



Progetto PERSUADED

Biomonitoraggio di ftalati e bisfenolo A in coppie madre-bambino del territorio italiano: associazione tra esposizione e malattie in età giovanile

Ambiente e salute

DESCRIZIONE

Gli **ftalati** (di cui il di-2-etilesilftalato, DEHP, è uno dei maggiori rappresentanti) e il **Bisfenolo A** (BPA), composti diffusamente utilizzati come plasticizzanti in numerosi prodotti di uso quotidiano (contenitori per alimenti, giocattoli, cosmetici, carta termica, dispositivi medici, etc.), sono sostanze non persistenti nell'ambiente e con rapido metabolismo, ma con caratteristica di **interferenti endocrini** (IE), ossia in grado di perturbare il funzionamento del sistema endocrino. In quanto interferenti endocrini (e non solo) DEHP e BPA sono stati inclusi nella lista delle sostanze candidate all'autorizzazione o restrizione del [regolamento REACH](#) (allegato XIV). Inoltre DEHP e BPA sono soggetti a [restrizione europea](#): l'utilizzo del DEHP non è consentito a concentrazioni superiori allo 0,1% nei giocattoli e negli articoli destinati all'infanzia; il motivo della restrizione è dovuto al pericolo di esposizione che può derivare dal masticare o succhiare per lunghi periodi di tempo oggetti che contengono ftalati. Per il BPA esistono limiti di migrazione **nei giocattoli e nei prodotti alimentari** da contenitori alimentari ([Direttiva \(UE\) 2017/898](#), [Regolamento \(UE\) n.2018/213](#)) nonché divieto d'uso nei biberon di polycarbonato e per altri contenitori alimentari destinati a lattanti e alla prima infanzia ([Regolamento \(UE\) n.2018/213](#), [Regolamento n.321/2011](#)).

Nonostante siano sostanze soggette a restrizione di uso, è stato dimostrato che sia il BPA sia il DEHP vengono continuamente rilasciati dai prodotti che li contengono e regolarmente rilevati nell'ambiente, nei prodotti alimentari e nella popolazione, con possibili effetti avversi per la salute principalmente a livello del sistema riproduttivo, nervoso, endocrino.

Negli ultimi anni si è registrato un significativo aumento di patologie legate a disturbi endocrini, tra cui pubertà precoce, disturbi neuro-comportamentali, obesità e diabete. La documentata esposizione a fattori ambientali che potenzialmente possono influire sulla salute umana rende il loro studio di importanza fondamentale. L'esposizione agli interferenti endocrini durante l'infanzia e la pubertà merita speciale attenzione poiché rappresentano fasi cruciali dello sviluppo. Studi recenti hanno associato l'esposizione a DEHP e a BPA all'insorgenza di **patologie infantili** multifattoriali endocrino-correlate; a loro volta, queste alterazioni nelle fasi dello sviluppo possono predisporre all'insorgenza di patologie quali il diabete di tipo 2 e le malattie cardiovascolari in età adulta.



OBIETTIVI

Il Progetto LIFE PERSUADED ha affrontato la **problematica dell'esposizione umana a plastificanti**, ed i loro effetti sulla salute focalizzando l'attenzione sulla popolazione infantile attraverso: i) uno studio di biomonitoraggio avente lo scopo di valutare i livelli di esposizione a DEHP e BPA dei bambini e delle loro madri, ii) lo studio dell'associazione tra esposizione e patologie infantili e iii) la valutazione degli effetti tossicologici dei plastificanti in esame. Il progetto LIFE PERSUADED si è posto i seguenti **obiettivi** principali:

- misurare i livelli di BPA e dei metaboliti attivi di DEHP nella popolazione infantile italiana,
- valutare le differenze di esposizione tra aree urbane e rurali nel Nord, Centro e Sud d'Italia;
- valutare la relazione tra l'esposizione a DEHP e BPA e l'insorgenza di patologie infantili endocrino-correlate attraverso tre studi caso-controllo;
- valutare il rapporto causa-effetto dovuto all'esposizione a concentrazioni reali di BPA e DEHP, in condizioni sperimentali;
- diffondere i risultati, i criteri e gli esiti del progetto alla comunità scientifica, alla popolazione, ai principali *stakeholder*,

compresi gli operatori del Servizio Sanitario Nazionale.

FASI DEL PROGETTO

Le principali azioni del Progetto sono state le seguenti:

- **Studio di biomonitoraggio (HBM)** per valutare l'esposizione a DEHP e BPA di bambini dai 4 ai 14 anni e delle loro madri, reclutati sul territorio italiano, al fine di evidenziare differenze di esposizione in relazione all'area di residenza, all'età e al sesso dei bambini.

Lo studio ha incluso le seguenti attività:

- **Il coinvolgimento e formazione dei pediatri di famiglia.** Per il reclutamento delle coppie madre-bambino nel territorio italiano, sono stati coinvolti **87** pediatri di famiglia in **11** regioni (Lombardia, Veneto, Friuli Venezia Giulia, Lazio, Marche, Umbria, Calabria, Puglia, Basilicata e Sicilia). Per ogni regione, è stato nominato un referente che ha seguito un corso formativo presso l'Istituto Superiore di Sanità, al fine di apprendere gli obiettivi dello studio, i criteri per l'arruolamento delle coppie madre-bambino, la raccolta, la conservazione e la gestione dei campioni di urine, l'apposizione di codici alfanumerici per garantire l'anonimato dei pazienti, la raccolta dei consensi informati e dei questionari/diari alimentari compilati su cartaceo ed *online*. Ogni referente regionale ha poi organizzato nel suo territorio incontri per trasferire tali conoscenze agli altri pediatri coinvolti nello studio, sotto la supervisione del coordinatore del progetto. In tal modo si è costituito un **network di pediatri** che ha collaborato attivamente con il progetto per la diffusione della conoscenza delle problematiche di ambiente e salute dei bambini. I pediatri hanno acquisito conoscenza della problematica e competenza tecnica per affrontare lo studio per le fasi di reclutamento dei soggetti, somministrazione di questionari e raccolta dei campioni, nonché capacità di trasferimento delle informazioni ai propri pazienti.
- **L'Identificazione dei comuni su cui operano i pediatri coinvolti.** I comuni su cui operano i pediatri della rete di progetto sono stati classificati in aree urbane e rurali in accordo ai criteri definiti dall'Istituto Italiano di Statistica (ISTAT) basati sulla densità di popolazione ($> 0 < 150$ abitanti/Km²) e sul numero di abitanti ($> 0 < 50.000$). Il numero di coppie madre-bambino da arruolare è stato assegnato a ciascun pediatra in modo da ottenere un numero equamente distribuito in aree urbane e rurali del Nord, Centro e del Sud del territorio italiano;
- **L'elaborazione dei questionari e dei diari alimentari per la raccolta e la gestione dei dati.** Il Progetto ha definito un questionario dedicato ed un diario alimentare a struttura chiusa (per la registrazione di due giorni di dieta), differenziati per mamma e bambino, per la raccolta dei dati sullo stile di vita e le abitudini di consumo alimentare come fattori determinanti per l'esposizione.
- **Il reclutamento, campionamento e raccolta dei dati da coppie madre-bambino da parte dei pediatri coinvolti.** Ogni pediatra ha reclutato il numero di coppie madre-bambino stabilito dallo studio in relazione alla macro area di competenza. Ai pediatri sono stati consegnati i *kit* contenenti il materiale utile per il reclutamento delle coppie, sia per la madre che per il bambino (documenti informativi per pediatri e per i soggetti reclutati, contenitori usa e getta per il campionamento delle urine, questionari e diari alimentari, consensi informati, adesivi stampati con il codice alfanumerico da associare al questionario e al campione di urine). Sono stati inoltre prodotti e inviati ai pediatri un poster informativo da affiggere nello studio medico e un **volantino illustrativo delle finalità del progetto per le famiglie** ("opuscolo per il reclutamento"). Alla fine dello studio è stato prodotto un **analogo volantino illustrativo dei risultati ottenuti** dal progetto. Lo studio di biomonitoraggio ha coinvolto **2.036 coppie madri-bambino**. Sono stati arruolati bambini ed adolescenti di entrambi i sessi nelle fasce di età 4-6, 7-10, 11-14, residenti nei comuni coinvolti da almeno 6 mesi, sani e con un indice di massa corporea nel *range* di normalità (compreso fra il 5% e l'85% come da linea guida OMS). Alle 2.036 coppie sono stati somministrati dei questionari sullo stile di vita e sono stati raccolti i campioni di urine per la misura delle concentrazioni di BPA e DEHP.

The image shows two pages of a questionnaire and data collection form. The left page is the 'QUESTIONARIO FIGLIO' (Child Questionnaire) with a header for 'PERSUADED' and a section for 'CODICE IDENTIFICAZIONE' (Identification Code). The right page is a data collection form with columns for 'REGIONALI', 'Sesso', 'CATEGORIA AREA', and 'Municipio'. It contains a table with rows for demographic and health-related information, including age, sex, residence type, and various health indicators.

Figura 1: Questionari su ambiente, stili di vita ed abitudini alimentari – madre e figli

- **Studi caso-controllo riguardanti patologie infantili quali** il telarca prematuro idiopatico e pubertà precoce centrale idiopatica e obesità infantile idiopatica. L'Ospedale Pediatrico Bambino Gesù di Roma si è occupato dell'arruolamento di 39 bambine con telarca prematuro idiopatico (IPT), 31 bambine con pubertà precoce centrale (ICPP), 30 bambini e 36 bambine con obesità idiopatica (Ob) e dei relativi controlli di pari età e sesso. Ai bambini è stato somministrato un questionario sugli stili di vita, le abitudini alimentari ed il diario alimentare dei due giorni precedenti la raccolta delle urine. Inoltre è stato prelevato un campione di sangue per l'analisi di marcatori di effetto associati alle patologie. Gli studi hanno avuto come principale scopo quello di valutare la relazione tra esposizione a DEHP e BPA e patologie infantili (pubertà precoce, telarca e obesità). Ulteriore scopo è stato quello di individuare in relazione alle patologie un pannello di biomarcatori di effetto (marcatori clinici e tossicologici quali ormoni sessuali, tiroidei, ormoni coinvolti nella regolazione dell'appetito, etc.) quali indici di potenziali effetti avversi e valutarne la correlazione con i livelli di DEHP e BPA misurati nelle urine.
- **Valutazione dei contaminanti nei campioni umani.** Ai soggetti reclutati nello studio di biomonitoraggio e negli studi caso-controllo sono stati richiesti campioni di urina per le analisi dei metaboliti del DEHP (MEHP, MEHHP e MEOHP) e del BPA. I campioni di urine sono stati suddivisi in due aliquote: una parte per le analisi, ed una parte è stata conservata nella [biobanca dell'IFC-CNR](#) per eventuali ulteriori studi. Il metodo per l'analisi dei metaboliti del DEHP si basa sulla cromatografia liquida accoppiata a spettrometria di massa a tempo di volo, utilizzando il sistema UHPLC-QTOF. È stato inoltre sviluppato un secondo metodo in Gas Cromatografia (GCMS) che ha permesso di analizzare il BPA partendo dallo stesso campione estratto per l'analisi dei metaboliti del DEHP. I metodi analitici sono stati validati attraverso la partecipazione a test interlaboratorio promossi dal progetto europeo HBM4EU ([Coordinating and advancing human biomonitoring in europe to provide evidence for chemical policy making](#)).
- **Valutazione dei dati.** I dati sono stati analizzati con metodi statistici per valutare eventuali differenze nei livelli di esposizione dei bambini e delle madri a seconda dell'area di residenza (macro-area o area) e, per i soli bambini, a seconda del genere e della categoria di età. È stata inoltre effettuata l'analisi delle risposte dei questionari e dei diari alimentari per stabilire quali comportamenti fossero associati ad un maggior rischio di avere livelli di esposizione più elevati.
- **Studio sperimentale in vivo**, progettato per valutare le potenziali modalità di azione e gli effetti specifici di BPA, DEHP e delle loro miscele, a concentrazioni misurate nella popolazione infantile, simulando in tal modo un realistico scenario di esposizione. Lo studio sperimentale ha utilizzato animali in età peripuberale ('juvenile'), ovvero dallo svezzamento fino a maturità sessuale. Questa finestra di esposizione è stata scelta perché gli animali si trovano nella stessa fase di sviluppo dei bambini selezionati per lo studio di biomonitoraggio. I livelli di dose dello studio sono stati scelti a partire dai valori di BPA e DEHP misurati nei primi 300 bambini dello studio di biomonitoraggio. Considerato che la popolazione è esposta a più contaminanti contemporaneamente, BPA e DEHP sono stati utilizzati anche in miscela per trattare gli animali ed ottenere così una valutazione più realistica degli effetti. Gli animali di entrambi i sessi sono stati trattati con BPA e DEHP e le loro miscele per 28 giorni fino a maturazione sessuale (circa 60 giorni di età nel ratto). I parametri di tossicità generale e di maturazione sessuale sono stati valutati durante il periodo di trattamento dallo svezzamento alla maturità sessuale (28 giorni) mentre alla fine dello studio sono stati raccolti numerosi organi per analisi istopatologiche e campioni di sangue per la valutazione dei biomarcatori. La valutazione tossicologica è stata eseguita sui due sessi separatamente.

RISULTATI RAGGIUNTI

Lo studio di biomonitoraggio realizzato dal progetto LIFE PERSUADED ha evidenziato la presenza di DEHP e BPA nei bambini e nelle madri della popolazione italiana. Nei bambini, sono state evidenziate differenze di esposizione in relazione al genere, all'età e all'area geografica: in tutti i campioni di urine dei bambini più piccoli sono stati trovati livelli più alti di ftalati e di BPA, pertanto risultano essere più esposti rispetto alle altre fasce di età, ed i maschi in misura maggiore rispetto alle femmine nelle aree urbane del Centro per il DEHP e nelle aree rurali del Sud per il BPA. L'esposizione delle madri è risultata essere diversa in relazione all'area geografica, con livelli di DEHP più alti nel Centro e nel Sud e di BPA al Nord d'Italia. Inoltre per il BPA sono state osservate differenze tra aree rurali e aree urbane del Centro e del Sud.

La valutazione dei dati sullo stile di vita, raccolti mediante i questionari e i diari alimentari, e dei livelli di DEHP e BPA ha permesso di identificare alcuni determinanti d'esposizione nei bambini e nelle madri. Le evidenze raccolte confermano che **alcuni stili di vita possono contribuire ad una maggiore esposizione a sostanze plasticizzanti**. In particolare, livelli più alti della somma dei metaboliti di ftalati si sono osservati in bambini che giocano più di 4 ore al giorno con giocattoli di plastica,

inclusi quelli elettronici. Tale associazione risulta più evidente nei bambini più piccoli di 4-6 anni. I bambini di età compresa tra i 7 e i 14 anni che svolgono attività fisica, hanno livelli più bassi di ftalati e BPA che variano a seconda dello sport praticato, del sesso e dell'area di residenza. Sia nei bambini che nelle madri, livelli più alti di ftalati e BPA sono associati all'utilizzo di plastica monouso (bicchieri, piatti) che aumentano in relazione alla frequenza d'uso, e all'utilizzo di contenitori in plastica nel microonde.

Attraverso la valutazione dei risultati, il **progetto è stato in grado di fornire indicazioni alla popolazione su come modificare il proprio stile di vita al fine di ridurre il rischio di esposizione** nell'età adulta e nell'età infantile/giovanile, attraverso la pubblicazione di "[10 pratici consigli per ridurre l'esposizione ai plastificanti per adulti e bambini](#)".

Lo studio caso-controllo ha evidenziato che nelle bambine affette da telarca prematuro e pubertà precoce non è esistita nessuna associazione con i livelli di esposizione a DEHP o BPA. I livelli degli ormoni T4, TSH, antimulleriano e leptina sono risultati diversi a seconda della patologia e rispetto al controllo. I risultati dello studio suggeriscono una possibile maggiore suscettibilità del telarca agli effetti dell'esposizione a ftalati.

L'esposizione a BPA è risultata genere-specifica, infatti solo le bambine obese hanno mostrato livelli urinari di BPA maggiori delle bambine di controllo. Sia i bambini che le bambine obese avevano livelli di leptina maggiori dei rispettivi controlli, mentre livelli più bassi di adiponectina sono stati osservati solo nei bambini maschi.

I risultati dello studio sperimentale in vivo hanno evidenziato che il fegato, il sistema riproduttivo e metabolico sono bersaglio sia del DEHP che del BPA sebbene con meccanismi e modalità diverse anche in dipendenza del sesso. La tiroide è risultata un bersaglio importante del DEHP. Per le miscele delle due sostanze si sono evidenziati meccanismi diversi a seconda della composizione della miscela (maggiore e/o minore presenza di DEHP e BPA) con fegato e tiroide nuovamente tessuti bersaglio. Interessante notare che la risposta è sesso-specifica: infatti, nei maschi la miscela in cui il BPA è maggiore ed il DEHP minore è quella che genera il numero maggiore di effetti, soprattutto nel sistema riproduttivo. Nelle femmine, le miscele che contengono una o entrambe le sostanze ad alta dose hanno come target il sistema endocrino e metabolico mentre le altre miscele inducono un numero di effetti tossici comparabile.

Il Progetto LIFE PERSUADED ha partecipato al **test interlaboratorio** organizzato dal progetto europeo HBM4EU, finanziato dal programma Horizon 2020 ([Coordinating and advancing human biomonitoring in europe to provide evidence for chemical policy making](#)), per il dosaggio di ftalati e BPA in campioni urinari, con l'obiettivo chiave di armonizzare le procedure analitiche tra i vari paesi europei. Questo aspetto è di fondamentale importanza per ottenere **dati comparabili** sull'esposizione umana da fornire agli organi regolatori per indicare politiche mirate a ridurre l'esposizione a queste sostanze.

I dati ottenuti da LIFE PERSUADED offrono un contributo alla valutazione del rischio tossicologico di DEHP e BPA. Infatti i dati dello studio di biomonitoraggio hanno determinato i livelli di esposizione della popolazione infantile italiana e definito valori di riferimento attraverso i quali poter individuare situazioni di esposizioni elevate. I dati di esposizione saranno inseriti nella banca dati della Commissione Europea e resi disponibili per le attività scientifiche e normative (IPCHEM, [Information Platform for Chemical Monitoring](#)). Gli studi caso controllo indicano che l'esposizione alle sostanze chimiche può essere associata ad alcune patologie infantili, di cui tener conto nella prevenzione e cura, avendo la possibilità di alterare alcuni parametri fisiologici. Gli studi in vivo hanno permesso la definizione di alcuni parametri (NOAEL e LOAEL, quest'ultimo riferito alla dose minima a cui si osservano effetti avversi) per il DEHP e il BPA e alla miscela dei due, distinti per sesso.

I risultati degli studi, resi noti nel [Layman's Report](#) e nel [volume ISTISAN Congressi 18/C3](#), sono stati pubblicati o sono in corso di pubblicazione su riviste *peer-reviewed* (La Rocca et al., Environ Sci Pollut Res. 2018 Sep; 25(25):25618-25625. doi: 10.1007/s11356-018-2660-4; Tassinari et al., Toxicol Sci. 2019 Nov 7. pii: kfz226. doi: 10.1093/toxsci/kfz226).

È inoltre importante evidenziare che LIFE PERSUADED è tra i promotori della rete [LIFE KTE EnvHealth](#) (Knowledge Transfer and Exchange in Environmental and Health) che riunisce i progetti LIFE impegnati nella tematica ambiente e salute con l'obiettivo di definire strumenti e modelli a supporto del processo decisionale basato sull'evidenza scientifica (<http://ocs.biologia.unipi.it/index.php/kte>; Cori et al., Epidemiol Prev. 2018 Mar-Apr;42(2):167-170. doi: 10.19191/EP18.2.P167.046).

LIFE PERSUADED prosegue le attività di comunicazione e diffusione delle metodologie applicate, dei risultati ottenuti e delle ricadute in ambito della valutazione del rischio delle sostanze chimiche come riportato in "[AfterLIFE Communication Plan](#)".



Progetto PERSUADED

Biomonitoraggio di ftalati e bisfenolo A in coppie madre-bambino del territorio italiano: associazione tra esposizione e malattie in età giovanile



Acronimo
PERSUADED

Protocollo
LIFE 13 ENV/IT/000482

Programma di riferimento
LIFE

Beneficiario coordinatore
Istituto Superiore di Sanità

Contatti
Dott.ssa Cinzia La Rocca

Contributo EU
877.658,00

Anno Call
2013

Anno di inizio
2014

Anno di chiusura
2018

Sede del Beneficiario

via Regina Elena 299
00161 Roma RM
Italia

Regione
Lazio

Descrizione Area

Lombardia, Veneto, Friuli Venezia
Giulia, Lazio, Marche, Umbria,
Campania, Calabria, Puglia, Basilicata e
Sicilia