



Progetto ammesso al contributo CUIS

# IMP.AIR.

Impatto della qualità dell'aria  
sulla salute della popolazione  
residente nel territorio dei  
Comuni di Sternatia,  
Galatina, Cutrofiano,  
Sogliano Cavour e Soletto

## RAPPORTO SCIENTIFICO



## TITOLO E PROGRAMMA DEL PROGETTO

TITOLO PROGETTO	IMP.AIR. Impatto della qualità dell'aria sulla salute della popolazione residente nel territorio dei Comuni di Sternatia, Galatina, Cutrofiano, Sogliano Cavour e Soletto
SOGGETTO PROPONENTE	Partenariato temporaneo dei Comuni di Sternatia (Comune capofila), Galatina, Cutrofiano, Sogliano Cavour e Soletto
PARTNERS CONSORZIATI	Comuni di Sternatia e Galatina
PARTNERS NON CONSORZIATI (COFINANZIATORI)	Comuni di Cutrofiano, Sogliano Cavour e Soletto
ENTE REALIZZATORE	Dipartimento di Scienze e Tecnologie Biologiche ed Ambientali – Università del Salento
RESPONSABILE SCIENTIFICO	Dott. Marcello Guido
AREA DI INTERVENTO	Territorio dei Comuni di Sternatia, Galatina, Cutrofiano, Sogliano Cavour e Soletto

## SOMMARIO

<b>PREMESSA</b>	<b>5</b>
<b>1 BASE DI PARTENZA</b>	<b>6</b>
1.1 INQUINAMENTO ATMOSFERICO E CANCRO	6
1.2 I BIOMARCATORI DI EFFETTO PRECOCE	7
1.3 IL TUMORE POLMONARE NEL SALENTO	9
<b>2 OBIETTIVI DELLO STUDIO</b>	<b>11</b>
<b>3 DISEGNO DELLO STUDIO</b>	<b>13</b>
3.1 BACINO TERRITORIALE INTERESSATO	13
3.1.1 POPOLAZIONE	13
3.1.2 EPIDEMIOLOGIA DEL CANCRO AL POLMONE	14
3.2 FASI DELLO STUDIO	15
3.3 ASPETTI ETICI	15
3.4 ELABORAZIONE DEI DATI	15
<b>4 ATTIVITÀ E RISULTATI</b>	<b>17</b>
4.1 RECLUTAMENTO	17
4.2 ANALISI DELLE VARIABILI INDIVIDUALI	19
4.2.1 SOMMINISTRAZIONE DEL QUESTIONARIO	19
4.2.2 CARATTERISTICHE DELLA POPOLAZIONE DI STUDIO	21
4.2.3 STATO PONDERALE	21
4.2.4 ATTIVITÀ FISICA	22
4.2.5 ABITUDINI ALIMENTARI	23
4.2.6 ADERENZA ALLA DIETA MEDITERRANEA	25
4.2.7 AMBIENTE DOMESTICO	26
4.2.8 CARATTERISTICHE DEI GENITORI	27
4.3 VALUTAZIONE DELLA QUALITÀ DELL'ARIA	27
4.3.1 ACQUISIZIONE DATI SUI PARAMETRI DELL'ARIA	27
4.3.2 COMPOSIZIONE DEL PARTICOLATO ATMOSFERICO	30
4.4 EFFETTI BIOLOGICI PRECOCI	32
4.4.1 PRELIEVO DEL CAMPIONE BIOLOGICO	32
4.4.2 TEST DEL MICRONUCLEO	32

4.4.3	COMET TEST	37
<b>5</b>	<b><u>CONCLUSIONI</u></b>	<b>38</b>
<b>6</b>	<b><u>BIBLIOGRAFIA</u></b>	<b>43</b>
	<b><u>IMP.AIR. STUDY GROUP</u></b>	<b>47</b>

## **PREMESSA**

IMP.AIR. è un progetto di iniziativa locale cofinanziato dal Consorzio Universitario Interprovinciale Salentino (CUIS) nell'ambito del "bando per il contributo 2012" che ha avuto l'obiettivo di studiare i principali fattori di rischio ambientale cui sono esposti i bambini di 6-8 anni residenti nei comuni di Sternatia, Galatina, Cutrofiano, Sogliano Cavour e Soleto e di valutare eventuali effetti biologici precoci riconducibili ad esposizioni ambientali o a stili di vita poco salubri.

Il progetto, realizzato dal Laboratorio di Igiene del Dipartimento di Scienze e Tecnologie Biologiche ed Ambientali (Di.S.Te.B.A.) dell'Università del Salento, ha avuto inizio il 15 ottobre 2013 e si è concluso due anni dopo. In questo periodo sono stati reclutati 122 bambini frequentanti le prime tre classi delle scuole primarie nei comuni oggetto di studio, sono stati indagati gli stili di vita dei soggetti reclutati, sono state raccolte informazioni sulla diffusione dei principali contaminanti aerei e sulla composizione del particolato atmosferico ed è stato condotto un monitoraggio biologico per verificare la presenza di marcatori di effetto biologico precoce nelle cellule della mucosa buccale dei bambini.

I risultati illustrati in questo rapporto contribuiscono alla definizione del livello di rischio per la salute dei bambini residenti nelle aree oggetto di studio e ad approfondire le conoscenze scientifiche utili a comprendere le ragioni alla base dell'epidemiologia di alcune malattie ambiente-correlate nella Provincia di Lecce.

# **1 BASE DI PARTENZA**

## **1.1 INQUINAMENTO ATMOSFERICO E CANCRO**

L'inquinamento dell'aria è un problema globale e rappresenta il principale fattore di rischio ambientale per la salute in Europa. Numerose indagini epidemiologiche hanno stabilito l'associazione tra esposizione ad inquinamento atmosferico, mortalità e morbosità nell'uomo e attribuito ad esso la riduzione della durata di vita e la diffusione di gravi patologie quali malattie cardiache, problemi respiratori e cancro. 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. In particolare, grande attenzione è stata data al particolato atmosferico (PM) e ai suoi potenziali effetti sulla salute. Un'associazione significativa è stata dimostrata tra esposizione a PM e incidenza e mortalità per patologie cardiovascolari e cancro al polmone e altre malattie cronico degenerative, legate a condizioni di stress ossidativo, infiammazione e di insulino-resistenza, come il diabete e l'obesità. L'Agenzia Internazionale per la Ricerca sul Cancro (IARC) nel 2013 ha dichiarato che l'inquinamento atmosferico ed il PM sono cancerogeni per l'uomo di classe A e causano il cancro al polmone.

Il PM è costituito da particelle inalabili a cui possono essere adsorbiti vari composti (metalli pesanti, idrocarburi policiclici aromatici, composti volatili). La frazione fine del particolato (<2,5µm) sembra avere un ruolo preponderante nell'insorgenza di queste patologie, in quanto, grazie alle ridotte dimensioni, penetra profondamente nel polmone; in particolare, le frazioni ultrafini (<0,5µm) raggiungono le regioni alveolari e passano nel torrente circolatorio inducendo effetti infiammatori e stress ossidativo. Alcuni dei parametri in grado di caratterizzare il particolato atmosferico, come la dimensione, la morfologia e la composizione chimica possono essere rivelate utilizzando il microscopio elettronico a scansione (Ebert et al., 2000; Ro et al., 2000; Sobanska et al., 2003).

Sebbene tutta la popolazione sia esposta all'inquinamento atmosferico, alcuni soggetti sono a rischio più alto di subire le conseguenze negative dell'esposizione ai composti chimici aerodispersi, in particolare i bambini, per vari motivi. Innanzitutto, i bambini 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. In secondo luogo, i bambini sono più vulnerabili agli effetti dell'inquinamento atmosferico per le loro dimensioni, lo sviluppo e l'im maturità dei loro organi (in particolare i polmoni) e funzioni corporee. Inoltre l'im maturità del sistema immunitario, la maggiore suscettibilità di tessuti e organi e i

meccanismi di riparazione cellulare non ancora maturi contribuiscono ad aumentare la loro suscettibilità. Alcuni dati suggeriscono, inoltre, che il danno genetico in età precoce può influenzare maggiormente il rischio di cancerogenesi rispetto ad un'esposizione più tardiva.

## ***1.2 I BIOMARCATORI DI EFFETTO PRECOCE***

Negli ultimi anni è cresciuta la consapevolezza che le politiche per la tutela della salute pubblica, messe in atto per prevenire le malattie legate all'ambiente, richiedono nuovi approcci per una valutazione precoce dei rischi per la salute derivanti dall'esposizione agli inquinanti. A causa di questa necessità la ricerca ha riservato una grande attenzione agli effetti precoci causati dal contatto con gli inquinanti.

Molti tumori, prima della comparsa dei sintomi riconoscono una fase di latenza più o meno lunga che comincia con l'esposizione ai contaminanti ambientali. Durante questa fase si susseguono una serie di eventi degenerativi che hanno inizio con alterazioni sub-cellulari, come i danni al DNA, per poi proseguire a livello di organi e di funzioni. Queste modificazioni, che possono essere accelerate o rallentate da fattori individuali e comportamentali, sono inizialmente reversibili. Per poter intraprendere azioni correttive efficaci diventa fondamentale riconoscere le condizioni "critiche" prima che queste possano tradursi in danni irreversibili per la salute.

In tal senso, l'approccio di epidemiologia molecolare risulta innovativo. Esso consente di misurare in maniera diretta la risposta biologica attribuita all'esposizione a composti mutageno/cancerogeni per mezzo di biomarcatori che misurano gli effetti molecolari osservabili nelle cellule e nei tessuti bersaglio (Bonassi et al., 2005). In questo contesto assumono particolare importanza il Test del Micronucleo (MN) (Fenech et al., 2007) e il Comet test (Collins 2004). Essi sono stati proposti come biomarcatori per lo studio delle sostanze inquinanti disperse nell'aria, poiché consentono di individuare effetti precoci in seguito ad esposizioni croniche ad agenti tossici. Sempre più spesso questi test vengono utilizzati in studi di monitoraggio biologico di popolazione per valutare il danno genotossico, in quanto rilevano la presenza di alterazioni nella struttura cromosomica e danno ossidativo causato da inquinanti atmosferici (Fairbairn et al., 1995; Szeto et al., 2005; Celik et al., 2004; Bonassi et al., 2007; Burlinson et al., 2007; Iarmarcovai et al., 2007; Holland et al., 2008; Collis et al., 2008; Dhawan et al., 2009; Fracasso et al., 2009; Samanta et al., 2012).

Questi biomarcatori possono essere studiati in vari tipi di cellule, come leucociti di sangue periferico e linfociti, ma anche cellule buccali esfoliate della mucosa orale e leucociti salivari (Bonassi et al., 2005; Holland et al., 2008; Ceretti et al., 2014), quest'ultimo considerato un metodo meno invasivo.

Tuttavia, qualsiasi risposta biologica rilevata deve essere interpretata in riferimento alle altre condizioni di esposizione, che variano sia individualmente che nel tempo e nello spazio a seconda non solo della qualità dell'aria, ma anche in base agli stili di vita e allo stato di salute generale dei soggetti presi in considerazione. Diversi fattori possono influenzare gli effetti dell'inquinamento atmosferico, modulando la risposta dell'organismo, sia in termini di aggravamento che di attenuazione del danno. Tra di essi, particolare interesse rivestono l'alimentazione, l'attività fisica e l'esposizione ad altri inquinanti, come quelli presenti all'interno delle abitazioni.

In letteratura, numerosi studi condotti sia sugli adulti che sui bambini hanno fornito prove riguardanti la correlazione positiva tra la frequenza di biomarcatori ad effetto biologico precoce e fattori come l'obesità (Torres et al., 2009; Scarpato et al., 2011), le malattie respiratorie (Rossnerova et al., 2011; Elsayh et al., 2013), la residenza in zone con alti livelli di traffico veicolare (Abou et al., 2007), l'esposizione al fumo passivo (Neri et al., 2003), i composti tossici che si formano durante la preparazione di alimenti utilizzando alcuni metodi di cottura (alla griglia, alla piastra, frittura, tostatura, affumicatura) (Jägerstad et al., 2005; Katic et al., 2010; Wang et al., 2011) e l'utilizzo di prodotti da disinfezione in piscine coperte (Kogevinas et al., 2010). Al contrario, un elevato livello di istruzione dei genitori (Mielżyńska et al., 2006; Kapka et al., 2007), un equilibrato apporto di nutrienti, vitamine e antiossidanti nella dieta (Fenech et al., 1994; Umegaki et al., 1994; Fenech et al., 2005; Moller et al., 2006; Thomas et al., 2011) e un esercizio fisico moderato (Fenech et al., 2011) potrebbe essere inversamente correlato alla frequenza di MN. Inoltre, la frequenza dei biomarcatori potrebbe essere soggetta a variazioni stagionali, in quanto gli effetti genotossici del particolato atmosferico risultano essere più intensi nel periodo invernale rispetto a quello estivo (Abou et al., 2007; Binkova et al., 1999; Castano et al., 2004). Tuttavia, altri fattori con differenti distribuzioni stagionali, ad esempio la luce del sole, l'alimentazione, le allergie e l'esercizio fisico, possono altresì contribuire a determinare differenze stagionali nella frequenza di danni al DNA (Verschaeve et al., 2007).



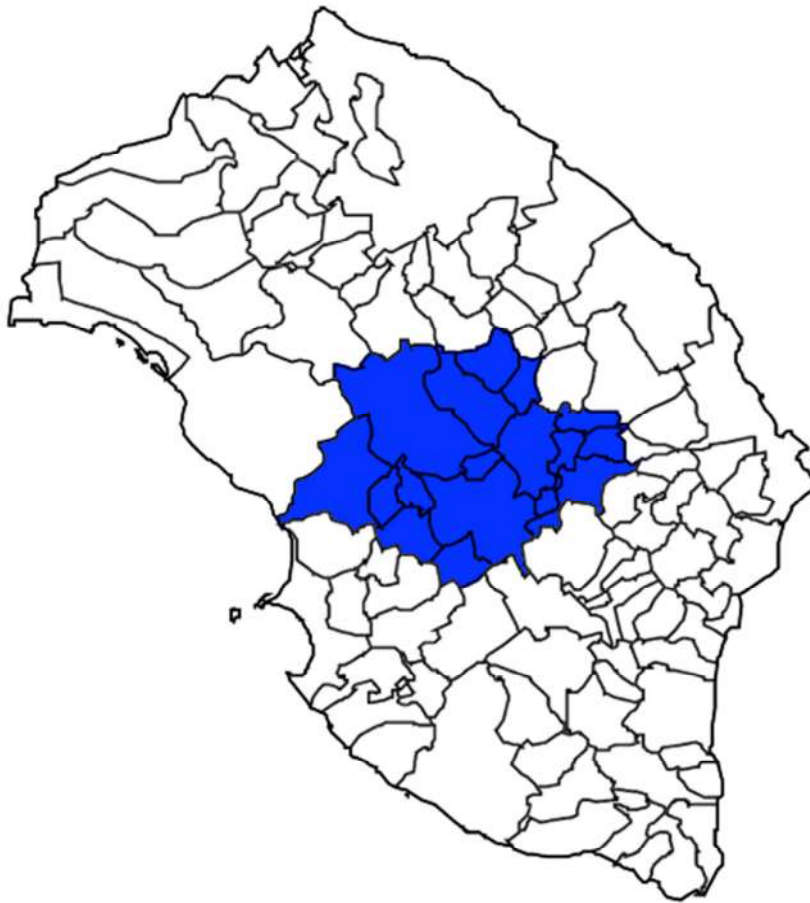
### **1.3 IL TUMORE POLMONARE NEL SALENTO**

Secondo i dati del "Rapporto Mortalità 2012" dell'Istituto Superiore di Sanità, i tassi standardizzati di mortalità per tutte le cause (per 100.000 abitanti) in provincia di Lecce sono in linea con il dato atteso e paragonabile con altre aree del Sud Italia. In questo quadro generale, emerge tuttavia una criticità riguardante l'epidemiologia del tumore del polmone. Ma mentre nelle donne la mortalità per tumore polmonare è inferiore (-37%) al dato nazionale, negli uomini i tassi di mortalità provinciali, 126,1/100.000 (1980-1984) ed 111,1 (2006-2010) risultano essere sempre superiori a quelli nazionali e regionali. Il dato provinciale potrebbe essere frutto di incrementi di mortalità attribuibili a singoli Comuni ovvero ad aree ben definite. Nell'analisi della distribuzione spazio-temporale del tumore polmonare attraverso i dati di mortalità e incidenza stimata dal Registro Tumori della Provincia di Lecce per gli anni 2006-2010 (Minelli et al., 2014) è stato individuato un "cluster" per elevata mortalità negli uomini in un'area centro-orientale del Salento leccese (Fig. 1), comprendente 50 Comuni, con 3.846 decessi registrati, contro i 3.447 attesi (+12%).



**Figura 1:** Area "cluster" ad elevata mortalità per cancro al polmone comprendente 50 comuni della Provincia di Lecce (Minelli et al., 2014)

Anche riguardo i dati di incidenza, le neoplasie polmonari nella popolazione maschile salentina hanno fatto registrare un numero di nuovi casi superiore all'atteso, con un tasso di incidenza standardizzato pari a 87.6/100.000 (contro un dato medio di 72.9/100.000 nelle Regioni del Nord Italia e 63.8/100.000 nelle regioni meridionali) e con il distretto di Galatina al vertice, seguito da quelli di Poggiardo, Casarano e Maglie. In uno studio specifico condotto dall'Istituto Superiore di Sanità, l'incidenza di tumori polmonari nei maschi ha evidenziato una nuova area "cluster" ben definita (355 casi confermati contro 285 attesi, +24%) (Fig. 2), inclusa nell'area "cluster" per la mortalità (ad eccezione del comune di Galatone), che includeva 16 Comuni dell'area centrale salentina tra cui i Comuni di Galatina, Cutrofiano, Sogliano Cavour, Soleto e Sternatia, promotori del progetto IMP.AIR.



**Figura 2:** Area "cluster" ad elevata incidenza di carcinoma polmonare comprendente 16 Comuni della Provincia di Lecce (Minelli et al., 2014)

## **2 OBIETTIVI DELLO STUDIO**

La base di partenza per lo studio è stata la consapevolezza che l'inquinamento ambientale deve essere gestito in modo tale da intervenire con risposte precoci rispetto ai danni potenziali sulla salute umana. Pertanto, le politiche progettate per prevenire le malattie legate all'ambiente necessitano di nuovi approcci metodologici per l'identificazione precoce dei rischi derivanti dall'esposizione alle sostanze inquinanti.

Questo tema rientra tra le priorità del Programma Quadro di Ricerca e Innovazione "Horizon 2020" che prevede lo studio delle relazioni tra ambiente e salute, per la promozione della salute, la comprensione dei determinanti della salute e la prevenzione delle malattie.

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

La difficoltà maggiore nell'intraprendere azioni opportune ed efficaci è determinare se l'esposizione attuale di una popolazione ad una certa condizione ambientale può essere causa in futuro di danni alla salute dei cittadini.

Molti tumori, prima della comparsa dei sintomi riconoscono una fase di latenza più o meno lunga che comincia con l'esposizione ai contaminanti ambientali. Durante questa fase si susseguono una serie di eventi degenerativi che hanno inizio con alterazioni sub-cellulari, come i danni al DNA, per poi proseguire a livello di organi e di funzioni. Queste modificazioni, che possono essere accelerate o contrastate da fattori individuali e comportamentali, sono inizialmente reversibili. Per poter individuare condizioni ambientali "critiche" ed intraprendere, pertanto, azioni correttive efficaci diventa fondamentale riconoscere questi cambiamenti biologici prima che possano tradursi in danni irreversibili per la salute. Uno dei metodi più efficaci per riconoscere le situazioni di rischio per la salute è la determinazione dei biomarcatori di effetto biologico precoce, come i micronuclei. Questi rappresentano un indicatore di danno al DNA cellulare indicativo dell'esposizione di una popolazione a fattori di rischio.

In particolare, l'individuazione di questi indicatori nei bambini può essere predittiva dell'insorgenza di patologie croniche in età adulta.

L'obiettivo principale del progetto è stato, pertanto, quello di studiare gli effetti biologici precoci associati all'esposizione ad inquinanti atmosferici ed a fattori individuali e comportamentali in grado di influenzare tali effetti in bambini di 6-8 anni residenti nel territorio dei Comuni di Sternatia, Galatina, Cutrofiano, Sogliano Cavour e Soleto.

In particolare:

- a) è stata valutata la frequenza di micronuclei, quali indicatori di danno al DNA associato all'esposizione ambientale, nelle cellule della mucosa buccale di una coorte di bambini reclutata nell'area geografica interessata;
- b) sono stati valutati i fattori individuali, quelli legati al contesto domestico e allo stile di vita dei bambini in grado di esercitare un effetto confondente sulle risposte biologiche misurate;
- c) è stata valutata la qualità dell'aria nel territorio oggetto di studio sia attraverso l'acquisizione dei dati rilevati da ARPA-Puglia sia attraverso il posizionamento di un campionatore al fine di valutare la composizione del particolato.

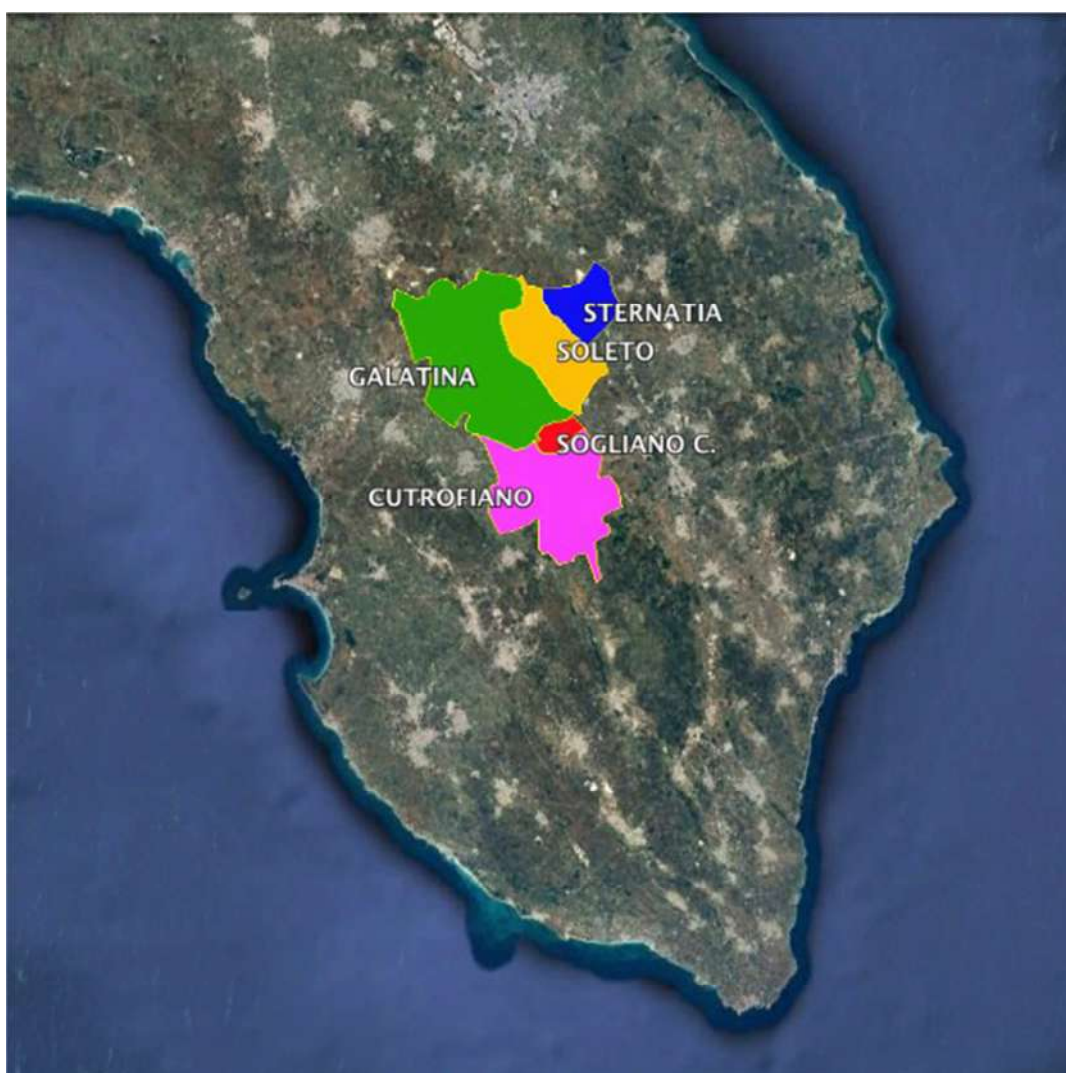
### 3 DISEGNO DELLO STUDIO

#### 3.1 BACINO TERRITORIALE INTERESSATO

##### 3.1.1 Popolazione

Il Progetto IMP.AIR. è uno studio epidemiologico che ha coinvolto i bambini di età compresa tra 6 e 8 anni residenti in 5 comuni della provincia di Lecce (Cutrofiano, Galatina, Sogliano Cavour, Soleto e Sternatia) e frequentanti la scuola primaria.

Il bacino territoriale interessato (Fig. 3) si estende nel cuore della Provincia di Lecce per 188,97 kmq e comprende una popolazione di 48.084 abitanti, il 60% della quale è concentrata nel solo comune di Galatina (Tab. 1).



**Figura 3.** Bacino territoriale incluso nello studio.

<b>Comune</b>	<b>Superficie territoriale (Kmq)</b>	<b>Popolazione totale</b>	<b>Densità demografica (Ab/Kmq)</b>
Cutrofiano	55,72	9.045	162
Galatina	81,62	27.109	332
Sogliano Cavour	5,17	4.114	796
Soletto	29,95	5.496	184
Sternatia	16,51	2.320	141
<b>TOTALE</b>	<b>188,97</b>	<b>48.084</b>	<b>254</b>

**Tabella 1.** Indicatori territoriali e demografici dei Comuni compresi nel territorio studiato.

### 3.1.2 Epidemiologia del cancro al polmone

Come detto dal punto di vista epidemiologico l'area oggetto di studio è inclusa in un'area "cluster" ad elevata mortalità per tumore al polmone di cui fanno parte 50 comuni della parte centro-orientale della Provincia di Lecce, e in un sottocluster ad elevata incidenza per lo stesso tipo di tumore di cui fanno parte 16 comuni.

Dai dati contenuti nelle tavole di mortalità dell'Osservatorio Epidemiologico Regionale (OER-Puglia) (Tab. 2) si può constatare che complessivamente nei cinque comuni coinvolti nello studio IMP.AIR. il numero di morti per carcinoma polmonare osservati nella popolazione maschile nel decennio 2000-2009 è risultato pari a 284 contro un numero di attesi di 197,7 mentre nella popolazione femminile è risultato pari a 33 contro 36,8 attesi.

Pertanto, il rapporto standardizzato di mortalità (SMR) per cancro al polmone negli anni 2000-2009 nella popolazione maschile è di 143,5 mentre in quella femminile è di 89,7.

<b>Comune</b>	<b>Maschi</b>			<b>Femmine</b>		
	<b>Osservati</b>	<b>Attesi</b>	<b>SMR</b>	<b>Osservati</b>	<b>Attesi</b>	<b>SMR</b>
Cutrofiano	65	37,7	172,4	4	6,9	58,1
Galatina	127	109,2	116,3	20	20,6	97,0
Sogliano Cavour	39	16,2	241,1	5	3,1	163,1
Soletto	36	23,1	156,1	3	4,1	73,2
Sternatia	17	11,8	143,5	1	2,1	47,5
<b>TOTALE</b>	<b>284</b>	<b>197,9</b>	<b>143,5</b>	<b>33</b>	<b>36,8</b>	<b>89,7</b>

**Tabella 2.** Morti osservati, attesi e rapporto standardizzato di mortalità (SMR) nella popolazione maschile ed in quella femminile dei cinque comuni coinvolti nello studio negli anni 2000-2009.

### **3.2 FASI DELLO STUDIO**

Lo studio è stato condotto dal Laboratorio di Igiene del Dipartimento di Scienze e Tecnologie Biologiche ed Ambientali dell'Università del Salento ed è stato articolato in diverse fasi:

1. RECLUTAMENTO di un numero rappresentativo di bambini frequentanti la scuola primaria nei Comuni interessati dal Progetto;
2. ANALISI DELLE VARIABILI INDIVIDUALI: raccolta delle informazioni sulle esposizioni domestiche, sulle caratteristiche socio-demografiche e sugli stili di vita dei bambini mediante la somministrazione di un questionario ai genitori;
3. VALUTAZIONE DELLA QUALITÀ' DELL'ARIA: valutazione della qualità dell'aria cui i bambini sono stati esposti sia attraverso la raccolta dei dati rilevati dalla centralina ARPA localizzata nell'area di studio sia attraverso un campionamento ambientale diretto effettuato nel periodo di studio.
4. EFFETTI BIOLOGICI PRECOCI: valutazione della presenza di modificazioni al DNA nelle cellule della mucosa buccale dei bambini.

### **3.3 ASPETTI ETICI**

Il progetto è stato sottoposto al parere del Comitato Etico della ASL di Lecce.

Tutti i genitori delle classi selezionate hanno ricevuto l'informativa dello studio e, nel caso di accettazione alla partecipazione, espresso il consenso al trattamento dei dati personali, firmando il relativo modulo. Anche i bambini hanno partecipato alla scelta riguardante la partecipazione allo studio esprimendo la loro volontà nel "modulo di assenso del minore" appositamente predisposto.

Tutti i dati sono stati raccolti ed analizzati secondo quanto disciplinato dal Decreto Legislativo n. 196 del 30/6/2003 "Codice in materia di protezione dei dati personali" e successive integrazioni, per gli scopi della ricerca.

### **3.4 ELABORAZIONE DEI DATI**

Tutti i dati ottenuti dalle fasi precedentemente descritte sono stati inseriti in un database utilizzando fogli di calcolo di Microsoft Excel per l'elaborazione. I dati sono stati quindi sottoposti ad elaborazione statistica con il software "MedCalc statistical" (Ver. 12.3).

Per ogni variabile quantitativa è stata calcolata media, deviazione standard, massimo, minimo e, dopo aver verificato la distribuzione, sono state evidenziate eventuali correlazioni fra gruppi attraverso il test one-way ANOVA, per distribuzioni normali, oppure il test di Mann-Whitney quando i valori erano distribuiti in maniera non normale. I dati relativi alle variabili qualitative (frequenze) sono stati confrontati utilizzando il Test del chi-quadrato. In tutti i casi le differenze sono state considerate significative con  $p < 0.05$ .



## 4 ATTIVITÀ E RISULTATI

### 4.1 RECLUTAMENTO

La popolazione oggetto dello studio appartiene alla popolazione studentesca di 6-8 anni dei comuni di Cutrofiano, Galatina, Sogliano Cavour, Soleto e Sternatia (Tab. 3), costituita complessivamente da 1.213 bambini, 622 maschi (51,3%) e 591 femmine (48,7%).

<b>Comune</b>	<b>Maschi (n)</b>	<b>Femmine (n)</b>	<b>Totale (n)</b>
Cutrofiano	116	97	213
Galatina	363	358	721
Sogliano Cavour	52	43	95
Soleto	64	67	131
Sternatia	27	26	53
<b>TOTALE</b>	<b>622</b>	<b>591</b>	<b>1.213</b>

**Tabella 3.** Popolazione studentesca relativa ai bambini di 6-8 anni nei comuni interessati dallo studio.

Nei 5 comuni coinvolti nello studio sono state selezionate 6 scuole primarie (Tab. 4) ed avviati i contatti con i rispettivi dirigenti scolastici e gli insegnanti al fine di presentare gli obiettivi dello studio e le attività da svolgere presso le scuole ed ottenere l'accettazione formale alla partecipazione.

<b>Comune</b>	<b>Scuola</b>
Cutrofiano	Scuola Primaria "Don Milani" (Istituto Comprensivo "Don Bosco")
Galatina	Scuola Primaria di Via Arno (Istituto Comprensivo Polo 2)
Noha	Scuola Primaria di Via Petronio (Istituto Comprensivo Polo 2)
Sogliano Cavour	Scuola Primaria "Mons. Giuseppe Palamà" (Ist. Comp. "Don Bosco")
Soleto	Scuola Primaria (Istituto Comprensivo "G. Falcone e P. Borsellino")
Sternatia	Scuola Primaria (Istituto Comprensivo "G. Falcone e P. Borsellino")

**Tabella 4:** Scuole reclutate nei comuni della provincia di Lecce partecipanti allo studio.

I genitori di tutti i bambini frequentanti le prime tre classi di queste scuole sono stati informati dello studio ed invitati alla partecipazione chiedendo loro di firmare il modulo di consenso appositamente predisposto dopo aver verificato che i loro figli non rientravano nei

criteri di esclusione (bambini con patologie gravi e/o sottoposti negli ultimi mesi a radioterapia, chemioterapia, esami radiografici e che usano apparecchi ortodontici) (Tab. 5).

<b>Criteri di esclusione dallo studio</b>
Suo figlio risiede in un Comune diverso da Cutrofiano/Galatina/Sogliano Cavour/Soletto/Sternatia?
Suo figlio ha più di 9 anni?
Negli ultimi 12 mesi suo figlio è stato sottoposto a radioterapia o chemioterapia?
Negli ultimi 12 mesi suo figlio ha o ha avuto un tumore maligno?
Nell'ultimo mese suo figlio è stato sottoposto a radiografie?
Suo figlio ha malattie genetiche (es. sindrome di Down)?
Suo figlio utilizza un apparecchio ortodontico?
Rispondere SI o NO alle domande. 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.

**Tabella 5:** Criteri di esclusione dallo studio.

In totale, sono stati invitati a partecipare allo studio 338 bambini frequentanti 19 classi delle scuole selezionate. Tra quelli che hanno restituito il consenso informato firmato dai genitori, 122 (36,1%), corrispondenti al 10% della popolazione studentesca di 6-8 anni (1.213 bambini), sono risultati idonei allo studio. Il numero di bambini reclutati per ciascuna scuola, è riportato in Tab. 6.

<b>Scuola</b>	<b>Numero di bambini idonei allo studio</b>
Cutrofiano, Scuola Primaria "Don Milani"	27
Galatina, Scuola Primaria di Via Arno	35
Noha, Scuola Primaria di Via Petronio	5
Sogliano Cavour, Scuola Primaria "Mons. Giuseppe Palamà"	20
Soletto, Scuola Primaria	17
Sternatia, Scuola Primaria	18
<b>Totale</b>	<b>122</b>

**Tabella 6:** Numero di bambini che hanno aderito allo studio.

## **4.2 ANALISI DELLE VARIABILI INDIVIDUALI**

### **4.2.1 Somministrazione del questionario**

Per la rilevazione delle variabili individuali è stato utilizzato un questionario precedentemente validato (Zani et al, 2015).

Tale questionario (Fig. 4) è stato somministrato, nelle settimane precedenti il campionamento biologico, a tutti i genitori dei bambini che avevano espresso consenso favorevole alla partecipazione allo studio.

Lo scopo del questionario è stato quello di caratterizzare la coorte di bambini selezionata ed identificarne i possibili fattori di rischio legati allo stile di vita ed alle condizioni socio-economiche, in grado di influenzare gli effetti biologici precoci come il danno al DNA.


Il questionario comprendeva 148 domande a risposta chiusa suddivise in varie sezioni:

- caratteristiche del bambino (genere, data e nazione di nascita, peso e altezza);
- stato di salute (problemi respiratori al di fuori dei comuni raffreddori, consumo di farmaci oltre i comuni farmaci come antibiotici, antipiretici e antinfiammatori);
- attività fisica (attività sportive, piscina, gioco all'aria aperta);
- abitudini alimentari (frequenza di consumo delle principali categorie alimentari; consumo di cibi cotti alla griglia e alla piastra, fritti, affumicati, pizza cotta a legna, pane tostato).
- informazioni sull'ambiente domestico (intensità del traffico nei pressi dell'abitazione, incluso il traffico da veicoli pesanti, combustibile utilizzato per il riscaldamento e per la cottura dei cibi, presenza di caldaia a gas, stufe e caminetti all'interno dell'appartamento, presenza di persone che fumano in casa, uso di solventi per hobby).
- caratteristiche dei genitori (nazione di nascita, livello di istruzione e di occupazione, abitudine al fumo);

I dati di tutti i bambini sono stati trattati con garanzia di riservatezza ai sensi delle normative vigenti (privacy). Per ogni questionario è stato generato un codice numerico a 3 cifre che è stato utilizzato anche per identificare il campione biologico associato allo stesso bambino.

L'età esatta del bambino al momento del test è stata calcolata a partire dalla data di nascita indicata sul questionario. I dati per il peso e l'altezza fornita dai genitori sono stati usati per calcolare l'indice di massa corporea dei bambini (BMI).

PROGETTO CUIS PER IL CONTRIBUTO 2012



**IMP.AIR.**

**Impatto della qualità dell'aria sulla salute della popolazione residente nel territorio dei Comuni di Sternatia, Galatina, Cutrofiano, Sogliano Cavour e Soleto**

**QUESTIONARIO PER I GENITORI**

**INFORMATIVA SUL QUESTIONARIO**

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 compilato deve essere riportato a scuola e consegnato all'insegnante in busta chiusa.

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 dal Dipartimento di Scienze e Tecnologie Biologiche e Ambientali dell'Università del Salento.

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

**Suo figlio ha già compiuto 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.

2

**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    2 | 9 | GIORNO    0 | 3 | MESE    2 | 0 | 0 | 6 | 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                      03  
 DATA DI NASCITA    2 | 9 | GIORNO    0 | 3 | MESE    2 | 0 | 0 | 6 | ANNO

3

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

**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

5

**Figura 4:** Alcune sezioni del questionario somministrato ai genitori: copertina, informativa e criteri di esclusione, guida alla compilazione e sezione riguardante le caratteristiche dell'abitazione.

#### 4.2.2 Caratteristiche della popolazione di studio

Dall'elaborazione delle risposte ai questionari è emerso che la coorte di bambini analizzata era costituita da 67 (54,9%) maschi e 55 (45,1%) femmine. Al momento del reclutamento, 34 bambini (27,9%) avevano 6 anni, 41 (33,6%) ne avevano 7 e infine 47 (38,5%) bambini avevano 8 anni (Tab. 7) con un'età media di circa 7,5 anni.

<b>Età (anni)</b>	<b>Maschi</b>	<b>Femmine</b>	<b>Totale</b>
6	21	13	34
7	24	17	41
8	22	25	47
<b>Totale</b>	<b>67</b>	<b>55</b>	<b>122</b>

**Tabella 7:** Caratteristiche (genere ed età) della coorte di bambini analizzata.

Riguardo le caratteristiche individuali, dall'analisi delle risposte date dai genitori al questionario autosomministrato è emerso che i bambini reclutati sono nati quasi tutti in Italia (99,2%), mediamente hanno un peso di  $28,3 \pm 7,6$  kg ed un'altezza di  $127,2 \pm 8,7$  cm ed un BMI medio di  $17,247 \pm 2,892$  kg/m<sup>2</sup>. Infine, il 20,5% dei soggetti hanno riportato disturbi respiratori al di fuori dei comuni raffreddori (Tab. 8).

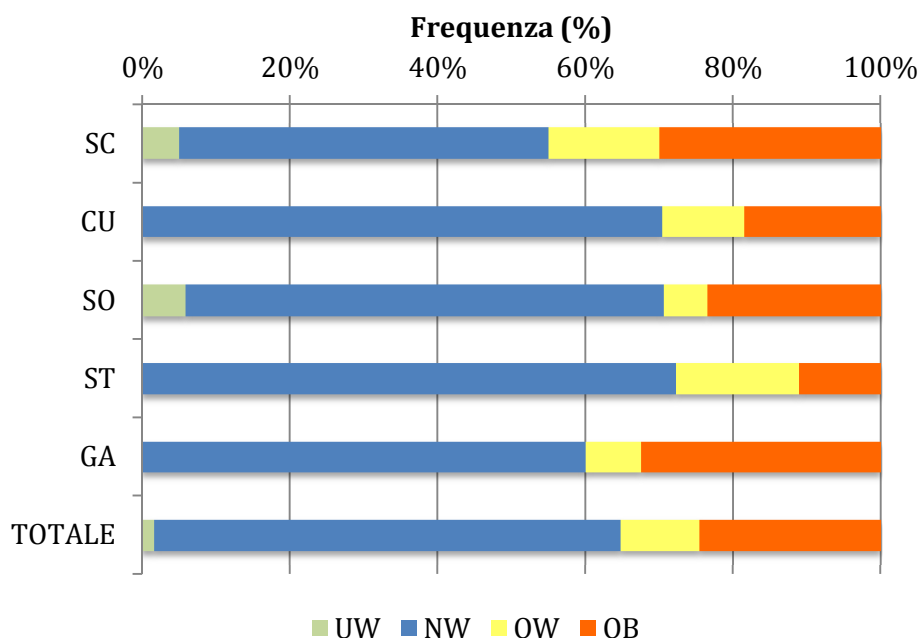
<b>Variabile</b>	<b>Unità di misura</b>	<b>Valore</b>
Nati in Italia	N (%)	121 (99,2%)
Peso	kg $\pm$ DS	$28,3 \pm 7,6$
Altezza	cm $\pm$ DS	$127,2 \pm 8,7$
BMI	kg/m <sup>2</sup> $\pm$ DS	$17,247 \pm 2,892$
Disturbi respiratori (al di fuori dei comuni raffreddori)	N (%)	25 (20,5%)

**Tabella 8:** Caratteristiche (nazione di nascita, peso, altezza, BMI, disturbi respiratori) dei bambini partecipanti allo studio.

#### 4.2.3 Stato ponderale

Il BMI di ciascun bambino è stato utilizzato per valutare se il soggetto era di peso normale (NW), sovrappeso (OW) oppure obeso (OB). I cut-off per le categorie OW, OB e UW sono stati fissati seguendo i criteri stabiliti dall'International Obesity Task Force (IOTF) secondo le indicazioni di Cole et al. (2000; 2007).

L'elaborazione dei dati ha permesso di verificare che al momento dell'indagine il 63,1% dei bambini era normopeso. La quota di bambini in eccesso ponderale, comprendente anche gli obesi (24,6%), era pari al 35,3% mentre quella di sottopeso era uguale all'1,6% (Fig. 5).



**Figura 5:** Stato ponderale dei bambini partecipanti allo studio.

#### 4.2.4 Attività fisica

In tabella 9 sono riportati i risultati relativi all'attività fisica svolta dai soggetti partecipanti allo studio.

Il 53,3% dei bambini partecipanti allo studio svolge regolare attività sportiva per almeno 3 volte la settimana, di questi 38 (31,7%) all'aperto e 11 (9,0%) in piscina. Il 20,5% gioca tutti i giorni per più di 2 ore all'aria aperta.

Variabile	Unità di misura	Valore
Attività sportiva ( $\geq 3$ volte/settimana)	N (%)	65 (53,3%)
Sport all'aperto	N (%)	38 (31,7%)
Piscina	N (%)	11 (9,0%)
Gioco all'aria aperta ( $>2$ ore/giorno)	N (%)	25 (20,5%)

**Tabella 9:** Attività fisica svolta dai bambini partecipanti allo studio.

#### **4.2.5 Abitudini alimentari**

La sezione del questionario relativa alle abitudini alimentari comprendeva 117 domande sulla frequenza di consumo di alcuni alimenti nell'ambito dei diversi pasti giornalieri effettuati sia in casa sia a scuola ed eventualmente nella mensa scolastica. I diversi cibi sono stati suddivisi nei seguenti gruppi alimentari: pane, pasta, pizza e focacce, legumi, verdure, frutta fresca, frutta secca, carne rossa e processata, carni bianche, prodotti ittici, uova, latte e prodotti caseari, dolci, snack salati, bevande non alcoliche. Il questionario conteneva anche una breve sezione riguardante il tipo di grasso (burro, olio di oliva, olio di semi, margarina) utilizzato per la preparazione, la cottura ed il condimento dei cibi.

Per ciascun alimento i genitori che compilavano il questionario potevano scegliere fra sette diverse opzioni concernenti la frequenza di consumo, elencate in ordine crescente da "mai" a "2 volte al giorno". Per l'olio d'oliva la porzione corrispondeva ad 1 cucchiaino d'olio (circa 10 g) mentre per il burro ad una noce di burro (circa 10 g). Per le bevande zuccherate invece, sono state considerate due ulteriori categorie di consumo, "4 volte o più al giorno" e "6 volte o più al giorno", in quanto, spesso, questo tipo di alimento viene assunto anche diverse volte durante la giornata.

Per poter effettuare le opportune analisi statistiche e calcolare il consumo medio di ciascun alimento le categorie di consumo sono state trasformate in valori numerici secondo i seguenti criteri: alla categoria di consumo "mai" è stato associato il valore 0 porzioni/settimana; a "meno di una volta la settimana" 0,5 porzioni/settimana; a "1-2 volte la settimana" 1,5 porzioni/settimana; a "3-4 volte la settimana" 3,5 porzioni/settimana; a "5-6 volte la settimana" 5,5 porzioni/settimana; a "tutti i giorni" 7 porzioni/settimana; a "2 volte al giorno" 14 porzioni/settimana; a "4 o più volte al giorno" 28 porzioni/settimana ed infine alla categoria "6 o più volte al giorno" 42 porzioni/settimana.

La frequenza di consumo dei principali alimenti da parte dei bambini partecipanti allo studio IMP.AIR., per categorie alimentari, è riportata nella tabella 10.

In relazione al consumo di alimenti preparati con particolari metodi di cottura (tab. 11) è emerso che molti dei soggetti reclutati sono soliti consumare cibi cotti con modalità considerate "a rischio" per la produzione di sostanze potenzialmente tossiche o cancerogene come l'acrilammide, le ammine eterocicliche, le nitrosammine e gli idrocarburi policiclici aromatici (Wang et al., 2011; Jägerstad and Skog, 2005; Katic et al., 2010). In particolare, nel mese precedente l'indagine, il 91% dei bambini ha consumato cibi fritti, il 79,5% pizza cotta a legna ed il 59,0% cibi cotti alla griglia.

<b>Categoria alimentare</b>	<b>Consumo medio settimanale (porzioni/settimana)</b>
Pane	6,97
Pasta, riso, minestre	10,36
Pizza e focacce	1,70
Legumi	0,80
Verdure	2,19
Patate	1,51
Frutta fresca	20,67
Frutta secca	1,10
Carne rossa e processata	6,29
Carni bianche	2,02
Prodotti ittici	3,74
Uova	1,33
Latte e prodotti caseari	16,42
Dolci	14,28
Snack salati	1,88
Bevande zuccherate	7,06
Olio d'oliva	7,98*
Burro	1,06**

**Tabella 10:** Frequenza di consumo media in porzioni settimanali dei principali alimenti e bevande per categorie alimentari (\*cucchiaini d'olio/settimana; \*\* noci di burro/settimana).

<b>Variabile</b>	<b>Unità di misura</b>	<b>Valore</b>
Consumo di cibi fritti	N (%)	111 (91,0%)
Consumo di pizza cotta a legna	N (%)	97 (79,5%)
Consumo di cibi alla griglia	N (%)	72 (59,0%)
Consumo di cibi alla piastra	N (%)	59 (48,4%)
Consumo di pane tostato	N (%)	45 (36,9%)
Consumo di cibi affumicati	N (%)	23 (18,9%)

**Tabella 11:** Consumo di cibi preparati con particolari modalità di cottura nel mese precedente l'indagine.



#### 4.2.6 Aderenza alla dieta mediterranea

Dall'analisi dei dati riguardanti le frequenze di consumo dei principali alimenti emerge che in media i bambini dei comuni di Sternatia, Galatina, Cutrofiano, Sogliano Cavour e Soletto, rispetto ai criteri alla base di un'alimentazione salutare come la Dieta Mediterranea (Serra-Majem et al., 2004), consumano carni rosse e processate, dolci, bevande zuccherate e burro in eccesso mentre mangiano bassissime quantità di legumi e verdure fresche o cotte. Il consumo di cereali, frutta, pesce e prodotti caseari, invece, sembra in linea con gli apporti nutrizionali raccomandati per i bambini.

Successivamente, è stata valutata l'aderenza del regime alimentare di ciascun bambino alla dieta mediterranea calcolando l' "Italian Mediterranean Index" (IMI) secondo i criteri descritti da Agnoli et al. (2011) (con l'esclusione del consumo di alcol) trasformando le quantità di riferimento da g/giorno a porzioni/settimana secondo gli standard quantitativi delle porzioni indicati dalla Società Italiana di Nutrizione Umana (SINU, 2014). L'indice IMI è basato sul consumo di 10 categorie alimentari: 6 alimenti tipicamente mediterranei (pasta, verdure, frutta, legumi, pesce ed olio d'oliva) e 4 alimenti non mediterranei (bevande zuccherate, burro, carne rossa e patate). Se il consumo degli alimenti mediterranei era compreso nel terzo terzile della distribuzione veniva assegnato il punteggio di 1, negli altri casi veniva assegnato il punteggio di 0. Al contrario per gli alimenti non mediterranei veniva assegnato 1 se il consumo era compreso nel primo terzile della distribuzione, 0 quando il consumo era superiore.

I risultati (Tab. 12) rivelano che nessuno dei bambini reclutati ha mostrato un livello di aderenza alla dieta mediterranea "elevato", il 24,6% ha evidenziato un livello di aderenza "moderato" mentre il 75,4 dei bambini ha abitudini alimentari lontane dal modello dietetico mediterraneo.

<b>Livello di aderenza alla DM</b>	<b>IMI</b>	<b>N</b>	<b>%</b>
Elevato	0-3	0	0
Moderato	4-5	30	24,6
Basso	6-10	92	75,4

**Tabella 12:** Livello di aderenza alla DM dei bambini partecipanti allo studio IMP.AIR. valutato calcolando l'indice IMI.

#### 4.2.7 Ambiente domestico

I dati relativi all'ambiente domestico (Tab. 13) evidenziano che il 27,9% dei bambini vive in aree percepite dai genitori come ad intenso traffico ed il 15,7% in aree ad elevata percorrenza di mezzi pesanti. Il combustibile utilizzato per il riscaldamento delle abitazioni dei soggetti reclutati è principalmente il gas (82,3%), seguito dalla legna (9,2%) e dal gasolio e dall'elettricità (3,8%), mentre il combustibile usato per cucinare è quasi esclusivamente rappresentato dal gas (91,0%). Il boiler a gas all'interno dell'appartamento è presente nel 3,3% dei casi mentre la presenza di almeno una persona che fuma in casa è stata rilevata nel 20,5% dei questionari. Nella maggior parte delle abitazioni (68,6%) si effettua la cottura di cibi alla griglia o alla piastra mentre i solventi per hobby vengono utilizzati solo nell'1,6% delle case.

Variabile	Unità di misura	Valore
Residenti in aree a traffico intenso	N (%)	34 (27,9%)
Residenti in aree ad intenso traffico di mezzi pesanti	N (%)	19 (15,7%)
Combustibile per il riscaldamento:		
Gas	N (%)	107 (82,3%)
Legna/pellet		12 (9,2%)
Gasolio/kerosene		5 (3,8%)
Elettricità		5 (3,8%)
Altro		1 (0,8%)
Combustibile per la cottura:		
Gas	N (%)	121 (91,0%)
Elettricità		9 (6,8%)
Legna/carbone		3 (2,3%)
Presenza di boiler a gas in casa	N (%)	4 (3,3%)
Convivenza con persone che fumano in casa	N (%)	25 (20,5%)
Soggiorno in ambienti chiusi con fumatori	N (%)	2 (1,6%)
Frequente presenza del bambino durante la cottura dei cibi	N (%)	23 (19,2%)
Cottura in casa di cibi alla piastra/griglia	N (%)	83 (68,6%)
Utilizzo di solventi per hobby	N (%)	2 (1,6%)

**Tabella 13:** Caratteristiche dell'ambiente domestico.

#### 4.2.8 Caratteristiche dei genitori

Oltre il 90% dei genitori dei bambini partecipanti è nato in Italia (Tab. 14). Il 70,5% delle madri ed il 59,5% dei padri è in possesso del diploma di maturità o di un titolo superiore mentre solo il 47,5% delle madri svolge un'attività lavorativa contro il 91% dei padri. L'abitudine al fumo, infine, è diffusa maggiormente nei papà (38,8%) rispetto alle mamme (12,3%)

Variabile	Unità di misura	Valore
Nati in Italia Madre Padre	N (%)	110 (90,2%) 112 (92,6%)
Diploma di maturità Madre Padre	N (%)	86 (70,5%) 72 (59,5%)
Tasso di occupazione Madre Padre	N (%)	58 (47,5%) 106 (91,4%)
Abitudine al fumo Madre Padre	N (%)	15 (12,3%) 47 (38,8%)

**Tabella 14:** Caratteristiche dei genitori dei bambini partecipanti allo studio.

### 4.3 VALUTAZIONE DELLA QUALITÀ DELL'ARIA

Per verificare se i bambini residenti nell'area oggetto di studio sono esposti a contaminanti atmosferici è stata effettuata la raccolta dei dati rilevati nel 2015 dalla stazione di campionamento dell'aria dell'ARPA-Puglia localizzata a Galatina. Inoltre, nel periodo di studio, è stato effettuato un monitoraggio ambientale diretto posizionando un campionario nel cortile della scuola primaria di Noha e valutando la composizione del particolato raccolto.

#### 4.3.1 Acquisizione dati sui parametri dell'aria

Per effettuare la caratterizzazione chimica dell'aria sono stati raccolti i dati relativi ai principali parametri della qualità dell'aria (CO, NO<sub>2</sub>, SO<sub>2</sub>, O<sub>3</sub>, PM<sub>2.5</sub>) misurati di routine dalle centraline dell'Agenzia Regionale per la Prevenzione e la Protezione dell'Ambiente

(ARPA). In particolare, sono stati analizzati i dati rilevati nel 2015 dalla centralina “I.T.C. La Porta” situata in Viale degli Studenti a Galatina. Per ogni parametro sono stati calcolati: il numero di giorni di campionamento nell'anno 2015, la media annuale, l'intervallo di confidenza al 95%; è stato, inoltre, verificato il rispetto del limite (valore obiettivo) stabilito dal D. Lgs. 155/2010 entrato in vigore il 13 agosto 2010 e modificato dal D. Lgs. 250 del 24 dicembre 2012.

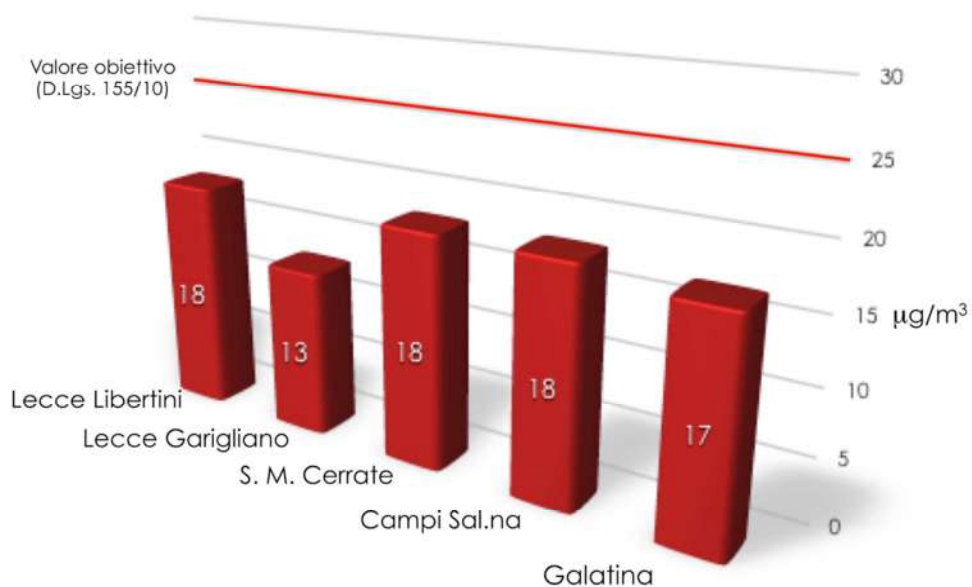
I livelli di PM<sub>2.5</sub>, CO, NO<sub>2</sub> ed SO<sub>2</sub>, (Tab. 15) sono risultati più bassi del valore obiettivo indicato dalla normativa. In particolare, il PM<sub>2.5</sub>, è apparso in linea con i livelli di particolato registrati dalle altre stazioni di monitoraggio atmosferico ARPA della Provincia di Lecce (Fig. 6) ed il suo andamento temporale negli ultimi anni (Fig. 7) appare in leggero decremento. L'O<sub>3</sub>, invece, ha superato spesso nel corso del 2015 il livello di sicurezza (Tab. 16). Invece, la concentrazione dell'ozono nel 2015 ha superato per ben 67 volte il "valore obiettivo" che la normativa prevede possa essere superato solo 25 volte in un anno civile.

<b>Variabile</b>	<b>PM<sub>2.5</sub></b>	<b>NO<sub>2</sub></b>	<b>CO</b>	<b>SO<sub>2</sub></b>
N giorni di campionamento	363	349	345	357
Media annuale (µg/m <sup>3</sup> )	17,0	26,4	0,6	5,97
Valore massimo (µg/m <sup>3</sup> )	62,0	63,0	1,6	21,5
Intervallo di confidenza (95%) (µg/m <sup>3</sup> )	16,08-17,92	25,26-27,54	0,56-0,64	5,76-6,18
Valore obiettivo (µg/m <sup>3</sup> )	25	40	10	125

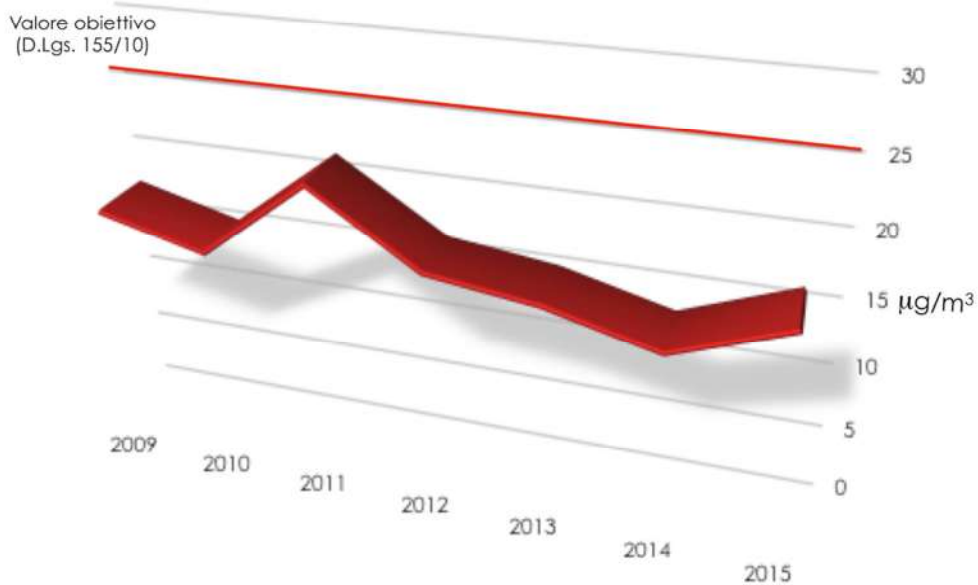
**Tabella 15:** Concentrazione degli inquinanti rilevati dalla centralina ARPA situata a Galatina

<b>Variabile</b>	<b>Valore</b>
Giorni di campionamento (N)	341
Media annuale (µg/m <sup>3</sup> )	103,3
Valore massimo (µg/m <sup>3</sup> )	166
Intervallo di confidenza (95%) (µg/m <sup>3</sup> )	101,4-105,2
Valore obiettivo (µg/m <sup>3</sup> )	120
Superamenti consentiti del valore obiettivo (N)	25
Superamenti osservati del valore obiettivo (N)	67
Valore di informazione (µg/m <sup>3</sup> )	180
Valore di allarme (µg/m <sup>3</sup> )	240

**Tabella 16:** Variabili relative al parametro Ozono (O<sub>3</sub>) monitorato dalla centralina ARPA situata a Galatina



**Figura 6:** Valore medio delle concentrazioni di PM<sub>2,5</sub> registrato nelle centraline ARPA della Provincia di Lecce nell'anno 2015 e confronto con il "valore obiettivo" indicato nel D.Lgs 155/10.



**Figura 7:** Andamento temporale del valore medio del PM<sub>2,5</sub> registrato dalla centralina ARPA di Galatina dal 2009 al 2015 e confronto con il "valore obiettivo" indicato nel D.Lgs 155/10

### 4.3.2 Composizione del particolato atmosferico

Il PM si mostra sotto differenti morfologie e dimensioni, risulta perciò un notevole vantaggio, nello studio del particolato atmosferico, la possibilità di visualizzare le superfici con dettagli micro/nano-metrici. Diversi sono gli strumenti microanalitici che possono essere utilizzati per l'analisi delle singole particelle e tra queste la microscopia elettronica a scansione (SEM) unita alla microanalisi a raggi X a dispersione di energia (EDX) è risultata essere la tecnica più versatile ed ampiamente utilizzata.

E' stato raccolto, tramite una pompa a basso volume, un campione di aria nei pressi dell'Istituto Comprensivo Polo 2, sede di Noha. Il filtro su cui è stato raccolto il PM<sub>10</sub> prima di essere analizzato tramite SEM-EDS è stato ricoperto da un sottile film di oro attraverso l'evaporazione sottovuoto. I parametri operativi del SEM sono stati i seguenti:

- Tensione del fascio: 20 kV;
- Tempo ottimale di acquisizione: 30 Lsec;
- Work distance: 15 nm;
- Low vacuum:  $4,3 \cdot 10^{-2} Pa$   $4,3 \cdot 10^{-2}$

L'analisi particella per particella ha riguardato sia l'individuazione delle caratteristiche morfologiche, sia la caratterizzazione chimica elementare.

Per ciascuna particella è stata determinata la concentrazione percentuale di: C, N, O, Na, Mg, Al, S, Si, P, Cl, K, Ca, Ti, V, Cr, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, Cd, Sn e Pb.

Dall'analisi della composizione e della morfologia delle particelle del campione di PM<sub>10</sub> sono state individuate 6 famiglie di particolato predominanti:

- Alluminosilicati

Queste particelle si originano di solito dall'erosione delle formazioni geologiche locali, in seguito a scavi o lavori di costruzione (Moreno et al., 2004). Particelle caratterizzate dagli stessi elementi chimici ma con morfologia sferica si originano invece da fonti antropogeniche (come le flyash prodotte da combustibili fossili) (Katrinak and Zygarlicke, 1995). Le particelle di origine naturale hanno una forma irregolare, mentre le flyash prodotte per combustione hanno tipicamente una forma sferica.

- Particelle ricche in Calcio

I composti del calcio sono associati ad elementi come Si, Al, Mg e Fe, tutti comuni elementi cristallini, ma possono essere prodotti dai processi industriali dei cementifici o dal traffico su strade in calcestruzzo (Post et al., 1984).

I carbonati di Ca e Mg, derivano sostanzialmente da processi di erosione del suolo e delle rocce e, nell'ambiente urbano, dal deterioramento degli edifici (Paoletti et al., 2003). Particelle ricche di calcio contenenti una frazione inferiore di P, possono essere legate alla presenza del minerale apatite, molto comune ed usato come base dell'industria dei fertilizzanti fosfatici, dell'industria chimica dei sali dell'acido fosforico e del fosforo.

- Sali (Sea Salt ed Aged Sea Salt)

Particelle caratterizzate dalla presenza di Na e Cl e in misura diversa S, Mg e Ca. Queste particelle sono caratterizzate principalmente da esser assimilabili a dei cubi e in minor misura a dei parallelepipedi. La morfologia e la composizione chimica è tipica del sale marino e sale marino invecchiato (sea salt e aged sea salt).

- Particelle ricche in Ferro

Sono state rilevate sia particelle costituite essenzialmente da Fe ed O (ossidi di ferro) sia particelle che oltre al ferro presentano alte quantità di S, Ca e/o Si (iron mixture). Queste ultime particelle si possono originare come agglomerati di differenti particelle primarie (principalmente ossidi e silicati) o si originano dalla condensazione di aerosol secondario su particelle primarie di ossidi di ferro (Ebert et al., 2012).

- Particelle Secondarie

Una grande parte di materiale in sospensione è composto da aerosol secondario derivato da reazioni chimiche tra gas in atmosfera, incluso SO<sub>2</sub>, NO<sub>x</sub> e composti organici. I maggiori componenti di questo particolato diventano solfati, nitrati e composti carboniosi. Per questa composizione complessa queste particelle vengono definite *particelle secondarie*.

- Particelle carboniose

Questa classe di particelle ha come elemento principale il carbonio. Queste possono essere emesse sia da fonti antropogeniche che naturali e a seconda di ciò le particelle si ritrovano ad avere forme molto variabili. Nella nostra analisi abbiamo distinto alcuni sottogruppi tipici di questa classe e cioè *soot*, *flyash*, *carboniose irregolari*, *carboniose biologiche* distinguibili solo per aspetto morfologico e non per composizione chimica in quanto il carbonio contenuto nella particella non può essere quantificato dato il substrato in policarbonato (Ebert et al., 2004; 2002).

#### **4.4 EFFETTI BIOLOGICI PRECOCI**

##### **4.4.1 Prelievo del campione biologico**

Nel mese di maggio 2015 i bambini eligibili, i cui genitori avevano compilato un questionario valido, sono stati sottoposti al monitoraggio biologico mediante il prelievo di un campione di cellule della mucosa buccale.

Il campionamento è stato effettuato in maniera semplice e non invasiva in modo da renderlo accettabile sia dai bambini sia dai genitori. È stato chiesto ai bambini di sciacquare due volte la bocca con una soluzione salina (NaCl 0,45%) e la saliva è stata raccolta in tubi contenenti 15 ml di soluzione fisiologica (NaCl 0,9%). I campioni di saliva sono stati destinati al Comet test. Successivamente, sono state prelevate le cellule epiteliali della mucosa orale mediante strofinamento dell'interno della guancia con uno spazzolino da denti a setole morbide, che è stato poi immerso in tubi contenenti 15 ml di *Buccal Cell Buffer* (BCB) pH=7,0 destinati al Test del micronucleo,

##### **4.4.2 Test del micronucleo**

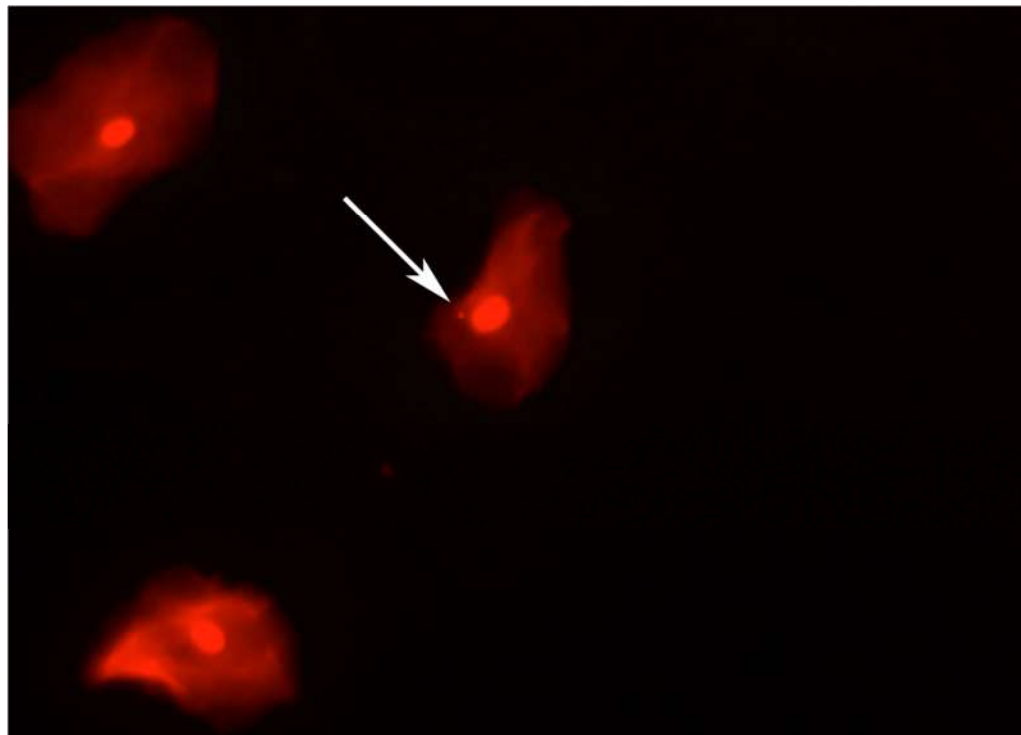
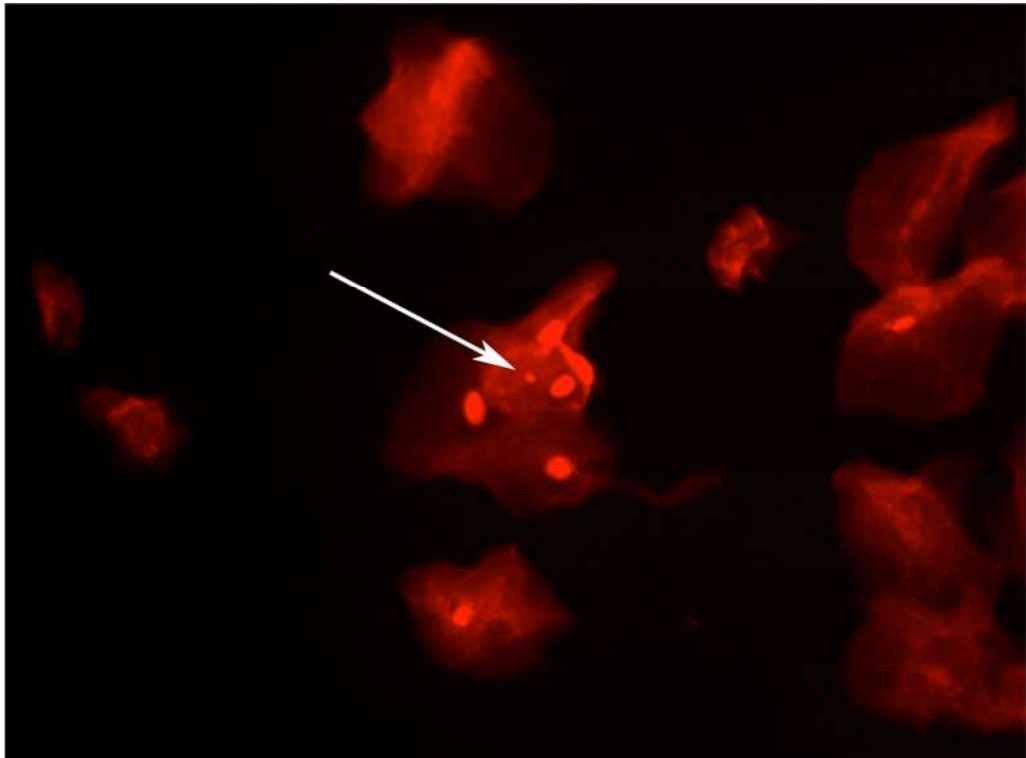
Dopo almeno 24 h di permanenza del campione prelevato in BCB, si è proceduto alla preparazione delle cellule, secondo il metodo di Thomas et al. (2009).

Si è dunque passati alla valutazione dell'entità del danno al DNA mediante la lettura di tutti i vetrini relativi al monitoraggio biologico condotto sulle cellule della mucosa orale dei bambini reclutati mediante Test del MN. I vetrini sono stati esaminati a 1000X sia in campo chiaro sia in fluorescenza (emissione: lunghezza d'onda 580-620 nm) (Figg. 8 e 9). Per ciascun vetrino sono state esaminate 1000 cellule per determinare la frequenza dei micronuclei.

Il test del MN è stato eseguito in totale su 122 bambini. I campioni leggibili sono risultati pari a 94 (77%); il principale motivo che ha reso impossibile la lettura di tutti i vetrini preparati è stata la scarsa presenza di cellule in 28 campioni.

Il numero dei campioni che sono risultati positivi (presenza di almeno 1 MN/1000 cellule differenziate) è stato pari a 39 (41,5%), mentre la frequenza media è risultata di 0,49 MN/1000 cellule (Tab. 12).





**Figure 8 e 9:** Osservazione dei vetrini al microscopio elettronico a fluorescenza: le frecce indicano dei micronuclei nelle cellule della mucosa buccale dei bambini arruolati nello studio MAPEC\_LIFE.

Città	Vetrini leggibili	Campioni positivi		Media positivi (MN/1000 cellule)
		n	%	
Cutrofiano	26	9	34,6%	0,38
Galatina	23	11	47,8%	0,61
Noha	0	-	-	-
Sogliano Cavour	12	4	33,3%	0,33
Soletto	16	9	56,2%	0,69
Sternatia	17	6	35,3%	0,41
<b>Totale</b>	<b>94</b>	<b>39</b>	<b>41,5%</b>	<b>0,49</b>

**Tabella 17:** Dati relativi al numero di vetrini leggibili, alla percentuale e alla media dei positivi in relazione alle 6 città prese in esame.

In tabella 13 sono riportati i risultati relativi all'associazione tra campioni positivi o frequenza di micronuclei nelle cellule della mucosa buccale e alcuni fattori individuali o comportamentali.

Per quanto riguarda il genere, il 41,8% dei maschi è risultato positivo al test del MN, con una frequenza media di 0,45 MN/1000 cellule, mentre, tra le femmine, è risultato positivo il 41,0% dei campioni, con una concentrazione di 0,55 MN/1000 cellule.

I bambini di 6 anni hanno mostrato una positività del 34,5% dei campioni, con una frequenza media di 0,41 MN/1000 cellule, i bambini di 7 anni del 41,9%, con una media di 0,48 MN/1000 cellule, e i bambini di 8 anni del 47,1%, con una media di 0,56 MN/1000 cellule.

Per quanto riguarda lo stato nutrizionale, l'analisi dei risultati ottenuti con il test del MN ha evidenziato la presenza di MN nel 55,0% dei campioni di bambini obesi (OB), con una frequenza media di 0,65 MN/1000 cellule, mentre i bambini normopeso avevano un tasso di positività del 37,8% ed una frequenza media di 0,44 MN/1000 cellule.

Tra le abitudini alimentari responsabili dell'allontanamento dalla Dieta Mediterranea il consumo di carne maggiore di 4 porzioni/settimana è risultato associato ( $p < 0,05$ ) alla prevalenza di campioni con micronuclei. Infatti, il 49,2% dei bambini che usualmente consumano più di 4 porzioni/settimana di carne rossa o processata presentano almeno un micronucleo nelle cellule della mucosa buccale, con una frequenza di 0,53 MN/1000 cellule, mentre tra i bambini che consumano quantità di carne inferiori la positività è pari al 25,8% e la frequenza media di 0,41 MN/1000 cellule.

In relazione all'attività fisica, i bambini che praticano regolarmente sport con una frequenza di almeno 3 volte a settimana presentano una percentuale di campioni positivi (36,0%) e una frequenza di MN (0,42 MN/1000 cellule) inferiori, sebbene non in maniera significativa ( $p > 0,05$ ) rispetto ai bambini che, invece, praticano sport con una frequenza minore o che non lo praticano affatto (campioni positivi: 47,6%; frequenza media: 0,57 MN/1000 cellule). Inoltre, tra i bambini che giocano per più di 2 ore al giorno all'aperto la percentuale di campioni positivi è risultata del 33,3% con una frequenza di 0,44 MN/1000 cellule mentre tra gli altri bambini la positività è stata del 43,4% e la frequenza media di 0,50 MN/1000 cellule.

I bambini che vivono in aree in cui viene percepita un'alta intensità di traffico, presentano una positività nel test MN (46,2%) e una frequenza media di MN (0,58 MN/1000 cellule) leggermente maggiori ( $p > 0,05$ ) rispetto ai bambini che vivono in aree con un livello di traffico giudicato moderato (positività: 39,7%; frequenza: 0,46 MN/1000 cellule).

Per quanto riguarda l'associazione tra danni al DNA e l'esposizione al fumo passivo, la positività al test del MN fra i figli di donne fumatrici (69,2%) è apparsa significativamente maggiore ( $p < 0,05$ ) rispetto alla positività fra i figli di donne non fumatrici (37,0%). La frequenza in questo caso è risultata pari rispettivamente a 0,75 MN/1000 cellule e 0,45 MN/1000 cellule. Le differenze appaiono meno accentuate se si considera l'abitudine al fumo del padre. In questo caso le cellule buccali del 48,6% dei bambini con padre fumatore sono risultate positive al test del MN con una frequenza media di 0,59 MN/1000 cellule mentre tra i bambini con padre non fumatore la positività è stata del 36,8% e la frequenza di 0,42 MN/1000 cellule. Inoltre, è emerso che il 44,8% dei campioni prelevati da bambini che vivono con persone solite fumare all'interno dell'abitazione presentano almeno un micronucleo con una frequenza di 0,50 MN/1000 cellule.

Il livello di istruzione dei genitori non sembra incidere in maniera significativa sulla presenza di micronuclei nelle cellule della mucosa buccale dei bambini sebbene i valori più alti siano stati registrati in bambini con madre (positività: 46,4%; frequenza: 0,50 MN/1000 cellule) o padre (positività: 45,9%; frequenza: 0,51 MN/1000 cellule) in possesso di titoli di istruzione inferiori al diploma di maturità.

Variabili		Campioni positivi (%)	Frequenza di MN (MN/1000 cellule)
Genere	M	41,8	0,45
	F	41,0	0,55
	valore di p	0,939	0,245
Età	6	34,5	0,41
	7	41,9	0,48
	8	47,1	0,56
	valore di p	0,357	0,790
Stato nutrizionale	NW	37,8	0,44
	OB	55,0	0,65
	Valore di p	0,167	0,209
Consumo di carne	>4 porz/sett	49,2	0,53
	≤4 porz/sett	25,8	0,41
	valore di p	0,030	0,230
Sport (≥3 volte a settimana)	SI	36,0	0,42
	NO	47,6	0,57
	valore di p	0,249	0,252
Gioco all'aperto (>2 ore/giorno)	SI	33,3	0,44
	NO	43,4	0,50
	valore di p	0,435	0,432
Intensità del traffico	BASSO	39,7	0,46
	ALTO	46,2	0,58
	valore di p	0,570	0,783
Madre fumatrice	SI	69,2	0,75
	NO	37	0,45
	Valore di p	0,029	0,113
Padre fumatore	SI	48,6	0,59
	NO	36,8	0,42
	valore di p	0,256	0,241
Convivenza con persone che fumano in casa	SI	44,8	0,50
	NO	40,8	0,49
	valore di p	0,777	0,701
Livello di istruzione della madre	BASSO	46,4	0,50
	ALTO	39,4	0,48
	valore di p	0,527	0,604
Livello di istruzione del padre	BASSO	45,9	0,51
	ALTO	38,6	0,47
	valore di p	0,479	0,581

**Tabella 18:** Campioni positivi (%) e frequenza media di MN (MN/1000 cellule) nelle cellule della mucosa orale dei bambini campionati in relazione ad alcune variabili investigate nel questionario.

#### 4.4.3 Comet test

Il Comet test sui leucociti della bocca è stato condotto in accordo con il metodo di Singh et al. (*A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. Exper Cell Res. 1988;175:184-191*).

La sospensione cellulare in soluzione fisiologica è stata centrifugata 10 minuti, (1100g, 4°C) e le cellule risospese in 1 ml di PBS. La sopravvivenza cellulare dei leucociti è stata determinata usando la metodica di esclusione con Trypan blue. Per la valutazione del danno al DNA, i vetrini, dopo la colorazione, sono stati analizzati al microscopio a fluorescenza mediante sistemi automatici.

Il Comet Test è stato eseguito su tutti i campioni prelevati ma solo il 6% di questi è risultato valido.

Questo tipo di indagine effettuata sui leucociti salivari dei bambini inclusi nello studio ha dato molti problemi di lettura, che non hanno permesso di ottenere dei risultati sul livello di danno primario al DNA in queste cellule. Come già successo per lo stesso test effettuato nello studio Mapec\_LIFE (*Monitoring air pollution effects on children for supporting public health policy*), 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. Questo rende necessario un'ulteriore messa a punto del metodo al fine di aumentare il numero di nuclei leggibili per spot e per ridurre le impurità.

## 5 CONCLUSIONI

Lo studio condotto ha permesso di valutare la frequenza di biomarcatori di effetto biologico precoce fra i bambini residenti nelle città di Cutrofiano, Galatina, Sogliano Cavour, Soletto e Sternatia e di associarli ad alcune variabili ambientali e comportamentali.

Nelle cellule della mucosa buccale del 41,5% dei bambini reclutati sono state evidenziate modificazioni a carico del DNA rilevabili mediante micronuclei con una frequenza media di 0,49 MN/1000 cellule differenziate.

Il livello di biomarcatori non è trascurabile e potrebbe indicare una condizione di rischio per la salute futura della popolazione che tuttavia può essere rimossa se venissero allontanate le cause.

Infatti, l'effetto biologico precoce evidenziato nelle cellule dei bambini, sebbene non sembri elevato se paragonato alle popolazioni di altri paesi europei (Bonassi et al., 2011), è sensibilmente più alto di quello riscontrato tra i bambini di Lecce della stessa età, campionati con gli stessi metodi e nella stessa stagione (progetto MAPEC\_LIFE) (De Donno et al., 2016). Occorre sottolineare, tuttavia, che la presenza di danni al DNA nella popolazione pediatrica non fornisce indicazioni sulla salute del singolo bambino ma è un segnale di quanto tutta la popolazione sia esposta ad un possibile danno.

La prevalenza di micronuclei riscontrata potrebbe essere attribuita alla frequenza di alcuni fattori ambientali e/o comportamentali.

Riguardo la presenza di contaminanti atmosferici, l'unica stazione di monitoraggio presente nell'area (Galatina) ha evidenziato che le concentrazioni di particolato, limitatamente al PM<sub>2,5</sub>, e i livelli di NO<sub>2</sub>, CO ed SO<sub>2</sub> sono nel complesso accettabili in quanto le medie annuali risultano inferiori al "valore obiettivo" indicato nel Decreto Legislativo 155 del 2010.

L'ozono, invece, supera spesso il livello di sicurezza previsto dalla normativa. Tale parametro è un inquinante secondario che si forma in atmosfera attraverso reazioni fotochimiche tra altre sostanze (tra cui gli ossidi di azoto e i composti organici volatili). Il processo di formazione è catalizzato dalla radiazione solare, per cui le concentrazioni più elevate si registrano nei mesi più caldi dell'anno. Alti livelli di ozono sono responsabili di effetti acuti sulla salute delle persone esposte e rappresentano un indice di possibile presenza di altri inquinanti.

Purtroppo dai dati disponibili non è possibile verificare i livelli di concentrazione di diversi inquinanti fondamentali nella definizione della qualità dell'aria e del possibile rischio per la

salute umana come il PM10, il benzene, gli idrocarburi policiclici aromatici ed i metalli pesanti.

Alcuni stili di vita non salutari riscontrati nella popolazione indagata potrebbero aver accentuato l'effetto biologico derivante dall'esposizione ai contaminanti ambientali e contribuito al manifestarsi di alterazioni a carico del DNA nelle cellule della bocca dei bambini individuabili attraverso i micronuclei.

In particolare, dall'analisi delle variabili antropometriche è emerso che il 35% dei bambini partecipanti è in eccesso ponderale ed addirittura il 24% risulta obeso. Queste percentuali sono più alte delle medie nazionali ma in linea con gli studi che evidenziano una elevata frequenza di bambini sovrappeso nelle regioni del sud (Nardone et al., 2016). La maggior parte dei bambini, inoltre, ha mostrato abitudini alimentari spesso poco salutari con un frequente consumo di cibi considerati "a rischio" ed una bassa aderenza alla dieta mediterranea. Questo regime alimentare, invece, rappresenta un modello dietetico altamente raccomandato in quanto equilibrato e ricco di sostanze (antiossidanti) in grado di contrastare i danni al DNA compresa la formazione di micronuclei (Fenech et al., 1994; Fenech et al., 2005; Moller and Loft, 2006; Thomas et al., 2011; Sofi et al., 2014).

Dallo studio del contesto familiare risulta che molti dei bambini partecipanti allo studio sono esposti al fumo passivo vivendo all'interno di abitazioni in cui è presente almeno un fumatore. Infatti, quasi il 40% dei padri ha l'abitudine di fumare sigarette, una quota notevolmente superiore a quello delle madri (circa il 12%) ed a quello registrato in altri studi condotti sui genitori dei bambini della stessa età (Bagordo et al. 2017). Oltre il 20% dei bambini vive in appartamenti in cui c'è almeno una persona che fuma all'interno dell'abitazione. L'esposizione al fumo passivo tra i bambini del progetto IMP.AIR. è più alta rispetto ai bambini di Lecce reclutati per uno studio analogo (progetto MAPEC\_LIFE) mentre l'esposizione al traffico sembra più bassa rispetto ai bambini del capoluogo salentino (Bagordo et al., 2017).

Tra gli aspetti positivi riguardanti gli stili di vita dei soggetti partecipanti occorre sottolineare quelli riguardanti l'attività fisica. Più della metà dei bambini, infatti, svolge regolare attività sportiva per almeno tre volte la settimana, mentre l'altra metà gioca all'aria aperta per almeno un'ora al giorno.

In tabella 19 è riportata la comparazione fra i risultati dello studio IMP.AIR e quelli dello studio MAPEC\_LIFE relativamente alla città di Lecce.

	<b>Parametro</b>	<b>Studio IMPAIR</b>	<b>MAPEC LIFE study (Città di Lecce)</b>
<b>Effetti biologici precoci</b>	Bambini reclutati (n)	122	241 <sup>(1)</sup>
	Campioni positivi al test del MN (%)	41,5	41,3 <sup>(1)</sup>
	Frequenza di MN (MN/1000 cellule)	0,49	0,24 <sup>(1)</sup>
<b>Qualità dell'aria</b> <sup>(2)</sup>	PM10 (media annuale, µg/m <sup>3</sup> ) (2015)	-	24 <sup>(3)</sup>
	PM10 (sup. limite giornaliero, n.) (2015)	-	7,5 <sup>(3)</sup>
	PM2,5 (media annuale, µg/m <sup>3</sup> ) (2015)	17,0	15,5 <sup>(3)</sup>
	Benzene (media annuale, µg/m <sup>3</sup> ) (2015)	-	1,05 <sup>(3)</sup>
	Benzo(a)pirene (media annuale, ng/m <sup>3</sup> ) (2014)	-	0,1 <sup>(4)</sup>
	Arsenico (media annuale, ng/m <sup>3</sup> ) (2014)	-	0,36 <sup>(4)</sup>
	Cadmio (media annuale, ng/m <sup>3</sup> ) (2014)	-	0,09 <sup>(4)</sup>
	Nichel (media annuale, ng/m <sup>3</sup> ) (2014)	-	2,1 <sup>(4)</sup>
	Piombo (media annuale, ng/m <sup>3</sup> ) (2014)	-	4,41 <sup>(4)</sup>
	NO <sub>2</sub> (media annuale, µg/m <sup>3</sup> ) (2015)	26,4	24 <sup>(3)</sup>
	SO <sub>2</sub> (media annuale, µg/m <sup>3</sup> ) (2015)	5,97	3,4 <sup>(4)</sup>
	CO (media annuale, µg/m <sup>3</sup> ) (2015)	0,6	0,7 <sup>(3)</sup>
	O <sub>3</sub> (sup. valore obiettivo, n.) (2015)	67	-
<b>Variabili individuali e comportamentali</b>	Bambini in eccesso ponderale (%)	35,3	31,0 <sup>(5)</sup>
	Bambini obesi (%)	24,6	15,3 <sup>(5)</sup>
	Bassa aderenza alla Dieta Mediterranea (%)	75,4	66,1 <sup>(6)</sup>
	Attività sportiva (≥ 3 volte/settimana) (%)	53,3	57,9 <sup>(5)</sup>
	Madri con diploma di maturità	70,5	85,1 <sup>(5)</sup>
	Padri con diploma di maturità	59,5	78,2 <sup>(5)</sup>
	Tasso di occupazione madri (%)	47,5	61,6 <sup>(5)</sup>
	Tasso di occupazione padri (%)	91,4	83,8 <sup>(5)</sup>
	Madri fumatrici (%)	12,3	20,2 <sup>(5)</sup>
	Padri fumatori (%)	38,8	28,6 <sup>(5)</sup>
	Convivenza con persone che fumano in casa (%)	20,5	12,8 <sup>(5)</sup>
	Residenza in aree ad intenso traffico (%)	27,9	29,3 <sup>(5)</sup>
	Consumo di cibi fritti (%)	91,0	82,2 <sup>(5)</sup>
	Consumo di pizza cotta a legna (%)	79,5	66,9 <sup>(5)</sup>
	Consumo di cibi alla griglia (%)	59,0	44,6 <sup>(5)</sup>
	Consumo di cibi alla piastra (%)	48,4	60,7 <sup>(5)</sup>
	Consumo di pane tostato (%)	36,9	50,4 <sup>(5)</sup>
Consumo di cibi affumicati (%)	18,9	19,8 <sup>(5)</sup>	

**Tabella 19:** Comparazione fra i risultati dello studio IMP.AIR. e quelli dello studio MAPEC\_LIFE relativamente alla città di Lecce. <sup>(1)</sup> De Donno et al., 2016. <sup>(2)</sup> <http://www.arpapuglia.it>. <sup>(3)</sup> Media fra le stazioni di monitoraggio ARPA di Via Garigliano e Piazza Libertini. <sup>(4)</sup> Dati rilevati dalla stazione di monitoraggio ARPA di Via Garigliano. <sup>(5)</sup> Bagordo et al., 2017. <sup>(6)</sup> Zani et al., 2016. - Dato non disponibile.



L'elaborazione dei dati desunti dal questionario e di quelli relativi alle indagini biologiche ha permesso di verificare alcune associazioni tra le variabili legate all'ambiente domestico e agli stili di vita e la frequenza di MN nei soggetti partecipanti allo studio.

Per quanto riguarda le caratteristiche individuali dei bambini, non sono state riscontrate differenze significative in relazione al genere, all'età ed allo stato ponderale, sebbene un tasso di positività più elevato e una maggiore concentrazione di MN sono stati osservati nei bambini obesi rispetto ai bambini di peso normale. Questa correlazione positiva è descritta in letteratura sia per i linfociti periferici (Scarpato et al., 2011) che per le cellule della mucosa orale (Torres et al., 2009) nei bambini in età scolare.

Tra le abitudini alimentari dei bambini partecipanti allo studio l'elevato consumo di carne rossa o processata sembra essere strettamente associato alla prevalenza di campioni con MN. La carne rossa occupa la parte alta della piramide alimentare descritta dalla Dieta Mediterranea e pertanto, secondo i principi di questo regime alimentare, non dovrebbe essere consumata con frequenza elevata in quanto potrebbe aumentare il rischio di patologie croniche e la frequenza di danni ossidativi al DNA evidenziabili con i MN.

Per quanto riguarda lo stile di vita dei bambini, è stata osservata una tendenza alla diminuzione di MN nelle cellule della mucosa buccale in associazione sia con l'attività sportiva che con il gioco all'aria aperta. Questi dati sembrano essere confermati da Fenech et al., 2011 sebbene in altri studi condotti in zone caratterizzate da elevato inquinamento atmosferico, la frequenza di danni al DNA sembra direttamente correlabile all'attività all'aperto (Battershill et al., 2008).

Le aree urbane caratterizzate da traffico intenso hanno un'alta concentrazione di inquinanti (particolato atmosferico, monossido di carbonio, biossido di zolfo, biossido di azoto, idrocarburi policiclici aromatici) e un alto rischio di danno genotossico per la popolazione residente che è stato ampiamente documentato (Abou et al., 2007). Nel nostro studio tale relazione è apparsa debole.

Più evidente, invece, è risultata l'associazione tra i MN ed il fumo passivo, soprattutto quando è la madre a fumare. Come descritto in letteratura (Neri et al., 2003), l'esposizione al fumo passivo sembra influenzare la frequenza e la concentrazione di MN nelle cellule della mucosa orale dei bambini. L'associazione tra le madri fumatrici e il danno genotossico nei bambini è stata dimostrata in alcuni studi (De Donno et al., 2016); questo deriva probabilmente dal più stretto legame tra madri e bambini piccoli in termini di tempo trascorso con loro e attività svolte insieme.

In conclusione, le criticità emerse nel corso dello studio IMP.AIR. meritano ulteriori ed opportuni approfondimenti al fine di definire in maniera più dettagliata il rapporto causa-effetto dei fenomeni individuati.

Occorrerebbe, in particolare, intensificare il monitoraggio degli inquinanti aerodispersi sia dal punto di vista qualitativo (tipologia di sostanze da ricercare) che quantitativo (numero di stazioni di monitoraggio), tenuto conto anche della elevata epidemiologia delle malattie croniche respiratorie, tra cui il cancro al polmone presente nell'area studiata.

Inoltre, dal momento che i micronuclei si sono dimostrati un buon indicatore, sarebbe auspicabile continuare la sorveglianza epidemiologico-molecolare estendendola anche ad altre aree critiche del Salento.

In ogni caso vi è la necessità di eseguire, a vari livelli, adeguati interventi di comunicazione in materia di rischi per la salute umana causati dall'inquinamento atmosferico e le misure per prevenirli. Come dimostrato in uno studio pilota nell'ambito del progetto Mapec\_LIFE al fine di valutare l'efficacia di alcuni strumenti educativi per quanto riguarda l'inquinamento (Carducci et al., 2016), i bambini sono molto sensibili alle tematiche ambientali e dimostrano di apprendere molto rapidamente i concetti sui corretti stili di vita per evitare effetti negativi sulla salute in seguito all'esposizione a sostanze nocive. Tuttavia, come sottolineato in altri studi (Dziubanek et al., 2013), è necessario prima di tutto insegnare ai genitori e alla comunità quali possono essere i rischi ambientali per la salute umana, tra cui quelli legati agli stili di vita, educarli circa la particolare vulnerabilità dei bambini mostrando loro come proteggere i loro figli attraverso l'adozione di pratiche che riducono i rischi di esposizione.

## 6 BIBLIOGRAFIA

1. Abou Chakra OR, Joyeux M, Nerrière E, Strub MP, Zmirou-Navier D. Genotoxicity of organic extracts of urban airborne particulate matter: an assessment within a personal exposure study. *Chemosphere* 2007;66(7):1375-81.
2. Agenzia Regionale per la Prevenzione e la Protezione Ambientale (ARPA) Relazione annuale sulla Qualità dell'Aria in Puglia, ARPA Puglia, Bari, Italia, 2014.
3. Agnoli C, Krogh V, Grioni S, et al. A priori- defined dietary patterns are associated with reduced risk of stroke in a large Italian cohort. *J Nutr* 2011;141:1552-8.
4. Bagordo F, De Donno A, Grassi T, Guido M, Devoti G, Ceretti E, et al. Lifestyles and socio-cultural factors among children aged 6-8 years from five Italian towns: the MAPEC\_LIFE study cohort. *BMC Public Health*, accepted on 22 February 2017.
5. Binkova B, Vesely D, Vesela D, Jelínek R, Srám RJ. Genotoxicity and embryotoxicity of urban air particulate matter collected during winter and summer period in two different districts of the Czech Republic. *Mutat Res* 1999;440:45-58.
6. Bonassi S, El-Zein R, Bolognesi C, Fenech M. Micronuclei frequency in peripheral blood lymphocytes and cancer risk: evidence from human studies. *Mutagenesis* 2011;26(1), pp. 93–100.
7. Bonassi S, Ugolini D, Kirsch-Volders M, Strömberg U, Vermeulen R, Tucker JD. Human population studies with cytogenetic biomarkers: review of the literature and future prospective. *Environ Mol Mutagen* 2005;45(2-3):258-70.
8. Bonassi S, Znaor A, Ceppi M, Lando C, Chang WP, Holland N, et al. An increased micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes predicts the risk of cancer in humans. *Carcinogenesis* 2007;28(3):625-31.
9. Burlinson B, Tice RR, Speit G, Agurell E, Brendler-Schwaab SY, Collins AR, et al. Fourth International Workgroup on Genotoxicity testing: results of the in vivo comet assay workgroup. *Mutat Res* 2007;627:31-5.
10. Carducci A, Casini B, Donzelli G, Verani M, Bruni B, Ceretti E, et al. Improving awareness of health hazards associated with air pollution in primary school children: design and test of didactic tools. *Appl Environ Educ Commun* 2016;15:247-60.  
DOI:10.1080/1533015X.2016.1181017
11. Castano-Vinyals G, D'Errico A, Malats N, Kogevinas M. Biomarkers of exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons from environmental air pollution. *Occup Environ Med* 2004;61(4):e12.
12. Çelik A, and Kanik A. Genotoxicity of occupational exposure to wood dust: Micronucleus frequency and nuclear changes in exfoliated buccal mucosa cells. *Environ Mol Mutagen* 2006;47(9):693-98.
13. Ceretti E, Feretti D, Viola GCV, Zerbini I, Limina RM, Zani C, 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. DOI:10.1371/journal.pone.0096524
14. Cole TJ, Bellizzi MC, Flegal KM, Dietz WH. Establishing a standard definition for child overweight and obesity worldwide: international survey. *BMJ* 2000;320:1240-3.
15. Cole TJ, Flegal KM, Nicholls D, Jackson AA. Body mass index cut offs to define thinness in children and adolescents: international survey. *BMJ* 2007;335:194.

16. Collins AR, Oscoz AA, Brunborg G, Gaivão I, Giovannelli L, Kruszewski M, et al. The comet assay: topical issues. *Mutagenesis* 2008;23:143-51.
17. Collins AR. The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations. *Mol Biotechnol* 2004;26(3):249-61.
18. De Donno A, Grassi T, Ceretti E, Viola GCV, Levorato S, Vannini S, et al. Air pollution biological effects in children living in Lecce (Italy) by buccal micronucleus cytome assay (the MAPEC\_LIFE study). *Int J Sus Dev Plann* 2016;4:500-10
19. Dhawan A, Anderson D. The comet assay in toxicology. RSC Publishing 2009.
20. Dziubanek G, Marchwińska-Wyrwał E, Piekut A, Hajok I, Bilewicz-Wyrozumska T, Kuraszewska B. Environmental Risks Perception – A Study of the awareness of families to threats in areas with increased health disorders in children. *Ann Agric Environ Med* 2013;20(3):555-8.
21. Ebert M, Müller-Ebert D, Benker N, Weinbruch S. Source apportionment of aerosol particles near a steel plant by electron microscopy. *J Environ Monit* 2012;14(12):3257-66.
22. Ebert M, Weinbruch S, Hoffmann P, Ortner HM. The chemical composition and complex refractive index of rural and urban influenced aerosols determined by individual particle analysis. *Atmos Environ* 2004;38:6531-45.
23. Ebert M, Weinbruch S, Rausch A, Gorzawski G, Hoffmann P, Wex H, Helas G. Complex refractive index of aerosols during LACE 98 as derived from the analysis of individual particles. *Journal of geophysical research* 2002;107:8121.
24. Ebert P, Urban K, Aballe L, Chen CH, Horn K, Schwarz G, Neugebauer J, Scheffler M. Symmetric versus nonsymmetric structure of the phosphorus vacancy on InP(110). *Phys Rev Lett* 2000;19;84(25):5816-9.
25. Elsayh KI, Sayed DM, Zahran AM, Saad K, Badr G. Effects of pneumonia and malnutrition on the frequency of micronuclei in peripheral blood of pediatric patients. *Int J Clin Exp Med* 2013;6(10):942-50.
26. Fairbairn DW, Olive PL, O'Neill KL. The Comet assay: a comprehensive review. *Mutat Res* 1995;339:37-59.
27. Fenech M and Bonassi S. The effect of age, gender, diet and lifestyle on DNA damage using micronucleus frequency in human peripheral blood lymphocytes. *Mutagenesis* 2011;26:43-9.
28. Fenech M, and Rinaldi J. The relationship between micronuclei in human lymphocytes and plasma levels of vitamin C, vitamin E, vitamin B12 and folic acid. *Carcinogenesis* 1994;15:1405-11.
29. Fenech M, Baghurst P, Luderer W, Turner J, Record S, Ceppi M, Bonassi S. 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.
30. Fenech M. Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. *Nat Protoc* 2007;2(5):1084-104.
31. Feretti D, Ceretti E, De Donno A, Moretti M, Carducci A, Bonetta S, et al. Monitoring air pollution effects on children for supporting public health policy: the protocol of the prospective cohort MAPEC study. *BMJ Open* 2014;4(9) e006096.
32. Fracasso ME, Doria D, Carrieri M, Bartolucci GB, Quintavalle S, De Rosa E. DNA single- and double-strand breaks by alkaline- and immuno-comet assay in lymphocytes of workers exposed to styrene. *Toxicol Lett* 2009;185(1):9-15.
33. Gilli G. 2010. Professione igienista, manuale dell'igiene ambientale e territoriale. Casa editrice Ambrosiana, Milano. pp. 512.

34. Grassi T, De Donno A, Bagordo F, Serio F, Piscitelli P, Ceretti E, et al. Socio-Economic and Environmental Factors Associated with Overweight and Obesity in Children Aged 6–8 Years Living in Five Italian Cities (the MAPEC\_LIFE Cohort). *Int J Environ Res Public Health* 2016;13:1002; doi:10.3390/ijerph13101002
35. Holland N, Bolognesi C, Kirsch-Volders M, Bonassi S, Zeiger E, Knasmueller S, Fenech M. The micronucleus assay in human buccal cells as a tool for biomonitoring DNA damage. The HUMN project perspective on current status and knowledge gaps. *Mut Res* 2008;659:93-108.
36. Iarmarcovai G, Botta A, Orsière T. Micronuclei and genetic polymorphisms: from exposure to susceptibility. *Ann Biol Clin (Paris)* 2007;65(4):357-63. DOI: 10.1684/abc.2007.0133.
37. Jägerstad M and Skog K. Genotoxicity of heat-processed foods. *Mutat Res* 2005;574(1-2):156-72.
38. Kapka L, Baumgartner A, Siwińska E, Knudsen LE, Anderson D, Mielżyńska D. Environmental lead exposure increases micronuclei in children. *Mutagenesis* 2007;22:201-7.
39. Katic J, Cemeli E, Baumgartner A, Laubenthal J, Bassano I, Stølevik SB, et al. Evaluation of the genotoxicity of 10 selected dietary/environmental compounds with the *in vitro* micronucleus cytokinesis-block assay in an interlaboratory comparison. *Food Chem Toxicol* 2010;48(10):2612-23.
40. Katrinak KA & Zigarlicke CJ. Size-related variations in coal fly ash composition as determined using automated scanning electron microscopy. *Fuel processing Technology* 1995;44:71-9.
41. Kogevinas M, Villanueva CM, Font-Ribera L, Liviak D, Bustamante M, Espinoza F, et al. Genotoxic Effects in Swimmers Exposed to Disinfection By-products in Indoor Swimming Pools. *Environ Health Perspect* 2010;118(11):1531-7.
42. Mielżyńska D, Siwińska E, Kapka L, Szyfter K, Knudsen LE, Merlo DF. The influence of environmental exposure to complex mixtures including PAHs and lead on genotoxic effects in children living in Upper Silesia, Poland. *Mutagenesis* 2006;21(5):295-304.
43. Minelli G, Melcarne A, Fazzo L, Quarta F, Golizia MG, De Maria V, Rashid I, Comba P, Conti S. Il tumore polmonare nella Provincia di Lecce: analisi di cluster di incidenza e mortalità. Atti della XXVIII riunione scientifica annuale Associazione Italiana Registri Tumori. Taranto 9-11 aprile 2014.
44. Moller P and Loft S. Dietary antioxidants and beneficial effect on oxidatively damage DNA. *Free Radic Biol Med* 2006;41(3):388-415.
45. Moreno T, Jones TP, Richards RJ. Characterisation of aerosol particulate matter from urban and industrial environments: examples from Cardiff and Port Talbot, South Wales, UK. *Sci Total Environ* 2004;337-46.
46. Nardone P, Spinelli A, Lauria L, Buoncristiano M, Bucciarelli M, Andreozzi S and Gruppo OKkio alla SALUTE 2008-09, 2010, 2012 e 2014. Lo stato ponderale dei bambini. In Nardone P, Spinelli A, Buoncristiano M, Lauria L, Pizzi E, Andreozzi S, Galeone D (Eds). *Il Sistema di sorveglianza OKkio alla SALUTE: risultati 2014*. Istituto Superiore di Sanità, Roma, 2016;13-18.
47. Neri M, Fucic A, Knudsen LE, Lando C, Merlo F, Bonassi S. Micronuclei frequency in children exposed to environmental mutagens: a review. *Mutat Res* 2003;544(2-3):243-54.
48. Paoletti L, De Berardis B, Arrizza L. Inhalable airborne particulate pollution in sites characterized by dissimilar environmental conditions. *Ann Ist Super Sanità* 2003;39(3):381-5.
49. Post JE, Buseck PR. Characterization of individual particles in the Phoenix urban aerosol, using electron beam instruments. *Environ Sci Technol* 1984;18(1):35-42.

50. Ro C-U, Osán J, Szalóki I, Van Grieken R. Determination of Chemical Species in Individual Aerosol Particles Using Ultrathin Window EPMA. *Environ Sci Technol* 2000;34:3023-30.
51. Rossnerova A, Spatova M, Rossner P Jr, Novakova Z, Solansky I, Sram RJ. Factors affecting the frequency of micronuclei in asthmatic and healthy children from Ostrava. *Mutat Res* 2011;708(1-2):44-9.
52. Samanta S, and Dey P. Micronucleus and its application. *Diagn Cytopathol* 2012;40(1):84-90.
53. Scarpato R, Verola C, Fabiani B, Bianchi V, Saggese G, Federico G. Nuclear damage in peripheral lymphocytes of obese and overweight Italian children as evaluated by the gamma-H2AX focus assay and micronucleus test. *The FASEB J* 2011;25(2):685-93.
54. Serra-Majem L, Ribas L, Ngo J, Ortega RM, García A, Pérez-Rodrigo C, Aranceta J. 'Food, youth and the Mediterranean diet in Spain. Development of KIDMED, Mediterranean Diet Quality Index in children and adolescents', *Public Health Nutrition* 2004;7(7):931-35.
55. Sobanska S, Coeur C, Maenhaut W, Adams F. SEM-EDX characterization of tropospheric aerosols in the Negev Desert (Israel). *J Atmos Chem* 2003;44:299-322.
56. Sofi F, Macchi C, Abbate R, Gensini GF, Casini A. Mediterranean diet and health status: an updated meta-analysis and a proposal for a literature-based adherence score. *Public Health Nutr* 2014;17:2769-82. □
57. Szeto YT, Benzie IF, Collins AR, Choi SW, Cheng CY, Yow CM, Tse MM. A buccal cell model comet assay: development and evaluation for human biomonitoring and nutritional studies. *Mutat Res* 2005;578(1-2):371-81.
58. Thomas P, Holland N, Bolognesi C, Kirsch-Volders M, Bonassi S, Zeiger E, et al. Buccal micronucleus cytome assay. *Nat Protoc* 2009;4(6):825-37.
59. 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.
60. Torres-Bugarin O, Fernández-Gracia A, Torres-Mendoza BM, Zavala-Aguirre JL, Nava-Zavala A, Zamora-Perez AL. Genetic profile of overweight and obese school-age children. *Toxicol Environ Chem* 2009;91(4):789-95.
61. Umegaki K, Ikegami S, Inoue K, Ichikawa T, Kobayashi S, Soeno N, et al. Beta-carotene prevents x-ray induction of micronuclei in human lymphocytes. *Am J Clin Nutr* 1994;59(2):409-12.
62. Verschaeve L, Koppen G, Gorp UV, Schoeters G, Jacobs G, Zwijsen C. Seasonal variations in spontaneous levels of DNA damage; implication in the risk assessment of environmental chemicals. *J Appl Toxicol* 2007;27:612-20.
63. Wang J, Luo X, Xu B, Wei J, Zhang Z, Zhu H. Elevated Oxidative Damage in Kitchen Workers in Chinese Restaurants. *J Occup Health* 2011;53:327-33.
64. Zani C, Ceretti E, Grioni S, Viola GCV, Donato F, Feretti D, et al. Are 6-8 year old Italian children moving away from the Mediterranean diet? *Ann Ig* 2016;28(5):339-48.
65. Zani C, Donato F, Grioni S, Viola GCV, Ceretti E, Feretti D, et al. Feasibility and reliability of a questionnaire for evaluation of the exposure to indoor and outdoor air pollutants, diet and physical activity in 6-8-year-old children. *Ann Ig* 2015;27(4):646-56.

## **IMP.AIR. STUDY GROUP**

Responsabile scientifico

Prof. Marcello Guido

Responsabile del Laboratorio di Igiene,  
Di.S.Te.B.A., Università del Salento

Prof.ssa Antonella De Donno

IMP.AIR study group

Francesco Bagordo, Mattia De Giorgi,  
Alessandra Genga, Tiziana Grassi,  
Adele Idolo, Alessandra Panico,  
Francesca Serio, Tiziana Siciliano,  
Maria Rosaria Tumolo