



UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE  
DIPARTIMENTO SCIENZE DELLA VITA E DELL' AMBIENTE

**Corso di Laurea  
SCIENZE BIOLOGICHE**

---

**FTALATI IN GRAVIDANZA: EFFETTI SUL NEUROSVILUPPO DEL FETO E SULL'INSORGENZA DI  
PROBLEMI COMPORTAMENTALI IN ETA' INFANTILE.**

**PHTHALATES DURING PREGNANCY: EFFECTS ON THE NEURODEVELOPMENT OF THE FETUS  
AND ON THE ONSET OF BEHAVIORAL PROBLEMS IN CHILDHOOD AGE.**

Tesi di Laurea di:

Alessandra Russolillo

Docente Referente

Chiar.ma Prof.ssa Francesca Maradonna

Sessione Straordinaria Febbraio 2021  
Anno Accademico: 2019/2020

# INTRODUZIONE



Gli **ftalati** sono **sostanze chimiche organiche** che derivano dal petrolio. Ampiamente utilizzati nell'industria delle materie plastiche come agenti plastificanti, ovvero come sostanze aggiunte per migliorare la flessibilità e la modellabilità dei prodotti. Sono in grado di penetrare nell'ambiente e negli alimenti entrando a contatto con l'organismo per inalazione, ingestione e assorbimento cutaneo.

Studi precedenti hanno dimostrato che gli ftalati sono **interferenti endocrini**, ovvero perturbano l'omeostasi ormonale dell'organismo, in particolare incidendo sulla ghiandola tiroidea (Boas et al., 2012). Gli ftalati vengono rapidamente metabolizzati nell'organismo ed eliminati attraverso le urine. Pertanto, la misurazione delle concentrazioni urinarie dei metaboliti degli ftalati è il metodo più comune, affidabile e non invasivo per valutare l'esposizione a queste sostanze, sebbene persistano nell'organismo per poco tempo (<24 h).



Il limite degli studi precedenti è legato al fatto che hanno esaminato una sostanza chimica alla volta e per un tempo non prolungato, escludendo a priori che anche le miscele dei metaboliti degli ftalati possono avere effetti negativi sull'organismo, come anche l'esposizione cumulativa a tali sostanze nel tempo.



## SCOPO:

Lo scopo di questo lavoro è verificare se l'esposizione durante la gravidanza agli *ftalati* e alle loro *miscele* può incidere negativamente sul neurosviluppo del feto e sia responsabile dell'insorgenza di problemi comportamentali in età infantile.

# MATERIALI E METODI

I dati esaminati sono quelli ottenuti dallo studio *Health Outcomes and Measures of the Environment* (HOME) che ha reclutato donne incinte (314 coppie madre-figlio) da Cincinnati, Ohio, e ha ripetuto visite dopo la nascita dei bambini fino all'età di otto anni.

Sono stati raccolti campioni di urine due volte durante la gestazione a 16 e 26 settimane, e più campioni di urine dai bambini fino agli 8 anni per ogni anno. Questi campioni sono stati :

- digeriti con enzimi specifici;
- le molecole ottenute separate attraverso *cromatografia liquida ad alta prestazione* (HPLC);
- trasformate in ioni carichi attraverso *l'Electrospray ionization* (ESI);
- separate in base alla loro massa all'interno di un *analizzatore di massa a triplo quadrupolo* (ESI-MS/MS), (Silvia et al. 2014).

Nei campioni di urine sono state misurate le concentrazioni di 4 metaboliti dello *di-2-etilesil ftalato* (DEHP):

1. *mono (2-etilesil) ftalato* (MEHP),
2. *mono (2-etil-5-ossoesile) ftalato* (MEOHP),
3. *mono (2-etil-5-carbossipentil) ftalato* (MECPP)
4. *mono (2-etil-5-idrossesil) ftalato* (MEHHP).

# ANALISI COMPORTAMENTALI

Il comportamento dei bambini da 0 a 8 anni è stato valutato attraverso il ***Behavioral Assessment System for Children-2 (BASC-2)***. Questo sistema valuta il comportamento sulla base di tre scale comportamentali e nove sotto-scale cliniche:

1. problemi di internalizzazione: ansia e depressione;
2. problemi di esternalizzazione: aggressività e iperattività;
3. indice dei sintomi comportamentali (*Behavioral Symptoms Index [BSI]*),

**RISULTATI:** Punteggi più alti su queste scale sono associati comportamenti più problematici dei bambini.

Composite Scale	Ages 2, 3, 4, 5, & 8 years	Ages 3, 4, 5, & 8 years	Ages 4, 5, & 8 years	Ages 5 & 8 years
Internalizing Problems	0.52	0.55	0.58	0.59
Externalizing Problems	0.57	0.61	0.64	0.63
Behavioral Symptoms Index	0.58	0.63	0.65	0.68

**Tabella 1.** Coefficiente di correlazione intraclasse (ICCs) di misurazioni ripetute attraverso il Sistema BASC-2 all'età di 2, 3, 4, 5, e 8 anni: The HOME Study.

# ANALISI DELLA COVARIANZA

I risultati ottenuti dallo studio HOME sono stati modificati sulla base di alcune variabili che potrebbero influenzare il risultato. La **covarianza** di due variabili è un numero che fornisce una misura di quanto le due variano assieme, ovvero della loro dipendenza.

## RISULTATI:

- ❑ le medie dei problemi di internalizzazione associati al livello di depressione materna, calcolata con il sistema *Becks Depression Inventory* (BDI).
- ❑ le medie dei problemi di esternalizzazione e l'indice BSI associate al sesso del bambino (più elevate nei maschi) e anche sempre all'indice di depressione materna.

	N	Internalizing Problems <sup>a</sup> Mean ± SD	P- value	Externalizing Problems <sup>a</sup> Mean ± SD	P- value	Behavioral Symptoms Index <sup>a</sup> Mean ± SD	P- value
Overall	314	48 ± 9		49 ± 9		49 ± 9	
Child Sex			0.37		0.01		0.01
Female	171	48 ± 9		47 ± 9		48 ± 9	
Male	143	47 ± 8		50 ± 9		50 ± 9	
Child Race			0.60		0.84		0.37
Non-Hispanic White	197	48 ± 8		49 ± 8		49 ± 8	
Non-Hispanic Black	97	47 ± 10		49 ± 11		50 ± 10	
Other	20	47 ± 9		48 ± 9		47 ± 9	
Maternal Education			0.51		0.54		0.26
High School or Less	68	48 ± 9		49 ± 10		50 ± 9	
Tech School/Some College	77	47 ± 9		50 ± 11		50 ± 10	
Bachelor's or More	169	48 ± 8		48 ± 7		48 ± 8	
Marital Status			0.54		0.51		0.14
Not Married	103	47 ± 10		49 ± 10		50 ± 9	
Married	211	48 ± 8		49 ± 8		49 ± 8	
Maternal Age			0.07		0.67		0.72
18-25 Years	70	47 ± 10		48 ± 11		50 ± 10	
25-35 Years	195	47 ± 9		49 ± 8		49 ± 8	
> 35 Years	49	50 ± 8		50 ± 8		50 ± 9	
Pre-Pregnancy BMI			0.36		0.18		0.26
< 25	166	47 ± 9		48 ± 9		49 ± 8	
≥ 25-30	85	49 ± 8		48 ± 7		49 ± 8	
≥ 30	63	47 ± 10		51 ± 11		51 ± 10	
Gestational Smoking			0.48		0.52		0.56
Unexposed	109	48 ± 8		49 ± 8		49 ± 8	
Second Hand Smoke	172	47 ± 9		49 ± 10		49 ± 9	
Active Smoking	33	48 ± 10		50 ± 10		50 ± 8	
Maternal Baseline BDI			0.02		0.01		0.01
0-14	257	47 ± 8		48 ± 8		48 ± 8	
> 14- < 19	29	50 ± 10		51 ± 11		53 ± 9	
≥ 19	25	51 ± 9		55 ± 10		55 ± 9	
Gestational Alcohol Drinking			0.27		0.23		0.28
Never or < 1/Month	269	47 ± 9		49 ± 9		49 ± 9	
> 1/Month	19	48 ± 8		51 ± 7		51 ± 7	
Binge	26	50 ± 8		50 ± 10		50 ± 9	

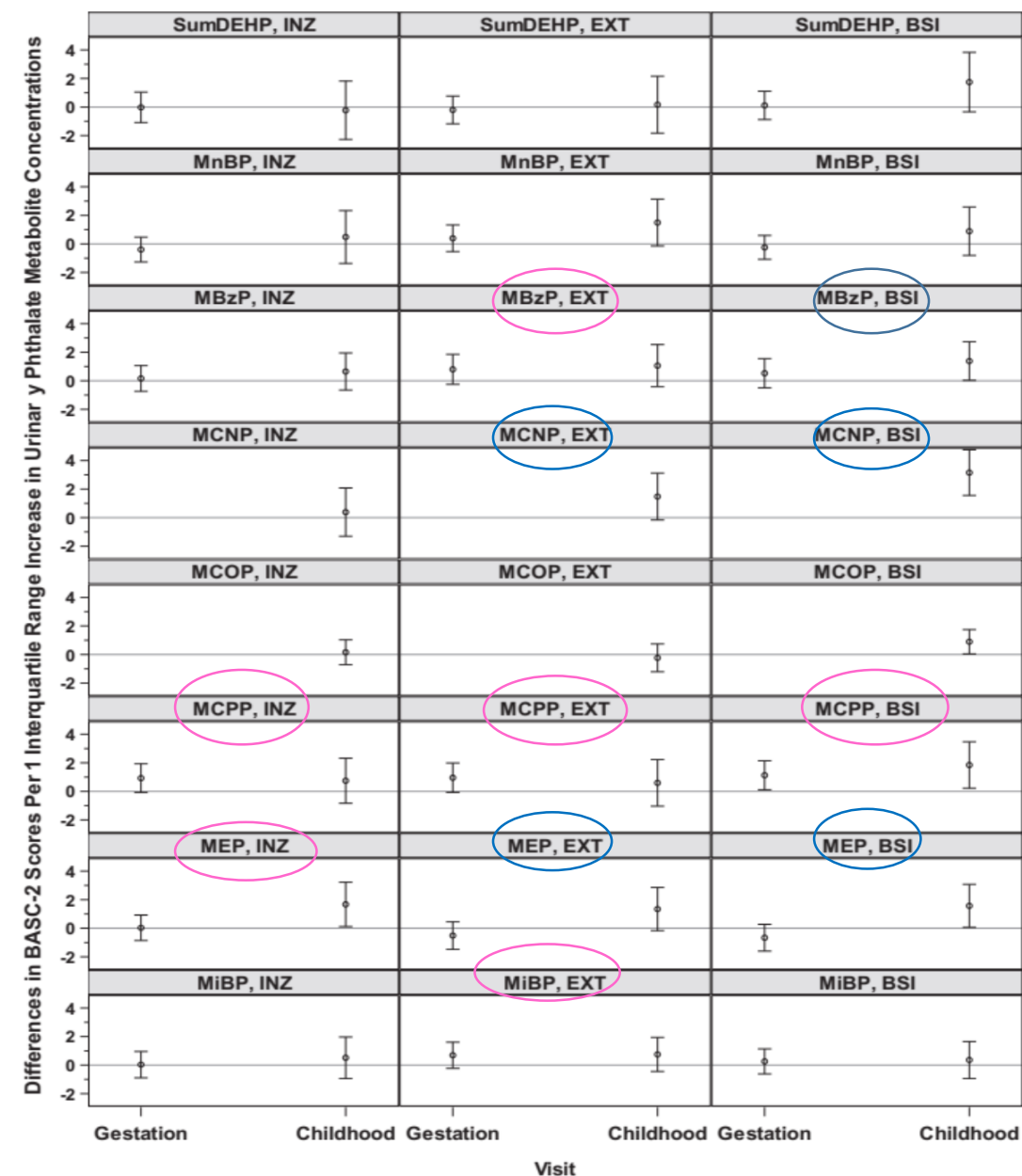
**Tabella 2:** i risultati ottenuti dal sistema BASC-2 dello studio HOME, sono stati adattati sulla base di diverse variabili. Mean: media, SD: deviazione standard. In evidenza le associazioni statisticamente rilevanti (p-value<0.05). P-value calcolato mediante il test di *Kruskal-Wallis*.

# ANALISI DELLA REGRESSIONE

- **MODELLI MISTI LINEARI AD INTERCETTA CASUALE:** permettono di stimare i valori delle associazioni tra le concentrazioni urinarie gestazionali e infantili dello ftalato e i suoi metaboliti con i valori ottenuti dal sistema BASC-2.

## RISULTATI:

- ❑ concentrazioni urinarie gestazionali di MEP, e MCPP associate a punteggi più alti dei problemi di internalizzazione infantili;
- ❑ concentrazioni urinarie gestazionali di MiBP, MCPP, MBzP associate a punteggi più alti del problema di esternalizzazione infantile;
- ❑ concentrazioni urinarie gestazionali di MCPP associate a punteggi più alti di BSI;
- ❑ concentrazioni urinarie infantili elevate di MEP, MCNP, MnBP associate a punteggi più alti del problema di esternalizzazione e BSI.



**Figura 1:** punteggi della scala BASC-2 associati all'aumento di 1 intervallo interquartile (1-IQR) per ogni aumento delle concentrazioni di metaboliti urinari dello ftalato (studio HOME) . In evidenza le associazioni tra le due variabili statisticamente rilevanti.

## WEIGHTED QUANTILE SUM REGRESSION ANALYSIS (WQS):

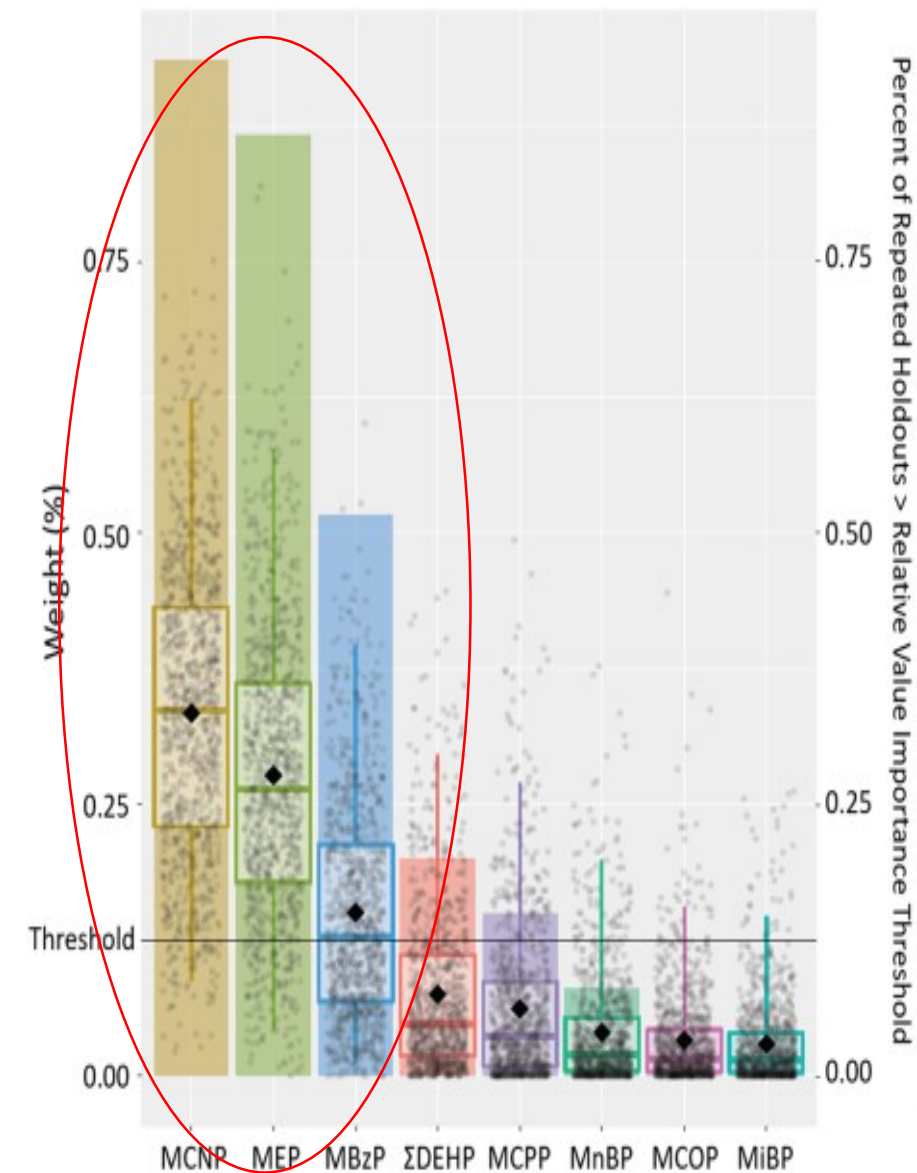
esamina l'impatto dell'associazione di tutti i metaboliti degli ftalati sui problemi neurocomportamentali dei bambini (Czarnota et al., 2015).

## RISULTATI:

- MCNP, MEP, MBzP componenti più rilevanti della miscela associati al problema di internalizzazione;
- MBzP, MCNP, MEP componenti più rilevanti della miscela associati al problema di esternalizzazione;
- ΣDEHP, MBzP, MCNP e MEP componenti più rilevanti della miscela associati al BSI.

	Internalizing Problems		Externalizing Problems		Behavioral Symptoms Index	
	Mean weights (95%CI) across 1,000 Iterations	Inclusion Probabilities	Mean weights (95%CI) across 1,000 Iterations	Inclusion Probabilities	Mean weights (95%CI) across 1,000 Iterations	Inclusion Probabilities
ΣDEHP	0.08 (0.00, 0.21)	0.200	0.08 (0.00, 0.22)	0.223	0.13 (0.01, 0.31)	0.444
MnBP	0.04 (0.00, 0.13)	0.080	0.08 (0.00, 0.22)	0.226	0.05 (0.00, 0.15)	0.105
MBzP	0.15 (0.01, 0.32)	0.516	0.36 (0.07, 0.62)	0.912	0.30 (0.05, 0.52)	0.878
MCNP	0.33 (0.09, 0.53)	0.935	0.22 (0.02, 0.44)	0.711	0.28 (0.05, 0.48)	0.855
MCOP	0.03 (0.00, 0.10)	0.044	0.01 (0.00, 0.04)	0.004	0.01 (0.00, 0.05)	0.011
M CPP	0.06 (0.00, 0.17)	0.149	0.03 (0.00, 0.10)	0.050	0.05 (0.00, 0.15)	0.118
MEP	0.28 (0.04, 0.49)	0.866	0.15 (0.01, 0.35)	0.480	0.13 (0.01, 0.30)	0.425
MiBP	0.03 (0.00, 0.09)	0.035	0.06 (0.00, 0.16)	0.151	0.05 (0.00, 0.15)	0.102

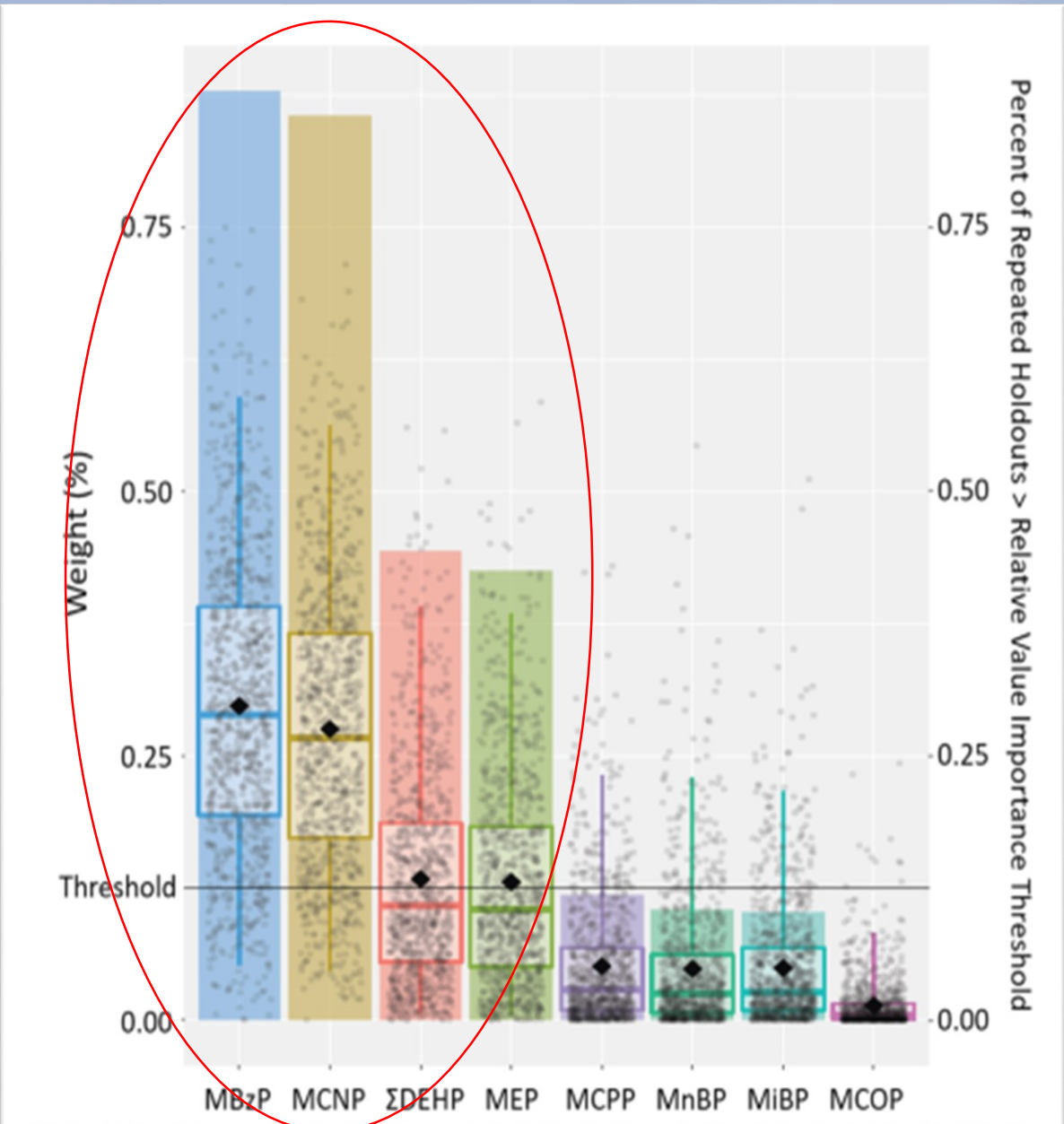
**Tabella 3:** risultati della Weighted Quantile Sum Regression Analysis dati dalle interazioni tra l'esposizione infantile alle miscele degli ftalati e i punteggi del Sistema BASC-2: importanza relativa di ogni metabolita dello ftalato e la sua probabilità d'inclusione all'interno della scala relativa del sistema BASC-2. In evidenza i dati staticamente rilevanti.



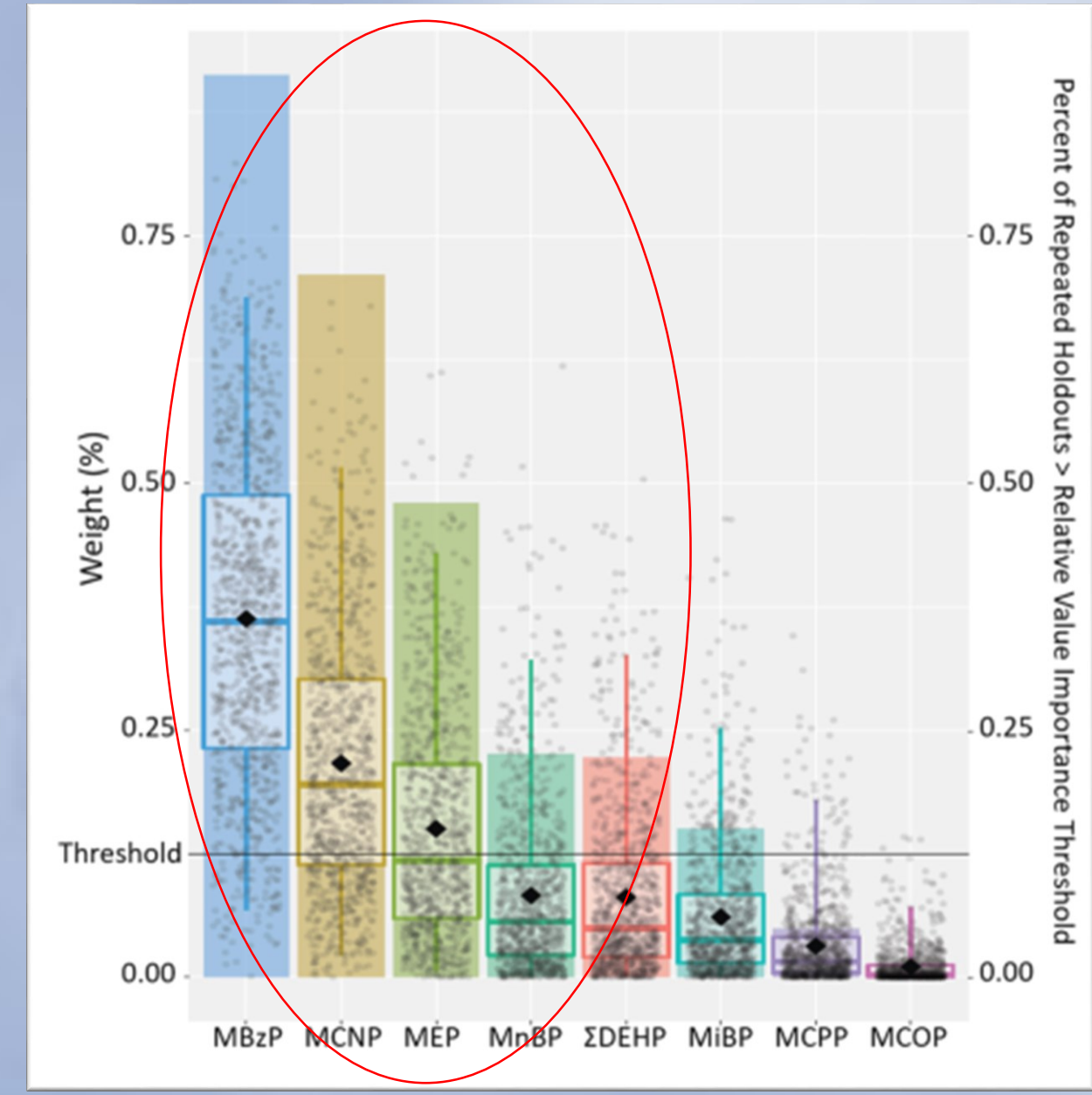
**Figura 2:** risultati dell'analisi WQS: l'importanza relativa in % di ogni metabolita dello ftalato all'interno di una miscela è stato associato ai punteggi dei **problemi di internalizzazione**. In evidenza i dati staticamente rilevanti.



**Figura 3:** risultati dell'analisi WQS: l'importanza relativa in % di ogni metabolita dello ftalato all'interno di una miscela associato ai punteggi di **BSI**. In evidenza i dati staticamente rilevanti.



**Figura 4:** risultati dell'analisi WQS: l'importanza relativa in % di ogni metabolita dello ftalato all'interno di una miscela associato ai punteggi dei **problemi di esternalizzazione**. In evidenza i dati staticamente rilevanti.



# CONCLUSIONI

- ✓ le concentrazioni urinarie di MCPP sono associate sia ai problemi di internalizzazione, esternalizzazione e BSI;
- ✓ le concentrazioni urinarie gestazionali di MBzP e MiBP sono associate ai problemi di esternalizzazione;
- ✓ le concentrazioni urinarie gestazionali di MEP sono associate ai problemi di internalizzazione;
- ✓ le concentrazioni urinarie infantili di MBzP sono associate a elevati problemi di attenzione e di condotta nei bambini.
- ❑ i risultati dall'analisi WQS, hanno dimostrato che all'interno delle miscele degli ftalati MEP, MCNP, e MBzP sono i metaboliti a cui corrispondono punteggi dei problemi comportamentali più rilevanti.

Non è chiaro come l'esposizione agli ftalati in età precoce influenzi il neurocomportamento, tuttavia si ritiene siano in grado di interferire con processi fondamentali del neurosviluppo:

- riducendo il livello degli ormoni tiroidei;
- alterando il metabolismo lipidico;
- inibendo la produzione di testosterone.

# REFERENZE

Boas, M., Feldt-Rasmussen, U., Main, K.M., 2012. Thyroid effects of endocrine disrupting chemicals. *Mol. Cell. Endocrinol.* 355 (2), 240–248. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2011.09.005>

Czarnota, J., Gennings, C., Wheeler, D.C., 2015. Assessment of weighted quantile sum regression for modeling chemical mixtures and cancer risk. *Cancer Inform.* 14 (Suppl 2), 159–171. <https://doi.org/10.4137/CIN.S17295>

Li N, Papandonatos GD, Calafat AM, Yolton K, Lanphear BP, Chen A, Braun JM. Gestational and childhood exposure to phthalates and child behavior. *Environ Int.* 2020 Nov;144:106036. doi: 10.1016/j.envint.2020.106036. Epub 2020 Aug 12. PMID: 32798801; PMCID: PMC7572811.

Silva, M.J., Barr, D.B., Reidy, J.A., Malek, N.A., Hodge, C.C., Caudill, S.P., Brock, J.W., Needham, L.L., Calafat, A.M., 2004. Urinary levels of seven phthalate metabolites in the U.S. population from the National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES) 1999–2000. *Environ. Health Perspect.* 112 (3), 331–338