte / Settimana |\_\_|\_\_| oppure

N. volte / Mese |\_\_|\_\_|

se SI, che tipo di combustibile viene usato? legna/pellet  carbonella  altro  \_\_\_\_\_

### 6. Quale combustibile viene generalmente usato per cucinare? (è possibile barrare più di una casella)

- elettricità, induzione  
 gas  
 legna o carbone  
 altro \_\_\_\_\_

### 7. C'è uno scaldabagno (boiler) a gas all'interno dei locali dell'abitazione?

- NO  SI

## SCUOLA FREQUENTATA DA SUO FIGLIO

### 8. Come giudica il traffico nella zona dove si trova la scuola?

- Scarso o assente
- Moderato
- Intenso e intermittente (ad es. solo nelle ore di punta)
- Intenso e continuo, per buona parte del giorno

### 9. Nella zona dove si trova la scuola c'è traffico di camion nei giorni lavorativi?

- Scarso o assente
- Moderato
- Intenso e intermittente (ad es. solo nelle ore di punta)
- Intenso e continuo, per buona parte del giorno

## STATO DI SALUTE DI SUO FIGLIO

### 10. Suo figlio ha un grave problema di salute?

- NO    SI

se SI, indicare quale: \_\_\_\_\_

### 11. Suo figlio assume o ha assunto farmaci negli ultimi sei mesi al di fuori dei comuni farmaci antibiotici, antipiretici e antinfiammatori (ad esempio: Velamox, Augmentin, Panacef, Tachipirina, Nurofen etc)?

- NO    SI   se SI, indicare quale/quali:

	Farmaco	Dose	Da/per quanto tempo	Quando è stata l'ultima assunzione
1				
2				
3				
4				
5				
6				

### 12. Suo figlio soffre o ha sofferto negli ultimi 12 mesi di disturbi respiratori al di fuori dei comuni raffreddori?

- NO    SI

se SI, indicare quale/quali? (*è possibile barrare più di una casella*)

- attacchi di asma
- fischi e sibili
- tosse
- catarro
- disturbi nasali persistenti e/o ricorrenti (muco nasale, naso chiuso)
- raffreddore allergico

## ABITUDINI DI VITA DI SUO FIGLIO

13. **Suo figlio pratica attività sportiva tre o più volte alla settimana?**

NO  SI

Suo figlio pratica attività sportiva all'aperto?

NO  SI

14. **Suo figlio frequenta una piscina tre o più volte alla settimana?**

NO  SI

15. **Quante ore al giorno, suo figlio, mediamente, gioca all'aria aperta, in questa stagione?**

meno di 1 ora

1 - 2 ore

3 - 4 ore

più di 4 ore

16. **Attualmente qualcuno fuma nell'abitazione dove vive suo figlio?**

NO  SI

se SI, quante persone, in totale, fumano nell'abitazione?   NUMERO persone

17. **Suo figlio soggiorna in ambienti chiusi con persone che fumano?**

NO  SI

se SI, approssimativamente quante ore al giorno in media?   NUMERO ore

18. **Suo figlio sta in cucina durante la cottura dei cibi?**

mai

talvolta

spesso/sempre

19. **Indicativamente, quante volte al mese vengono cotti in casa cibi alla piastra (bistecchiera o superficie rovente) o alla griglia (legna, carbonella)?**

mai  oppure N. volte / mese

20. **Nell'ultimo mese, può indicare la frequenza con cui suo figlio ha mangiato i seguenti alimenti? (escludendo il cibo consumato a scuola)**

cibi fritti mai  oppure N. volte / mese

cibi alla griglia\* mai  oppure N. volte / mese

cibi alla piastra\*\* mai  oppure N. volte / mese

pane tostato mai  oppure N. volte / mese

pizza cotta a legna mai  oppure N. volte / mese

cibi affumicati mai  oppure N. volte / mese

\* cibi cucinati su legna o carbonella, non su griglia elettrica

\*\* bistecchiera o superficie rovente

21. **In casa qualcuno ha hobby che prevedono l'uso di solventi (colle, vernici, colori, ecc.)?**

NO  SI

se SI, indicare approssimativamente per quante ore vengono usati alla settimana oppure al mese

N. ore / settimana   oppure N. ore / mese

## LA MAMMA

22. In quale nazione è nata la mamma del bambino? \_\_\_\_\_

23. Qual è il titolo di studio della mamma?

- Non ha titoli di studio
- Licenza elementare
- Diploma di scuola media inferiore/istituto professionale
- Diploma di scuola media superiore
- Laurea

24. La mamma fuma sigarette?

- NO     SI

Se SI, quante sigarette fuma al giorno?    |\_|\_| SIGARETTE

Se SI, lo fa in presenza di suo figlio?

- NO     SI

25. Indichi, tra le seguenti situazioni lavorative, quella che descrive l'attuale condizione professionale della mamma.

- Occupata tempo pieno
- Occupata part-time
- Disoccupata in cerca di nuova occupazione
- In cerca di prima occupazione
- Casalinga
- Studentessa
- Pensionata
- In altra condizione

26. Indichi, tra le seguenti categorie professionali, quella che meglio descrive l'attuale lavoro della mamma (o l'ultimo lavoro svolto)

• **Dipendente:**

- dirigente
- direttivo/quadro/funzionaria (*include docenti di scuola secondaria*)
- tecnica o impiegata ad alta/media qualificazione (*ad es. analisti di dati, geometri, periti tecnici, impiegate amministrative, infermiere, docenti di scuole materne ed elementari*)
- impiegata esecutiva (*es. segretarie, personale di sportello*)
- capo operaia, operaia specializzata
- operaia generica, lavoratrice manuale, personale ausiliario (*ad es. braccianti, usciere, commesse, cameriere*)

• **Autonomo:**

- imprenditrice
- libera professionista (*include persone con contratti di collaborazione coordinata e continuativa o di collaborazione occasionale*)
- lavoratrice in proprio (*include commercianti, artigiane, coadiuvanti e socie di cooperativa*)

## IL PAPÀ

27. In quale nazione è nato il papà del bambino? \_\_\_\_\_

28. Qual è il titolo di studio del papà?

- Non ha titoli di studio
- Licenza elementare
- Diploma di scuola media inferiore/istituto professionale
- Diploma di scuola media superiore
- Laurea

29. Il papà fuma sigarette?

- NO     SI

Se SI, quante sigarette fuma al giorno?    |\_\_|\_\_| SIGARETTE

Se SI, lo fa in presenza di suo figlio?

- NO     SI

30. Indichi, tra le seguenti situazioni lavorative, quella che descrive l'attuale condizione professionale del papà.

- Occupato tempo pieno
- Occupato part-time
- Disoccupato in cerca di nuova occupazione
- In cerca di prima occupazione
- Studente
- Pensionato
- In altra condizione

31. Indichi, tra le seguenti categorie professionali, quella che meglio descrive l'attuale lavoro del papà (o l'ultimo lavoro svolto).

• **Dipendente:**

- dirigente
- direttivo/quadro/funzionario (*include docenti di scuola secondaria*)
- tecnico o impiegato ad alta/media qualificazione (*ad es. analisti di dati, geometri, periti tecnici, impiegati amministrativi, infermieri, docenti di scuole materne ed elementari*)
- impiegato esecutivo (*es. segretari, personale di sportello*)
- capo operaio, operaio specializzato
- operaio generico, lavoratore manuale, personale ausiliario (*ad es. braccianti, uscieri, commessi, camerieri*)

• **Autonomo:**

- imprenditore
- libero professionista (*include persone con contratti di collaborazione coordinata e continuativa o di collaborazione occasionale*)
- lavoratore in proprio (*include commercianti, artigiani, coadiuvanti e soci di cooperativa*)

Ora, vorremmo caratterizzare le abitudini alimentari del suo bambino/a. Le domande che compongono questa parte del questionario si riferiscono all'alimentazione di suo figlio/a durante questa stagione.

Nel rispondere alle domande la preghiamo di:

- Indicare (marcando con una X la casella appropriata) la frequenza con cui il bambino ha consumato i vari alimenti durante questa stagione, considerando ogni pasto della giornata (colazione, pranzo, cena e merende), sia a casa che a scuola.
- Per alcuni alimenti che si consumano principalmente in alcune stagioni indicare la frequenza di consumo riferita a questa stagione.

La preghiamo di dare una risposta per tutti gli alimenti sotto indicati e se un alimento non viene mai consumato indichi solo la colonna mai. Risponda alle domande con la maggiore attenzione possibile.

<b>CONSUMO MEDIO DI SUO FIGLIO</b>								
		Mai	Meno di 1 volta a settimana	1-2 volte a settimana	3-4 volte a settimana	5-6 volte a settimana	1 volta al giorno	2 volte al giorno
	<b>PANE, PASTA, CEREALI</b>							
1	Cereali a colazione	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
2	Pane/panini	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
3	Crackers, grissini	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
4	Pasta o riso (in bianco o con sugo di pomodoro)	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
5	Pasta o riso con verdure	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
6	Pasta o riso con legumi	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
7	Pasta all'uovo	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
8	Tortellini, ravioli, agnolotti	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
9	Pasta al forno (lasagne, cannelloni ecc.)	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
10	Zuppe d'orzo/farro	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
11	Risotti	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
12	Polenta	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
13	Pizza	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
14	Focaccia al forno	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
	<b>MINESTRE</b>							
15	Minestrone, passati di sole verdure o legumi	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
16	Minestra in brodo (di dado o carne)	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
	<b>LEGUMI DA SOLI</b>							
17	Fagioli, piselli, ceci, lenticchie, fave	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
	<b>VERDURA</b> (incluse quelle con pasta o riso)							
18	Funghi	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
19	Peperoni	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
20	Lattughe, radicchio e altre insalate	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
21	Patate	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
22	Finocchi	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
23	Asparagi	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>

		Mai	Meno di 1 volta a settimana	1-2 volte a settimana	3-4 volte a settimana	5-6 volte a settimana	1 volta al giorno	2 volte al giorno
24	Pomodori da insalata	○	○	○	○	○	○	○
25	Zucca	○	○	○	○	○	○	○
26	Cavolo, cavolfiore, broccoli, cavolo di Bruxelles, cime di rapa	○	○	○	○	○	○	○
27	Fagiolini	○	○	○	○	○	○	○
28	Spinaci, scarole, bietole	○	○	○	○	○	○	○
29	Carciofi	○	○	○	○	○	○	○
30	Carote	○	○	○	○	○	○	○
31	Melanzane, zucchini	○	○	○	○	○	○	○
32	Cetrioli	○	○	○	○	○	○	○
33	Olive verdi o nere	○	○	○	○	○	○	○
	<b>FRUTTA</b>							
34	Cocomero (anguria)	○	○	○	○	○	○	○
35	Pesche	○	○	○	○	○	○	○
36	Albicocche	○	○	○	○	○	○	○
37	Arance, mandarini, clementine, mandaranci	○	○	○	○	○	○	○
38	Mele, pere	○	○	○	○	○	○	○
39	Banane	○	○	○	○	○	○	○
40	Cachi	○	○	○	○	○	○	○
41	Uva	○	○	○	○	○	○	○
42	Ciliegie	○	○	○	○	○	○	○
43	Prugne, susine	○	○	○	○	○	○	○
44	Fragole	○	○	○	○	○	○	○
45	Kiwi	○	○	○	○	○	○	○
46	Mirtilli, more, lamponi	○	○	○	○	○	○	○
47	Melone, melone giallo	○	○	○	○	○	○	○
48	Frutta secca (noci, mandorle, nocciole)	○	○	○	○	○	○	○
	<b>CARNI</b>							
49	Vitello, manzo (anche tritato)	○	○	○	○	○	○	○
50	Maiale (escluse salsicce)	○	○	○	○	○	○	○
51	Capretto, agnello, coniglio	○	○	○	○	○	○	○
52	Pollo, tacchino	○	○	○	○	○	○	○
53	Carne in scatola	○	○	○	○	○	○	○
54	Fegato di vitello o maiale	○	○	○	○	○	○	○
55	Fratteggie	○	○	○	○	○	○	○
56	Salsicce, wurstel, salame (insaccati)	○	○	○	○	○	○	○
57	Prosciutto cotto, mortadella, pancetta, speck, prosciutto crudo	○	○	○	○	○	○	○

		Mai	Meno di 1 volta a settimana	1-2 volte a settimana	3-4 volte a settimana	5-6 volte a settimana	1 volta al giorno	2 volte al giorno
<b>PESCE E FRUTTI DI MARE</b>								
58	Cozze, vongole, gamberi, gamberoni, scampi	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
59	Polpo, seppia, calamari	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
60	Tonno in scatola	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
61	Bastoncini di pesce	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
62	Tonno (fresco), pesce spada	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
63	Dentice, sogliola, palombo, orata, branzino, cefalo, triglia, latterini, merluzzo	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
64	Alici, sarde, sardine (fresche), sgombro	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
65	Salmone e altri pesci d'acqua dolce	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
<b>VARIE</b>								
66	Uova (incluse frittate e omelette)	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
67	Maionese	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
<b>LATTE, LATTICINI, FORMAGGI</b>								
68	Latte intero	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
69	Latte parzialmente scremato	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
70	Ricotta di vacca	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
71	Parmigiano e grana (grattugiato)	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
72	Pecorino (fresco e stagionato)	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
73	Mozzarella, scamorza, fiordilatte	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
74	Sottilette	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
75	Formaggi stagionati (es. caciocavallo, emmenthal, fontina, provolone, parmigiano in pezzi)	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
76	Formaggi a pasta molle (es. bel paese, stracchino, gorgonzola, brie)	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
77	Mascarpone, panna, creme di formaggio	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
78	Formaggi spalmabili tipo Philadelphia	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
79	Yogurt magro bianco/ frutta	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
80	Yogurt intero bianco/ frutta	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
81	Yogurt da bere tipo actimel	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>



		Mai	Meno di 1 volta a settimana	1-2 volte a settimana	3-4 volte a settimana	5-6 volte a settimana	1 volta al giorno	2 volte al giorno
<b>BISCOTTI, DESSERT, SNACK</b>								
82	Biscotti secchi (novellino, pavesini, saiwa, grantur-chese, ...)	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
83	Biscotti farciti (tipo oro ciok, ringo...)	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
84	Focacce dolci, brioche	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
85	Merendine o dolci o torte senza crema (tipo torta margherita)	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
86	Merendine o dolci o torte con creme/marmellate	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
87	Dolci con ricotta	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
88	Dolci al cucchiaino (tipo tiramisù, panna cotta..)	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
89	Cioccolata e snack a base di cioccolato	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
90	Caramelle	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
91	Snack salati (patatine, pizzette, salatini...)	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
92	Gelati alla frutta	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
93	Gelati alla panna/crema	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
94	Gelati confezionati con panna/crema	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>

		Mai	1 volta al mese o meno	Meno di 1 volta a settimana	1-2 volte a settimana	Meno di 1 volta al dì	1 volta al dì	2-3 volte al dì	4-5 volte al dì	6 o più volte al dì
<b>BEVANDE NON ALCOLICHE, ZUCCHERO</b>										
95	1 Lattina di Coca cola	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
96	1 Lattina di aranciata o altre bevande gassate	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
97	1 bicchiere di succo di frutta	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
98	1 tazza d'orzo	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
99	1 tazza di tè	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
100	1 cucchiaino di zucchero (nel tè, nel latte, etc.)	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
101	1 cucchiaio di miele (nel tè, nel latte, etc.)	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>

**GRASSI E CONDIMENTI:**

vorremmo adesso farle alcune domande sul consumo di alcune categorie di alimenti e sui grassi utilizzati per il condimento o nella preparazione dei pasti. Indichi per ognuna delle pietanze elencate la frequenza di consumo sbarrando la casella corrispondente.

		Mai	Meno di 1 volta a settimana	1-2 volte a settimana	3-4 volte a settimana	5-6 volte a settimana	1 volta al giorno	2 volte al giorno
102	Fritture (cotolette, pesce fritto, patate fritte, frittiture miste, etc.)	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
103	Condimenti sulla pasta (es. salsa di pomodoro, ragù, salse con panna o burro, etc.)	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
104	Cibi al forno (arrostiti di carne, pollo, tacchino, pesce)	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
105	Carni, pesce o vegetali cotti in padella	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
106	Verdure crude e cotte	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
107	Dolci fatti in casa	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>

**TIPO DI GRASSO**

Indichi adesso il tipo di grasso utilizzato di solito. N.B. indicare un solo tipo di grasso per ciascun tipo di cottura

		Burro	Margarina	Olio di oliva	Olio di arachidi	Altri oli di semi
108	Fritture	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
109	Salse e sughi sulla pasta	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
110	Cibi al forno	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
111	Carni, pesci o vegetali cotti in padella	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
112	Verdure crude	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
113	Verdure cotte (bollite)	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
114	Dolci fatti in casa	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>

115 Di solito suo figlio/a quando mangia il pollo o il tacchino, mangia anche la pelle?

- No, non la mangia                       Sì, la mangia

116 Di solito suo figlio/a quando mangia carne di maiale, di vitello o di manzo, mangia anche il grasso?

- No, non lo mangia                       Sì, lo mangia

117 Di solito suo figlio/a quando mangia il prosciutto, mangia anche il grasso?

- No, non lo mangia                       Sì, lo mangia



**Allegato 5.** Risultati del test del micronucleo dello studio RESPIRA pubblicati sulla rivista PlosOne (Ceretti et al., 2014).



# DNA Damage in Buccal Mucosa Cells of Pre-School Children Exposed to High Levels of Urban Air Pollutants

Elisabetta Ceretti<sup>1</sup>, Donatella Feretti<sup>1\*</sup>, Gaia C. V. Viola<sup>1</sup>, Ilaria Zerbini<sup>1</sup>, Rosa M. Limina<sup>1</sup>, Claudia Zani<sup>1</sup>, Michela Capelli<sup>2</sup>, Rossella Lamera<sup>2</sup>, Francesco Donato<sup>1</sup>, Umberto Gelatti<sup>1</sup>

**1** Unit of Hygiene, Epidemiology and Public Health, Department of Medical and Surgical Specialities, Radiological Sciences and Public Health, University of Brescia, Brescia, Italy, **2** Post-Graduate School of Public Health, University of Brescia, Brescia, Italy

## Abstract

Air pollution has been recognized as a human carcinogen. Children living in urban areas are a high-risk group, because genetic damage occurring early in life is considered able to increase the risk of carcinogenesis in adulthood. This study aimed to investigate micronuclei (MN) frequency, as a biomarker of DNA damage, in exfoliated buccal cells of pre-school children living in a town with high levels of air pollution. A sample of healthy 3-6-year-old children living in Brescia, Northern Italy, was investigated. A sample of the children's buccal mucosa cells was collected during the winter months in 2012 and 2013. DNA damage was investigated using the MN test. Children's exposure to urban air pollution was evaluated by means of a questionnaire filled in by their parents that included items on various possible sources of indoor and outdoor pollution, and the concentration of fine particulate matter (PM<sub>10</sub>, PM<sub>2.5</sub>) and NO<sub>2</sub> in the 1–3 weeks preceding biological sample collection. 181 children (mean age±SD: 4.3±0.9 years) were investigated. The mean±SD MN frequency was 0.29±0.13%. A weak, though statistically significant, association of MN with concentration of air pollutants (PM<sub>10</sub>, PM<sub>2.5</sub> and NO<sub>2</sub>) was found, whereas no association was apparent between MN frequency and the indoor and outdoor exposure variables investigated via the questionnaire. This study showed a high MN frequency in children living in a town with heavy air pollution in winter, higher than usually found among children living in areas with low or medium-high levels of air pollution.

**Citation:** Ceretti E, Feretti D, Viola GCV, Zerbini I, Limina RM, et al. (2014) DNA Damage in Buccal Mucosa Cells of Pre-School Children Exposed to High Levels of Urban Air Pollutants. PLoS ONE 9(5): e96524. doi:10.1371/journal.pone.0096524

**Editor:** Susanna Esposito, Fondazione IRCCS Ca' Granda Ospedale Maggiore Policlinico, Università degli Studi di Milano, Italy

**Received:** December 24, 2013; **Accepted:** April 8, 2014; **Published:** May 2, 2014

**Copyright:** © 2014 Ceretti et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Funding:** The study was funded by the Q-TECH Research and Study Centre (Quality and Technology Assessment, Governance and Communication Strategies in Health Systems), University of Brescia. The Lombardy Regional Authority provided a three-year research grant under agreements with the university for the promotion of research in the Lombardy region. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

**Competing Interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

\* E-mail: feretti@med.unibs.it

## Introduction

Air pollution is a global health problem, particularly in urban areas. Close to 90% of European citizens residing in urban areas are exposed to air pollution exceeding EU limit values (Air Quality Directive 2008/50/EC) and WHO guideline levels [1–3].

Several epidemiologic studies have demonstrated the association between air pollution exposure, especially to particulate matter, and mortality and morbidity in humans [4–8].

The finest fractions of particulate matter (PM<sub>2.5</sub> and less) play a major role in causing chronic diseases because they are retained in the alveolar regions of the lungs and diffuse into the blood stream, inducing inflammation, oxidative stress, and blood coagulation [9,10]. Extracts of urban air particles can induce cancer in animals [11,12] and are mutagenic in bacteria, plant and mammalian cells in *in-vitro* tests [13–17]. *In-vivo* mutagenicity tests have been performed on humans as well. The micronuclei (MN) formation has been used as an indicator of chromosome damage, induced by substances that cause chromosome breakage (clastogens) as well as by agents that affect the spindle apparatus (aneugens) [18]. Other nuclear anomalies were investigated as biomarkers of DNA damage and cell death, which may be useful for a more comprehensive assessment of genotoxic damage [19–22].

An increase in cancer risk has been observed in the presence of a high level of chromosomal aberrations and micronuclei in several studies [23–26]. This biomarker can be investigated in various organs, tissues and body fluids, such as leukocytes or lymphocytes in peripheral blood, though cells derived from target tissues are considered more appropriate. In particular, exfoliated buccal and nasal cells have been used in the biological monitoring of people exposed to airborne pollutants as they are representative of epithelial respiratory tract cells and are easier to collect than those of other respiratory organs [21,27–29].

An increase of micronuclei in leukocytes in peripheral blood has been observed in people exposed to urban air pollutants [30–36] and a strong correlation of MN frequency in buccal exfoliated cells and peripheral lymphocytes has been found [37,38].

Children are a high-risk group in terms of the health effects of air pollution [2,5,39–42]. Some studies suggest that early exposure during childhood can play an important role in the development of chronic diseases in adulthood: the earlier the exposure, the greater the risk of chronic disease, including cancer [43].

Few studies have considered genetic damage in mucosa buccal cells as MN frequency in cells of children exposed to air pollution, and they only involved a small number of subjects showing cytogenetic damage in children or young adults living in polluted

**Table 1.** Micronuclei (MN) frequencies observed in buccal mucosa cells of children according to socio-demographic features and exposure variables (N = 181).

Subjects and demographic features	N (%)	% MN (Mean ± SD)
<b>Sex</b>		
M	103 (56.9)	0.30 ± 0.13
F	78 (43.1)	0.29 ± 0.13
<b>Children's age</b>		
3 years	34 (18.8)	0.31 ± 0.16
4 years	59 (32.6)	0.28 ± 0.13
5–6 years	88 (48.6)	0.29 ± 0.12
<b>Parents' education (at least one parent)</b>		
Primary school or less	19 (10.5)	0.28 ± 0.12
Secondary school	53 (29.3)	0.32 ± 0.16
College or university	109 (60.2)	0.28 ± 0.12
<b>Home characteristics</b>		
<u>Traffic in the area</u>		
Heavy	97 (53.6)	0.31 ± 0.14
Moderate	59 (32.6)	0.28 ± 0.13
Very light	25 (13.8)	0.25 ± 0.08
<u>Truck traffic in the area</u>		
Heavy	31 (17.1)	0.30 ± 0.12
Moderate	67 (37.0)	0.31 ± 0.17
Very light	82 (45.3)	0.27 ± 0.09
<u>Indoor exposure</u>		
Gas stove in home	61 (33.7)	0.28 ± 0.11
Fireplace in home	37 (20.4)	0.28 ± 0.11
Presence of smokers in home	28 (15.5)	0.30 ± 0.18
<b>School characteristics</b>		
<u>Traffic in the area</u>		
Heavy	102 (56.4)	0.31 ± 0.15
Moderate	68 (37.6)	0.27 ± 0.09
Very light	10 (5.5)	0.29 ± 0.15
<u>Truck traffic in the area</u>		
Heavy	27 (14.9)	0.33 ± 0.19
Moderate	80 (44.2)	0.29 ± 0.12
Very light	72 (39.8)	0.28 ± 0.12
<b>Child's habits</b>		
<u>Plays outdoors</u>		
Less than 1 hour	78 (43.1)	0.31 ± 0.16
More than 1 hour but less than 3 hours	67 (37.0)	0.28 ± 0.10
3 hours or more	35 (19.3)	0.28 ± 0.10
<u>Remains in the kitchen while meals are cooked</u>		
Never	24 (13.3)	0.29 ± 0.13
Sometimes	119 (65.8)	0.30 ± 0.14
Often/always	37 (20.4)	0.27 ± 0.09
<u>Consumes fried/grilled/smoked food</u>		
Never	5 (2.8)	0.36 ± 0.17
More than once per month	123 (68.0)	0.28 ± 0.14
<b>Parents' smoking habits</b>		
Neither parent smoke	118 (65.2)	0.29 ± 0.12
Mother smoked during pregnancy	40 (22.1)	0.29 ± 0.14
Mother smokes	30 (16.6)	0.29 ± 0.15

**Table 1. Cont.**

Subjects and demographic features	N (%)	% MN (Mean ±SD)
Father smoke	49 (27.1)	0.30±0.17
Both parents smokers	42 (23.2)	0.29±0.15

doi:10.1371/journal.pone.0096524.t001

areas with a high concentration of PM or oxidant pollutants [33,44–47].

The aim of this study was to investigate MN frequency, as a biomarker of DNA damage, in exfoliated buccal cells of pre-school children living in a town with high levels of air pollution during the winter season, when the highest levels of particulate matter and other pollutants are usually found.

## Materials and Methods

### Study design

This study is part of the RESPIRA study (Italian acronym for Rischio ESposizione Inquinamento aRia Atmosferica), a molecular epidemiology cross-sectional study aiming to assess the presence of MN frequency in pre-school children living in Brescia, a highly polluted town in Northern Italy, located in the Po Valley, one of the most highly polluted areas of Europe. The children were recruited in 6 schools located in different areas of the town. The study enrolled children aged 3–6 years, born in Italy to European parents, without malignant tumours, who had not undergone radiotherapy or chemotherapy in the previous 12 months or X-rays in the previous 3 months.

The presence of MN and other nuclear anomalies were investigated in buccal mucosa cells taken from the children.

The biological samples were collected during two consecutive winter seasons (2012 and 2013) since the highest values of PM10 and PM2.5 in Brescia are usually observed in the winter months. The project was approved by the Ethics Committee of Local Unit Health of Brescia (Comitato Etico dell'ASL -Azienda Sanitaria Locale- di Brescia). The children's parents provided their written informed consent to participate in this study. All the data collected were treated confidentially in accordance with current Italian legislation (privacy law).

### Questionnaire

The children's parents were interviewed using an *ad hoc* questionnaire designed to gather information on exposure to air pollutants from both indoor and outdoor sources, including some characteristics of the area of residence (e.g. traffic, factories), parents' smoking habits, and children's respiratory diseases and drug consumption.

### Collection of air pollution data

Chemical data regarding daily concentration of the most commonly measured air pollutants (CO, NO<sub>2</sub>, SO<sub>2</sub>, benzene, O<sub>3</sub>, PM10 and PM2.5) were retrieved from the freely available ARPA (Regional Agency for Environmental Protection) database to characterize urban air quality.

### Collection of biological samples

All the biological samples were taken during or after a series of days with high levels of PM10, PM2.5 and NO<sub>2</sub>.

For the collection of buccal mucosa cells, the children rinsed their mouths twice with mineral water. Interdental brushes were

used to collect epithelial buccal cells for the micronucleus test, by gently scraping the inside of both cheeks and dipping them into tubes containing 15 ml of PBS (phosphate buffered saline solution) [21]. This method is simple and non-invasive and therefore easily acceptable by both children and parents.

### Micronucleus test

After shaking and removing the brush, the epithelial buccal cells in PBS were centrifuged for 10 minutes at 1100 g at 4°C and re-suspended in warm PBS (37°C). In order to determine whether enough cells had been collected to perform the test, 10 µl of cell suspension was applied in a Burk chamber on which the number of cells was scored. The PBS cell suspension was then centrifuged for 4 minutes at 8700 g and the pellet was re-suspended in 700 µl of warm hypotonic solution (KCl 0.56%, 37°C). After 1 minute, 700 µl of cold methanol/acetic acid (14:1, -20°C) was added. This fixed suspension was centrifuged for 4 minutes at 8700 g, and the pellet was re-suspended in 40 µl of warm PBS and dropped onto two frosted slides, which were dried and stained with Giemsa dye (5 minutes at room temperature). The slides were then washed with distilled water, dried and mounted with Eukitt.

The slides were examined at 1000X magnification for microscope analysis. Before MN frequency was assessed, cells were divided into two categories: "normal" cells and ones that are considered "abnormal" based on their cytobiological and nuclear features, which are indicative of DNA damage (MN and nuclear buds), cytokinetic failure (binucleated cells), proliferative potential (basal cells) or cell death (condensed chromatin, karyorrhexis, pyknotic, karyolytic and without nucleus cells), according to the Buccal Micronucleus Cytome (BMCyt) assay [22]. To assess MN, nuclear buds, binucleated and basal cells frequency, at least 2000 "normal" cells per slide (two slides per subject, 4000 cells per subject) were scored by two expert operators with duplicate reading. The results are given as the percentage of cells with MN and buds, and binucleated and basal cells [19,22]. Moreover, condensed chromatin, karyorrhexis, pyknotic, karyolytic, and without nucleus cells were evaluated scoring 2000 total cells per subject, and expressed as percentages.

### Statistical analysis

All the data were processed to investigate the associations between air pollution parameters and MN frequency. As buccal cells have a short life, no more than 3 weeks [22], the associations between frequency of MN and other biomarkers frequency and air pollutants concentration (CO, NO<sub>2</sub>, SO<sub>2</sub>, benzene, O<sub>3</sub>, PM10 and PM2.5) were analysed using air pollutants mean levels at 0 (sampling day), 1, 2 and 3 weeks before sampling. Both univariate analysis and multivariate analysis (multiple regression, logistic regression) were performed to assess the association investigated, adjusting for confounding factors. Particularly, linear regression with biological parameters as dependent variables and the concentration of air pollutants as independent variables were fitted. In order to improve the interpretation of these findings the coefficients of the linear regression were computed on a 10 µg/m<sup>3</sup>

**Table 2.** Frequency of micronuclei (MN) and other nuclear anomalies in all children and according to sex and age.

N° children	% MN	% Binucleated cells	% Basal cells	% Condensed chromatin cells	% Karyorrhetic cells	% Pyknotic cells	% Karyolytic cells	% Without nucleus cells
	(Mean±SD)	(Mean±SD)	(Mean±SD)	(Mean±SD)	(Mean±SD)	(Mean±SD)	(Mean±SD)	(Mean±SD)
All children	0.29±0.13	0.11±0.08	0.72±1.15	17.20±6.13	7.44±4.29	0.57±0.48	3.72±3.37	1.42±1.28
Sex								
Males	0.30±0.13	0.11±0.09	0.84±1.38	17.10±6.26	7.88±4.72	0.61±0.50	3.96±3.97	1.42±1.18
Females	0.29±0.13	0.10±0.08	0.56±0.73	17.33±6.00	6.86±3.60	0.52±0.46	3.42±2.34	1.43±1.40
Children's age								
3 years	0.31±0.16	0.10±0.09	0.56±0.80	16.70±4.52	7.48±4.84	0.65±0.53	4.07±2.91	1.65±1.27
4 years	0.28±0.13	0.13±0.10	0.64±0.69	16.58±6.18	7.96±4.41	0.52±0.49	3.21±2.31	1.23±1.15
5–6 years	0.29±0.12	0.09±0.06	0.83±1.46	17.80±6.62	7.07±3.99	0.57±0.46	3.94±4.05	1.47±1.35

doi:10.1371/journal.pone.0096524.t002

scale of measures of air pollutants. Two-tailed statistical tests were performed, with 0.05 p-value as the threshold for rejecting the null hypothesis. All the analyses were performed using the Stata TM 12.0 statistical package (Stata Statistical Software Release 12.0, 2012; Stata Corporation, College Station, Texas, USA).

**Results**

A total of 222 children were recruited, of whom 181 (mean age ±SD: 4.35±0.84 years; 56.9% males) were examined because 41 samples were not eligible for MN analysis due to an insufficient number of cells collected.

The mean±SD MN frequency expressed as a percentage was 0.29±0.13 (median 0.28 and range 0.085–0.990).

Table 1 shows the results of the MN analysis, according to children's socio-demographic characteristics and habits, and indoor and outdoor exposure data. No variable was associated with MN frequency in exfoliated buccal cells.

Table 2 sets out all the biomarkers evaluated in the buccal mucosa cells of children according to children's sex and age. No statistically significant difference was observed according to sex and age for each parameter.

The daily levels of PM10, PM2.5 and NO<sub>2</sub> from January to March 2012 and 2013, and biological sampling days are shown in Figure 1. During these months, the concentrations of PM10 and PM2.5 were almost always over the EU limit values for daily means (50 and 25 µg/m<sup>3</sup>, respectively). Likewise, the annual EU limit for NO<sub>2</sub> (40µg/m<sup>3</sup>) was exceeded on all the days. On the contrary, the concentration of CO, ozone, SO<sub>2</sub> and benzene remained low throughout the period considered and were always below the EU limit values (data not shown).

The mean MN frequency according to concentrations of PM10, PM2.5 and NO<sub>2</sub> on the day of sampling and one, two and three weeks before sampling are shown in Table 3. A fair variation (from 0.21% to 0.62%) was found in MN frequency from one day to another, without a clear relationship with concentration of air pollutants.

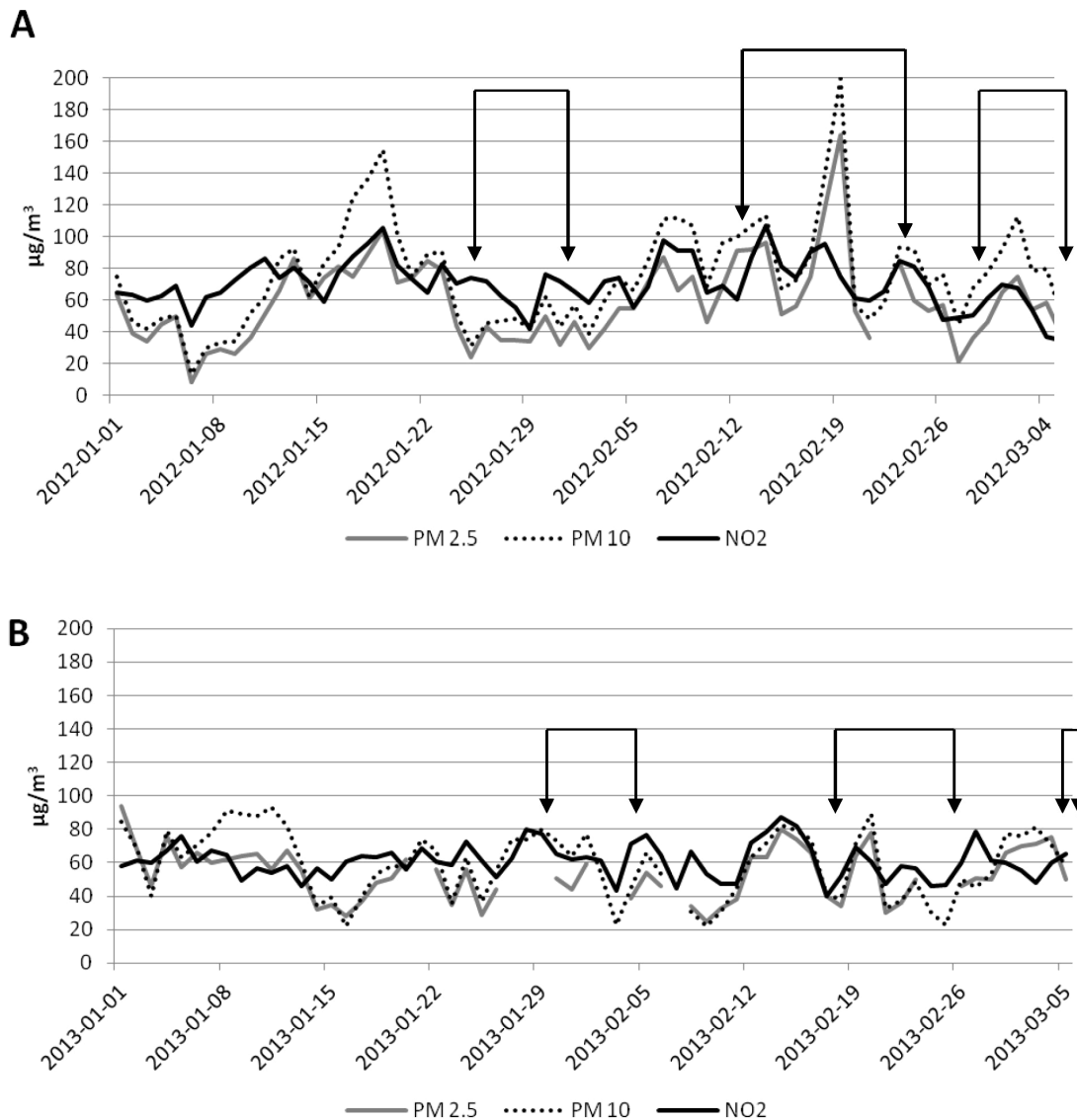
The coefficients of linear regressions of the biological markers on the concentration of PM10, PM2.5 and NO<sub>2</sub> on the same day and at 1, 2 and 3 weeks preceding biological sampling computed for 10 µg/m<sup>3</sup> units of increase are shown in Table 4. A modest, though statistically significant, increase of the frequency of nuclear anomalies (MN, buds and binucleated cells) and of basal cells for an increase of PM10, PM2.5 and NO<sub>2</sub> was found. No clear pattern was evident for the other parameters.

**Discussion**

The main finding of this study was a surprisingly high level of MN frequency in exfoliated buccal cells of pre-school children living in Brescia.

The MN frequency (mean: 0.29%) observed in our study was higher than that observed in healthy children “without important exposure” (0.108%) as a result of a pooled analysis of 321 children aged up to 9 years [48]. Furthermore, the value observed in children living in Brescia was higher than that shown in adolescents or young adults working in an engine repair workshop (mean age: 15.5 years, MN frequency: 0.07%) [49] or exposed to ozone air pollution (university students, MN frequency: 0.12%) [46]. However, these studies are not comparable to ours due to the different age of the people investigated. Age is in fact one of the most important factors affecting MN data in both lymphocytes and oral cells, with a progressively increase of MN with age [33,36,48,50]. However, the MN frequency observed in our study was higher than that found in children (aged 6–17) living in the





**Figure 1. PM<sub>10</sub>, PM<sub>2.5</sub> and NO<sub>2</sub> concentration in 2012 (A) and 2013 (B).** The arrows indicate the days on which biological sampling was performed. The dotted lines refer to the days without measurement of air pollutants.  
doi:10.1371/journal.pone.0096524.g001

urban area of Calcutta [44], which was higher than that found in those living in rural area (0.22% vs 0.17%). Children of a similar age to those in our study were included in a study on genotoxicity of air pollutants generated by biomass burning [47], which found a significant difference in MN frequency in oral cells between children exposed to high PM<sub>2.5</sub> concentration and those living in a control area with a lower PM<sub>2.5</sub> concentration (0.12% vs 0.02% in children under 7 years of age). A MN frequency similar to, or higher than, that observed in our study was reported in some studies carried out in Eastern Europe, as revised by Holland et al. [36].

According to a wide dataset which includes adults and children, a MN frequency interval of between 0.03% and 0.17% can be considered as a range of spontaneous MN frequency in buccal exfoliated cells of “unexposed” children [48]. Other authors have reported a range of 0.05–0.08% as the baseline MN frequency in exfoliated cells in healthy people [46]. Therefore, the mean MN frequency of 0.29% found in our study is about two-three-fold

higher than that considered as a “reference” value for children of this age.

The MN frequency did not vary according to sex, age, parental education and all the variables investigated through the questionnaire. A weak, though statistically significant, association of MN frequency with concentration of air pollutants in the week preceding the buccal mucosa cell collection, but not on the same day and in the second or third week before sampling, was found. These results are partially in agreement with findings from previous studies comparing people at different exposure levels to air pollutants, which showed that industrial or urban air pollutants had a genotoxic effect on mucosa cells [44,47,49]. It should be pointed out, however, that the concentration of PM<sub>10</sub>, PM<sub>2.5</sub> and NO<sub>2</sub> was high throughout the study period, and always above the EU proposed limits for daily levels. The range of variation of pollutant concentration may therefore have been too narrow to determine a substantial change in MN frequency in the children. Alternatively, a threshold instead of a dose-response mechanism

**Table 3.** Micronuclei (MN) frequency and PM10, PM2.5 and NO<sub>2</sub> concentrations on the day of sampling and in the 1–3 weeks preceding biological sampling.

Day of sampling	% MN	N° children (Mean ±SD)	Same day			Weeks preceding biological sampling								
			PM10 (µg/m <sup>3</sup> )	PM2.5 (µg/m <sup>3</sup> )	NO <sub>2</sub> (µg/m <sup>3</sup> )	1 week			2 weeks			3 weeks		
			PM10 (µg/m <sup>3</sup> )	PM2.5 (µg/m <sup>3</sup> )	NO <sub>2</sub> (µg/m <sup>3</sup> )	PM10 (µg/m <sup>3</sup> )	PM2.5 (µg/m <sup>3</sup> )	NO <sub>2</sub> (µg/m <sup>3</sup> )	PM10 (µg/m <sup>3</sup> )	PM2.5 (µg/m <sup>3</sup> )	NO <sub>2</sub> (µg/m <sup>3</sup> )	PM10 (µg/m <sup>3</sup> )	PM2.5 (µg/m <sup>3</sup> )	NO <sub>2</sub> (µg/m <sup>3</sup> )
2012-01-24		8	52.0	44	70.3	110.2	82.6	84.5	92.9	73.8	80.0	73.9	59.6	74.1
2012-01-25		4	31	24	73.9	99.8	78.1	82.0	93.0	74.4	79.3	74.4	60.0	74.6
2012-01-26		4	45.5	43	71.8	84.7	68.7	78.9	90.8	72.4	78.4	73.5	59.0	75.1
2012-01-30		4	62.0	50	76.1	50.9	42.0	65.4	80.7	62.4	74.6	76.2	60.7	74.7
2012-01-31		7	43.0	32	71.9	46.8	37.9	64.5	78.5	60.2	74.5	77.5	61.8	74.9
2012-02-13		12	106.5	92	87.2	97.1	72.0	77.4	77.1	58.1	72.5	68.4	52.8	70.2
2012-02-14		12	113.0	96	107.1	100.1	75.0	80.1	80.3	61.1	73.3	69.1	53.4	70.4
2012-02-20		12	57.0	53	61.3	112.3	93.1	87.0	104.7	82.6	82.2	88.9	69.8	77.4
2012-02-22		11	57.5	nd	65.4	95.9	79.0	76.6	98.2	67.3	79.0	88.9	70.1	76.1
2012-02-23		10	93.5	83	84.4	94.6	71.7	74.4	94.3	72.9	77.2	88.9	68.0	76.1
2012-02-28		11	67.5	36	50.5	68.7	44.3	65.0	87.0	65.9	74.2	91.4	69.0	76.1
2012-02-29		12	77.5	46	60.8	71.5	44.3	63.7	83.7	61.6	70.1	89.3	66.5	73.9
2012-03-01		12	92.0	65	69.7	74.4	50.9	63.3	84.5	61.3	68.7	87.7	65.6	72.5
2012-03-05		6	51.0	38	34.5	78.8	50.7	55.6	74.6	49.8	61.2	87.2	64.2	69.8
2013-01-29		6	80	nd	77.4	57.9	36.7	63.8	53.6	40.1	62.5	61.3	46.4	60.0
2013-01-30		3	73.5	51	65.5	59.8	32.8	66.2	56.5	40.5	64.5	60.8	45.6	60.6
2013-02-04		1	45.0	39	71.4	63.7	38.5	64.7	60.8	41.6	63.4	55.0	41.7	62.1
2013-02-18		9	39.0	34	52.2	65.2	60.6	67.9	50.3	46.8	64.3	54.8	44.9	64.4
2013-02-19		5	71.0	64	69.5	64.4	60.0	68.6	49.9	46.4	62.9	53.1	46.8	63.1
2013-02-25		7	23	nd	46.9	58.5	48.7	55.8	55.7	55.1	61.8	50.1	47.8	61.4
2013-03-04		16	70.5	75	60.1	58.0	59.0	58.6	53.9	53.8	57.2	57.7	56.3	60.7
2013-03-05		9	58.0	50	65.0	64.8	61.3	60.5	56.1	57.3	57.8	58.9	58.3	61.4

doi:10.1371/journal.pone.0096524.t003

**Table 4.** Coefficients of linear regression of the biological markers for 10 µg/m<sup>3</sup> units of increase of PM10, PM2.5 and NO<sub>2</sub> concentration.

	Weeks preceding biological sampling											
	Same day			1 week			2 weeks			3 weeks		
	PM 10	PM 2.5	NO <sub>2</sub>	PM 10	PM 2.5	NO <sub>2</sub>	PM 10	PM 2.5	NO <sub>2</sub>	PM 10	PM 2.5	NO <sub>2</sub>
MN	-0.01	-0.00	0.00	0.01*	0.01	0.03**	0.00	0.00	0.02	-0.01	-0.03**	-0.01
Nuclear buds	-0.00	0.00	0.08*	0.01***	0.01**	0.01***	0.00	0.00	0.01**	-0.00	-0.00	0.00
Binucleated cells	-0.00	-0.00	0.01	0.01**	0.01*	0.02**	0.01**	0.02**	0.03***	0.00	0.00	0.03**
Basal cells	0.02	0.00	0.10	0.20***	0.15**	0.40***	0.15**	0.26**	0.42***	0.06	0.03	0.40**
Condensed chromatin cells	0.20	0.06	1.07***	1.13***	1.06***	2.93***	1.26***	1.94***	3.61***	0.74*	0.71	3.79***
Karyorrhetic cells	0.04	-0.36**	-0.26	1.73	-0.29	0.20	0.66***	0.60	1.22**	1.05***	1.32**	2.22***
Pyknotic cells	0.01	0.04**	0.02	0.02	0.03	0.03	-0.03	-0.01	-0.05	-0.07**	-0.11**	-0.12*
Karyolytic cells	-0.04	0.02	-0.25	-0.48***	-0.36**	-0.93***	-0.61***	-0.93***	-1.40***	-0.61**	-0.71*	-2.05***
Without nucleus cells	0.09*	0.07	0.12	-0.01	-0.08	0.05	-0.01	-0.04	0.03	-0.01	-0.12	-0.04

statistically significant: \*p<0.05;

\*\*p<0.01;

\*\*\*p<0.001.

doi:10.1371/journal.pone.0096524.t004

may be proposed, so similar genotoxic effects on children’s buccal mucosa cells may have been produced by air pollutant values above a defined level. Lastly, the role of confounding factors, such as children’s diet, physical activity and others, which was not investigated in our study, cannot be excluded. Indeed, some studies have observed an association between MN frequency in buccal mucosa cells and diet (e.g. fruit consumption, supplementation with B vitamins or antioxidants) and some specific behaviours, such as smoking habit, intake of alcohol, and betel quid chewing [21,37,48,51,52].

Other nuclear anomalies apart from MN were associated with the PM10, PM2.5 and NO<sub>2</sub> concentration, particularly during the week preceding exfoliated cells sampling confirming findings of MN analysis on the possible effects of air pollutant exposure. However, the biological significance of these biomarkers in exfoliated oral cells is still unclear. Some nuclear anomalies, as buds, could be the result of genotoxic damage but these events are also associated with natural degenerative processes in these short-lived cells [53,54]. The frequency of binucleated cells was related to air pollutants concentration too. This parameter is primarily an indicator of cytotoxicity because of failures in cell division. Although these findings should be considered with caution because of paucity of data on the relationship between these biomarkers and air pollutants levels, overall they suggest that air pollution exposure may induce both genotoxic and cytotoxic damage in buccal mucosa cells of children. This observation strengthens the need to investigate these additional biomarkers of DNA damage together with MN for a more comprehensive evaluation of these issues.

This study has various strengths. First, the number of subjects recruited (181 children) is relatively high compared to previous studies of MN frequency in oral cells, particularly in this age group.

Second, it is unlikely that other important factors biased our results: there is no major industrial exposure in the area and few children could have been exposed to indoor pollution sources, including passive smoking at home, according to data collected via the questionnaire. Furthermore, the inclusion and exclusion criteria, e.g. residence in town, born to European parents, no malignant tumours, no radiotherapy or chemotherapy in the previous 12 months, no X-ray exposure in the three months before buccal cell collection, allowed us to rule out a possible role of other mutagenic factors.

Third, the collection of exfoliated buccal cells during two consecutive winter seasons (2012 and 2013) provided information on two periods characterized by similar environmental conditions and it showed consistent results, with no substantial difference in MN frequency in the two years.

Lastly, 4000 cells per child were scored for assessing MN frequency, representing a very high number of observations, higher than normally performed in current practice, in order to reduce the variability of the estimate, as suggested by Ceppi et al. [37].

This study has some limitations, however, mainly the lack of a control group of subjects living in a less polluted area or another collection of biological samples from the same or similar children in a period with lower airborne pollutant levels, for evaluating the role of spatial or seasonal differences in influencing MN frequency in buccal mucosa cells. Differences between more and less polluted areas have been found in some research [47] and seasonal differences in air pollution composition could be relevant for genotoxic damage, such as the summer increase of ozone concentration [46]. Nevertheless, this study was designed to assess MN frequency in a sufficiently large sample of children regularly

exposed to high levels of air genotoxic pollutants (PM and PAH), and not seasonal differences. We are, however, planning to extend the research to summer months and to children living in less polluted areas.

Only one sampling of oral cells was performed for each child, so the intra-individual variability of this early effect biomarker was not evaluated. The use of only one effect measure does not cause an important bias, however, because it reflects the mean exposure of the three preceding weeks, when the climate situation had not substantially changed. On the other hand, previous studies which found an association between this biomarker and air pollution also used a single measure of effect [31,44,47,49,50,55,56].

MN are a marker of early biological effect able to detect both clastogens and aneuploidy-inducing chemicals [18]. They are formed from acentric chromosomal fragments or whole chromosomes that are not included in the main daughter nuclei during nuclear division and their induction therefore reflects clastogenic and/or aneugenic events. They represent stable cytogenetic alterations which are the result of recent exposure of buccal mucosa cells, in a rapidly dividing tissue [18,28]. These cells are short-lived and they are the first barrier for substances introduced into the body by inhalation or ingestion and may be an excellent target tissue for detecting early genotoxic effects induced by mutagenic airborne compounds. Their use can, therefore, be proposed for assessing exposure to airborne mutagens, especially

in the paediatric population as they are easy to collect, considering also the strong correlation of MN frequency in these cells and in lymphocytes, which have been shown to be related to the subsequent risk of developing cancer [37,48].

Brescia is a highly industrialized area with a high level of motor vehicle traffic. It is located in the Po Valley, one of the most highly polluted areas of Europe, where the concentrations of PM<sub>10</sub>, PM<sub>2.5</sub> and NO<sub>x</sub> are usually above the EU reference values for many days of the year, as in the two years of this study (2012 and 2013), similar to those found in other towns and cities in the Po Valley [3].

In conclusion, this study shows that children living in a town with high levels of air pollutants in a Western country have a high level of MN in buccal mucosa cells, confirming previous findings of a mutagenic effect of urban air pollution on human beings.

## Acknowledgments

We wish to thank the Brescia Municipality for its logistic support and the school personnel and all children and parents involved in the research.

## Author Contributions

Conceived and designed the experiments: EC DF FD UG. Performed the experiments: EC DF GCVV IZ CZ. Analyzed the data: RML MC RL FD. Wrote the paper: EC DF FD UG.

## References

- WHO (2006) Air Quality Guidelines. Global Update 2005. World Health Organization Office for Europe, Copenhagen, Denmark.
- WHO (2007) Children's health and the environment in Europe: a baseline assessment. World Health Organization Regional Office for Europe, Copenhagen, Denmark.
- EAA (2012) Air Quality in Europe 2011. European Environment Agency, Technical report No 4/2012.
- Pope CA 3rd, Burnett RT, Thun MJ, Calle EE, Krewski D, et al. (2002) Lung cancer, cardiopulmonary mortality, and long-term exposure to fine particulate air pollution. *JAMA* 287(9):1132–1141.
- ERS (2010) Air quality and health. European Respiratory Society. Lausanne, Switzerland.
- Janssen NA, Fischer P, Marra M, Ameling C, Cassee FR (2013) Short-term effects of PM<sub>2.5</sub>, PM<sub>10</sub> and PM<sub>2.5-10</sub> on daily mortality in the Netherlands. *Sci Total Environ* 463–464: 20–26.
- Raaschou-Nielsen O, Andersen ZJ, Beelen R, Samoli E, Stafoggia M, et al. (2013) Air pollution and lung cancer incidence in 17 European cohorts: prospective analyses from the European Study of Cohorts for Air Pollution Effects (ESCAPE). *Lancet Oncol* 14: 813–822.
- Shah ASV, Langrish JP, Nair H, McAllister DA, Hunter AL, et al. (2013) Global association of air pollution and heart failure: a systematic review and meta-analysis. *Lancet* 382: 1039–1048.
- Sorensen M, Astrup H, Moller P, Hertel O, Jensen SS, et al. (2003) Linking exposure to environmental pollutants with biological effects. *Mutat Res* 544: 255–271.
- Lewtas J (2007) Air pollution combustion emissions: characterization of causative agents and mechanisms associated with cancer, reproductive, and cardiovascular effects. *Mutat Res* 636: 95–133.
- Claxton LD, Woodall GM Jr (2007) A review of the mutagenicity and rodent carcinogenicity of ambient air. *Mutat Res* 636: 36–94.
- Moller P, Folkmann JK, Forchhammer L, Brauner EV, Danielsen PH, et al. (2008) Air pollution, oxidative damage to DNA, and carcinogenesis. *Cancer Lett* 266: 84–97.
- Monarca S, Crebelli R, Feretti D, Zanardini A, Fuselli S, et al. (1997) Mutagens and carcinogens in size-classified air particulates of a northern Italian town. *Sci Total Environ* 205: 137–144.
- Monarca S, Feretti D, Zanardini A, Falistocco E, Nardi G (1999) Monitoring of mutagens in urban air samples. *Mutat Res* 426: 189–192.
- Claxton LD, Matthews PP, Warren SH (2004) The genotoxicity of ambient outdoor air, a review: Salmonella mutagenicity. *Mutat Res* 567: 347–399.
- Traversi D, Degan R, De Marco R, Gilli G, Pignata C, et al. (2009) Mutagenic properties of PM<sub>2.5</sub> urban pollution in the northern Italy: the nitro-compounds contribution. *Environ Int* 35: 905–910.
- de Brito KC, de Lemos CT, Rocha JA, Mielli AC, Matzenbacher C, et al. (2013) Comparative genotoxicity of airborne particulate matter (PM<sub>2.5</sub>) using Salmonella, plants and mammalian cells. *Ecotoxicol Environ Saf* 94: 14–20.
- Kirsch-Volders M, Plas G, Elhajouji A, Lukamowicz M, Gonzalez L, et al. (2011) The in vitro MN assay in 2011: origin and fate, biological significance, protocols, high throughput methodologies and toxicological relevance. *Arch Toxicol* 85: 873–899. doi:10.1007/s00204-011-0691-4
- Tolbert PE, Shy CM, Allen JW (1992) Micronuclei and other nuclear anomalies in buccal smears: methods development. *Mutat Res* 271: 69–77.
- Fenech M, Crott JW (2002) Micronuclei, nucleoplasmic bridges and nuclear buds induced in folic acid deficient human lymphocytes – evidence for breakage – fusion-bridge cycles in the cytokinesis-block micronucleus assay. *Mutat Res* 504: 131–136.
- Holland N, Bolognesi C, Kirsch-Volders M, Bonassi S, Zeiger E, et al. (2008) The micronucleus assay in human buccal cells as a tool for biomonitoring DNA damage: the HUMN project perspective on current status and knowledge gaps. *Mutat Res* 659: 93–108.
- Thomas P, Holland N, Bolognesi C, Kirsch-Volders M, Bonassi S, et al. (2009) Buccal micronucleus cytome assay. *Nat Protoc* 4(6):825–837.
- Hagmar L, Brøgger A, Hansteen IL, Heim S, Høgstvedt B, et al. (1994) Cancer risk in humans predicted by increased levels of chromosomal aberrations in lymphocytes: Nordic study group on the health risk of chromosome damage. *Cancer Res* 4(11):2919–2922.
- Bonassi S, Abbondandolo A, Camurri L, Dal Prà L, De Ferrari M, et al. (1995) Are chromosome aberrations in circulating lymphocytes predictive of future cancer onset in humans? Preliminary results of an Italian cohort study. *Cancer Genet Cytogenet* 79(2):133–135.
- Bonassi S, Znaor A, Ceppi M, Lando C, Chang WP, et al. (2007) An increased micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes predicts the risk of cancer in humans. *Carcinogenesis* 28(3):625–631.
- Bonassi S, El-Zein R, Bolognesi C, Fenech M (2011) Micronuclei frequency in peripheral blood lymphocytes and cancer risk: evidence from human studies. *Mutagenesis* 26(1):93–100.
- Coronas MV, Pereira TS, Rocha JA, Lemos AT, Fachel JM, et al. (2009) Genetic biomonitoring of an urban population exposed to mutagenic airborne pollutants. *Environ Int* 35(7):1023–1029.
- Kashyap B, Reddy PS (2012) Micronuclei assay of exfoliated oral buccal cells: means to assess the nuclear abnormalities in different diseases. *J Cancer Res Ther* 8(2):184–191.
- Samanta S, Dey P (2012) Micronucleus and its applications. *Diagn Cytopathol* 40: 84–90.
- Bolognesi C, Merlo F, Rabboni R, Valerio F, Abbondandolo A (1997) Cytogenetic biomonitoring in traffic police workers: micronucleus test in peripheral blood lymphocytes. *Environ Mol Mutagen* 30: 396–402.
- Maffei F, Hrelia P, Angelini S, Carbone F, Cantelli Forti G, et al. (2005) Effects of environmental benzene: Micronucleus frequencies and haematological values in traffic police working in an urban area. *Mutat Res* 583: 1–11.
- Cavallo D, Ursini CL, Carelli G, Iavicoli I, Ciervo A, et al. (2006) Occupational exposure in airport personnel: characterization and evaluation of genotoxic and oxidative effects. *Toxicology* 223: 26–35.
- Huen K, Gunn L, Duramad P, Jeng M, Scalf R, et al. (2006) Application of a geographic information system to explore associations between air pollution and

- micronucleus frequencies in African American children and adults. *Environ Mol Mutagen* 47(4):236–246.
34. Pedersen M, Vinzents P, Petersen JH, Kleinjans JC, Plas G, et al. (2006) Cytogenetic effects in children and mothers exposed to air pollution assessed by the frequency of micronuclei and fluorescence in situ hybridization (FISH): a family pilot study in the Czech Republic. *Mutat Res* 608: 112–120.
  35. Tovalin H, Valverde M, Morandi MT, Blanco S, Whitehead L, et al. (2006) DNA damage in outdoor workers occupationally exposed to environmental air pollutants. *Occup Environ Med* 63: 230–236.
  36. Holland N, Fucic A, Merlo DF, Sram R, Kirsch-Volders M (2011) Micronuclei in neonates and children: effects of environmental, genetic, demographic and disease variables. *Mutagenesis* 26: 51–56.
  37. Ceppi M, Biasotti B, Fenech M, Bonassi S (2010) Human population studies with the exfoliated buccal micronucleus assay: statistical and epidemiological issues. *Mutat Res* 705(1):11–19.
  38. Desai SS, Ghaisas SD, Jakhi SD, Bhide SV (1996) Cytogenetic damage in exfoliated oral mucosal cells and circulating lymphocytes of patients suffering from precancerous oral lesions. *Cancer Lett* 109: 9–14.
  39. Landrigan PJ, Kimmel CA, Correa A, Eskenazi B (2004) Children's health and the environment: public health issues and challenges for risk assessment. *Environ Health Perspect* 112(2):257–265.
  40. WHO (2005) Effects of air pollution on children's health and development. World Health Organization Regional Office for Europe, Copenhagen, Denmark.
  41. Bateson TF, Schwartz J (2008) Children's response to air pollutants. *J Toxicol Environ Health A* 71(3):238–243.
  42. Grigg J (2009) Particulate matter exposure in children: relevance to chronic obstructive pulmonary disease. *Proc Am Thorac Soc* 6(7):564–569.
  43. Wild CP, Kleinjans J (2003) Children and increased susceptibility to environmental carcinogens: evidence or empathy? *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 12(12):1389–1394.
  44. Lahiri T, Roy S, Basu C, Ganguly S, Ray MR, et al. (2000) Air pollution in Calcutta elicits adverse pulmonary reaction in children. *Indian J Med Res* 112: 21–26.
  45. Montero R, Serrano L, Dávila V, Segura Y, Arrieta A, et al. (2003) Metabolic polymorphisms and the micronucleus frequency in buccal epithelium of adolescents living in an urban environment. *Environ Mol Mutagen* 42: 216–222.
  46. Chen C, Arjomandi M, Qin H, Balmes J, Tager I, et al. (2006) Cytogenetic damage in buccal epithelia and peripheral lymphocytes of young healthy individuals exposed to ozone. *Mutagenesis* 21(2):131–137.
  47. Sisenando HA, Batistuzzo de Medeiros SR, Artaxo P, Saldiva PH, Hacon Sde S (2012) Micronucleus frequency in children exposed to biomass burning in the Brazilian Legal Amazon region: a control case study. *BMC Oral Health* 12: 6. doi:10.1186/1472-6831-12-6
  48. Bonassi S, Coskun E, Ceppi M, Lando C, Bolognesi C, et al. (2011) The HUMAN MicroNucleus project on exfoliated buccal cells (HUMN(XL)): the role of life-style, host factors, occupational exposures, health status, and assay protocol. *Mutat Res* 728(3):88–97.
  49. Karahalil B, Karakaya AE, Burgaz S (1999) The micronucleus assay in exfoliated buccal cells: application to occupational exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Mutat Res* 442(1):29–35.
  50. Rossnerova A, Spatova M, Pastorkova A, Tabashidze N, Veleminsky M Jr, et al. (2011) Micronuclei levels in mothers and their newborns from regions with different types of air pollution. *Mutat Res* 715: 72–78.
  51. Mondal NK, Ghosh S, Ray MR (2011) Micronucleus formation and DNA damage in buccal epithelial cells of Indian street boys addicted to gasp 'Golden glue'. *Mutat Res* 721: 178–183.
  52. Thomas P, Wu J, Dhillon V, Fenech M (2011) Effect of dietary intervention on human micronucleus frequency in lymphocytes and buccal cells. *Mutagenesis* 26: 69–76.
  53. Nersesyan AK (2005) Nuclear buds in exfoliated human cells. Letter to the Editor. *Mutat Res* 588: 64–68.
  54. Cerqueira EMM, Gomes-Filho IS, Trindade S, Lopes MA, Passos JS, et al. (2004) Genetic damage in exfoliated cells from oral mucosa of individuals exposed to X-rays during panoramic dental radiographies. *Mutat Res* 562: 111–117.
  55. Neri M, Ugolini D, Bonassi S, Fucic A, Holland N, et al. (2006) Children's exposure to environmental pollutants and biomarkers of genetic damage. II. Results of a comprehensive literature search and meta-analysis. *Mutat Res* 612: 14–39.
  56. Pedersen M, Wichmann J, Autrup H, Dang DA, Decordier I, et al. (2009) Increased micronuclei and bulky DNA adducts in cord blood after maternal exposures to traffic-related air pollution. *Environ Res* 109: 1012–1020.