



**UNIVERSITÀ  
DI PARMA**

**DIPARTIMENTO DI MEDICINA E CHIRURGIA**

**CORSO DI LAUREA MAGISTRALE IN PSICOBIOLOGIA E NEUROSCIENZE  
COGNITIVE**

**INTERFERENTI ENDOCRINI E  
NEUROSVILUPPO DEL BAMBINO: STUDIO DI  
UNA COORTE DEL PROGETTO LIFE- MILCH**

**Relatore:**

*Chiar.ma Prof.ssa PAOLA PALANZA*

**Controrelatore:**

*Chiar.ma Prof.ssa ANNALISA PELOSI*

**Laureando/a:**

*ALESSANDRA SCARAMUZZI*

**ANNO ACCADEMICO 2022/2023**



## SOMMARIO

<b>ABSTRACT .....</b>	<b>5</b>
<b>INTRODUZIONE.....</b>	<b>7</b>
<b>1.1 SVILUPPO, SALUTE E MALATTIA .....</b>	<b>7</b>
<b>1.2 INTERFERENTI ENDOCRINI.....</b>	<b>9</b>
1.2.1 Meccanismi d'azione degli IE .....	11
1.2.2 Diverse classi di IE.....	14
1.2.3 Effetti degli interferenti endocrini.....	20
<b>1.3 IL PROGETTO Life- MILCH .....</b>	<b>26</b>
<b>1.4 LA SCALA BAYLEY-III.....</b>	<b>30</b>
<b>SCOPO DELLA TESI .....</b>	<b>33</b>
<b>MATERIALI E METODI.....</b>	<b>34</b>
<b>2.1 PARTECIPANTI .....</b>	<b>34</b>
<b>2.2 VALUTAZIONE DELLA CRESCITA E SVILUPPO FISILOGICO....</b>	<b>35</b>
<b>2.3 VALUTAZIONE DEL NEUROSVILUPPO TRAMITE BAYLEY-III.....</b>	<b>36</b>
2.3.1 Somministrazione.....	37
2.3.2 Codifica dei punteggi .....	38
<b>2.4 RACCOLTA E ANALISI DEI CAMPIONI BIOLOGICI.....</b>	<b>39</b>
<b>2.5 ANALISI DEI DATI .....</b>	<b>41</b>
<b>RISULTATI .....</b>	<b>43</b>
<b>DISCUSSIONE .....</b>	<b>60</b>
<b>BIBLIOGRAFIA .....</b>	<b>65</b>



## **ABSTRACT**

L'esposizione a sostanze chimiche come gli Interferenti Endocrini (IE), soprattutto durante particolari periodi critici, può avere conseguenze negative sul successivo sviluppo del bambino.

Il progetto Life MILCH è uno studio longitudinale elaborato con il fine di misurare l'esposizione agli inquinanti chimici ad azione endocrina nella diade madre-bambino, in particolar modo nei periodi pre e post-natale, per valutarne gli eventuali effetti sullo sviluppo fisiologico e neurocomportamentale del bambino nel primo anno di vita.

Il presente studio ha l'obiettivo di indagare, in un sotto campione di diadi madre- bambino reclutate dal progetto Life-MILCH, la possibile relazione tra l'esposizione pre e postnatale a diversi IE e lo sviluppo fisiologico e neurocomportamentale del bambino. Le concentrazioni di IE sono state rilevate nei campioni biologici di urina materna, urina del bambino e latte materno, prelevati al reclutamento delle diadi, alla nascita e durante i richiami a 1, 3 e 6 mesi. I parametri di crescita del bambino sono stati misurati dalla nascita fino al 2° anno di vita; mentre la valutazione del neurosviluppo è stata effettuata a 6, 12 e 24 mesi mediante la somministrazione della Scala Bayley-III.

I dati sulla crescita e il neurosviluppo delineano un quadro coerente con la letteratura. I risultati dello studio, seppur in maniera non statisticamente significativa per il campione ridotto, suggeriscono la presenza di correlazioni tra i parametri di crescita del bambino e le concentrazioni di IE trovate nei campioni biologici analizzati. Allo stesso modo è stata riscontrata una correlazione, seppur non significativa, tra i punteggi ottenuti nelle scale della Bayley -III e le concentrazioni di IE.

Lo studio qui presentato è un lavoro preliminare e, pertanto, presenta dei limiti, tra i quali la piccola numerosità del campione.

Studi futuri potranno approfondire tali risultati indagando la relazione tra l'esposizione pre e postnatale a diversi IE e lo sviluppo fisiologico e neurocomportamentale del bambino su un campione più ampio.

# INTRODUZIONE

## 1.1 SVILUPPO, SALUTE E MALATTIA

L'ipotesi delle origini nello sviluppo della salute e della malattia (Developmental Origins of Health and Disease- DOHaD) presuppone che l'ambiente perinatale possa avere un impatto sulla salute del feto e della vita successiva (Gluckman et al, 2008; Gluckman et al., 2010).

Inizialmente l'ipotesi fu formulata da Barker, nel 1995, che la definì “ipotesi della programmazione fetale”, per sottolineare come alcune patologie che l'individuo svilupperà nel corso della sua vita, originano dalle condizioni dell'ambiente intrauterino durante lo sviluppo. Grazie a studi successivi, l'ipotesi di Barker è stata trasformata in quella che oggi è conosciuta nella comunità scientifica come Developmental Origins of Health and Disease Hypothesis (DOHaD), che mostra e conferma l'impatto di fattori peri e postnatali sullo sviluppo e sulla salute adulta (Barker, 2007).

Molte evidenze precedenti supportarono l'ipotesi di Barker. Alcuni studi trovarono una relazione tra le morti in età adulta per malattie del cuore e condizioni di vita misere in infanzia e adolescenza come, per esempio, una ricorrente esposizione a infezioni e malnutrizione (Buck e Simpson, 1982).

In un lavoro del 1989, mettendo in relazione cause di morte con peso alla nascita e a dodici mesi, e con la tipologia di alimentazione, venne evidenziato come precoci e sfavorevoli condizioni ambientali possano compromettere lo sviluppo, andando a costituire fattori di rischio per la salute del cuore. Il tasso di mortalità per cardiopatia ischemica registrato cinquant'anni dopo era maggiore per coloro che si collocavano sotto la media per peso alla nascita e a dodici mesi di età. Un abbassamento del tasso di incidenza si osservava tra i soggetti con un peso maggiore a un anno di età, nonostante

un basso peso alla nascita, e che quindi erano andati incontro a un buon livello di crescita postnatale (Barker et al., 1989). Negli anni altri studi su modello umano e animale hanno aggiunto evidenze all'ipotesi elaborata da Barker confermando l'influenza di fattori prenatali su pressione arteriosa, funzione vascolare, metabolismo ma anche su sviluppo neurocomportamentale e funzioni cognitive.

Le applicazioni dell'ipotesi DOHaD rientrano nell'epigenetica, quella branca della genetica che si occupa di evidenziare come le esperienze durante tutto il corso della vita influenzino l'espressione genica senza modificazioni del DNA. I processi epigenetici forniscono un meccanismo biologico per spiegare come le influenze ambientali possano influenzare la variazione fenotipica di una generazione, o più generazioni, inclusa la loro suscettibilità alle malattie non trasmissibili (Gluckmann et al., 2010). L'ipotesi DOHaD rispecchia il concetto di epigenetica, perché è un'ipotesi che mira a spiegare come alcuni eventi possano caratterizzare a lungo termine il percorso di salute e malattia dell'individuo, soprattutto se avvengono nei periodi pre, neo e postnatali di massima plasticità.

Tra i fattori ambientali che possono avere un impatto sulla salute del feto e della vita successiva troviamo: l'inquinamento ambientale, lo stress materno, il consumo di alcool e tabacco, l'abuso di sostanze e l'alimentazione ricca di grassi. Questi possono portare ad alterazioni a livello vascolare, cardiaco, metabolico, polmonare, renale ma anche neurocomportamentale e psichiatrico, come disturbo dello spettro autistico, disturbo da deficit dell'attenzione/iperattività e innalzamento del rischio di sviluppare schizofrenia (Nobile et al., 2022).

Continuano ad aumentare in letteratura le evidenze a favore della DOHaD, la quale viene applicata ad ambiti di salute diversi.

## 1.2 INTERFERENTI ENDOCRINI

Un interferente endocrino (IE) è una sostanza chimica esogena, o una miscela di sostanze chimiche, che interferisce con la produzione, il rilascio, il trasporto, il metabolismo, il legame, l'azione o l'eliminazione degli ormoni naturali dell'organismo responsabili del mantenimento dell'omeostasi e della regolazione dei processi di sviluppo, funzione cardine del sistema endocrino (Zoeller et al., 2012). Le sostanze con caratteristiche di interferenti endocrini sono molte e possono essere suddivise in diverse classi alcune delle quali più comunemente studiate.

Il sistema endocrino può essere definito come l'insieme di tutte le ghiandole a secrezione interna che esistono nel corpo umano. La funzione deputata a quest'ultimo è quella di garantire al corpo umano l'approvvigionamento di tutti gli ormoni nelle corrette quantità di cui necessita per il compimento di tutti i processi fisiologici. L'equilibrio dei processi fisiologici è possibile grazie al rapporto di mutua dipendenza che esiste tra le varie ghiandole. Queste producono delle sostanze note come ormoni, che sono indispensabili per mantenere l'equilibrio delle funzioni dell'organismo e delle proprietà chimico-fisiche del suo ambiente interno. Questo equilibrio, noto come omeostasi, è necessario per rispondere ai mutamenti che hanno luogo all'esterno del corpo.

Gli IE tendono ad interferire con l'azione degli ormoni, interrompendo l'omeostasi e alterando la fisiologia di un individuo, dallo sviluppo fetale all'età adulta. Alcuni IE, a dosi rilevanti per l'ambiente, si legano a recettori ormonali e agiscono come agonisti o antagonisti, potenziando, smorzando o bloccando l'azione di specifici ormoni. Inoltre, alterano il numero di recettori ormonali in diversi tipi di cellule alterando di conseguenza la concentrazione degli ormoni in circolazione (Gore et al., 2015).

Questi effetti, a seconda dei tempi e della dose di esposizione, danno origine a fenotipi alternativi, che possono portare ad una maggiore suscettibilità alla malattia. Se l'esposizione altera le azioni ormonali durante l'ontogenesi, gli effetti sono spesso permanenti e possono influenzare lo sviluppo e la funzione degli organi. Inoltre, potrebbero avere conseguenze nel corso della vita che sono, allo stesso tempo, complesse e difficili da prevedere. L'entità e la natura delle conseguenze a lungo termine dipendono dall'interazione tra geni e ambiente e coinvolgono molte variabili, tra cui la finestra di esposizione evolutiva, il metabolismo dell'individuo e la sua formazione genetica (Gore et al., 2015). Le esposizioni agli IE hanno effetti potenti e irreversibili.

Alcune sostanze chimiche altamente diffuse ad azione neuroendocrina hanno proprietà immunosoppressive, ossidative, proinfiammatorie, neuroendocrine, metaboliche, con anche effetti genotossici (Porta, 2012). Tali esposizioni possono essere collegate all'insorgenza di disturbi metabolici, ma anche a problemi fisici e psicologici, o problemi riproduttivi e ad alcune forme di cancro, a causa della loro capacità di immagazzinarsi nei tessuti adiposi dell'uomo e di altri animali (Gasull et al., 2018; Porta et al., 2012).

Gli IE possono derivare da fonti naturali animali, umane o vegetali, ma soprattutto possono essere la sintesi di sostanze chimiche sintetiche, quelle su cui la ricerca si è maggiormente concentrata (Casals-Casas e Desvergne, 2011). Infatti, possiamo distinguere composti di origine:

1) Naturale:

- fitoestrogeni ed estrogeni;

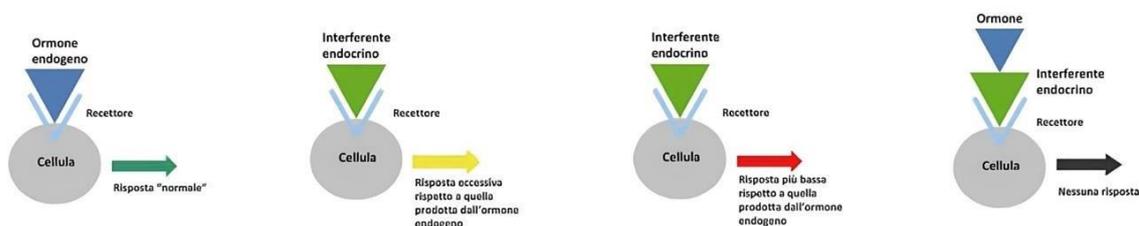
2) Sintetica:

- estrogeni sintetici, distinti in: farmaceutici (diethylstilbestrol) e industriali tra cui pesticidi, conservanti, solventi e plasticizzanti;

- antiestrogeni sintetici, suddivisi in: farmaceutici (tamoxifen) e industriali (diossine).

### 1.2.1 Meccanismi d'azione degli IE

Gli IE agiscono sul sistema endocrino a vari livelli e attraverso vari meccanismi; possono legarsi ai recettori di alcuni ormoni (per esempio quelli degli androgeni e degli estrogeni, o anche degli ormoni tiroidei) agendo da agonisti oppure da antagonisti recettoriali, modificandone la sintesi, la secrezione, il metabolismo, l'eliminazione e il trasporto degli stessi ormoni (Giannelli et al., 2023) (*Figura 1*).



*Figura 1* Meccanismi d'azione degli Interferenti Endocrini (ISS, 2023).

Alcune prove recenti suggeriscono che alcuni di essi possono causare cambiamenti epigenetici, che a loro volta potrebbero portare a effetti transgenerazionali (Gore et al., 2015).

I cambiamenti epigenetici vengono descritti come cambiamenti ereditabili nell'espressione genica non dovuti a modificazioni della sequenza genica. Uno dei meccanismi più importanti che produce modificazioni epigenetiche, è la metilazione del DNA. Un processo in cui i gruppi metili si attaccano ai residui di citosina tramite DNA metiltransferasi sui siti CpG, ovvero i siti dove la citosina è seguita da una guanina. È un

meccanismo fondamentale per diversi processi di sviluppo e riproduttivi come la gametogenesi e l'embriogenesi (Gore et al., 2015). La metilazione può avere un ruolo chiave nella regolazione genica, sia nel silenziamento genico, basato sulla capacità di questa modificazione di impedire il legarsi al DNA di fattori di trascrizione, sia nell'attivazione genica, tramite il processo opposto ovvero quello di demetilazione, che permette la riattivazione di un gene, con la sua conseguente espressione, e ciò avviene tramite la rimozione del gruppo metile (Fuso e Lucarelli, 2019).

L'epigenoma è suscettibile all'azione di diversi fattori, in particolare le modificazioni dei normali processi epigenetici possono essere indotte da fattori ambientali (esposizione a xenobiotici, comportamenti sociali e carenze nutrizionali) (Ficociello et al., 2010). I cambiamenti epigenetici rappresentano quindi una risposta biologica a fattori di stress ambientale e possono essere trasmessi alle generazioni successive. La modulazione dell'epigenoma può avere effetti a lungo termine sulla salute dell'uomo e condurre a malattie come il cancro o a disturbi comportamentali, in quanto un'esposizione a sostanze tossiche ambientali può avere effetti fenotipici persistenti nel corso della vita (Ficociello et al., 2010). Quando gli IE introducono cambiamenti epigenetici durante le prime fasi dello sviluppo, l'epigenoma si altera in modo permanente e i cambiamenti possono essere trasmessi alle generazioni successive. Se invece un IE introduce cambiamenti epigenetici durante l'età adulta, i cambiamenti si verificano all'interno delle cellule somatiche dell'individuo e non sono né permanenti, né vengono ereditati dalle generazioni successive (Gore et al., 2015).

Studi su modelli animali hanno individuato dei periodi critici durante i quali gli organismi sono più vulnerabili all'esposizione agli IE con possibili conseguenze sullo sviluppo del cervello materno e del feto, dal punto di vista fisiologico e comportamentale. Ad esempio,

si parla di “feto fragile” per indicare un periodo critico durante il quale c’è stata esposizione agli IE, e questo può provocare alterazioni irreversibili del Sistema Nervoso Centrale (SNC); tale fenomeno può verificarsi anche a concentrazioni molto basse di IE, che nell'animale adulto potrebbero non essere nemmeno individuate dagli esami tossicologici (Bern, 1992; Ponzi, 2008). La riproduzione e lo sviluppo pre e postnatale sembrano essere le fasi biologiche più sensibili agli effetti endocrini degli IE, questo perché sono periodi governati dall’azione degli ormoni. Questo è stato confermato anche da sperimentazioni sul modello animale, dove si evince che l'esposizione agli interferenti endocrini estrogenici, durante i periodi critici della vita fetale, può alterare lo sviluppo degli organi riproduttivi, del sistema neuroendocrino e il conseguente comportamento (Palanza et al., 1999). Uno dei risultati ottenuti ha evidenziato come i topi esposti in fase prenatale al metossicloro hanno mostrato cambiamenti nello sviluppo dei riflessi; l'esposizione a una dose molto bassa sembrava produrre una maggiore reattività durante le prime fasi della vita postnatale (Palanza et al., 1999). La somministrazione di 1 mg/kg/al giorno di metossicloro a topi maschi durante la prima settimana dopo la nascita ha portato ad una riduzione dei livelli di testosterone e ad una riduzione del contenuto di DNA nella prostata e nelle vescicole seminali in età adulta (Palanza et al., 1999); e la somministrazione di 50 mg/kg/al giorno di metossicloro a ratti femmine durante la gravidanza e l'allattamento ha prodotto testicoli più piccoli e una riduzione della conta degli spermatozoi nella prole maschile (Palanza et al., 1999).

Per quanto concerne il modello umano, ci sono varie spiegazioni del motivo per cui i bambini, particolarmente nei primi anni di vita, costituiscono una popolazione molto sensibile a questo tipo di esposizioni: le quantità di aria, di acqua e di cibo introdotte nel loro organismo, per unità di peso corporeo, sono maggiori rispetto a quelle dell’adulto; la

barriera emato-encefalica non è ancora completamente matura e ciò li rende più sensibili al danno neurologico; la cute è maggiormente permeabile; passano la maggior parte del loro tempo nelle abitazioni, negli asili e nelle scuole e sono maggiormente soggetti al contatto con gli IE dispersi nell'aria; i più piccoli sono spesso a contatto con terreno e pavimento e hanno l'abitudine di succhiare giocattoli o oggetti che possono contenere IE. Inoltre, durante l'età evolutiva, i sistemi biologici e gli organi sono in diverso stadio di maturazione e funzionalità e ciò rende meno efficace il sistema di detossicazione (Bernasconi, 2022).

### **1.2.2 Diverse classi di IE**

Come già accennato in precedenza ci sono diversi tipi di IE.

Nel dettaglio abbiamo:

- *Bisfenolo A (BPA)*: rientra nella classe dei fenoli, sostanze chimiche che interferiscono con le funzioni del sistema endocrino legandosi ai recettori degli estrogeni (Nelson et al., 2020). È stato sintetizzato per la prima volta nel 1891 e si scoprì che aveva proprietà estrogeniche nel 1936; questo viene metabolizzato in fretta e ha l'abilità di legarsi ai recettori degli estrogeni e iniziare una risposta cellulare simile a quella causata dall'estradiolo, uno degli estrogeni più importanti. È usato in una vasta gamma di prodotti manifatturieri, imballaggi alimentari, giocattoli, e non solo; le resine BPA si trovano nei rivestimenti di molti cibi e bevande in scatola in modo tale che se ne entra in contatto molto facilmente. Nei materiali a contatto con il cibo, il BPA può penetrare negli alimenti o entrare a contatto con l'acqua. A causa di ciò, è stato riscontrato che il 93% degli americani ha quantità significative

di BPA misurabile attraverso i campioni della loro urina. In alcuni casi viene rilevato anche nel latte materno. Questa sostanza viene rapidamente metabolizzata dall'organismo, ed ha un'emivita di circa 4 –5 ore negli esseri umani adulti, mentre ha tassi metabolici più bassi nel feto e nei neonati. Nel 2023, l'Autorità europea per la sicurezza alimentare (EFSA), sulla base di tutte le nuove evidenze scientifiche prese in esame, ha stabilito una soglia di assunzione giornaliera tollerabile (DGT) di 0,2 ng/kg di peso corporeo/giorno, in sostituzione della precedente soglia temporanea, valutata nel 2015, di 4 µg/kg di peso corporeo/giorno.

- *Ftalati*: sono un grande gruppo di composti utilizzati come plastificanti liquidi e sono presenti in una vasta gamma di prodotti di consumo, in particolare nelle vernici industriali, nei solventi ma anche in prodotti per la cura della persona, nei giocattoli e in dispositivi medici. L'esposizione può avvenire tramite ingestione, esposizione dermale o inalazione.

Questi possono attraversare la placenta e interferire con lo sviluppo ontogenetico negli animali e probabilmente anche negli umani. Hanno un'emivita molto breve, meno di 24 ore.

Gli ftalati sono rilevabili nell'urina umana, nel siero ed anche nei campioni di latte e l'esposizione giornaliera stimata principalmente su uno ftalato, il di(2-etilesil) ftalato (DEHP), varia da 3 a 30 g/kg di peso corporeo /giorno (Gore et al, 2015). Per quanto concerne i limiti di sicurezza per gli ftalati, gli esperti dell'EFSA hanno aggiornato la valutazione dei rischi di cinque ftalati impiegati nelle materie plastiche a contatto con gli alimenti, fissando nuovi livelli di sicurezza in termini di soglia di assunzione giornaliera tollerabile. Il valore DGT di gruppo (che tiene conto dell'esposizione

combinata a diverse sostanze) è stato fissato a 50 µg/kg di peso corporeo/giorno per quattro dei cinque ftalati (DBP, BBP, DEHP e DINP), a causa dei rischi legati alla diminuzione del testosterone nei feti. Il quinto ftalato inserito nella valutazione, il DIDP, non influenza i livelli di testosterone nei feti, per cui è stata stabilita una DGT separata, pari a 150 µg/kg di peso corporeo/giorno sulla base dei suoi effetti sul fegato (EFSA, 2019).

- *Pesticidi*: con il termine “pesticida” si indicano tutte quelle sostanze che interferiscono o distruggono organismi viventi animali o vegetali. Vengono anche definiti “fitofarmaci” e tra questi troviamo diserbanti, fungicidi, agenti chimici contro insetti, virus e batteri. Accreditate organizzazioni quali l’Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS), il Programma della Nazioni Unite per l’Ambiente (UNEP) e la Comunità Europea da tempo allertano sui pericoli derivanti dall’impiego delle sostanze pesticide, definite tossiche, persistenti, bioaccumulabili e negativamente impattanti sulle proprietà fisiche e chimiche dei suoli nonché estremamente nocive per la salute dell’intero ecosistema, dell’uomo e di qualunque altro organismo vivente. La ricerca ha aggiunto i fitofarmaci tra gli interferenti o i disturbatori endocrini, responsabili di disturbi e di danni a carico della funzionalità del sistema endocrino causando effetti avversi sulla salute dell’organismo, della sua progenie o di una (sotto)popolazione (EFSA, 2015). Il glifosato è una sostanza chimica ampiamente utilizzata negli erbicidi. I prodotti fitosanitari a base di glifosato, ossia formulazioni contenenti il principio attivo “glifosato” nonché coformulanti, ed eventualmente altre sostanze chimiche, sono utilizzati principalmente in agricoltura e orticoltura per combattere le erbe infestanti che competono con le colture. Il 30

maggio 2022, l'Agencia europea delle sostanze chimiche (ECHA) conferma l'attuale classificazione del glifosato come sostanza pericolosa, in quanto può causare gravi danni agli occhi ed è tossica per gli organismi acquatici. Sulla base delle evidenze scientifiche disponibili però, il comitato ECHA per la valutazione dei rischi (RAC) conclude che la classificazione del glifosato come sostanza cancerogena, mutagena o reprotossica non è giustificata (EFSA, 2022).

Secondo il regolamento Europeo n.396/2005, i livelli massimi di residui (LMR) sono i tenori massimi di residui di pesticidi ammessi per legge all'interno o sulla superficie di alimenti o mangimi, fatte salve le buone prassi agricole (GAP) e l'esposizione minima possibile dei consumatori per tutelare quelli vulnerabili. Essi vengono calcolati dopo una valutazione esaustiva delle proprietà del principio attivo e della destinazione d'uso del pesticida. I medesimi limiti di legge, stabiliti come "limiti di tolleranza", si applicano anche ai prodotti alimentari d'importazione per agevolare il commercio internazionale (EFSA, 2005).

I piretroidi sono un gruppo di composti utilizzati come insetticidi e antiparassitari. Vengono suddivisi in piretroidi di tipo 1 (caratterizzati dalla presenza di una molecola alcolica che attribuisce fotostabilità alla molecola, aumentandone la permanenza ambientale) e in piretroidi di tipo 2 (questi invece legano al gruppo alcolico un cianogruppo, che aumenta consistentemente la loro efficacia insetticida ma anche la loro tossicità). Sono spesso associati a composti sinergici come il piperonil butossido, il sesamox o il piperonil ciclone, che inibiscono gli enzimi citocromo P450-dipendente che disattivano il piretroide, oppure ad organoclorurati o carbamati, che ne potenziano la tossicità anche nei mammiferi. L'intossicazione può avvenire per via orale, cutanea o respiratoria; la molecola si distribuisce poi attraverso il sangue a

tutti gli organi e tessuti. L'Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Lazio e della Toscana ha valutato gli effetti di queste sostanze sul modello animale evidenziando che influiscono fortemente sulle funzionalità del sistema nervoso.

- *Parabeni*: sono una classe di conservanti usati principalmente nei cosmetici, ma anche nei farmaci e in alcuni alimenti. Appartengono alla categoria dei paraidrossibenzoati o esteri dell'acido paraidrossibenzoico e hanno proprietà antibatteriche e antifungine. I parabeni hanno una blanda attività estrogenica, cioè agiscono come gli ormoni femminili naturalmente prodotti dall'organismo, ma sono migliaia di volte meno potenti degli estrogeni naturali (AIRC, 2018). La Commissione Europea nel regolamento n. 1223/2009 ha fissato il limite massimo di parabeni sui prodotti cosmetici, stabilendo una concentrazione massima dello 0,4 % per un singolo estere e dello 0,8 % per le miscele di esteri.

Questo tipo di sostanze produce un effetto negativo soprattutto sul sistema riproduttivo, in particolare recando danni alla salute riproduttiva femminile (ISDE, 2016).

- *Idrocarburi Policiclici Aromatici (PAHs)*: sono una classe di sostanze chimiche presenti naturalmente nel carbone, nel petrolio greggio e nella benzina. Vengono prodotti anche quando vengono bruciati carbone, petrolio, gas, legno, rifiuti e tabacco. Il naftalene ne è un esempio, e questo viene prodotto commercialmente negli Stati Uniti per produrre altri prodotti chimici e naftalina. Solitamente è facile venirne a contatto in quanto si disperde facilmente nell'aria, o anche mangiando alimenti come carne o pesce alla griglia "carbonizzati", ovvero che presentano particelle di

carbone. Gli effetti sulla salute umana derivanti dall'esposizione ambientale a bassi livelli di PAHs non sono noti, però è stato visto che grandi quantità di naftalene nell'aria possono irritare gli occhi e le vie respiratorie. I lavoratori esposti a questa sostanza hanno sviluppato anomalie del sangue e del fegato (ATSDR, 2009). I limiti massimi dei PAHs fissati nel 2002 dalla Commissione Europea erano di 100 mg/kg di peso corporeo/giorno o 1 000 mg/kg di peso corporeo/giorno, ma sulla base di nuove disposizioni dei comitati scientifici dell'ECHA i limiti di concentrazione sono stati abbassati a 20 mg/kg di peso corporeo/giorno.

- *Diossine*: con il termine diossine vengono generalmente indicati i derivati policlorurati della dienzo-p-diossina, dei quali esistono ben 75 composti, e del dibenzofurano, dove troviamo invece 135 composti. Si tratta di due serie di composti aromatici, triciclici, per i quali si adoperano le sigle PCDD (policlorodibenzodiossine) e PCDF (policlorodibenzofurani). Questi non esistono in natura, ma parecchi processi industriali portano alla loro formazione e alla loro dispersione nell'ambiente. Uno di questi processi è l'incenerimento dei rifiuti urbani, ma non l'unico; esistono altre sorgenti di diossine, tra le quali troviamo, gli inceneritori in servizio presso ospedali, gli impianti di riciclaggio/recupero termico dei metalli (fonderie del rame, fabbriche dell'acciaio) e diversi prodotti chimici come i derivati clorurati dei fenoli, defoglianti (impiegati, per esempio, nella guerra del Vietnam), policlorobifenili, ed anche l'olio usato proveniente dai motori delle automobili. Le misure delle concentrazioni di tali microinquinanti nell'ambiente, quindi, possono essere il risultato di contaminazioni provenienti da diverse fonti

(Carbone et al., 1989). Il valore limite per le diossine imposto dalla Commissione Europea nel 2022 è stato fissato a 5 µg/kg di peso corporeo/giorno.

- *Composti Organici Perfluorati (PFCs)*: i composti organici perfluorati sono sostanze di origine antropica e presentano svariate applicazioni industriali e domestiche; sono largamente usati in prodotti di consumo come Teflon, isolanti, tappezzerie, tappeti, presidi odontotecnici, tessuti tecnici come il Gore-Tex o anche rivestimenti antiaderenti per tegami, schiume antiincendio, detergenti, cosmetici e altri. L'esposizione umana ai PFC avviene principalmente attraverso la dieta (Barbarossa et al., 2012).
- *Ritardanti Di Fiamma Bromurati (BFR)*: sono sostanze chimiche solitamente addizionate a prodotti industriali, come materiali polimerici, materiali tessili e circuiti elettrici ed elettronici, allo scopo di prevenire o ritardare l'insorgere di un incendio. A seguito del divieto di utilizzo dei principali ritardanti di fiamma bromurati (PBDE e HBCD) previsto dalla Convenzione di Stoccolma, sono stati introdotti nuovi ritardanti di fiamma bromurati new-BFR; a differenza di altri inquinanti organici, gli studi riguardanti la distribuzione dei PBDE e dei new-BFR nelle diverse frazioni del materiale particolato aerodisperso sono limitati o assenti.

### **1.2.3 Effetti degli interferenti endocrini**

Diversi studi, su modello animale e su uomo, si sono concentrati nel valutare quali fossero gli effetti maggiormente negativi sulla salute dopo l'esposizione agli IE.

Sono stati riscontrati:

- *Effetti sul metabolismo*: da uno studio su modello animale è stato visto come l'esposizione durante lo sviluppo dei topi al DES, sia associata all'aumento di peso sia per le femmine che per i maschi (Newbold RR et al., 2008). In un altro studio, l'esposizione prenatale al DES ha comportato un aumento del numero di adipociti creando un cuscinetto adiposo a livello gonadico di topi maschi (Angle BM, et al., 2013). In relazione al BPA è stato dimostrato, da molti studi su modello animale, che una prolungata esposizione comporti l'aumento di peso e di grasso corporeo in topi e ratti (Heindel et al, 2017).

Anche sull'uomo è stato evidenziato come l'esposizione perinatale al Bisfenolo A, altera i processi metabolici che sono precursori di sovrappeso, obesità, omeostasi alterata del glucosio/insulina, diabete e malattie cardiovascolari in età adulta. Gli effetti sono più marcati sulla prole maschile. Ad esempio, uno studio ha dimostrato che l'esposizione prenatale al BPA è associata ad un aumento del grasso corporeo all'età di 7 anni (Heindel et al, 2017), mentre in un altro si è visto come la sua esposizione sia legata ad una crescita postnatale accelerata senza una variazione del BMI tra i 2 e i 5 anni di età (Braun JM et al., 2014).

- *Effetti sul neurosviluppo*: in uno studio effettuato su modello animale con l'obiettivo di esaminare gli effetti dell'esposizione pre e/o postnatale al BPA sull'esplorazione, sull'attività e sul comportamento ansioso in topi CD-1 maschi e femmine testati da giovani e/o adulti, è stato dimostrato che l'esposizione al BPA ha prodotto effetti marginali sul comportamento esplorativo ed emotivo maschile, mentre le femmine esposte al BPA hanno mostrato una minore propensione ad esplorare un'area nuova, una minore attività locomotoria e risposte di tipo ansioso

più elevate in tutti i paradigmi di test e in entrambe le età, giovanile e adulto (Gioiosa et al., 2015). In relazione agli ftalati è stato visto che l'esposizione prenatale allo ftalato DEHP ha aumentato i comportamenti ansiosi nell'EPM solo nei ratti e nei topi maschi, mentre le femmine esposte al DEHP non sono state influenzate (Quinnies et al., 2017). Al contrario, in un altro studio si è visto che il DEHP perinatale ha aumentato le risposte di tipo ansioso in giovani topi sia maschi che femmine, ma ha causato effetti maggiori solo nelle femmine adulte (Xu et al., 2015).

Il cervello umano è molto vulnerabile all'esposizione di agenti chimici e un cambiamento nelle sue funzioni può causare un'interruzione diffusa dei recettori ormonali e dei segnali nervosi, influenzando negativamente lo sviluppo del cervello infantile (Xu et al., 2010). È stato dimostrato che i livelli materni di BPA misurati durante la gravidanza e al momento del parto sono stati positivamente associati a comportamenti esternalizzati più elevati nelle ragazze (Braun et al., 2009, 2011; Harley et al., 2013) e ad una diminuzione dell'ansia (Perera et al., 2012), mentre nei ragazzi ad un aumento delle risposte emotive, dei comportamenti internalizzanti e dell'ansia (Braun et al., 2017b; Harley et al., 2013; Perera et al., 2012; Roen et al., 2015). Uno studio condotto in Spagna ha riportato un'associazione tra i livelli gestazionali di BPA e un aumento del rischio di comportamenti correlati all'ADHD all'età di 4 anni nei ragazzi (Casas et al., 2015). È stato visto anche come livelli prenatali più elevati di BPA sono associati ad una sostanza bianca meno sviluppata nello splenio che, a sua volta, è associata a punteggi più alti nelle capacità di internalizzazione del bambino (ad esempio, ansia e depressione) (Grohs et al., 2019). In relazione agli ftalati è stato visto che diversi studi riportano che la loro

esposizione prenatale è associata alla funzione psicomotoria e ai livelli di attività nei bambini piccoli che possono essere collegati all'ADHD (Ejaredar et al., 2015), e non solo, in altri due studi riportano punteggi psicomotori più elevati e comportamenti di iperattività tra i ragazzi, ma punteggi motori inferiori nelle ragazze sono positivamente associati a livelli aumentati di metaboliti ftalati (Doherty et al., 2017; Factor-Litvak et al., 2014).

In relazione alle funzioni cognitive, le prove sperimentali sugli effetti degli IE sulle risposte cognitive sono più scarse. Alcuni studi riportano un deterioramento delle prestazioni cognitive influenzato dal sesso in seguito all'esposizione agli IE durante lo sviluppo nei roditori, nei primati non umani e umani, e studi che non hanno trovato effetti o risultati misti. Studi riportano che gli effetti del BPA sono più pronunciati sulle risposte di apprendimento e memoria delle femmine che su quelle dei maschi nei ratti (Kubo et al., 2001; Hass et al., 2016), e nei topi (Matsuda et al., 2012; Jang et al. al., 2012). Al contrario, uno studio recente ha riportato che l'esposizione prenatale al BPA ha ridotto la memoria di riconoscimento nel test di riconoscimento degli oggetti nei topi CD1 sia maschi che femmine (18 mesi) (Xiao et al., 2020). Sono presenti anche studi in cui non sono riportati effetti significativi sulle risposte cognitive né dei maschi né delle femmine nei topi (Nakamura et al., 2012), e nei ratti (Stump et al., 2010; Jones e Wat-son, 2012; Johnson et al., 2016). In uno studio sugli ftalati è stato riscontrato che l'esposizione perinatale allo ftalato DHEP ha prodotto disturbi dell'apprendimento e della memoria spaziale solo tra i giovani topi maschi, ma non ha influenzato la funzione cognitiva nelle femmine (Dai et al., 2015).

Per quanto riguarda gli studi sull'uomo pochi hanno tentato di correlare l'esposizione gestazionale al BPA con le risposte cognitive dei bambini e sono state raggiunte conclusioni contrastanti; uno studio non è riuscito a trovare alcuna correlazione (Casas et al., 2015), mentre altri due studi hanno riportato significativi disturbi della memoria associati al BPA sia tra i ragazzi che tra le ragazze (Hong et al., 2013) o solo tra i ragazzi (Braun et al., 2017). Uno studio più recente ha riportato una correlazione positiva tra concentrazioni più elevate di BPA urinario materno a 3 mesi dopo il parto e crescenti difficoltà nelle funzioni esecutive nelle ragazze in età prescolare ma non nei ragazzi (England-Mason et al., 2020). Inoltre, livelli più elevati di metaboliti urinari dello ftalato materno sono stati associati a prestazioni cognitive inferiori nei bambini (Factor-Litvak et al., 2014; Kim et al., 2011; Polanska et al., 2014; Whyatt et al., 2012). Più specificamente, i livelli di diversi metaboliti dello ftalato prenatale sono stati associati a un punteggio QI ridotto sia nei ragazzi che nelle ragazze (Factor-Litvak et al., 2014), a una diminuzione dello sviluppo mentale e psicomotorio nei ragazzi ma non nelle ragazze (Kim et al., 2011), e una diminuzione dello sviluppo mentale solo nelle ragazze di 3 anni (Whyatt et al., 2012). Negli ultimi anni sono aumentati gli studi che hanno indagato la possibile relazione tra IE e sviluppo neurocomportamentale del bambino, indagato tramite la somministrazione della Bayley; tra questi c'è lo studio effettuato su una coorte di 456 coppie madre-bambino che ha indagato le associazioni tra le concentrazioni di BPA, BPS e BPF nell'urina materna prelevata ripetutamente durante la gravidanza, con il neurosviluppo del bambino a 2 anni, (valutato con la Bayley) trovando che una maggiore esposizione prenatale al BPS era associata a uno sviluppo psicomotorio compromesso, e che l'esposizione al BPA nel secondo

trimestre, ma non durante il primo o il terzo trimestre, è stata associata negativamente allo sviluppo mentale all'età di 2 anni (Jiang et al, 2020); un altro esempio è lo studio del 2023 che cerca di determinare la relazione tra l'esposizione prenatale e della prima infanzia a nonilfenolo (NP) e bisfenolo A (BPA) e lo sviluppo neurocognitivo dei bambini in una coorte di coppie madre- bambino. I risultati dello studio mostrano associazioni sia positive che negative tra l'esposizione a NP e BPA e lo sviluppo neurologico nei bambini. Hanno trovato una correlazione inversa tra le concentrazioni di NP e lo sviluppo neurocognitivo di bambini di 2 e 3 anni. Al contrario, le concentrazioni di BPA nelle donne in gravidanza erano positivamente associate allo sviluppo neurocognitivo nei bambini di questa fascia di età (Wang et al., 2023).

- *Effetti sulla riproduzione:* per quanto riguarda la riproduzione si è visto come gli studi suggeriscono che l'esposizione a basse dosi di bisfenolo A (BPA-uno dei fenoli più diffusi) può influenzare lo sviluppo della ghiandola mammaria nella prole femmina di ratto (Acevedo et al., 2013; Mandrup et al., 2016); nei maschi, invece, l'esposizione a bisfenolo A, ma non ad altri fenoli, sembra alterare la performance sessuale soprattutto in termini di efficienza copulatoria e velocità nella monta (Jones et al. 2011). Considerando gli ftalati, invece, sono stati riscontrati soprattutto effetti sulla fertilità maschile, dove si evince che sembrano essere responsabili di una riduzione della fertilità dovuta al deterioramento della qualità e quantità dello sperma (Ahmad et al., 2014). Diversi studi sugli animali riportano che DBP, DEHP e BzBP inducono una marcata riduzione del testosterone fetale (prodotto dalle cellule di Leydig) e del fattore di crescita insulino-simile-3 (Insl-3), determinando diverse anomalie riproduttive maschili come: distanza anogenitale ridotta,

ipospadia, criptorchidismo e malformazioni dell'epididimo, dei vasi deferenti, delle vescicole seminali e della prostata. Queste anomalie insieme costituiscono la “sindrome degli ftalati” (Foster, 2006). Dagli studi sull'uomo invece, si riscontra una tendenza all'aumento, negli ultimi cinquant'anni, del tasso di infertilità e aborto, ovaio policistico, alterazioni degli organi genitali e incidenza di tumore mammario e uterino nella popolazione europea e americana, coerenti e probabilmente riconducibili all'esposizione a estrogeni come il BPA durante le prime fasi di sviluppo (Vandenberg et al., 2007).

### **1.3 IL PROGETTO Life- MILCH**

Il progetto Life MILCH “Mother and Infant dyads: Lowering the impact of endocrine disrupting Chemicals in milk for a Healthy Life” è uno studio longitudinale elaborato con il fine di misurare l'esposizione agli inquinanti chimici ad azione endocrina nella diade madre-bambino. Si tratta di uno studio sperimentale non su farmaco, a basso rischio perché non prevede esami invasivi e non aggiunge nessun tipo di rischio ai soggetti arruolati. È stato co-finanziato nel 2019 dalla Commissione Europea nell'ambito del programma finanziario LIFE Environment and Resource Efficiency che ha lo scopo di salvaguardia dell'ambiente e della natura, per cercare di ripristinare e migliorare la qualità delle risorse naturali.

Il progetto, di durata quinquennale, è stato sviluppato dall'Università di Parma in collaborazione con l'Azienda Ospedaliero-Universitaria di Parma; l'AUSL e l'IRCCS di Reggio Emilia, l'Università di Cagliari e il laboratorio PeptLab dell'Università di Firenze. Tale studio è multicentrico, ossia coinvolge tre centri ospedalieri di ricerca nelle città di Parma, Reggio Emilia e Cagliari. La scelta di località dislocate in Italia è stata effettuata

ipotizzando che ci fossero livelli di esposizione agli IE differenti tra Sardegna e Emilia-Romagna, dovuti principalmente ad un diverso livello di industrializzazione dei territori presi in esame.

Sono state arruolate 689 diadi (255 nella sede di Parma, 283 nella sede di Reggio Emilia e 151 nella sede di Cagliari) tra la trentaseiesima e la quarantunesima settimana di gestazione. A 0, 1, 3, 6, 12 e 24 mesi di età sono stati svolti follow-up al fine di indagare la presenza di IE nell'organismo materno e la loro eventuale influenza sullo sviluppo fisiologico e cognitivo del bambino.

La valutazione della presenza degli IE nella coppia madre-bambino è stata effettuata dalle ultime fasi della gravidanza fino al primo anno di vita, indagandone la presenza in diverse matrici biologiche, siero materno, sangue cordonale, urina materna e del bambino e latte materno (e/o artificiale).

Il progetto prevede tre fasi e l'avvio di una campagna di prevenzione:

- *1° fase*: vi è un primo attento biomonitoraggio delle diadi madre-infante e successivamente l'elaborazione di un "modello di rischio" per definire delle linee guida strategiche di salute pubblica.
- *Campagna di prevenzione*: sulla base dei risultati scientifici, le sedi coinvolte nel progetto promuoveranno una campagna di prevenzione presso le scuole, le università, i consultori, centri nascita, sedi di corsi parto, studi di medici di base, ginecologi, pediatri, ma principalmente la campagna vuole essere rivolta alle donne in gravidanza e allattamento, perché acquisiscano maggiore conoscenza e consapevolezza riguardo le abitudini che comportano una più elevata esposizione agli IE e gli effetti negativi che questi possono avere sulla salute e sulla prole esposta.

- 2° fase: prevede un secondo screening, ovvero un nuovo reclutamento con le medesime caratteristiche e modalità di svolgimento del primo, ma prendendo in considerazione e selezionando un numero di coppie madre- bambino inferiore e con il requisito di aver partecipato alla campagna di sensibilizzazione.
- 3° fase: a distanza di un lasso di tempo considerevole verrà effettuata una terza selezione per un numero ancora inferiore di diadi, per verificare o meno il risultato del secondo screening.

Il progetto, inoltre si propone di istituire un tavolo di confronto, una “tavola rotonda”, per/tra operatori commerciali coinvolti nella produzione di latte artificiale e prodotti per infanti. L'obiettivo è quello di persuaderli della necessità di ridurre la presenza degli IE in ciò che immettono sul mercato e di ottenerne un impegno formale attraverso la firma di accordi volontari. Un successivo attento monitoraggio socio-economico ed ambientale, in itinere, servirà per verificare l'efficacia degli interventi messi in atto per la riduzione dell'impatto negativo sulla salute umana dato dall'esposizione agli IE, con l'obiettivo, anche, di realizzare un marchio di certificazione informale di qualità, EDC-free LABEL, che sarà possibile assegnare a prodotti con comprovate caratteristiche (prodotti a basso contenuto di IE) che saranno scelti dal consumatore finale, a sua volta consapevole di quale sia la scelta giusta da fare per preservare la propria e altrui salute.

### **Prima fase**

La prima fase del progetto si divide in cinque tempi (*Figura 2*), ovvero cinque richiami in cui è richiesto alla diade madre- bambino di partecipare: reclutamento-gravidanza (T0); primo mese del bambino (T1); terzo mese (T3); sesto mese (T4); dodicesimo mese (T4).

A T0 è stato svolto il reclutamento di un campione di donne in gravidanza, tra la 36° e la 41° settimana gestazionale, avvenuto nelle città di Parma, Reggio Emilia e Cagliari. Per quanto riguarda la coorte di Parma sono state selezionate, su base volontaria, 245 donne presso il reparto di maternità dell'ospedale. Per questioni di privacy ad ogni diade veniva assegnato un codice identificativo alfanumerico che ne preservava l'anonimato. Veniva richiesta la compilazione di due questionari per indagare lo stile di vita della donna (Q1) e le sue abitudini alimentari (Q2) e la consegna di un campione di urina. Subito dopo il parto, vi era la raccolta dei campioni biologici e la prima visita neonatologica, che prevedeva la raccolta di alcuni parametri del bambino.

Il primo richiamo (T1) avveniva al compimento del primo mese del bambino. Si chiedeva alla madre di compilare nuovamente i questionari Q1, Q2, con l'aggiunta di Q3, relativo al bambino. Veniva effettuata, come da prassi, la visita neonatologica al bambino, vi era il prelievo di campioni biologici ed in aggiunta avveniva la somministrazione di un test, il paradigma di visualizzazione preferenziale, per ottenere informazioni sulle capacità percettive (Macchi Cassia et al., 2004).

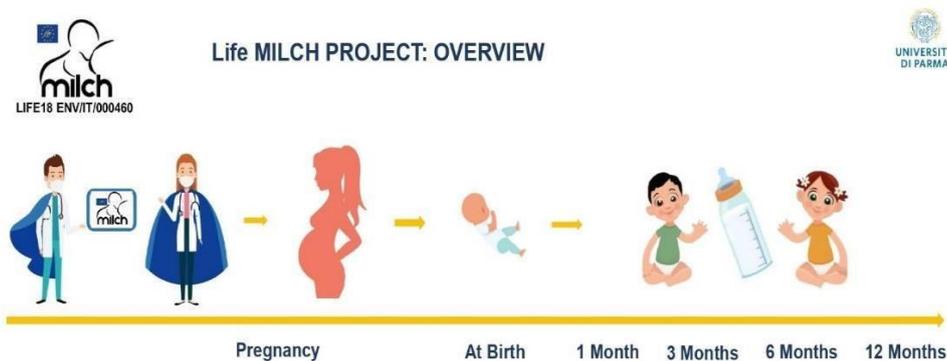
Il secondo richiamo (T2), al terzo mese del bambino, era strutturato con un iter pressoché identico al precedente. Veniva effettuata la visita neonatologica, la somministrazione dei questionari, la raccolta dei campioni biologici e la valutazione comportamentale che, in questo caso, veniva effettuata con la somministrazione del paradigma Face-to-face Still-Face (Tronick et al., 1978).

Al compimento del sesto mese veniva svolto il terzo richiamo (T3), che prevedeva, come di consueto, la visita neonatologica, la raccolta dei campioni biologici, la somministrazione dei questionari e la valutazione comportamentale effettuata tramite il Fagan Test of Infant Intelligence (Fagan J. F. e Shepard P., 1986) e, solitamente durante

un secondo incontro, veniva effettuata una valutazione globale del neurosviluppo tramite la Bayley Scales of Infant and Toddler Development, III Edizione (Bayley, 2006).

L'ultimo richiamo era ai 12 mesi del bambino (T4), anche in questo caso la procedura si ripeteva uguale ai richiami precedenti: visita neonatologica, questionari e raccolta dei campioni biologici. Veniva somministrata la Bayley III, come al senso mese e veniva valutato lo sviluppo comportamentale tramite l'osservazione del piccolo durante il compito del Barrier Task (Goldsmith e Rothbart, 1993).

Come precedentemente detto, si procederà con l'elaborazione del modello di rischio, la campagna di prevenzione e infine con il secondo e terzo screening.



*Figura 2 Timeline delle fasi del primo screening del Progetto (Brambilla, M.M.).*

#### **1.4 LA SCALA BAYLEY-III**

La Bayley Scales of Infant and Toddler Development (BSITD-III) è una versione rivisitata della Bayley Scales of Infant Development (BSITD-II). È uno strumento somministrato individualmente che valuta il funzionamento dello sviluppo di neonati e bambini di età compresa tra i 16 giorni e i 3 anni e mezzo di età (42 mesi e 15 giorni). I

suoi obiettivi primari sono identificare i bambini con ritardi dello sviluppo e fornire informazioni utili per pianificare l'intervento. La scala Bayley-III indaga cinque aree di competenza a cui corrispondono le cinque scale dello strumento. Gli ambiti cognitivo, linguistico e motorio sono valutati tramite somministrazione diretta da parte di un operatore formato in neuropsichiatria infantile e/o psicologia, mentre le aree socioemozionale e del comportamento adattivo sono indagate tramite la somministrazione di un questionario ai caregiver (La Madre et al., 2015) in quanto indagano comportamenti difficilmente osservabili in contesto clinico- osservazionale.

Le scale sono:

- Scala Cognitiva (Cog) valuta lo sviluppo sensomotorio, l'esplorazione, la manipolazione, la relazione con gli oggetti, la formazione dei concetti, la memoria e altri aspetti dell'elaborazione cognitiva;
- Scala del Linguaggio (Lang) è suddivisa in due sottoscale:
  - *Comunicazione recettiva (RC)*: prende in esame comportamenti preverbali, lo sviluppo del vocabolario e la comprensione verbale;
  - *Comunicazione espressiva (EC)*: valuta la comunicazione preverbale, lo sviluppo del vocabolario e quello morfosintattico;
- Scala Motoria (Mot) è suddivisa in due sottoscale:
  - *Fine motricità (FM)*: esamina l'integrazione motoria-percettiva, la pianificazione e velocità motoria;
  - *Grosso motricità (GM)*: valuta la postura, il movimento dinamico, l'equilibrio e la pianificazione grosso-motoria. (La Madre et al., 2015)

- Scala socioemozionale (SE): analizza il dominio dell'abilità emozionale-funzionale, le necessità di comunicazione, lo stabilire relazioni con gli altri, l'utilizzo delle emozioni con scopo interattivo, l'uso di segnali emozionali o gesti per risolvere i problemi.
- Scala del comportamento adattivo (GAC): valuta l'abilità nelle attività quotidiane del bambino, misurando ciò che fa abitualmente e ciò che potrebbe essere in grado di fare. Le aree misurate all'interno di questa scala includono: Comunicazione, Competenze prescolari, Autocontrollo, Gioco, Sociale, Comunità, Vivere in casa, Salute e sicurezza, Autonomia e Motoria.

La Scala Bayley è una delle maggiormente usate per indagare lo sviluppo neurocomportamentale del bambino. Inoltre, negli ultimi anni, è stata utilizzata in diversi studi per correlare lo sviluppo neurocognitivo del bambino con l'esposizione pre e post-natale agli IE, alcuni di questi citati precedentemente.

## **SCOPO DELLA TESI**

Basandosi sullo stato dell'arte riguardo gli IE e i loro effetti sullo sviluppo, questo studio ha l'obiettivo di indagare se le esposizioni pre e postnatali a specifici IE, possano avere effetti sullo sviluppo fisiologico e neurocomportamentale del bambino su una coorte del progetto Life MILCH. Lo sviluppo fisiologico inteso come peso, lunghezza e distanza anogenitale, è stato valutato dalla nascita, fino ai 24 mesi, con dei follow-up intermedi ad 1, 3, 6 mesi e 12 mesi. Mentre lo sviluppo neurocomportamentale è stato valutato tramite LA Bayley Development Scales III, somministrata a 6, 12 e 24 mesi, per cercare di evidenziare eventuali effetti degli IE sullo sviluppo cognitivo e comportamentale del bambino. È stata scelta la Bayley per questo tipo di valutazione, in quanto, tra le diverse valutazioni neurocomportamentali, è stato dimostrato in letteratura, sia quella che con il valore predittivo più alto riguardo le funzioni cognitive, il linguaggio e il quoziente intellettivo (Rubio-Codina & Grantham- McGregor, 2020).

## **MATERIALI E METODI**

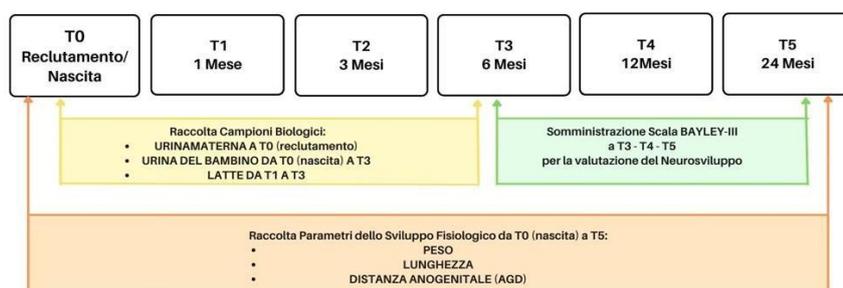
### **2.1 PARTECIPANTI**

Nel presente studio è stato considerato un sottocampione di 39 diadi madre-bambino, facenti parte dei partecipanti reclutati nella prima fase del progetto Life-MILCH, e aventi specifici requisiti.

Un requisito importante come criterio di inclusione della diade nel campione è che fossero presenti i parametri del bambino misurati durante le visite pediatriche e neonatologiche, sia al momento del parto che nei successivi follow-up (T0=nascita, T1= 1 mese, T2= 3 mesi, T3= 6 mesi, T4=12 mesi). Il secondo requisito è l'aver sostenuto la valutazione neurocomportamentale Bayley-III a 6 e 12 mesi. In ultimo, che tutte le diadi avessero partecipato anche ad un ulteriore richiamo effettuato al compimento dei 2 anni del bambino (T5), durante il quale c'è stata l'ultima somministrazione della Scala Bayley per la valutazione del neurosviluppo ed un'ulteriore visita pediatrica, con la raccolta di tutti i parametri del bambino precedentemente raccolti nelle visite neonatologiche. Successivamente, i parametri di crescita, nello specifico, peso, lunghezza e distanze anogenitali anteriore e posteriore sono state messe in relazione alle concentrazioni di IE trovate nei campioni biologici, per farlo è stato selezionato un primo sottocampione di 16 diadi, delle quali erano disponibili i campioni biologici analizzati.

In ultimo è stato selezionato un secondo sottocampione di 12 diadi, per il quale i criteri di inclusione da rispettare sono stati l'aver partecipato a tutte le somministrazioni della Scala Bayley-III (a 6, 12 e 24 mesi), e ancora una volta la disponibilità dei campioni biologici analizzati, in modo da poter indagare la possibile relazione tra le concentrazioni di IE e lo sviluppo neurocomportamentale (*Figura 3*).

## TIMELINE DEL PROGETTO



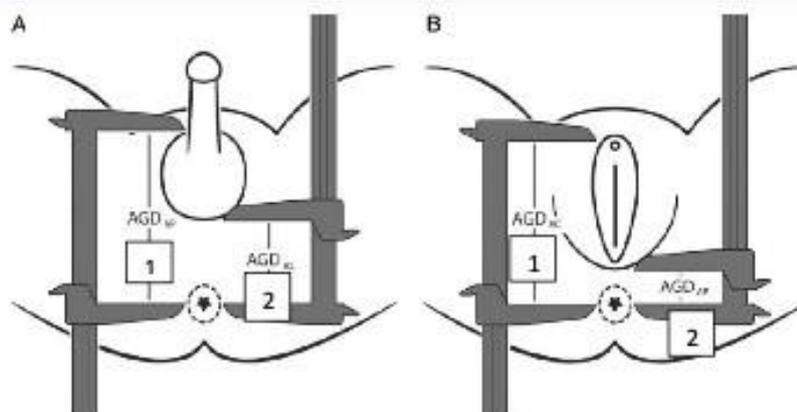
*Figura 3 Timeline fasi del presente studio*

## 2.2 VALUTAZIONE DELLA CRESCITA E SVILUPPO FISIOLÓGICO

Sono state raccolte le misure riguardanti i parametri di crescita e di sviluppo puberale in 21 maschi e 18 femmine a T0, T1, T2, T3, T4 e T5. Durante tutti gli incontri il personale medico ha provveduto alla rilevazione delle misure dei parametri presi in considerazione in questo studio che sono: lunghezza (cm), peso (kg) circonferenza cranica (cm), circonferenza dell'addome (rilevata solo alla nascita), dimensioni della fontanella bregmatica (cm), pliche cutanee (del bicipite, del tricipite, la sottoscapolare e la sovrailiaca, misurate in mm) e le distanze anogenitali anteriore e posteriore (cm) (*Figura 4*).

Veniva anche assegnato un valore di maturazione puberale tarato secondo gli stadi di Tanner. Venivano inoltre valutate le caratteristiche dei genitali esterni e la possibile presenza di ulteriori malformazioni.

In aggiunta, per i maschi sono state valutate lunghezza del pene (cm), la localizzazione dei testicoli, il volume testicolare (ml).



**Figura 4** Misurazione della distanza anogenitale. A) Maschio: 1)  $AGD_{AP}$ - $AGD 1$ = distanza dall'ano alla base anteriore del pene; 2-  $AGD_{AS}$ - $AGD 2$ = distanza dall'ano alla giunzione perineoscrotale; B) Femmine: 1)  $AGD_{AC}$ - $AGD 1$ =distanza dall'ano al clitoride; 2-  $AGD_{AF}$ - $AGD 2$  = distanza dall'ano alla forchetta posteriore.

### 2.3 VALUTAZIONE DEL NEUROSVILUPPO TRAMITE BAYLEY-III

Le scale Bayley-III (Bayley, 2006) è stata somministrata in 21 maschi e 18 femmine a 6, 12 e 24 mesi di età. La scala indaga cinque aree di competenza, alle quali fanno riferimento le scale di cui si compone lo strumento, che sono: la scala cognitiva; la scala del linguaggio, divisa in comunicazione recettiva ed espressiva; la scala motoria, divisa in fine-motricità e grosso motricità; la scala socioemozionale; e la scala del comportamento adattivo.

La scala Bayley-III copre un range di età molto ampio, per cui, molti item sono esclusi dalla valutazione dei bambini più piccoli, trattandosi di competenze che acquisiranno con l'avanzare dell'età. Per determinare il punto di partenza appropriato per la somministrazione delle scale si considera l'età al momento del test (data di nascita sottratta dalla data del test).

### **2.3.1 Somministrazione**

In una fase precedente alla somministrazione, si procede con la preparazione del materiale, con il calcolo dell'età del bambino in modo da individuare l'item di partenza da cui iniziare la valutazione e con la firma dei consensi necessari.

Durante la somministrazione della BSITD-III il bambino ed il somministratore si trovano l'uno di fronte all'altro. Il bambino è seduto sulle gambe del caregiver (il più delle volte la madre), in modo che si possa sentire a proprio agio nella fase di interazione con gli oggetti e con l'osservatore. Il caregiver può interagire con il bambino, incoraggiandolo a giocare ma non può interferire con la sua performance. Tra l'esaminatore ed il bambino è posizionato un tavolo, necessario per la somministrazione dei diversi item. Si inizia con la somministrazione, dal punto della scala individuato, il bambino deve ricevere un punteggio pari a 1 nei primi tre item consecutivi per proseguire (ottenendo il basal, ovvero il livello base). Se il bambino ottiene un punteggio pari a 0 in qualcuno dei primi tre item, si deve tornare al punto di partenza per l'età precedente e somministrare questi item procedendo nel percorso. Questa regola è applicata finché il bambino non supera i primi tre item consecutivi. Ottenuto il basal, si procede item dopo item fino a quando il bambino non è più in grado di portare a termine i compiti e ottiene un punteggio pari a 0 per cinque item successivi. In questo caso si termina la valutazione in una specifica sottoscala e si passa alla successiva. Questa procedura viene svolta per tutte le sottoscale presenti nel test. Il passo successivo consiste nell'attribuzione di un punteggio ad ogni item che il bambino ha svolto.

Al termine della somministrazione diretta al bambino, si chiede alla madre di compilare il questionario sul comportamento socioemozionale e sul comportamento adattivo. Indipendentemente dall'età del bambino, il caregiver deve iniziare con l'item 1 della scala

socioemozionale e completare ogni item finché non raggiunge il punto di arresto appropriato all'età del bambino. Anche la scala del comportamento adattivo deve essere completata nella sua interezza con l'eccezione di tre aree di abilità per bambini d'età inferiore ai 12 mesi. Le tre aree di abilità che non sono rilevanti per questo gruppo d'età sono: Competenze prescolari, Vivere in casa e Comunità.

### **2.3.2 Codifica dei punteggi**

Per quanto riguarda la parte della scala somministrata al bambino, gli item di ogni sottoscala fanno riferimento a diversi comportamenti che il bambino potrebbe o meno manifestare e ad ognuno viene assegnato un punteggio di 0 o 1, dove 0 viene assegnato se il bambino non ha soddisfatto il criterio, se il bambino rifiuta di svolgere il compito o se il comportamento non è stato osservato durante il test. Mentre il punteggio 1 viene assegnato se il bambino ha soddisfatto il criterio. Questo permette di generare un punteggio grezzo per ogni scala, calcolato sommando il numero totale di item per i quali il bambino riceve un punteggio pari a 1 e tutti gli item che precedono il basal.

Se facciamo riferimento, invece, ai questionari somministrati al caregiver, la codifica della scala socioemozionale implica che venga attribuito un punteggio agli item utilizzando una scala Likert da 0 a 5, in cui 0 corrisponde a "Non so" e 5 corrisponde a "Sempre". Mentre, le aree delle abilità del comportamento adattivo richiedono l'attribuzione di un punteggio, in base alla frequenza del comportamento, da 0 a 3, dove 0 corrisponde a "Non è in grado" e 3 corrisponde a "sempre". È anche presente un'opzione aggiuntiva che la madre può contrassegnare se non è del tutto certa di aver rilevato il comportamento in questione. Il punteggio grezzo per la scala socioemozionale e del comportamento adattivo si ottiene sommando le frequenze del comportamento (0,

1, 2, 3, 4 o 5 per gli item socioemozionali; 0, 1, 2 o 3 per gli item del comportamento adattivo).

Utilizzando apposite tabelle normative distinte per età, dai punteggi grezzi si ottengono i punteggi scalati che sono classificati da 1 a 19, con una media pari a 10 e una deviazione standard pari a 3. Successivamente, dai punteggi scalati, sono dedotti i punteggi compositi che, per la Scala del linguaggio, la scala motoria e la scala del comportamento adattivo, sono ricavati dalle diverse somme dei punteggi scalati. I punteggi compositi sono pesati in base ad una metrica con una media pari a 100 e una deviazione standard pari a 15 e classificati da 40 a 160 (Bayley, 2009). Punteggi compresi tra 85 e 115 nelle diverse aree sono considerati nella norma.

## **2.4 RACCOLTA E ANALISI DEI CAMPIONI BIOLOGICI**

Sono stati raccolti i seguenti campioni biologici:

- Urina materna a: T0 (reclutamento), T1, T2, T3;
- Urina del bambino a: T0 (nascita), T1, T2, T3, T4;
- Latte materno a: T1, T2, T3.

I dosaggi dei livelli di IE sono stati analizzati dal laboratorio PeptLab dell'Università di Firenze, usando una metodologia LC-MS/MS specifica per la valutazione degli IE. A questo scopo i campioni pretrattati sono stati iniettati in una UPLC (Ultra Performance Liquid Chromatography- Waters, Acquity, Midford, Massachusetts, USA) accoppiata ad un triplo quadrupolo Waters XEVO TQ-S usando una strumentazione di ionizzazione elettrospray. Sono state acquisite due transizioni MRM (Multiple reaction monitoring) per la quantificazione e conferma degli obiettivi. Le transizioni MRM, i voltaggi del cono e le energie di collisione sono state precedentemente adeguate insieme ai tempi attesi di

conservazione. Le diadi sono state suddivise sulla base dei limiti di quantificazione (Limit of Quantification, LOQ), di detezione o rivelabilità (Limit of Detection, LOD) delle sostanze di interesse. Questi indici sono un'importante caratteristica del metodo analitico che identifica il limite inferiore di concentrazione sotto il quale il campione non può essere rilevato dallo strumento (LOD) o quantificato (LOQ) con sufficiente probabilità statistica. La concentrazione di IE nell'urina materna, nell'urina del bambino e nel latte per ogni diade è stata dunque definita sopra, sotto o tra i livelli di quantificazione e detezione standardizzati.

Nel dettaglio gli IE analizzati da Firenze sono ftalati, bisfenolo A (BPA) (e suoi analoghi BPS, BPF), idrocarburi aromatici policiclici (PAHs), policlorodibenzofurani (PCDFs), diossine e simil-diossine, sostanze perfluoro alchiliche (PFAS), glifosato, parabeni, insetticidi piretroidi e metalli pesanti.

Per il presente lavoro di tesi sono stati considerati soltanto alcuni di questi IE, nello specifico quelli rilevati in più del 50% dei campioni delle diadi considerate (*Tabella 1 e*

2). Gli IE considerati sono:

- Bisfenolo A (BPA)
- Dimetil ftalato (DMP)
- DEP
- Dibutil ftalato (DBP)
- Monoetil ftalato (MEP)
- MBP
- Monobenzil ftalato (MBzP)
- MEHP
- MEHHP

- Mono (2-etil-5-ossoetil) ftalato (MEOHP)

ANALITI	T1			T2			T3		
	% > LOQ	LOQ < % < LOD	% > LOD	% > LOQ	LOQ < % < LOD	% > LOD	% > LOQ	LOQ < % < LOD	% > LOD
N=16									
BPA	37,5	12,5	50	75	6,25	81,25	68,75	0	68,75
DMP	68,75	0	68,75	25	12,5	37,5	31,25	12,5	43,75
DEP	37,5	6,25	43,75	12,5	0	12,5	37,5	0	37,5
DBP	43,75	6,25	50	87,5	0	87,5	75	0	75
MEP	37,5	25	62,5	12,5	6,25	18,75	0	0	0
MBP	31,25	0	31,25	6,25	0	6,25	0	0	0
MBZP	75	6,25	81,25	25	25	50	0	31,25	31,25
MEHP	6,25	18,75	25	12,5	0	12,5	0	0	0
MEHHP	43,75	6,25	50	12,5	0	12,5	0	0	0
MEOHP	75	0	75	12,5	0	12,5	0	0	0

Tabella 1 Percentuali dei campioni di latte materno con concentrazioni di IE >LOQ, LOQ < % < LOD e > LOD.

ANALITI	T0			T1			T2			T3		
	% > LOQ	LOQ < % < LOD	% > LOD	% > LOQ	LOQ < % < LOD	% > LOD	% > LOQ	LOQ < % < LOD	% > LOD	% > LOQ	LOQ < % < LOD	% > LOD
N=16												
BPA	62,5	0	62,5	43,75	6,25	50	50	6,25	56,25	56,25	0	56,25
DMP	25	6,25	31,25	25	6,25	31,25	31,25	6,25	37,5	18,75	18,75	37,5
DEP	93,75	0	93,75	93,75	0	93,75	100	0	100	93,75	0	93,75
DBP	18,75	12,5	31,25	18,75	6,25	25	0	0	0	0	12,5	12,5
MEP	93,75	6,25	100	75	6,25	93,75	81,25	6,25	93,75	93,75	18,75	93,75
MBP	100	6,25	100	100	6,25	100	100	6,25	100	100	18,75	100
MBZP	43,75	6,25	62,5	43,75	6,25	62,5	56,25	6,25	56,25	31,25	18,75	50
MEHP	25	6,25	43,75	31,25	6,25	68,75	18,75	6,25	37,5	50	18,75	68,75
MEHHP	56,25	6,25	62,5	62,5	6,25	75	87,5	6,25	87,5	87,5	18,75	87,5
MEOHP	56,25	6,25	75	75	6,25	93,75	87,5	6,25	87,5	75	18,75	87,5

Tabella 2 Percentuali dei campioni di urina materna con concentrazioni di IE >LOQ, LOQ < % < LOD e > LOD.

## 2.5 ANALISI DEI DATI

Nel presente studio le descrizioni del campione, dei dati biologici, dei parametri di crescita e delle valutazioni effettuate con la Scala Bayley-III sono state eseguite calcolando percentuali, medie e deviazioni standard per ogni variabile in funzione del genere di appartenenza.

I parametri di crescita e le scale del neurosviluppo sono state analizzate tramite ANOVA a misure ripetute, per indagare come variano i parametri nel tempo ed anche se nella variazione nel tempo incide l'apparenza al genere.

Per la valutazione di una possibile relazione tra le concentrazioni degli IE trovati nei campioni biologici, e le misure riguardanti specifici parametri di crescita del bambino, raccolte ad ogni richiamo (peso, lunghezza e distanze anogenitali), è stato utilizzato il test di correlazione Rho di Spearman. Il medesimo procedimento è stato eseguito anche per valutare la possibile correlazione tra le concentrazioni di IE, e lo sviluppo neurocomportamentale del bambino, valutato a 6, 12 e 24 mesi, utilizzando per la correlazione i dati ottenuti da ogni scala della Bayley-III (cognitiva, del linguaggio, motoria, socioemozionale e del comportamento adattivo).

Tutti i dati sono stati analizzati utilizzando il programma R versione 4.3.2.

## RISULTATI

### 3.1 CAMPIONE

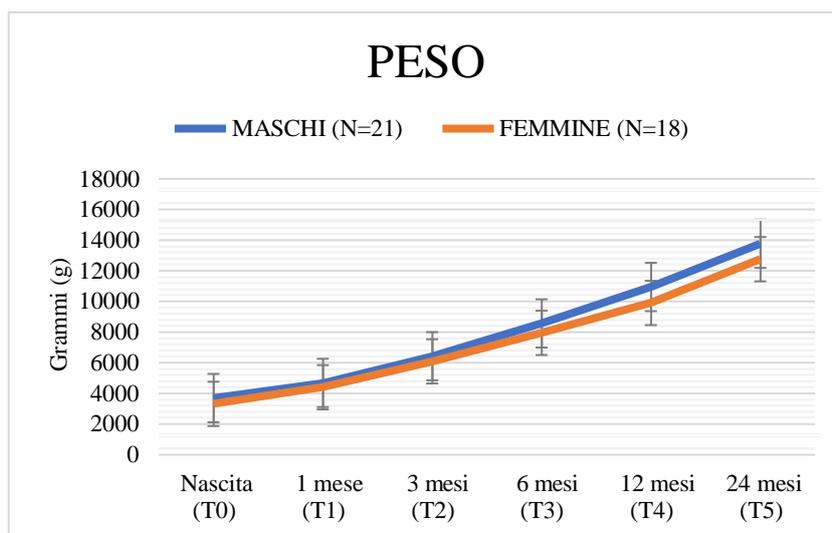
Il campione oggetto del presente studio comprende 39 diadi madre-bambino: 21 bambini di genere maschile e 18 di genere femminile.

Sono state descritte le misure di crescita del campione, nello specifico peso, lunghezza e le distanze anogenitali: anteriore (AGD 1<sub>AP-AC</sub>) e posteriore (AGD 2<sub>AS-AF</sub>) a T0, T1, T2, T3, T4 E T5.

### 3.2 ANALISI DEI PARAMETRI DI CRESCITA E SVILUPPO FISIOLÓGICO

#### Peso

L'analisi della crescita corporea dei bambini dalla nascita (T0) ai 24 mesi (T5) ha mostrato che tutti i bambini, indipendentemente dal sesso, aumentano significativamente il loro peso dalla nascita al 24° mese (tempo:  $F(5, 95) = 1.11$ ,  $p = 0.358$ ,  $\eta^2_p = 0.055$ ) (Figura 5).



**Figura 5** Peso corporeo (g) dalla nascita (T0) a 24 mesi (T5). I dati sono mostrati come medie  $\pm$  sd.

## Lunghezza

L'analisi della lunghezza dei bambini dalla nascita (T0) ai 24 mesi (T5) ha mostrato che tutti i bambini, indipendentemente dal sesso, aumentano significativamente la loro lunghezza dalla nascita al 24° mese (tempo:  $F(5,95)=0.257$ ,  $p=0.935$ ,  $\eta^2_P=0.013$ ) (Figura 6).

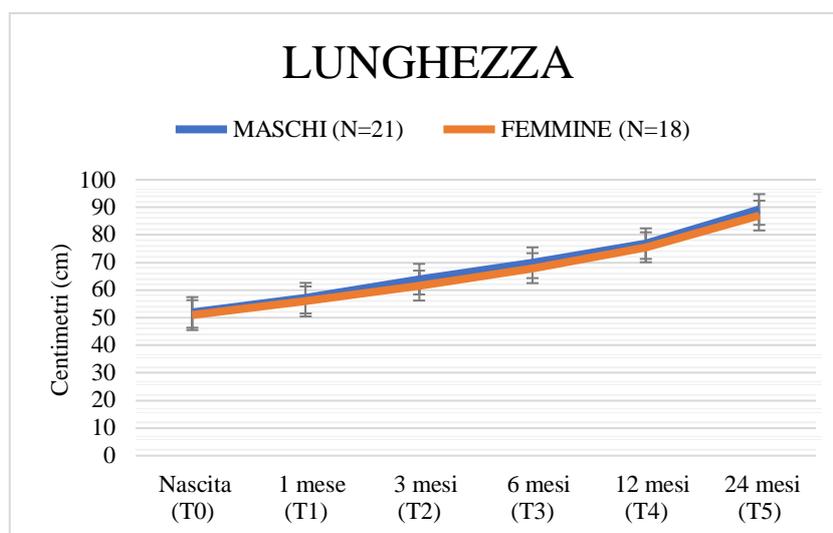


Figura 6 Lunghezza (cm) dalla nascita (T0) a 24 mesi (T5). I dati sono mostrati come medie  $\pm$  sd.

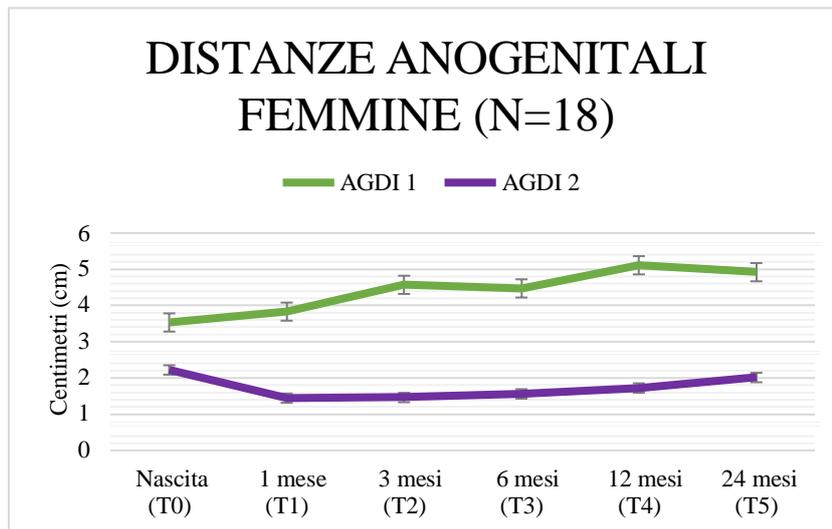
## Distanza anogenitale

L'analisi statistica della distanza anogenitale è stata effettuata separatamente per maschi e femmine in quanto parametri differenti nei due sessi.

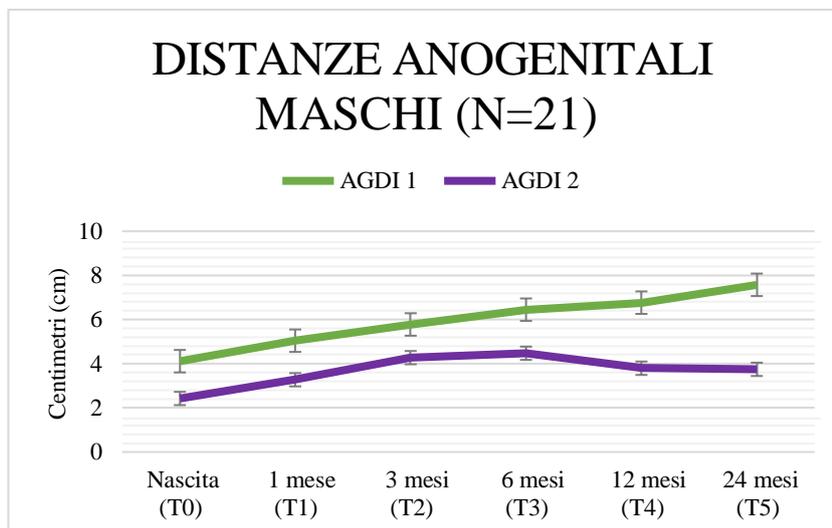
La distanza anogenitale anteriore (AGD1) sia nei maschi che nelle femmine mostra un aumento perlopiù costante dalla nascita (T0) ai 24 mesi (T5) (maschi-tempo:  $F(5,55)=19.6$ ,  $p<0.001$ ,  $\eta^2_P=0.641$ ; femmine-tempo:  $F(5,40)=7.05$ ,  $p<0.001$ ,  $\eta^2_P=0.469$ ).

Diversamente, l'analisi della distanza anogenitale posteriore (AGD2) nei maschi aumenta fino ai 6 mesi (T3) poi diminuisce fino ai 24 mesi (T5) (maschi-tempo:  $F(5,55)=10.5$ ,

$p < 0.001$ ,  $\eta^2_P = 0,490$ ) mentre nelle femmine decresce con il crescere dell'età (femmine-tempo:  $F(5,35) = 1.26$ ,  $p = 0.303$ ,  $\eta^2_P = 0.152$ ) (Figure 7 e 8).



**Figura 7** Distanze anogenitali anteriore (AGDI1) e posteriore (AGDI2) nelle femmine dalla nascita (T0) a 24 mesi (T5). I dati sono mostrati come medie  $\pm$  sd.



**Figura 8** Distanze anogenitali anteriore (AGDI1) e posteriore (AGDI2) nei maschi dalla nascita (T0) a 24 mesi (T5). I dati sono mostrati come medie  $\pm$  sd.

### 3.3 ANALISI DEI PARAMETRI DEL NEUROSVILUPPO

È stato valutato lo sviluppo neurocomportamentale, tramite la somministrazione della Scala Bayley-III a 6, 12 e 24 mesi.

Tutte le scale valutate in maschi e femmine a 6, 12 e 24 mesi mostrano punteggi all'interno dei range normativi di riferimento (85-115) (Tabella 3a, b e c).

a

#### T3 – 6 MESI (N=39)

	FEMMINE (N=18)					MASCHI (N=21)					
	Cognitiva	Linguistica	Motoria	Socioem.	C. Adattivo	Cognitiva	Linguistica	Motoria	Socioem.	C. Adattivo	
<b>Media</b>	110,28	84,89	109,44	106,61	105,61	<b>Media</b>	110	86,81	106,43	103,81	106,95
<b>SD</b>	7,17	9,4	8,66	12,42	12,42	<b>SD</b>	7,75	8,73	12,02	13,03	10,56
<b>MIN</b>	100	74	94	80	80	<b>MIN</b>	100	65	79	80	87
<b>MAX</b>	125	115	124	124	124	<b>MAX</b>	125	100	121	125	126

b

#### T4 – 12 MESI (N=39)

	FEMMINE (N=18)					MASCHI (N=21)					
	Cognitiva	Linguistica	Motoria	Socioem.	C. Adattivo	Cognitiva	Linguistica	Motoria	Socioem.	C. Adattivo	
<b>Media</b>	106,39	91,61	100	102,22	100,11	<b>Media</b>	104,28	89,85	92,62	104,29	99,9
<b>SD</b>	11,61	7,39	12,1	17,67	14	<b>SD</b>	7,46	5,73	11,51	11,54	15,42
<b>MIN</b>	65	79	82	70	71	<b>MIN</b>	90	79	79	90	62
<b>MAX</b>	120	112	121	140	123	<b>MAX</b>	115	97	115	130	132

c

#### T5 – 24 MESI (N=39)

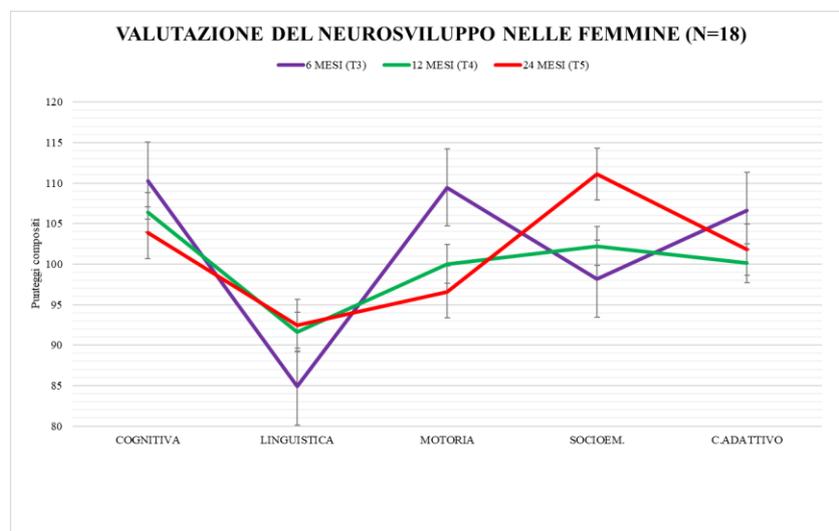
	FEMMINE (N=18)					MASCHI (N=21)					
	Cognitiva	Linguistica	Motoria	Socioem.	C. Adattivo	Cognitiva	Linguistica	Motoria	Socioem.	C. Adattivo	
<b>Media</b>	103,88	92,44	96,56	111,11	101,78	<b>Media</b>	99,76	87,33	91,43	105,95	96,86
<b>SD</b>	10,92	6,26	7,51	14,71	16,27	<b>SD</b>	8,29	8,78	6,09	18,07	13,33
<b>MIN</b>	90	79	85	85	67	<b>MIN</b>	80	68	73	60	70
<b>MAX</b>	130	103	112	140	128	<b>MAX</b>	120	103	100	140	123

**Tabella 3** Punteggi compositi ottenuti mediante la Scala di valutazione Bayley- III in maschi e femmine a: a) 6 mesi; a) 12 mesi e c) 24 mesi.

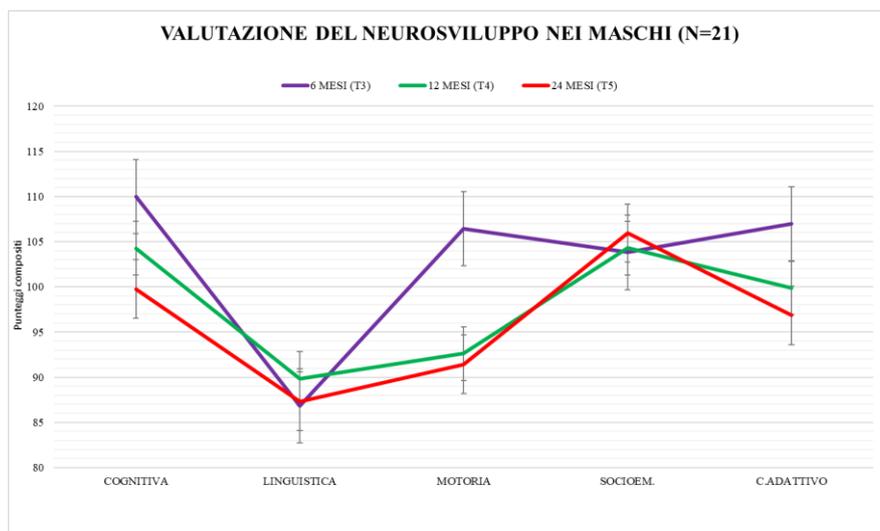
Tutti i punteggi delle varie scale variano con lo stesso andamento nei due sessi. Le scale cognitiva e motoria mostrano un decremento statisticamente significativo da T3 a T5 sia nei maschi che nelle femmine (cognitiva-tempo:  $F(2,74)=8.996$ ,  $p<0.001$ ,  $\eta^2_P=0.196$ ; motoria- tempo:  $F(2,74)=0.25.921$ ,  $p<0.001$ ,  $\eta^2_P=0.412$ ).

La scala linguistica mostra una crescita statisticamente significativa nel tempo (linguistica-tempo:  $F(2,74)=5.53$ ,  $p=0.006$ ,  $\eta^2_P=0.130$ ) (Figure 9 e 10).

Non si riscontrano differenze dipendenti dal genere.



**Figura 9** Punteggi composti ottenuti mediante la Scala di valutazione Bayley III nelle femmine a 6 mesi (T3), 12 mesi (T4) e 24 mesi (T5).



**Figura 10** Punteggi composti ottenuti mediante la Scala di valutazione Bayley III nei maschi a 6 mesi (T3), 12 mesi (T4) e 24 mesi (T5).

### 3.4 CORRELAZIONI TRA ESPOSIZIONE PRE- E POST-NATALE AD IE E SVILUPPO

Le correlazioni sono state effettuate su un sottocampione di 16 diadi madre-bambino, andando a valutare le concentrazioni degli IE selezionati per questo studio. Bisogna inoltre tenere presente che, data la piccola numerosità del campione, le analisi effettuate possiedono una potenza limitata, e questo spiega anche la frequente mancanza di significatività. Si tratta di uno studio preliminare, con il quale non è possibile generalizzare i risultati ottenuti alla popolazione.

## Concentrazione degli IE nei campioni biologici

LIVELLI DI IE NELL'URINA MATERNA A T0 (µg/g creatinina)						
IE	N > LOQ	Media (µg/g creatinina)	SD	Mediana	Min	Max
BPA	10	3,8294	4,76051	1,052	0,51	12,81
DMP	4	2,31	1,72965	1,8545	0,76	4,78
DEP	15	4,1142	7,55229	1,984	0,47	30,81
DBP	3	1,6897	0,38378	1,533	1,41	2,13
MEP	15	13,8859	22,8793	2,551	0,24	83,43
MBP	16	1,5333	2,14922	0,9235	0,32	9,32
MBP	7	0,5707	0,31819	0,659	0,21	0,94
MEHP	4	0,3898	0,17814	0,466	0,12	0,5
MEHHP	9	1,0399	1,16187	0,695	0,08	3,89
MEOHP	9	1,0421	1,11239	0,822	0,09	3,79

Tabella 4 Concentrazioni degli IE (µg/g creatinina) nell'urina materna al reclutamento (T0).

LIVELLI DI IE NEL LATTE MATERNO a T1, T2 e T3 (ng/ml)							
IE	Tempo	N > LOQ	Media (ng/ml)	Mediana	SD	Min	Max
BPA	T1	6	1,5093	0,4485	2,54414	0,24	6,67
	T2	11	6,2063	6,548	6,65976	0,34	21,01
	T3	11	4,0565	1,958	4,45514	0,02	11,85
DMP	T1	11	1,1754	1,086	1,00521	0,19	3,89
	T2	4	3,037	2,285	2,83774	0,51	7,07
	T3	5	2,2988	1,757	1,95078	0,69	5,68
DEP	T1	6	0,9777	0,6385	1,01099	0,11	2,94
	T2	2	1,3505	1,3505	1,24946	0,47	2,23
	T3	6	1,0413	0,957	0,87822	0,13	2,4
DBP	T1	7	4,0776	2,862	4,05665	0,87	12,61
	T2	14	5,2032	5,1205	2,79139	0,59	9,29
	T3	12	7,4601	5,8395	7,23904	0,44	28,57
MEP	T1	6	0,0277	0,0265	0,01086	0,02	0,05
	T2	2	0,0275	0,0275	0,01061	0,02	0,04
	T3	0					
MBP	T1	5	0,6774	0,273	0,76152	0,04	1,91
	T2	1	1,624	1,624		1,62	1,62
	T3	0					
MBzP	T1	12	0,2653	0,2735	0,05851	0,09	0,31
	T2	4	0,1868	0,1945	0,12223	0,05	0,31
	T3	0					
MEHP	T1	0					
	T2	2	0,17	0,17	0,17819	0,04	0,3
	T3	0					
MEHHP	T1	7	0,0633	0,059	0,02213	0,04	0,11
	T2	2	0,063	0,063	0,01556	0,05	0,07
	T3	0					
MEOHP	T1	12	0,0567	0,054	0,00822	0,05	0,08
	T2	2	0,053	0,053	0,00141	0,05	0,05
	T3	0					

Tabella 5 Concentrazioni degli IE nel latte materno (ng/ml) a 1 mese (T1), 3 mesi (T2) e a 6 mesi (T3).

LIVELLI DI IE NELL'URINA BAMBINO a T0, T1, T2, T3 e T4 (µg/g creatinina)							
IE	Tempo	N > LOQ	Media (µg/g creatinina)	SD	Mediana	Min	Max
BPA	T0	6	11,6863	6,2175	13,73235	0,41	33,39
	T1	5	34,9696	30,372	31,97485	4,15	88,36
	T2	4	16,225	6,903	21,50889	2,81	48,29
	T3	0					
DMP	T0	1	0,224	0,224		0,22	0,22
	T1	2	0,623	0,623	0,35214	0,37	0,87
	T2	1	0,532	0,532		0,53	0,53
	T3	1	0,295	0,295		0,3	0,3
DEP	T0	11	4,476	2,745	3,20388	1,4	10,89
	T1	7	3,7747	0,924	7,13479	0,27	19,79
	T2	5	1,0356	0,754	0,87066	0,25	2,53
	T3	4	3,5713	2,273	4,10667	0,36	9,38
DBP	T0	3	3,1403	3,653	1,44776	1,51	4,26
	T1	0					
	T2	0					
	T3	1	119,778	119,778		119,78	119,78
MEP	T0	11	1,3655	1,113	1,56578	0,22	5,72
	T1	11	4,7405	0,953	12,36278	0,08	41,86
	T2	5	1,893	1,715	1,6396	0,2	4,55
	T3	4	2,267	1,6645	2,25832	0,27	5,47
MBP	T0	12	4,4203	3,9015	2,42666	1,04	8,39
	T1	12	1,5166	0,288	3,83476	0,04	13,6
	T2	4	0,451	0,394	0,27806	0,18	0,84
	T3	3	2,5557	0,472	3,89387	0,15	7,05
MBzP	T0	7	0,6556	0,32	0,72489	0,06	2,04
	T1	4	0,6002	0,35	0,64007	0,17	1,54
	T2	1	0,131	0,131		0,13	0,13
	T3	0					
MEHP	T0	0					
	T1	0					
	T2	0					
	T3	1	86,481	86,481		86,48	86,48
MEHHP	T0	6	0,2077	0,16	0,16948	0,07	0,53
	T1	6	0,498	0,3095	0,55405	0,16	1,6
	T2	3	0,585	0,059	0,93279	0,03	1,66
	T3	0					
MEOHP	T0	3	0,103	0,116	0,03439	0,06	0,13
	T1	0					
	T2	1	0,035	0,035		0,04	0,04
	T3	0					

**Tabella 6** Concentrazioni degli IE (µg/g creatinina) nell'urina del bambino al reclutamento alla nascita (T0), 1 mese (T1), 3 mesi (T2), 6 mesi (T3) e 12 mesi (T4).

Nelle *tabelle 4, 5 e 6* vengono riportati i valori di concentrazione dei vari IE espressi in µg/ g di creatinina per l'urina e in ng/ml per il latte, e calcolate media, mediana, sd, N di campioni sopra LOQ, il valore minimo ed il valore massimo di ogni concentrazione. Dalle analisi si è riscontrato che l'IE presente maggiormente nell'urina materna al reclutamento (T0) è il MEP con un valore medio di  $13.88 \pm 22.88$  µg/g creatinina. Mentre nel latte la concentrazione media maggiore ad 1 mese (T1) la ha il DBP con  $4.07 \pm 4.05$  ng/ml, a 3 mesi (T2) la ha il BPA con  $6.20 \pm 6.65$  ng/ml, e a 6 mesi (T3) la ha nuovamente il DBP con  $7.46 \pm 7.2$  ng/ml. Infine, nell'urina del bambino la maggiore concentrazione riscontrata alla nascita (T0) è quella del BPA con un valore medio di  $11.68 \pm 6.21$  µg/g creatinina, come anche ad 1 mese (T1) con  $34.96 \pm 30.37$  µg/g creatinina ed a 3 mesi (T2)

con  $16.22 \pm 2.90$   $\mu\text{g/g}$  creatinina. Mentre a 6 mesi (T3), la concentrazione maggiore è quella del DBP con un valore medio di  $119.78 \pm 119.78$   $\mu\text{g/g}$  creatinina (in questo caso però il valore medio si riferisce ad una sola diade, in quanto è stata l'unica ad avere un punteggio sopra il LOQ).

### Effetti sulla crescita corporea

In relazione ai parametri di crescita sono emerse correlazioni sia negative che positive. A T0 è risultata significativa una correlazione forte negativa tra i valori rilevati al MBP nell'urina materna a T0 e AGD 2 a T0 ( $\rho = -0.6$ ;  $p = 0.04$ ), ed una seconda correlazione significativa forte ma positiva, sempre tra i valori di MBP nell'urina materna a T0 ed il peso a T0. Tutte le altre correlazioni calcolate, seppur alcune di forte entità, non sono risultate significative. (Tabella 9).

Questo può essere dovuto alla limitatissima numerosità campionaria.

CORRELAZIONE ESPOSIZIONE PRE-NATALE e PARAMENTRI DI CRESCITA ALLA NASCITA					
URINA MATERNA		PESO	LUNGHEZZA	AGD1	AGD2
IE	Dosaggio	T0	T0	T0	T0
BPA	T0	$\rho = -0.07$ ; $p = 0.90$	$\rho = 0.3$ ; $p = 0.93$	$\rho = 0.25$ ; $p = 0.65$	$\rho = -0.71$ ; $p = 0.17$
DMP	T0	NA	NA	NA	NA
DEP	T0	$\rho = 0.57$ ; $p = 0.08$	$\rho = 0.10$ ; $p = 0.76$	$\rho = 0.05$ ; $p = 0.89$	$\rho = -0.15$ ; $p = 0.71$
DBP	T0	NA	NA	NA	NA
MEP	T0	$\rho = 0.41$ ; $p = 0.23$	$\rho = 0.06$ ; $p = 0.84$	$\rho = -0.24$ ; $p = 0.52$	$\rho = -0.26$ ; $p = 0.52$
MBP	T0	$\rho = 0.63$ ; $p = 0.04^*$	$\rho = 0.44$ ; $p = 0.16$	$\rho = 0.08$ ; $p = 0.81$	$\rho = -0.65$ ; $p = 0.04^*$
MBzP	T1	NA	NA	NA	NA
MEHP	T0	NA	NA	NA	NA
MEHHP	T0	$\rho = 0.6$ ; $p = 0.24$	$\rho = 0.51$ ; $p = 0.30$	$\rho = 0.6$ ; $p = 0.24$	$\rho = -0.05$ ; $p = 0.93$
MEOHP	T0	$\rho = 0.9$ ; $p = 0.08$	$\rho = 0.44$ ; $p = 0.45$	$\rho = 0.6$ ; $p = 0.35$	$\rho = -0.4$ ; $p = 0.75$

Tabella 9 Correlazioni tra concentrazioni di IE nell'urina materna al reclutamento (T0) e i parametri di crescita del bambino alla nascita (T0).

Sono state trovate diverse correlazioni significative tra le concentrazioni di IE rilevati nel latte materno a 1 mese (T1), 3 mesi (T2) e 6 mesi (T3), e le misure relative al peso e alla lunghezza (*Tabelle 10 e 11*):

- una correlazione forte e negativa tra le concentrazioni di MEOHP trovate nel latte a T1 e il peso a T1 ( $\rho = -0.6$ ;  $p = 0.04$ );
- una correlazione forte negativa tra i valori trovati nel latte di MEOHP a T1 e AGD 1 a T1 ( $\rho = -0.8$ ;  $p = 0.001$ );
- una correlazione forte positiva tra i valori di DMP nel latte a T3 e AGD 1 a T3 ( $\rho = 1$ ;  $p = 0.02$ );
- una correlazione forte negativa tra i valori di BPA nel latte a T3 e AGD 2 a T3 ( $\rho = -0.7$ ;  $p = 0.008$ );
- una correlazione moderata positiva tra i valori di DBP presenti nel latte a T2 e AGD 2 a T2 ( $\rho = 0.5$ ;  $p = 0.04$ );

CORRELAZIONE ESPOSIZIONE POST-NATALE – LUNGHEZZA E PESO a T1, T2 e T3							
IE	LATTE	PESO			LUNGHEZZA		
	Dosaggio	T1	T2	T3	T1	T2	T3
BPA	T1	rho= 0.42; p=0.41			rho= 0.43; p=0.38		
	T2		rho= 0.04; p=0.90			rho= -0.55; p=0.07	
	T3			rho= -0.47; p=0.14			rho= -0.30; p=0.35
DMP	T1	rho= 0.29; p=0.38			rho= 0.19; p=0.56		
	T2		rho= 0.8; p=0.33			rho= 0.8; p=0.33	
	T3			rho= 0.5; p=0.45			rho= 0.56; p=0.32
DEP	T1	rho= -0.48; p=0.35			rho= -0.28; p=0.57		
	T2		NA			NA	
	T3			rho= -0.42; p=0.41			rho= -0.38; p=0.45
DBP	T1	rho= -0.32; p=0.49			rho= -0.44; p=0.31		
	T2		rho= -0.21; p=0.46			rho= -0.08; p=0.77	
	T3			NA			NA
MEP	T1	rho= -0.14; p=0.80			rho= -0.26; p=0.61		
	T2		NA			NA	
	T3			NA			NA
MBP	T1	NA			NA		
	T2		NA			NA	
	T3			NA			NA
MBzP	T1	rho= 0.06; p=0.85			rho= 0.07; p=0.82		
	T2		rho= -0.4; p=0.75			rho= -0.4; p=0.75	
	T3			NA			NA
MEHP	T1	NA			NA		
	T2		NA			NA	
	T3			NA			NA
MEHHP	T1	NA			rho= 0.07; p=0.90		
	T2		NA			NA	
	T3			NA			NA
MEOHP	T1	rho= -0.58; p=0.04*			rho= -0.34; p=0.27		
	T2		NA			NA	
	T3			NA			NA

**Tabella 10** Correlazioni tra concentrazioni di IE nel latte materno, lunghezza e peso a 1 mese (T1), 3 mesi (T2), 6 mesi (T3)

CORRELAZIONE ESPOSIZIONE POST-NATALE – AGD 1 e AGD 2 a T1, T2 e T3							
LATTE		AGD 1			AGD 2		
IE	Dosaggio	T1	T2	T3	T1	T2	T3
BPA	T1	rho= 0.2; p=0.71			rho= -0.14; p=0.80		
	T2		rho= -0.19; p=0.57			rho= -0.49; p=0.12	
	T3			rho= -0.34; p=0.29			rho= -0.74; p=0.008**
DMP	T1	rho= 0.34; p=0.30			rho= 0.21; p=0.52		
	T2		NA			rho= -0.2; p=0.91	
	T3			rho= 1; p=0.01*			rho= 0.7; p=0.23
DEP	T1	rho= -0.08; p=0.91			rho= -0.55; p=0.25		
	T2		NA			NA	
	T3			rho= 0.08; p=0.91			rho= -0.14; p=0.80
DBP	T1	rho= 0.23; p=0.61			rho= 0.21; p=0.63		
	T2		rho= -0.44; p=0.10			rho= -0.55; p=0.04*	
	T3			rho= -0.37; p=0.22			rho= -0.29; p=0.35
MEP	T1	rho= -0.6; p=0.24			rho= -0.26; p=0.52		
	T2		NA			NA	
	T3			NA			NA
MBP	T1	NA			NA		
	T2		NA			NA	
	T3			NA			NA
MBzP	T1	rho= -0.21; p=0.51			rho= -0.28; p=0.36		
	T2		NA			NA	
	T3			rho= 0.4; p=0.75			rho= 0.2; p=0.91
MEHP	T1	NA			NA		
	T2		NA			NA	
	T3			NA			NA
MEHHP	T1	rho= -0.52; p=0.22			rho= -0.07; p=0.90		
	T2		NA			NA	
	T3			NA			NA
MEOHP	T1	rho= -0.80; p=0.001**			rho= -0.38; p=0.21		
	T2		NA			NA	
	T3			NA			NA

**Tabella 11** Correlazioni tra concentrazioni di IE nel latte materno, AGD1 AGD2 a 1 mese (T1), 3 mesi (T2), 6 mesi (T3).

Anche in relazione alle concentrazioni di IE rilevati nell'urina del bambino sono state effettuate delle correlazioni con i parametri di crescita. Sono state trovate, infatti, delle correlazioni significative (Tabelle 12 e 13):

- una correlazione molto forte negativa tra le concentrazioni di BPA a T1 trovate nell'urina del bambino ed il peso (rho= -1; p=0.02); è una correlazione che in realtà è stata trovata anche a T0 (rho= -1; p=0.08) ed a T2 (rho= -0.8; p=0.3) anche se in questi casi non sono risultate significative;

- una correlazione forte e negativa tra i valori di DEP trovati nell'urina del bambino a T0 e AGD 2 a T0 ( $\rho = -0.8$ ;  $p=0.008$ );
- una correlazione forte negativa tra i valori di DEP trovati nell'urina del bambino a T0 e l'AGD 1 a T0 ( $\rho = -0.7$ ;  $p=0.04$ );
- una correlazione forte negativa tra i valori di MEP trovati nell'urina del bambino a T1 e l'AGD 2 a T1 ( $\rho = -0.6$ ;  $p=0.04$ );

CORRELAZIONE ESPOSIZIONE POST-NATALE- LUNGHEZZA E PESO a T0, T1, T2, T3									
URINA BAMBINO		PESO				LUNGHEZZA			
IE	Dosaggio	T0	T1	T2	T3	T0	T1	T2	T3
BPA	T0	$\rho = -1$ ; $p=0.08$				NA			
	T1		$\rho = -1$ ; $p=0.01^*$				$\rho = -0.9$ ; $p=0.08$		
	T2			$\rho = -0.8$ ; $p=0.33$				$\rho = 0.2$ ; $p=0.91$	
	T3				NA				NA
DMP	T0	NA				NA			
	T1		NA				NA		
	T2			NA				NA	
DEP	T0	$\rho = 0.18$ ; $p=0.64$				$\rho = 0.46$ ; $p=0.21$			
	T1		$\rho = -0.21$ ; $p=0.66$				$\rho = -0.36$ ; $p=0.42$		
	T2			$\rho = 0.4$ ; $p=0.51$				$\rho = 0.7$ ; $p=0.23$	
	T3				$\rho = -0.4$ ; $p=0.75$				$\rho = -0.6$ ; $p=0.36$
DBP	T0	NA				NA			
	T1		NA				NA		
	T2			NA				NA	
MEP	T0	$\rho = -0.04$ ; $p=0.93$				$\rho = 0.13$ ; $p=0.74$			
	T1		$\rho = -0.33$ ; $p=0.31$				$\rho = -0.33$ ; $p=0.31$		
	T2			$\rho = -0.8$ ; $p=0.13$				$\rho = -0.5$ ; $p=0.45$	
	T3				$\rho = -0.4$ ; $p=0.75$				$\rho = -0.63$ ; $p=0.36$
MBP	T0	$\rho = 0.01$ ; $p=0.98$				$\rho = -0.31$ ; $p=0.40$			
	T1		$\rho = -0.27$ ; $p=0.37$				$\rho = -0.18$ ; $p=0.56$		
	T2			$\rho = 1$ ; $p=0.08$				$\rho = 1$ ; $p=0.8$	
MEHP	T0	NA				NA			
	T1		NA				NA		
	T2			NA				NA	
MEHHP	T0	$\rho = 0.3$ ; $p=0.68$				$\rho = 0.05$ ; $p=0.93$			
	T1		$\rho = -0.25$ ; $p=0.65$				$\rho = -0.37$ ; $p=0.49$		
	T2			NA				NA	
	T3				NA				NA
MEOHP	T0	NA				NA			
	T1		NA				NA		
	T2			NA				NA	
	T0								
	T1								
	T2								
	T0								
	T1								
	T2								
	T0								
	T1								
	T2								
	T0								
	T1								
	T2								
	T0								
	T1								
	T2								
	T0								
	T1								
	T2								
	T0								
	T1								
	T2								
	T0								
	T1								
	T2								
	T0								
	T1								
	T2								
	T0								
	T1								
	T2								
	T0								
	T1								
	T2								
	T0								
	T1								
	T2								
	T0								
	T1								
	T2								
	T0								
	T1								
	T2								
	T0								
	T1								
	T2								
	T0								
	T1								
	T2								
	T0								
	T1								
	T2								
	T0								
	T1								
	T2								
	T0								
	T1								
	T2								
	T0								
	T1								
	T2								
	T0								
	T1								
	T2								
	T0								
	T1								
	T2								
	T0								
	T1								
	T2								
	T0								
	T1								
	T2								
	T0								
	T1								
	T2								
	T0								
	T1								
	T2								
	T0								
	T1								
	T2								
	T0								
	T1								
	T2								
	T0								
	T1								
	T2								
	T0								
	T1								
	T2								
	T0								
	T1								
	T2								
	T0								
	T1								
	T2								
	T0								
	T1								
	T2								
	T0								
	T1								
	T2								
	T0								
	T1								
	T2								
	T0								
	T1								
	T2								
	T0								
	T1								
	T2								
	T0								
	T1								
	T2								
	T0								
	T1								
	T2								
	T0								
	T1								
	T2								
	T0								
	T1								
	T2								
	T0								
	T1								
	T2								
	T0								
	T1								
	T2								
	T0								
	T1								
	T2								
	T0								
	T1								
	T2								
	T0								
	T1								
	T2								
	T0								
	T1								
	T2								
	T0								
	T1								
	T2								
	T0								
	T1								
	T2								
	T0								
	T1								
	T2								
	T0								
	T1								
	T2								
	T0								
	T1								
	T2								
	T0								
	T1								
	T2								
	T0								
	T1								
	T2								
	T0								
	T1								
	T2								
	T0								

CORRELAZIONE ESPOSIZIONE POST-NATALE- LUNGHEZZA E PESO a T0, T1, T2, T3									
URINA BAMBINO		AGD 1				AGD 2			
IE	Dosaggio	T0	T1	T2	T3	T0	T1	T2	T3
BPA	T0	rho= 0.86; p=0.33				rho= 1; p=0.33			
	T1		rho= -0.61; p=0.26				rho= -0.1; p=0.95		
	T2			rho= -0.4; p=0.75				rho= 0.4; p=0.75	
	T3				NA				NA
DMP	T0	NA				NA			
	T1		NA				NA		
	T2			NA				NA	
	T3				NA				NA
DEP	T0	rho= -0.71; p=0.04*				rho= -0.8; p=0.008**			
	T1		rho= 0.36; p=0.42				rho= 0.46; p=0.28		
	T2			rho= 0.9; p=0.08				rho= 0.7; p=0.23	
	T3				rho= 0.4; p=0.75				rho= 0.2; p=0.91
DBP	T0	NA				NA			
	T1		NA				NA		
	T2			NA				NA	
	T3				NA				NA
MEP	T0	rho= -0.28; p=0.49				rho= -0.24; p=0.56			
	T1		rho= 0.39; p=0.22				rho= 0.59; p=0.04*		
	T2			rho= 0.3; p=0.68				rho= 0.4; p=0.51	
	T3				rho= 0.4; p=0.75				rho= 0.2; p=0.91
MBP	T0	rho= -0.02; p=0.95				rho= 0.14; p=0.73			
	T1		rho= 0.19; p=0.54				rho= 0.51; p=0.08		
	T2			rho= 0.8; p=0.33				rho= 0.4; p=0.75	
	T3				NA				NA
MEHP	T0	NA				NA			
	T1		NA				NA		
	T2			NA				NA	
	T3				NA				NA
MEHHP	T0	rho= -0.21; p=0.78				rho= -0.31; p=0.68			
	T1		rho= 0.02; p=1				rho= 0.2; p=0.71		
	T2			NA				NA	
	T3				NA				NA
MEOHP	T0	NA				NA			
	T1		NA				NA		
	T2			NA				NA	
	T3				NA				NA

**Tabella 13** Correlazioni tra concentrazioni di IE nell'urina del bambino, AGD1 AGD2 alla nascita (T0), 1 mese (T1), 3 mesi (T2), 6 mesi (T3).

## Effetti sul neurosviluppo

Le correlazioni sono state effettuate su un sottocampione di 12 diadi madre-bambino.

Il sottocampione presenta 6 soggetti di genere femminile e 6 soggetti di genere maschile.

Sono stati descritti i punteggi medi relativi alle tre scale della Bayley-III considerate nelle correlazioni, la scala cognitiva, la scala del linguaggio e la scala motoria, a tutti i T in cui è avvenuta la somministrazione (T3, T4, T5).

I risultati dell'analisi hanno mostrato:

- una correlazione forte negativa e significativa è stata rilevata tra le concentrazioni di DEP nell'urina materna a T0 e la scala del linguaggio a T3 (rho= -0.7; p=0.01),

dove a concentrazioni maggiori di DEP si riscontrano minori punteggi nella scala linguistica.

- una correlazione forte negativa e significativa tra le concentrazioni di BPA nell'urina materna a T0 e la scala del linguaggio a T5 (rho= -0.8; p=0.02);
- una correlazione forte negativa e significativa tra le concentrazioni di MEHHP nell'urina materna a T0 e la scala motoria a T5 (rho= - 0.9; p=0.004) (Tabella 14).

CORRELAZIONE ESPOSIZIONE PRE-NATALE e PARAMENTRI DI NEUROSVILUPPO										
URINA MATERNA		S. COGNITIVA			S. LINGUISTICA			S. MOTORIA		
IE	Dosaggio	T3	T4	T5	T3	T4	T5	T3	T4	T5
BPA	T0	rho= 0.49; p=0.25	rho= 0.47; p=0.28	rho= -0.12; p=0.78	rho= -0.57; p=0.17	rho= -0.36; p=0.41	rho= -0.82; p=0.02*	rho= -0.40; p=0.37	rho= -0.37; p=0.40	rho= 0.25; p=0.57
DMP	T0	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
DEP	T0	rho= -0.14; p=0.67	rho= -0.26; p=0.42	rho= 0.009; p=0.97	rho= 0.70; p=0.01*	rho= -0.20; p=0.54	rho= 0.07; p=0.81	rho= 0.05; p=0.86	rho= -0.45; p=0.16	rho= -0.57; p=0.06
DBP	T0	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
MEP	T0	rho= 0.03; p=0.92	rho= -0.06; p=0.84	rho= 0.27; p=0.41	rho= 0.33; p=0.31	rho= -0.33; p=0.31	rho= 0.05; p=0.86	rho= 0.12; p=0.70	rho= -0.19; p=0.56	rho= -0.40; p=0.21
MBP	T0	rho= -0.05; p=0.85	rho= -0.06; p=0.84	rho= 0.38; p=0.21	rho= 0.09; p=0.76	rho= 0.12; p=0.70	rho= -0.02; p=0.94	rho= -0.13; p=0.66	rho= -0.42; p=0.16	rho= -0.45; p=0.13
MBzP	T0	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
MEHP	T0	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
MEHHP	T0	rho= -0.35; p=0.43	rho= -0.53; p=0.21	rho= 0.31; p=0.48	rho= 0.71; p=0.08	rho= 0.46; p=0.28	rho= 0.11; p=0.81	rho= -0.55; p=0.19	rho= -0.55; p=0.19	rho= -0.9; p=0.004**
MEOHP	T0	rho= -0.20; p=0.65	rho= -0.50; p=0.24	rho= 0.53; p=0.21	rho= 0.17; p=0.71	rho= 0.11; p=0.81	rho= -0.07; p=0.87	rho= -0.42; p=0.35	rho= -0.72; p=0.06	rho= -0.54; p=0.20

Tabella 14 Correlazioni tra concentrazioni di IE nell'urina materna al reclutamento (T0) e i parametri del neurosviluppo del bambino a 6 mesi (T3), a 12 mesi (T4) e a 24 mesi (T5).

- delle concentrazioni di BPA nel latte a T1 che correlano in modo significativamente negativo con la scala del linguaggio a T4 (rho= -0.9; p=0.04) e quella motoria a T4 (rho= - 0.9; p=0.04) a T4, e quella cognitiva a T5 (rho= -0.9; p=0.04).
- una correlazione forte positiva e significativa tra le concentrazioni di DEP nel latte a T1 e la scala motoria a T5 (rho= 0.9; p=0.04);
- una correlazione forte positiva e significativa tra le concentrazioni di DBP nel latte a T1 e la scala del linguaggio a T4 (rho= 0.8; p=0.04), e la stessa correlazione la si trova anche con le concentrazioni a T3 (rho= 0.6; p=0.04);
- una correlazione forte negativa e significativa tra le concentrazioni di MBzP trovate nel latte ma a T2 con la scala motoria a T3 (rho= - 0.9; p=0.04) ed ancora

tra le concentrazioni di MBzP nel latte a T1 e la scala motoria a T5( $\rho = -0.8$ ;  $p=0.01$ );

- due correlazioni, una forte positiva e significativa tra le concentrazioni di MBzP nel latte a T1 e la scala del linguaggio a T4( $\rho = 0.7$ ;  $p=0.02$ ), ed una seconda forte negativa e significativa tra le concentrazioni di MBzP trovate sempre nel latte a T2 con la scala cognitiva a T4( $\rho = -0.9$ ;  $p=0.04$ ) (Tabella 15).

CORRELAZIONE ESPOSIZIONE POST-NATALE e PARAMETRI DI NEUROSVILUPPO										
LATTE		S. COGNITIVA			S. LINGUISTICA			S. MOTORIA		
IE	Dosaggio	T3	T4	T5	T3	T4	T5	T3	T4	T5
BPA	T1	$\rho = -0.6$ ; $p=0.36$	$\rho = -0.6$ ; $p=0.36$	$\rho = -0.94$ ; $p=0.04^*$	$\rho = 0.63$ ; $p=0.36$	$\rho = -0.94$ ; $p=0.04^*$	$\rho = 0.25$ ; $p=0.74$	$\rho = -0.8$ ; $p=0.33$	$\rho = -0.94$ ; $p=0.04^*$	$\rho = 0.4$ ; $p=0.75$
	T2	$\rho = -0.31$ ; $p=0.44$	$\rho = -0.14$ ; $p=0.74$	$\rho = -0.23$ ; $p=0.58$	$\rho = -0.46$ ; $p=0.24$	$\rho = 0.12$ ; $p=0.77$	$\rho = 0.08$ ; $p=0.83$	$\rho = 0.14$ ; $p=0.72$	$\rho = 0.31$ ; $p=0.45$	$\rho = 0.67$ ; $p=0.06$
	T3	$\rho = -0.66$ ; $p=0.07$	$\rho = -0.11$ ; $p=0.78$	$\rho = -0.22$ ; $p=0.59$	$\rho = -0.22$ ; $p=0.58$	$\rho = -0.14$ ; $p=0.72$	$\rho = 0.19$ ; $p=0.65$	$\rho = 0.02$ ; $p=0.95$	NA	$\rho = 0.58$ ; $p=0.12$
DMP	T1	$\rho = -0.06$ ; $p=0.88$	$\rho = 0.18$ ; $p=0.66$	$\rho = -0.03$ ; $p=0.93$	$\rho = 0.06$ ; $p=0.88$	$\rho = 0.01$ ; $p=0.97$	$\rho = -0.28$ ; $p=0.49$	$\rho = -0.14$ ; $p=0.72$	$\rho = 0.24$ ; $p=0.56$	$\rho = 0.02$ ; $p=0.95$
	T2	$\rho = -0.8$ ; $p=0.33$	NA	NA	$\rho = -0.4$ ; $p=0.75$	NA	NA	$\rho = -0.8$ ; $p=0.33$	NA	NA
	T3	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
DEP	T1	$\rho = 0.8$ ; $p=0.33$	$\rho = -0.31$ ; $p=0.68$	$\rho = -0.31$ ; $p=0.68$	$\rho = -0.2$ ; $p=0.91$	$\rho = -0.31$ ; $p=0.68$	$\rho = 0.77$ ; $p=0.22$	$\rho = 0.31$ ; $p=0.68$	$\rho = -0.21$ ; $p=0.78$	$\rho = 0.94$ ; $p=0.04^*$
	T2	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
	T3	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
DBP	T1	$\rho = 0.35$ ; $p=0.55$	NA	$\rho = 0.71$ ; $p=0.17$	$\rho = 0.03$ ; $p=0.68$	$\rho = 0.87$ ; $p=0.04^*$	$\rho = 0.33$ ; $p=0.58$	$\rho = 0.66$ ; $p=0.21$	$\rho = 0.66$ ; $p=0.21$	$\rho = -0.44$ ; $p=0.45$
	T2	$\rho = -0.61$ ; $p=0.06$	$\rho = 0.34$ ; $p=0.33$	$\rho = 0.006$ ; $p=0.98$	$\rho = 0.15$ ; $p=0.66$	$\rho = -0.07$ ; $p=0.83$	$\rho = 0.10$ ; $p=0.77$	$\rho = 0.34$ ; $p=0.32$	$\rho = 0.21$ ; $p=0.55$	$\rho = 0.006$ ; $p=0.98$
	T3	$\rho = 0.16$ ; $p=0.70$	$\rho = 0.03$ ; $p=0.93$	$\rho = 0.07$ ; $p=0.85$	$\rho = 0.05$ ; $p=0.88$	$\rho = 0.68$ ; $p=0.04^*$	$\rho = 0.45$ ; $p=0.25$	$\rho = 0.10$ ; $p=0.79$	$\rho = 0.09$ ; $p=0.8$	$\rho = -0.12$ ; $p=0.77$
MEP	T1	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
	T2	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
	T3	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
MBP	T1	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
	T2	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
	T3	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
MBzP	T1	$\rho = -0.62$ ; $p=0.09$	$\rho = -0.33$ ; $p=0.42$	$\rho = 0.49$ ; $p=0.21$	$\rho = 0.49$ ; $p=0.21$	$\rho = 0.77$ ; $p=0.02^*$	$\rho = 0.57$ ; $p=0.13$	$\rho = 0.02$ ; $p=0.95$	$\rho = 0.24$ ; $p=0.56$	$\rho = -0.8$ ; $p=0.01^*$
	T2	NA	$\rho = -0.94$ ; $p=0.04^*$	$\rho = -0.6$ ; $p=0.36$	$\rho = -0.31$ ; $p=0.68$	$\rho = -0.4$ ; $p=0.75$	$\rho = -0.25$ ; $p=0.74$	$\rho = -0.94$ ; $p=0.04^*$	$\rho = -0.21$ ; $p=0.78$	$\rho = 0.8$ ; $p=0.33$
	T3	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
MEHP	T1	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
	T2	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
	T3	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
MEHHP	T1	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
	T2	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
	T3	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
MEOHP	T1	$\rho = -0.33$ ; $p=0.42$	$\rho = 0.41$ ; $p=0.30$	$\rho = 0.59$ ; $p=0.11$	$\rho = -0.14$ ; $p=0.73$	$\rho = 0.28$ ; $p=0.50$	$\rho = -0.30$ ; $p=0.46$	$\rho = 0.13$ ; $p=0.75$	$\rho = 0.09$ ; $p=0.82$	$\rho = 0.48$ ; $p=0.22$
	T2	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
	T3	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA

Tabella 15 Correlazioni tra concentrazioni di IE nel latte e i parametri del neurosviluppo del bambino a 6 mesi (T3), a 12 mesi (T4) e a 24 mesi (T5).

- una correlazione forte negativa e significativa tra le concentrazioni di MEP nell'urina del bambino a T0 e la scala cognitiva a T3( $\rho = -0.7$ ;  $p=0.03$ ) e motoria ( $\rho = -0.8$ ;  $p=0.01$ ) a T3;
- una correlazione forte negativa e significativa tra le concentrazioni di MEP nell'urina del bambino a T0 e la scala cognitiva a T4( $\rho = -0.7$ ;  $p=0.04$ ) e la

stessa correlazione la si trova anche con le concentrazioni di MEP rilevate a T1 (rho=- 0.7; p=0.03);

- Una correlazione forte negativa e significativa tra le concentrazioni di MBP nell'urina del bambino a T1 e la scala motoria a T3 (rho= -0.7; p=0.04), e la scala cognitiva a T5 (rho= -0.7; p=0.03);
- una correlazione forte positiva e significativa tra le concentrazioni di MEHHP nell'urina del bambino a T0 e la scala motoria a T3 (rho=0.9; p=0.04); e con la scala motoria a T4 (rho= - 0.9; p=0.04) (Tabella 16).

CORRELAZIONE ESPOSIZIONE POST-NATALE e PARAMENTRI DI NEUROSVILUPPO										
URINA BAMBINO		S. COGNITIVA			S. LINGUISTICA			S. MOTORIA		
IE	Dosaggio	T3	T4	T5	T3	T4	T5	T3	T4	T5
BPA	T0	rho= 1; p=0.33	rho= 1; p=0.33	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
	T1	rho= -0.4; p=0.75	rho= 0.77; p=0.22	rho= -0.25; p=0.74	rho= 0.6; p=0.41	rho= -0.44; p=0.55	rho= -0.21; p=0.78	rho= 0.4; p=0.75	rho= -0.4; p=0.75	rho= 0.31; p=0.68
	T2	NA	rho= 0.86; p=0.33	NA	NA	rho= -0.86; p=0.33	NA	NA	rho= -1; p=0.33	NA
DMP	T0	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
	T1	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
	T2	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
DEP	T0	rho= -0.67; p=0.06	rho= 0.20; p=0.61	rho= 0.17; p=0.67	rho= 0.07; p=0.86	rho= 0.48; p=0.22	rho= -0.23; p=0.57	rho= -0.15; p=0.70	rho= 0.47; p=0.23	rho= 0.09; p=0.81
	T1	rho= 0.52; p=0.36	NA	rho= -0.8; p=0.13	rho= -0.35; p=0.55	NA	rho= -0.44; p=0.45	rho= -0.35; p=0.55	NA	rho= 0.11; p=0.85
	T2	rho= 0.6; p=0.41	rho= -0.2; p=0.91	rho= -0.4; p=0.75	rho= -0.31; p=0.68	rho= -0.31; p=0.68	rho= 0.21; p=0.78	rho= 0.77; p=0.22	rho= 0.4; p=0.75	rho= -0.21; p=0.78
DBP	T0	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
	T1	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
	T2	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
MEP	T0	rho= -0.7; p=0.03*	rho= -0.69; p=0.04*	rho= -0.28; p=0.49	rho= -0.07; p=0.86	rho= -0.06; p=0.88	rho= 0.05; p=0.89	rho= -0.82; p=0.01*	rho= -0.29; p=0.4	rho= 0.39; p=0.33
	T1	rho= 0.12; p=0.78	rho= -0.77; p=0.03*	rho= -0.45; p=0.31	rho= 0.01; p=0.96	rho= -0.36; p=0.42	rho= 0.17; p=0.70	rho= -0.37; p=0.40	rho= -0.63; p=0.12	rho= -0.11; p=0.81
	T2	NA	rho= 0.4; p=0.75	rho= 0.2; p=0.91	rho= -0.31; p=0.68	rho= 0.31; p=0.68	rho= -0.7; p=0.26	rho= -0.77; p=0.22	rho= -0.2; p=0.91	rho= 0.7; p=0.26
MBP	T0	rho= 0.38; p=0.34	rho= -0.20; p=0.61	rho= -0.25; p=0.54	rho= 0.16; p=0.68	rho= -0.09; p=0.82	rho= 0.06; p=0.87	rho= 0.20; p=0.61	rho= 0.42; p=0.28	rho= 0.29; p=0.47
	T1	rho= -0.21; p=0.61	rho= -0.35; p=0.38	rho= -0.73; p=0.03*	rho= -0.44; p=0.26	rho= -0.65; p=0.08	rho= -0.48; p=0.22	rho= -0.72; p=0.04*	rho= -0.65; p=0.08	rho= 0.38; p=0.35
	T2	rho= 0.6; p=0.41	rho= -0.2; p=0.91	rho= -0.4; p=0.75	rho= -0.31; p=0.68	rho= -0.31; p=0.68	rho= 0.21; p=0.78	rho= 0.77; p=0.22	rho= 0.4; p=0.75	rho= -0.21; p=0.78
MEHP	T0	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
	T1	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
	T2	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
MEHHP	T0	rho= 0.6; p=0.41	rho= 1; p=0.08	rho= 0.31; p=0.68	NA	rho= 0.31; p=0.68	rho= -0.25; p=0.74	rho= 0.94; p=0.04*	rho= 0.94; p=0.04*	rho= -0.21; p=0.78
	T1	rho= -0.44; p=0.55	rho= 0.63; p=0.36	rho= 0.31; p=0.68	rho= 0.63; p=0.36	rho= -0.2; p=0.91	rho= 0.25; p=0.74	rho= 0.73; p=0.26	rho= -0.10; p=0.89	rho= -0.6; p=0.41
	T2	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
MEOHHP	T0	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
	T1	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
	T2	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA

Tabella 16 Correlazioni tra concentrazioni di IE nell'urina del bambino e i parametri del neurosviluppo del bambino a 6 mesi (T3), a 12 mesi (T4) e a 24 mesi (T5).

## **DISCUSSIONE**

Il presente studio ha avuto lo scopo di indagare una possibile relazione tra l'esposizione pre- e postnatale a diversi interferenti endocrini (IE) e lo sviluppo fisiologico e neurocomportamentale del bambino fino ai due anni di età. Questo è il periodo in cui lo sviluppo del bambino risente fortemente dell'azione di fattori esterni, come gli IE.

### **Parametri di crescita e IE**

È stato monitorato lo sviluppo fisiologico del bambino dalla nascita fino ai due anni di vita. Sono state raccolte le misure dei parametri di crescita durante tutti i follow-up presenti nel progetto Life MILCH (alla nascita e ad 1, 3, 6 e 12 mesi), ed anche in un richiamo effettuato ai 2 anni del bambino. Nel presente studio le analisi effettuate hanno considerato solo tre dei parametri raccolti: il peso, la lunghezza e le distanze anogenitali, in quanto dagli studi presenti in letteratura sembrano essere i parametri che più risentono dell'azione degli IE durante lo sviluppo del bambino. Le analisi effettuate sui parametri suggeriscono ci sia uno sviluppo fisiologico del campione nella norma indipendentemente dal genere, il loro peso, la lunghezza e le distanze anogenitali si sviluppano normalmente rispetto ai parametri riscontrati in popolazione.

Dalle correlazioni effettuate, il presente studio riporta:

- la presenza di una relazione negativa tra l'esposizione al BPA ed il peso, ovvero maggiori concentrazioni di BPA, rilevate nell'urina del bambino, correlano con un minor peso nel bambino; una correlazione negativa tra l'esposizione al MEOHP (appartenente agli ftalati) ed il peso, dove, ancora una volta, maggiori concentrazioni di MEOHP, rilevate nei campioni di latte analizzati, correlano con un minor peso nel bambino; queste correlazioni sono risultate significative. Questi

risultati sono in linea con le evidenze presenti in letteratura, come lo studio del 2018 in cui è stata evidenziata la presenza di una relazione tra maggiori concentrazioni di BPA, trovate in campioni di urina materna prenatali, e un minore peso del bambino alla nascita (Mustieles et al., 2018).

- In contrasto con le correlazioni viste precedentemente, sono state rilevate anche due correlazioni forti, questa volta però non significative, positive, tra una maggiore esposizione a due ftalati, l'MEOHP e l'MBP, rilevati rispettivamente nell'urina materna e nell'urina del bambino, e la presenza di un maggior peso nel bambino, anche di queste si ha supporto in letteratura, in quanto in un altro studio invece, è stato riscontrato che la presenza di maggiori concentrazioni di ftalati, in particolar modo il DEP, e di BPA correlano con un eccessivo aumento di adiposità e con una maggiore predisposizione all'obesità (Braun, 2016).
- in relazione ai parametri riguardanti le distanze anogenitali, i dati rilevati in questo studio riportano la presenza di correlazioni sia positive che negative. La maggior parte dei risultati sono fortemente in contrasto tra loro, l'esposizione al MEOHP mostra una relazione fortemente negativa con l'AGD rilevata ad 1 mese nel bambino, mentre maggiori esposizioni a DMP sono correlate con misure maggiori di AGD a sei mesi nel bambino; lo stesso per l'esposizione al BPA, che sembra correlare positivamente con l'AGD rilevata a 3 mesi del bambino, ma non a 6 mesi, dopo è stata trovata una forte relazione negativa tra maggiori concentrazioni di BPA rilevate nel latte materno e l'AGD misurata nel bambino. In letteratura esistono moltissime evidenze sulla presenza di una relazione tra le misure di AGD e le esposizioni agli IE; anche in questo caso però le relazioni trovate sono contrastanti. In alcuni studi, i risultati riportano la presenza di una diminuzione

dell'AGD, soprattutto nei maschi, legata a maggiori esposizioni a ftalati e BPA (Mammadov et al., 2018); un altro studio del 2018, invece, riporta un'associazione positiva tra l'esposizione agli ftalati e maggiori distanze anogenitali (Arbuckle et al., 2018).

I risultati mostrano delle correlazioni di forte e di media entità sia negative che positive tra i parametri di crescita indagati e gli IE analizzati, molte di queste non significative, fattore sicuramente influenzato dalla limitata numerosità del campione che non permette di generalizzare i risultati ottenuti alla popolazione. Come riscontrato in moltissimi studi presenti sull'argomento, nonostante i risultati molto spesso incoerenti tra loro, sembra essere presente una relazione tra le concentrazioni di IE e lo sviluppo fisiologico.

### **Sviluppo neurocomportamentale e IE**

La somministrazione delle Bayley Scales of Infant and Toddlers Development (Bayley III) ha permesso di valutare il neurosviluppo dei bambini a 6, 12 e 24 mesi. I punteggi riportati sono comparabili con quelli normativi in tutte le scale analizzate. Le analisi effettuate sui punteggi ottenuti nella valutazione del neurosviluppo mostrano una crescita nella norma in tutte le scale considerate.

Numerosi studi in letteratura hanno dimostrato che maggiori esposizioni a diversi IE nell'uomo, in particolar modo in specifici periodi dello sviluppo, possono influenzare il neurosviluppo del soggetto. Nel presente studio è stata trovata una forte correlazione negativa, ed anche significativa, tra l'esposizione al BPA, rilevato nel latte materno ed i punteggi rilevati nella scala cognitiva dei bambini a due anni di età, risultato in linea con altri dati della letteratura che hanno mostrato che l'esposizione al BPA, rilevato nei

campioni di urina materna prelevati nel secondo trimestre di gravidanza, è stato associato negativamente allo sviluppo mentale all'età di 2 anni (Jiang et al., 2020).

Altri, invece, non hanno riportato alcun effetto del BPA sul neurosviluppo dei bambini (Braun et al., 2017). Sono state trovate anche relazioni forti negative tra le concentrazioni di BPA ed i punteggi nella scala motoria e nella scala del linguaggio, valutate a 12 mesi nel bambino. I risultati ottenuti nella relazione tra BPA e sviluppo del linguaggio sembrano essere in linea con quelli riportati in uno studio del 2019 di Jensen dove è stato riscontrato che concentrazioni prenatali più elevate di BPA sono significativamente associate a un rischio più elevato di scarse abilità linguistiche nel bambino, soprattutto nei maschi (Jensen et al., 2019).

Anche l'esposizione agli ftalati influisce fortemente con il neurosviluppo del bambino. Nel presente studio sono state trovate forti correlazioni negative tra l'esposizione a ftalati come il MEP, L'MBzP, MBP e prestazioni cognitive deficitarie valutate a 12 e 24 mesi del bambino. Questo risultato è supportato da diversi studi che hanno dimostrato come l'esposizione prenatale a diversi ftalati (DEHP, BBzP, DEP e DBP) correla negativamente con lo sviluppo cognitivo e comportamentale dei bambini (Zhang et al., 2019). Sono presenti però anche risultati discordanti che rivelano delle correlazioni fortemente positive tra l'esposizione a ftalati come l'MEHHP, il DEP, ed il DBP e lo sviluppo cognitivo del bambino.

## **CONCLUSIONI**

In conclusione, questo studio ha confermato che l'esposizione a diverse categorie di Interferenti Endocrini durante periodi critici dello sviluppo, ovvero durante lo sviluppo fetale e neonatale, possono esercitare effetti su numerosi parametri di crescita e di maturazione neuro-comportamentale nel bambino, confermando la corrente letteratura scientifica. Lo studio presentato nella tesi è ovviamente preliminare e presenta numerosi limiti dovuti principalmente alla ridotta numerosità del campione analizzato. Tuttavia, questi risultati pongono le basi per futuri studi che possano approfondire la relazione tra gli IE e lo sviluppo neurocomportamentale in soggetti in via di sviluppo. Questo anche perché lo studio della relazione tra l'esposizione agli IE ed i possibili effetti che possono essere rilevati sullo sviluppo è un argomento sempre più dibattuto in letteratura, che sta acquistando sempre più importanza.

Il completamento delle analisi nell'ambito del progetto LIFE MILCH, tuttora in corso di svolgimento, potrebbe consentire non solo di chiarire i possibili effetti dell'esposizione a IE sullo sviluppo infantile, ma anche contribuire a determinare il possibile legame tra il livello di contaminazione ambientale, le abitudini di vita e di alimentazione delle madri coinvolte e i livelli di interferenti endocrini riscontrabili nel latte materno e nell'infante, in modo da sviluppare adeguate azioni e interventi per ridurre l'esposizione della popolazione vulnerabile e salvaguardare la salute futura.

## **BIBLIOGRAFIA**

- Acevedo N, Davis B, Schaeberle CM et al (2013) Perinatally administered bisphenol a as a potential mammary gland carcinogen in rats. *Environ Health Perspect* 121:1040–1046.
- Ahmad R, Gautam AK, Verma Y et al (2014) Effects of in utero di-butyl phthalate and butyl benzyl phthalate exposure on offspring development and male reproduction of rat. *Environ Sci Pollut Res Int* 21:3156–3165.
- Angle, B. M., Do, R. P., Ponzi, D., Stahlhut, R. W., Drury, B. E., Nagel, S. C., ... & Taylor, J. A., (2013). Metabolic disruption in male mice due to fetal exposure to low but not high doses of bisphenol A (BPA): evidence for effects on body weight, food intake, adipocytes, leptin, adiponectin, insulin and glucose regulation. *Reproductive toxicology*, 42, 256-268.
- Arbuckle, TE, Agarwal, A., MacPherson, SH, Fraser, WD, Sathyanarayana, S., Monnier, P., (2018). Esposizione prenatale a ftalati e fenoli ed esiti sensibili al sistema endocrino infantile: lo studio MIREC. *Ambiente interno*, 120, 572–583
- Barbarossa, A., Devicienti, C., Zironi, E., Pagliuca, G., Scardilli, M., Masetti, R., & Gazzotti, T. (2012). Monitoraggio preliminare sulla presenza di composti perfluorurati in latte vaccino italiano. In XXII Convegno Nazionale AIVI: "Autorità Competente e Operatore del Settore Alimentare: armonizzazione degli strumenti di gestione del rischio" pp. 2-2.
- Barker, D. J. P., (1995). Fetal origins of coronary heart disease. *British Medical Journal*, 195-196.
- Barker, D. J. P., Osmond, C., Winter, P. D., Margetts, B., (1989). Weight in infancy and death from ischaemic Heart disease. *The Lancet*, 577-580.

- Barker, D. J. P., (1989). The intrauterine and early postnatal origins of cardiovascular disease and chronic bronchitis. *Journal of Epidemiology and Community Health*, 239.
- Barker, D. J. P. (2007). The origins of developmental origins theory. *Journal of Internal Medicine*, 413, 415-416.
- Bern, H. A., (1992). The fragile fetus. Pp 9-15 in Colborn, T and C Clement. Chemically-induced alterations in sexual and functional development: The wildlife/human connection. *Advances in Modern Environmental Toxicology*.
- Bernasconi, S., (2022). Interferenti endocrini e salute del bambino: interrogativi aperti e ruolo del pediatra. *Area Pediatrica*, 23(1), 6-13.
- Biasini, F. J., De Jong, D., Ryan, S., Thorsten, V., Bann, C., Bellad, R., ... & McClure, E., (2015). Development of a 12-month screener based on items from the Bayley II Scales of Infant Development for use in Low Middle Income countries. *Early Human Development*, 91(4), 253-258.
- Braun, J. M., Lanphear, B. P., Calafat, A. M., Deria, S., Khoury, J., Howe, C. J., & Venners, S.A., (2014). Early-life bisphenol a exposure and child body mass index: a prospective cohort study. *Environmental health perspectives*, 122(11), 1239-1245.
- Braun, JM, Bellinger, DC, Hauser, R., Wright, RO, Chen, A., Calafat, AM, Yolton, K., Lanphear, BP., (2017). Esposizioni prenatali a ftalati, triclosan e bisfenolo A e abilità visuo-spaziali del bambino. *Neurotossicologia* 58, 75–83
- Buck, C., & Simpson, H., (1982). Infant diarrhoea and subsequent mortality from heart disease and cancer. *Journal of Epidemiology & Community Health*, 36(1), 27-30.
- Carbone, A. I., & Zagaroli, M., (1989). Emissions and dioxins formation from waste incinerators; Emissioni di diossine da inceneritori.

- Casals-Casas, C., & Desvergne, B. (2011). Endocrine disruptors: from endocrine to metabolic disruption.
- Coppola, L., Vari, R., & La Rocca, C., (2023). ESPOSIZIONE DEI BAMBINI AI PESTICIDI E EFFETTI SULLA SALUTE. Workshop finale del Progetto PEACH. Medicina di genere: l'impatto delle differenze di sesso e di genere nell'assistenza sanitaria Convegno. La tutela della salute nelle attività sportive e la lotta al doping, 36(9), 11-14.
- Dai Y, Yang Y, Xu X, Hu Y (2015) Effects of uterine and lactational exposure to di- (2-ethylhexyl) phthalate on spatial memory and NMDA receptor of hippocampus in mice. *Horm Behav* 71:41–48.
- DiCorcia, J. A., Snidman, N., Sravish, A. V., & Tronick, E., (2016). Evaluating the nature of the still-face effect in the double face-to-face still-face paradigm using different comparison groups. *Infancy*, 21(3), 332-352.
- Doherty, B. T., Engel, S. M., Buckley, J. P., Silva, M. J., Calafat, A. M., & Wolff, M. S. (2017). Prenatal phthalate biomarker concentrations and performance on the Bayley Scales of Infant Development-II in a population of young urban children. *Environmental research*, 152, 51-58.
- Ejaredar, M., Nyanza, E. C., Ten Eycke, K., & Dewey, D., (2015). Phthalate exposure and childrens neurodevelopment: a systematic review. *Environmental research*, 142, 51-60.
- Fagan, J. F., & Shepard, P., (1986). The Fagan test of infant intelligence. Cleveland, OH: Infantest Corporation, 87.

- Factor-Litvak, P., Insel, B., Calafat, A. M., Liu, X., Perera, F., Rauh, V. A., & Whyatt, R. M., (2014). Persistent associations between maternal prenatal exposure to phthalates on child IQ at age 7 years. *PloS one*, 9(12), e114003.
- Ficociello, B., Sturchio, E., Minoia, C., Casorri, L., Imbriani, P., & Signorini, S., (2010). Epigenetica ed esposizione ambientale a xenobiotici. *G Ital Med Lav Erg*, 32(1), 13-22.
- Foster, P. M. (2006). Disruption of reproductive development in male rat offspring following in utero exposure to phthalate esters. *International journal of andrology*, 29(1), 140-147.
- Fuso, A., & Lucarelli, M. (2019). La metilazione del DNA nella diagnostica: stato dell'arte e prospettive. *Biochimica Clinica*
- Gagne, J. R., Van Hulle, C. A., Aksan, N., Essex, M. J., & Goldsmith, H. H., (2011). Deriving childhood temperament measures from emotion-eliciting behavioral episodes: scale construction and initial validation. *Psychological assessment*, 23(2), 337.
- Gasull, M., Castell, C., Pallarès, N., Miret, C., Pumarega, J., Téllez-Plaza, M., ... & Porta, M., (2018). Blood concentrations of persistent organic pollutants and unhealthy metabolic phenotypes in normal-weight, overweight, and obese individuals. *American Journal of Epidemiology*, 187(3), 494-506.
- Giannelli, J., Campioni, L., Rossi, M., Prencipe, N., Marinelli, L., Pagano, L., & Giordano, R. (2023). Distruttori endocrini dal 2023 in poi. *L'Endocrinologo*, 24(5), 490-497.
- Gioiosa, L., Palanza, P., Parmigiani, S., vom Saal, F. S. (2015). Risk evaluation of Endocrine-Disrupting Chemicals: effects of developmental exposure too low

doses of Bisphenol A on behaviour and Physiology in mice (*Mus musculus*).  
*Dose-Response: An International Journal*, 1-2, 4-6.

Gluckman, P., Hanson, M., & Buklijas, T. (2010). A conceptual framework for the developmental origins of health and disease. *Journal of Developmental Origins of Health and Disease*, 1(1), 6-18.

Gluckman, P., Hanson, M., Cooper, C., & Thornburg, K. (2008). Effect of In Utero and Early-Life Conditions on Adult Health and Disease. *The New England Journal of Medicine*, 359(1), 61-73.

Gore, A. C., Chappell, V. A., Fenton, S. E., Flaws, J. A., Nadal, A., Prins, G. S., ... & Zoeller, R. T., (2015). EDC-2: the Endocrine Society's second scientific statement on endocrine-disrupting chemicals. *Endocrine reviews*, 36(6), E1-E150.

Gore, A. C., Chappell, V. A., Fenton, S. E., Flaws, J. A., Nadal, A., Prins, G. S., ... & Zoeller, R. T., (2015). Executive summary to EDC-2: the Endocrine Society's second scientific statement on endocrine-disrupting chemicals. *Endocrine reviews*, 36(6), 593.

Grohs, M. N., Reynolds, J. E., Liu, J., Martin, J. W., Pollock, T., Lebel, C., & Dewey, D., (2019). Prenatal maternal and childhood bisphenol a exposure and brain structure and behavior of young children. *Environmental Health*, 18, 1-12.

Hannon, P. R., & Flaws, J. A., (2015). The effects of phthalates on the ovary. *Frontiers in endocrinology*, 6, 8.

Heindel, J. J., Blumberg, B., Cave, M., Machtinger, R., Mantovani, A., Mendez, M. A., ... & Vom Saal, F., (2017). Metabolism disrupting chemicals and metabolic disorders. *Reproductive toxicology*, 68, 3-33.

- Hong, S. B., Hong, Y. C., Kim, J. W., Park, E. J., Shin, M. S., Kim, B. N., ... & Cho, S. C., (2013). Bisphenol A in relation to behavior and learning of school-age children. *Journal of Child Psychology and Psychiatry*, 54(8), 890-899.
- Jiang, Y., Li, J., Xu, S., Zhou, Y., Zhao, H., Li, Y., ... & Xia, W., (2020). Prenatal exposure to bisphenol A and its alternatives and child neurodevelopment at 2 years. *Journal of hazardous materials*, 388, 121774
- Kubo, K., Arai, O., Ogata, R., Omura, M., Hori, T., & Aou, S. (2001). Exposure to bisphenol A during the fetal and suckling periods disrupts sexual differentiation of the locus coeruleus and of behavior in the rat. *Neuroscience letters*, 304(1-2), 73-76.
- Lapehn, S., & Paquette, A. G., (2022). The placental epigenome as a molecular link between prenatal exposures and fetal health outcomes through the DOHaD hypothesis. *Current Environmental Health Reports*, 9(3), 490-501.
- Mammadov, E., Uncu, M., Dalkan, C., (2018). L'elevata esposizione prenatale al bisfenolo A riduce la distanza anogenitale nei neonati maschi sani. *J Clin Res Pediatr Endocrinol* 10 (1), 25–29.
- Matsuda, S., Matsuzawa, D., Ishii, D., Tomizawa, H., Sutoh, C., Nakazawa, K., ... & Shimizu, E. (2012). Effects of perinatal exposure to low dose of bisphenol A on anxiety like behavior and dopamine metabolites in brain. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 39(2), 273-279.
- Mustieles, V., Williams, P. L., Fernandez, M. F., Mínguez-Alarcón, L., Ford, J. B., Calafat, A. M., ... & Environment and Reproductive Health (EARTH) Study Team, (2018). Maternal and paternal preconception exposure to bisphenols and size at birth. *Human Reproduction*, 33(8), 1528-1537.

- Nakamura, K., Itoh, K., Dai, H., Han, L., Wang, X., Kato, S., ... & Fushiki, S. (2012). Prenatal and lactational exposure to low-doses of bisphenol A alters adult mice behavior. *Brain and Development*, 34(1), 57-63.
- Nelson, W., Wang, Y. X., Sakwari, G., & Ding, Y. B. (2020). Review of the effects of perinatal exposure to endocrine-disrupting chemicals in animals and humans. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology* Volume 251, 131-184.
- Newbold, R. R., Padilla-Banks, E., Jefferson, W. N., & Heindel, J. J., (2008). Effects of endocrine disruptors on obesity. *International journal of andrology*, 31(2), 201-208.
- Nobile, S., Di Sipio Morgia, C., Vento, G., (2022). Perinatal Origins of Adult Disease and Opportunities for Health Promotion: A Narrative Review. *Journal of Personalized Medicine*, 1-2.
- Palanza, P., Paterlini, S., Brambilla, M. M., Ramundo, G., Caviola, G., Gioiosa, L., ... & Ponzi, D., (2021). Sex-biased impact of endocrine disrupting chemicals on behavioral development and vulnerability to disease: Of mice and children. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 121, 29-46.
- Perera, F., Vishnevetsky, J., Herbstman, J. B., Calafat, A. M., Xiong, W., Rauh, V., & Wang, S., (2012). Prenatal bisphenol a exposure and child behavior in an inner-city cohort. *Environmental health perspectives*, 120(8), 1190-1194.
- Polanska, K., Ligocka, D., Sobala, W., & Hanke, W., (2014). Phthalate exposure and child development: the Polish Mother and Child Cohort Study. *Early human development*, 90(9), 477-485.
- Ponzi, D., (2008). Esposizione ai distruttori endocrini durante lo sviluppo: effetti neuro-comportamentali in un modello animale.

- Porta, M., Pumarega, J., & Gasull, M., (2012). Number of persistent organic pollutants detected at high concentrations in a general population. *Environment international*, 44, 106-111.
- Puche-Juarez, M., Toledano, J. M., Moreno-Fernandez, J., Gálvez-Ontiveros, Y., Rivas, A., Diaz-Castro, J., & Ochoa, J. J., (2023). The role of endocrine disrupting chemicals in gestation and pregnancy outcomes. *Nutrients*, 15(21), 4657.
- Quinnies, K. M., Harris, E. P., Snyder, R. W., Sumner, S. S., & Rissman, E. F., (2017). Direct and transgenerational effects of low doses of perinatal di-(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) on social behaviors in mice. *PLoS One*, 12(2).
- Rubio-Codina, M., & Grantham-McGregor, S., (2020). Predictive validity in middle childhood of short tests of early childhood development used in large scale studies compared to the Bayley-III, the Family Care Indicators, height-for-age, and stunting: A longitudinal study in Bogota, Colombia. *PloS one*, 15(4), e0231317.
- Street, M. E., & Bernasconi, S., (2020). Endocrine-disrupting chemicals in human fetal growth. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(4), 1430.
- Stump, D. G., Beck, M. J., Radovsky, A., Garman, R. H., Freshwater, L. L., Sheets, L. P., ... & Hentges, S. G., (2010). Developmental neurotoxicity study of dietary bisphenol A in Sprague-Dawley rats. *Toxicological Sciences*, 115(1), 167-182.
- Swan, S. H., (2008). Environmental phthalate exposure in relation to reproductive outcomes and other health endpoints in humans. *Environmental research*, 108(2), 177-184.
- Vandenberg, L. N., Hauser, R., Marcus, M., Olea, N., & Welshons, W. V., (2007). Human exposure to bisphenol A (BPA). *Reproductive toxicology*, 24(2), 139-177.

- Viola Macchi, C., Turati, C., & Simion, F., (2004). Can a nonspecific bias toward top-heavy patterns explain newborns' face preference? *Psychological Science*, 15(6), 379-383.
- Wang, P. W., Huang, Y. F., Wang, C. H., Fang, L. J., & Chen, M. L., (2023). Prenatal to preschool exposure of nonylphenol and bisphenol A exposure and neurodevelopment in young children. *Pediatrics & Neonatology*.
- Whyatt, R. M., Liu, X., Rauh, V. A., Calafat, A. M., Just, A. C., Hoepner, L., ... & Factor-Litvak, P., (2012). Maternal prenatal urinary phthalate metabolite concentrations and child mental, psychomotor, and behavioral development at 3 years of age. *Environmental health perspectives*, 120(2), 290-295.
- Xiao, C., Wang, L., Zhou, Q., & Huang, X. (2020). Hazards of bisphenol A (BPA) exposure: a systematic review of plant toxicology studies. *Journal of hazardous materials*, 384, 121488.
- Xu, X. B., He, Y., Song, C., Ke, X., Fan, S. J., Peng, W. J., ... & Kato, N., (2014). Bisphenol A regulates the estrogen receptor alpha signaling in developing hippocampus of male rats through estrogen receptor. *Hippocampus*, 24(12), 1570-1580
- Yung, H. W., Hemberger, M., Watson, E. D., Senner, C. E., Jones, C. P., Kaufman, R. J., ... & Burton, G. J., (2012). Endoplasmic reticulum stress disrupts placental morphogenesis: implications for human intrauterine growth restriction. *The Journal of pathology*, 228(4), 554-564.
- Zhang, Q., Chen, X. Z., Huang, X., Wang, M., & Wu, J., (2019). The association between prenatal exposure to phthalates and cognition and neurobehavior of children-evidence from birth cohorts. *Neurotoxicology*, 73, 199-212.
- Zoeller, R.T.; Brown, T.R.; Doan, L.L.; Gore, A.C.; Skakkebaek, N.E.; Soto, A.M.; Woodruff, T.J., (2012). Vom Saal, F.S. Endocrine-disrupting chemicals and

public health protection: A statement of principles from The Endocrine Society.  
Endocrinology, 153, 4097–4110.