

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PARMA

**Dottorato di Ricerca in Scienze della Prevenzione
Ciclo XXV**

**VALUTAZIONE DEL RISCHIO DI ESPOSIZIONE
FETALE AD AGENTI CANCEROGENI
ED INTERFERENTI ENDOCRINI MEDIANTE
ANALISI DEL LIQUIDO AMNIOTICO**

Coordinatore:
Chiar.mo Prof. Antonio Mutti

Tutor:
Chiar.mo Prof. Sergio Iavicoli

Dottorando:
dott.ssa Giovanna Tranfo

Anno Accademico 2011 - 2012

SOMMARIO

INTRODUZIONE

1. INQUINANTI CONSIDERATI: Benzene
 - a. Proprietà chimico fisiche
 - b. Produzione, usi e sorgenti di esposizione
 - c. Assorbimento, Distribuzione, Metabolismo ed Escrezione
 - d. Tossicità umana
 - e. Quadro legislativo di riferimento

2. INQUINANTI CONSIDERATI: Idrocarburi Policiclici Aromatici (IPA)
 - a. Proprietà chimico fisiche
 - b. Produzione, usi e sorgenti di esposizione
 - c. Assorbimento, Distribuzione, Metabolismo ed Escrezione
 - d. Tossicità umana
 - e. Quadro legislativo di riferimento

3. INQUINANTI CONSIDERATI: Ftalati
 - a. Proprietà chimico fisiche
 - b. Produzione, usi e sorgenti di esposizione
 - c. Assorbimento, Distribuzione, Metabolismo ed Escrezione
 - d. Tossicità umana
 - e. Quadro legislativo di riferimento

PARTE SPERIMENTALE : VALUTAZIONE DEL RISCHIO DI ESPOSIZIONE FETALE AD AGENTI CANCEROGENI ED INTERFERENTI ENDOCRINI MEDIANTE ANALISI DEL LIQUIDO AMNIOTICO

4. DISEGNO SPERIMENTALE

- a. Fase 1
- b. Fase 2

5. SVOLGIMENTO DELLA FASE 1

- a. Campagna di campionamento dei liquidi amniotici
- b. Messa a punto della metodica analitica HPLC/MS/MS per l'analisi dei metaboliti degli ftalati.
- c. Procedimento per l'analisi dei campioni biologici
- d. Risultati ottenuti su 59 campioni di liquido amniotico
- e. Messa a punto della metodica per l'analisi metaboliti dei cancerogeni ambientali
- f. Materiali e metodi
- g. Risultati e discussione

6. SVOLGIMENTO DELLA FASE 2

- a. Reclutamento delle gestanti volontarie
- b. Risultati delle analisi dei metaboliti dei cancerogeni ambientali
- c. Risultati delle analisi dei metaboliti degli ftalati nelle urine e nei liquidi amniotici
- d. Correlazione fra liquidi amniotici e urina materna

7. ANALISI DEI QUESTIONARI

8. CONCLUSIONI

9. BIBLIOGRAFIA

ALLEGATO 1 – CONSENSO INFORMATO E QUESTIONARIO

ALLEGATO 2 - LAVORI PUBBLICATI NEL CORSO DEL DOTTORATO DALLA DOTT.SSA
GIOVANNA TRANFO

RIASSUNTO

L'esposizione umana ad agenti chimici è considerata da tempo un fattore di rischio rilevante per la salute umana; anche i feti sono esposti a questo rischio poichè molecole di piccole/medie dimensioni sono in grado di attraversare la placenta. Fra gli inquinanti ambientali più diffusi sono stati presi in considerazione il benzene e gli idrocarburi policiclici aromatici per la loro mutagenicità, e tre ftalati, sostanze utilizzate dall'industria chimica e interferenti del sistema endocrino. In seguito all'esposizione umana queste sostanze sono metabolizzate ed escrete nell'urina. L'obiettivo di questo studio è determinare una eventuale correlazione fra la concentrazione dei metaboliti delle sostanze considerate nell'urina materna e quella dei liquidi amniotici corrispondenti, per verificare se sia possibile considerare la concentrazione urinaria materna come una misura dell'esposizione fetale.

Per l'analisi quantitativa dei metaboliti è stata utilizzata la tecnica HPLC/MS/MS con diluizione isotopica, analizzando campioni di urina e liquido amniotico di 70 gestanti volontarie. Mentre non sono state riscontrate concentrazioni significative degli indicatori di esposizione ad IPA e benzene, né correlazioni significative fra le concentrazioni dei 5 metaboliti (monoesteri) dei 3 ftalati considerati, nelle due matrici, una elevata percentuale delle gestanti presenta una concentrazione urinaria di monoesteri superiore all'intervallo di confidenza del 95% dei Valori di Riferimento.

Gli ftalati monoesteri sono escreti nell'urina coniugati con acido glucuronico, e perciò viene normalmente effettuata una idrolisi enzimatica prima dell'analisi: poichè nel liquido amniotico sono stati trovati solo in forma libera, su 25 campioni è stata valutata la correlazione con l'urina materna senza idrolisi enzimatica. I risultati indicano che questi metaboliti non attraversano la placenta nella forma coniugata, e che esiste una relazione fra le forme libere per 3 dei 5 metaboliti, da confermare su un maggior numero di campioni per poter considerare l'urina materna una misura dell'esposizione fetale a ftalati.

ABSTRACT

Human exposure to chemicals has been long considered a risk factor for human health; fetuses are also exposed to this risk, as small/medium size molecule can cross the placental barrier. Among the most frequent environmental contaminants, benzene, PAH have been considered for their mutagenic properties, and three phthalates, widely used industrial chemicals which possess endocrine-disrupting properties. Following human exposure, these substances are metabolized and excreted in the urine. The objective of the present experiment is to determine the possible correlation between the metabolites concentrations in maternal urine and in the corresponding amniotic fluid samples in order to verify if maternal urine concentration can be considered as a measure of fetal exposure.

The quantitative determination of the metabolites was carried out by HPLC/MS/MS with isotopic dilution, applied to samples of urine and amniotic fluid from 70 pregnant volunteers. No significant concentration of exposure indicators for benzene and PAH were found, nor significant correlations between the concentrations of the 5 metabolites (monoesters) of the 3 considered phthalates found in the two matrices, while a significant number of mothers showed urine phthalate monoesters concentrations higher than the 95% confidence interval for Reference Values.

Phthalate monoesters are excreted in the urine in the glucuronated form, and therefore an enzymatic hydrolysis is normally carried out before analysis: as only the free forms were found in the amniotic fluids, the correlation was evaluated without hydrolysis on 25 samples.

Results indicate that these metabolites don't cross the placenta in the conjugated form and that a correlation exists between the concentration in maternal urine and amniotic fluids of 3 non hydrolyzed monoesters out of 5, to be confirmed on a larger number of samples in order to consider maternal urine concentration as a measure of fetal exposure to phthalates.

Introduzione

L'esposizione umana ad agenti chimici è considerata da tempo un fattore di rischio rilevante sia per la sanità pubblica che per la salute dei lavoratori, la cui prevenzione si avvale sia di apposita normativa sia di continue verifiche e approfondimenti. E' possibile valutare l'esposizione attraverso il monitoraggio di indicatori di dose e di effetto su tutte le matrici biologiche disponibili, da quelle tradizionali quali il sangue, l'urina e l'aria espirata, a quelle innovative come la saliva, il condensato dell'aria espirata e le matrici cheratiniche come unghie e capelli (1).

L'effettuazione routinaria dell' amniocentesi su donne in gravidanza fra la 14° e la 23° settimana di gestazione, ha reso disponibile una nuova matrice, il liquido amniotico, che permette di studiare l'esposizione prenatale a xenobiotici. Anche i feti sono infatti una popolazione esposta a questo rischio poichè i contaminanti ambientali e i loro metaboliti, in quanto molecole di piccole dimensioni, sono in grado di attraversare la placenta (2). Il liquido amniotico è un pool di urina fetale ricircolante, e pertanto contiene livelli rilevabili degli xenobiotici cui la madre è esposta nonché dei loro metaboliti.

Esiste un numero limitato di lavori scientifici che esplorano questa tematica, tutti successivi al 1999: le sostanze cercate sono interferenti endocrini quali i composti organici clorurati, i fitoestrogeni (3), i Pcb (4, 5), i polifenoli (6), i metaboliti di alcuni ftalati (7, 8, 9, 10,), la nicotina e il suo metabolita cotinina (11), farmaci e droghe . Il numero di campioni analizzati è in media inferiore a 100. I campioni di liquido amniotico sono in genere residui che vengono resi disponibili dopo la nascita del bambino, quindi spesso non è possibile correlare i livelli di xenobiotici riscontrati con quelli materni, e talvolta nemmeno con informazioni personali o demografiche sulle gestanti.

Il presente progetto si propone di valutare i livelli di concentrazione dei metaboliti di inquinanti diffusi, in particolare cancerogeni ed interferenti endocrini, in campioni di liquidi amniotici e di correlarli con quelli riscontrati nelle urine materne, allo scopo di approfondire i meccanismi di esposizione fetale e identificare i comportamenti a rischio nelle gestanti.

Sulla base delle informazioni ottenute sarà possibile realizzare una campagna di sensibilizzazione volta prevenire le conseguenze negative dell'esposizione agli xenobiotici considerati nella fase di sviluppo fetale.

Il progetto si inserisce nelle aree definite prioritarie dal piano Nazionale della prevenzione in particolare nella tutela di soggetti "deboli" come le donne e i neonati, con lo scoraggiamento di comportamenti a rischio, in primis il fumo e altre esposizioni ad agenti chimici causate dallo stile di vita, e nella medicina predittiva, con la prevenzione precoce di malattie congenite causate da esposizione fetale a cancerogeni, e di disturbi dello sviluppo sessuale nei bambini, causate da esposizione fetale a interferenti endocrini.

1. INQUINANTI CONSIDERATI: Benzene

Il **benzene** (Codice CAS 71-43-2, EC Number 200-753-7) è un solvente organico liquido a 20°C and 1013 hPa. La molecola di **benzene** è costituita da 6 atomi di carbonio e 6 atomi di idrogeno e la sua formula chimica è C_6H_6 (figura 1), e la sua massa molecolare è di 78,11 u.m.a. E' il più semplice dei composti organici aromatici, e uno dei composti organici più utilizzati nel mondo. (12, 13).

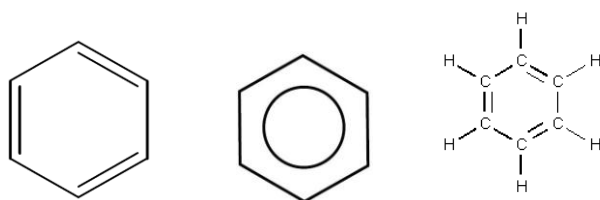


Figura 1: formule di struttura del benzene

a. Proprietà chimico fisiche:

Il benzene è un liquido incolore, di densità 0.879 g/L a 20 °C , che bolle a 80,1 °C e, solidifica a 5,5°C, formando una massa bianca cristallizzata. La sua viscosità è minore di quella dell'acqua. È miscibile nei solventi organici, ma la sua solubilità in acqua è bassissima (1,18 g% a 25°C). E' stabile a temperatura ambiente e cui gli esseri umani possono percepire la sua presenza nell'aria ad una concentrazione di 5 ppm. E' molto infiammabile (auto infiammazione a 555 – 580°C).

b. Produzione, usi e sorgenti di esposizione

Su scala industriale viene prodotto attraverso processi di raffinazione del petrolio e trova impiego principalmente nella chimica come materia prima per numerosi composti secondari, che a loro volta vengono utilizzati per produrre plastiche, resine, detergenti, pesticidi. È un costituente della benzina che, assieme ad altri idrocarburi aromatici (toluene, etilbenzene, xileni, ecc.), ne incrementa il potere antidetonante. Il benzene presente nell'aria deriva quindi da processi evaporativi (emissioni industriali) e di combustione incompleta sia di natura antropica (veicoli a motore), che naturale (incendi). Tra queste, la maggiore fonte emissiva è costituita

dai gas di scarico dei veicoli a motore, alimentati con benzina (principalmente auto e ciclomotori). Il benzene rilasciato dai veicoli, che da solo incide per circa l'80% sul totale, deriva dalla frazione di carburante incombusto, da reazioni di trasformazione di altri idrocarburi e, in parte, anche dall'evaporazione che si verifica durante la preparazione, distribuzione e stoccaggio delle benzine, ivi comprese le fasi di marcia e sosta prolungata dei veicoli.

c. Assorbimento, Distribuzione, Metabolismo ed Escrezione

Il benzene è facilmente assorbito a livello del tratto gastrointestinale, e per inalazione il 50% della dose si ritrova nel sangue e nei tessuti. Se liquido è assorbito per via cutanea per lo 0,2% e sotto forma di vapore per lo 0,05%. La distribuzione avviene di preferenza nei tessuti ricchi in lipidi ed è in grado di attraversare la placenta.

È metabolizzato principalmente nel fegato, ma anche negli altri tessuti dove si deposita, specie nel midollo osseo. La prima reazione, catalizzata dal citocromo P450 (CYP2E1) porta alla formazione dell'epossido, un intermedio estremamente reattivo a partire dal quale, attraverso diverse vie di ossidazione, si formano i metaboliti tossici. Il metabolismo del benzene è riassunto nella figura 2.

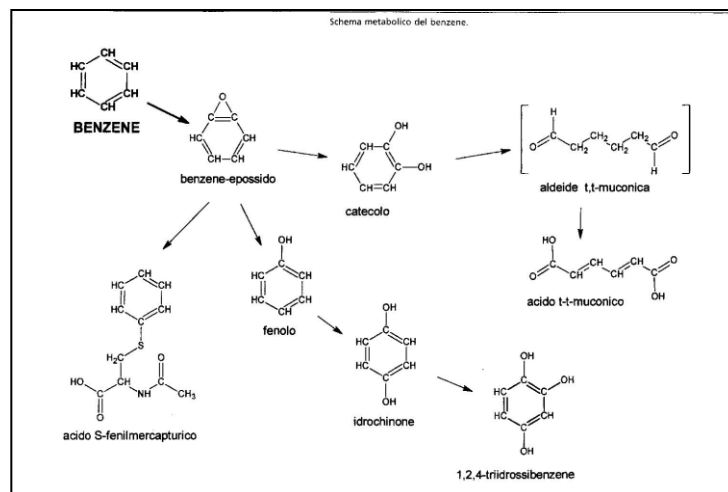


Figura 2. Schema metabolico del benzene

Dopo l'esposizione, il benzene si ritrova dal 10 al 50% della dose assorbita nell'aria espirata e fra il 30 e il 40% sotto forma di metaboliti nelle urine, alcuni dei quali

coniugati con solfato o acido glucuronico. L'1% circa viene escreto immodificato nelle urine. L'eliminazione urinaria si completa fra 24 e 36 ore.

d. Tossicità umana

Per ingestione il benzene mostra la tossicità tipica dei solventi organici, dolori addominali, nausea e vomito, disturbi neurologici, ed una pneumopatia da inalazione; provoca irritazione persistente sulla pelle e sull'occhio. Il suo principale organo bersaglio è il sistema ematopoietico e provoca una diminuzione sia dei globuli bianchi che dei globuli rossi e delle piastrine. Ha effetti genotossici ed induce aberrazioni cromosomiche e micronuclei in vivo sia sulle cellule somatiche che su quelle germinali. E' un cancerogeno sistemico sia per via orale che inalatoria, provocando vari tipi di leucemie: la **IARC** (Agenzia Internazionale per la Ricerca sul Cancro) classifica il benzene come un cancerogeno accertato (classe 1A), a causa dei suoi dimostrati effetti tossici sulle cellule del midollo osseo (Ref. 14).

e. Quadro legislativo di riferimento

Classificazione CE (CLP n. 1272/2008)

Indicazioni di pericolo:

H225 Liquido e vapore facilmente infiammabili.

H350 Può provocare il cancro.

H340 Può provocare alterazioni genetiche.

Regolamento REACH

Sostanza soggetta a restrizioni secondo l'Allegato XVII del regolamento REACH e successivi aggiornamenti.

Secondo la normativa Italiana l'impiego del benzene è sottoposto a limitazioni dal Decreto ministeriale 10 dicembre 1996, n. 707 - Regolamento concernente l'impiego del benzene e suoi omologhi nelle attività lavorative, Pubblicato in *Gazzetta Ufficiale* n. 97 del 28 aprile 1997 che stabilisce che nelle attività lavorative è vietato l'uso di benzene e di sostanze e preparati contenenti benzene in concentrazione pari o superiore allo 0,1% della massa. Il divieto non si applica ai carburanti contemplati dal decreto ministeriale 28 maggio 1988, n. 214 e successive

modificazioni e integrazioni e ad altri casi particolari. La legge n. 413/97 ha stabilito che il contenuto di benzene nelle benzine non deve superare l'1% in volume.

Secondo la Normativa CEE (Rettifica del regolamento REACH n.1907/2006 del Parlamento europeo e del Consiglio, pubblicata sulla Gazzetta ufficiale dell'Unione europea L 396 del 30 dicembre 2006) il benzene non è ammesso:

1. nei giocattoli o parti di giocattoli immessi sul mercato laddove la concentrazione di benzene libero è superiore a 5 mg/kg del peso del giocattolo o di una parte di giocattolo
2. in concentrazioni pari o superiori allo 0.1% della massa in sostanze e preparati immessi sul mercato.

Inoltre è stabilito dal DM 60 del 2/4/2002 pubblicato in Gazzetta Ufficiale n.87 del 13 Aprile 2002 – Supplemento Ordinario n. 77, recepimento della Direttiva Europea 2000/69/CE il valore limite per il benzene all'aperto, nell'aria urbana di 5 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ (valido a partire dal 1/1/2010).

Per quanto riguarda gli ambienti chiusi, l'unica normativa esistente è quella per gli ambienti di lavoro. L'allegato XLIII del D. Lgs. 81/08 prevede che un lavoratore possa essere esposto per 8 ore al giorno, per 5 giorni alla settimana, ad una concentrazione media di benzene di 3,25 mg/m^3 (3250 $\mu\text{g}/\text{m}^3$).

2. INQUINANTI CONSIDERATI: Idrocarburi Policiclici Aromatici (IPA)

Gli idrocarburi policiclici aromatici (IPA) costituiscono un'ampia classe di composti organici, contenenti due o più anelli aromatici fusi, che si formano durante la combustione incompleta e la pirolisi di materiali organici (15).

a. Proprietà chimico fisiche

In condizioni normali gli IPA si presentano tutti allo stato solido. La tensione di vapore di tali composti è generalmente bassa, ed inversamente proporzionale al numero di anelli contenuti. I composti a peso molecolare basso generalmente sublimano a temperatura ambiente. Gli IPA sono poco solubili o

insolubili in acqua; la solubilità diminuisce all'aumentare del loro peso molecolare. Sono altamente lipofili e questa loro caratteristica ne influenza fortemente il bioaccumulo. La struttura molecolare ne determina la stabilità: in genere, a causa delle notevoli repulsioni elettroniche, la struttura lineare è la meno stabile; la conformazione ripiegata possiede invece minore energia e quindi un guadagno di stabilità.

b. Produzione, usi e sorgenti di esposizione

Gli idrocarburi policiclici aromatici si liberano dalle sostanze organiche sottoposte a combustione incompleta. Gli Idrocarburi Policiclici Aromatici sono contenuti nel carbone e nei prodotti petroliferi (particolarmente nel gasolio e negli olii combustibili).

Essi vengono emessi in atmosfera come residui di combustioni incomplete in alcune attività industriali (cokerie, produzione e lavorazione di grafite, trattamento del carbon fossile) e nelle caldaie (soprattutto quelle alimentate con combustibili solidi e liquidi pesanti); inoltre sono presenti nelle emissioni degli autoveicoli (sia diesel che benzina). Sorgenti naturali sono i vulcani e gli incendi boschivi. Gli IPA sono per la maggior parte adsorbiti e trasportati da particelle carboniose (fuliggine) emesse dalle stesse fonti che li hanno originati. La maggior concentrazione di IPA si trova nelle aree urbane attraversate da traffico veicolare intenso, con valori più elevati nei mesi invernali. Il fumo di tabacco è la principale fonte di emissione per quanto riguarda l'inquinamento indoor, che è legato anche al tipo di riscaldamento (caminetti e stufe a legna) e ai procedimenti di cottura usati (brace, affumicatura). L'esposizione agli idrocarburi policiclici aromatici può verificarsi per inalazione, per contatto con materiali contaminati - l'asfalto, il bitume, gli oli pesanti e il carbone sono soltanto alcuni dei materiali che contengono IPA - e per ingestione di cibo o bevande contaminate. Va detto, a questo proposito, che anche alcuni procedimenti di cottura e di conservazione alimentare costituiscono fonte di esposizione agli IPA. Sono implicati tutti quei trattamenti, come l'affumicatura, la grigliatura, la torrefazione e la tostatura, che prevedono la combustione di legno o altro materiale

di origine organica. L'esposizione può inoltre legarsi alla deposizione atmosferica di IPA su ortaggi, frutta o verdura prodotti in terreni agricoli contaminati.

c. Assorbimento, Distribuzione, Metabolismo ed Escrezione

Gli IPA si sciolgono facilmente nei grassi e vengono assorbiti per via polmonare, intestinale e attraverso la pelle. L'assorbimento "tipo" di IPA per un americano medio non fumatore, calcolato per la somma di otto molecole tramite estrapolazioni statistiche, è di 3,12 µg al giorno. Esso avviene per oltre il 96% tramite il cibo per circa l'1,5% dall'aria, lo 0,2% dall'acqua e lo 0,4% dal suolo.

d. Tossicità umana

Il rischio legato agli idrocarburi policiclici aromatici risulta di difficile valutazione in virtù del fatto che questi composti sono sempre presenti in miscele di composizione variabile. Per quanto riguarda le conseguenze sulla salute, mentre non sono stati rilevati casi di effetti tossicologici acuti, un numero considerevole di Idrocarburi Policiclici Aromatici presentano attività cancerogena, sia in esperimenti di laboratorio che tramite indagini epidemiologiche.

La IARC (14) ha recentemente inserito il benzo(a)pirene nella classe 1° (cancerogeni accertati) e altri IPA con 4-6 anelli condensati nelle classi 2A o 2B (possibili o probabili cancerogeni per l'uomo) per gli effetti dimostrati, come riportato nella tabella 1.

Tabella 1: IPA classificati dalla IARC (2010)

Composto	Classe IARC
Benzo(a)pyrene	1
Cyclopenta[cd]pyrene	2A
Dibenz[a,h]anthracene	2A
Dibenzo[a,l]pyrene	2A
benz[a]anthracene	2B
5-methylchrysene	2B
benz[j]aceanthrylene	2B
benzo[b]fluoranthene	2B
benzo[j]fluoranthene	2B
benzo[k]fluoranthene	2B
benzo[c]phenanthrene	2B
Chrysene	2B
dibenzo[a,h]pyrene	2B
indeno[1,2,3-cd]pyrene	2B
Tutti gli altri IPA	3

e. Quadro legislativo di riferimento

Gli IPA rientrano tra gli inquinanti da considerare nel quadro della valutazione e della gestione della qualità dell'aria. A tal riguardo il Decreto Ministeriale del 25/11/1994 fissa come obiettivo di qualità per gli IPA il valore giornaliero medio annuale di $1\text{ng}/\text{m}^3$ in riferimento al benzo(a)pirene. La direttiva 2004/107/CE del parlamento europeo e del consiglio del 15 dicembre 2004 concernente l'arsenico, il cadmio, il mercurio, il nickel e gli idrocarburi policiclici aromatici nell'aria ambiente, recepita in Italia con il D.Lgs. n. 152/2007, afferma che il benzo(a)-pirene dovrebbe essere usato come marker per il rischio cancerogeno degli idrocarburi policiclici aromatici nell'aria ambiente, e stabilisce come valore obiettivo $1\text{ng}/\text{m}^3$ per il tenore totale della frazione PM10 calcolata in media su un anno di calendario. La stessa

direttiva prevede inoltre il monitoraggio di altri idrocarburi policiclici aromatici quali: benzo(a)antracene, benzo(b)fluorantene, benzo(j)fluorantene, benzo(k)fluorantene, indeno(1,2,3-cd)pirene e dibenzo(a,h)antracene.

Gli IPA sono tra gli inquinanti presi in considerazione per limitare la circolazione nei centri urbani. Sono inoltre previsti valori limite di emissione in atmosfera per gli impianti di incenerimento dei rifiuti pericolosi nonché per il contenuto nei combustibili diesel. Per quanto riguarda gli ambienti di lavoro, il D.Lgs 81/08 considera "cancerogeni" le attività che espongono i lavoratori agli idrocarburi policiclici aromatici (IPA) contenuti nel catrame, nella pece, nel fumo o nelle polveri di carbone e alla fuliggine delle canne fumarie.

3. INQUINANTI CONSIDERATI: Ftalati

Gli ftalati sono i diesteri dell'acido ftalico (fig. 3) e rappresentano una ampia ed importante classe di sostanze largamente usate come plasticizzanti nei polimeri sintetici ed additivi in molti prodotti di uso comune, dai detergenti ai prodotti per l'igiene della casa e personali.

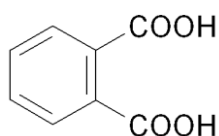


Figura 3: acido ftalico

a. Proprietà chimico fisiche

Gli ftalati sono per lo più liquidi poco volatili, generalmente incolori e inodori, e sono facilmente biodegradabili. Le proprietà chimico fisiche variano in funzione delle dimensioni della molecola, cioè degli alcoli con cui l'acido ftalico è esterificato. La loro solubilità in acqua è bassa e decresce all'aumentare della lunghezza delle catene alcoliche o del peso molecolare. I più importanti sono riassunti nella tabella 2:

Tabella2: ftalati più diffusi e loro abbreviazione

Denominazione chimica	Abbreviazione
di (2-etilexil) ftalato	DEHP
dibutilftalato	DBP
diisonilftalato	DINP
dietilftalato	DEP
di (2-metoxietil) ftalato	DMEP
diisodecilftalato	DIDP
di-n-pentilftalato	DnPP
di-n-octilftalato	DNOP
diisopentilftalato	DiPP
butilbenzilftalato	BBP

b. Produzione, usi e sorgenti di esposizione

Gli ftalati vengono ottenuti per esterificazione tra l'anidride ftalica e un alcol opportuno, generalmente compreso tra i 6 ed i 13 atomi di carbonio. Gli ftalati sono una famiglia di composti chimici usati nell'industria delle materie plastiche come agenti plastificanti, ovvero come sostanze aggiunte al polimero per migliorarne la flessibilità e la modellabilità. Il PVC è la principale materia plastica (in termini di volume di produzione) in cui vengono impiegati. Ftalati di alcoli leggeri (dimetilftalato, dietilftalato) sono usati come solventi nei profumi e nei pesticidi. Gli ftalati trovano inoltre uso frequente nella preparazione di smalti per unghie, adesivi, vernici e cibi. Queste sostanze non sono legate chimicamente al materiale plastico, ma al contatto con liquidi o grassi si sciolgono o evaporano nell'aria. Le possibili fonti di esposizione sono generi alimentari, materiale di confezionamento, acqua potabile e oggetti d'uso (p.es. guanti in PVC, giocattoli), esalazioni provenienti dal pavimento o dal mobilio interno foderato con materiale plastico. Il DEHP e il DINP contaminano gli alimenti durante il trattamento, il confezionamento e

l'immagazzinamento. Gli ftalati DEB e DBP possono essere assorbiti se utilizzati per il confezionamento di medicinali. Inoltre, il DBP può essere assunto dal corpo mediante la respirazione e il contatto con la pelle, nell'utilizzo di prodotti cosmetici (16).

c. Assorbimento, Distribuzione, Metabolismo ed Escrezione

Gli ftalati vengono assorbiti rapidamente sia per inalazione che per contatto cutaneo e distribuiti a tutti i tessuti del corpo. L'emivita di queste sostanze chimiche è breve: essi vengono metabolizzati a monoesteri (fase 1) e successivamente ossidati o idrossilati o coniugati con acido glucuronico (fase 2) per essere rapidamente escreti nelle urine (17).

d. Tossicità umana

Gli ftalati si sono dimostrati essere sostanze mutagene e sospette cancerogene (18), classificate come interferenti endocrini, cioè dannose per il ciclo riproduttivo umano (19). I più utilizzati, dietilftalato e di-n-butilftalato non sono tossici dopo esposizione acuta, ma sono deboli agenti cancerogeni negli animali. Gli effetti avversi includono dermatite allergica da contatto (dietil ftalato e di-n-butil ftalato) e danno epatico (di-n-ottilftalato). Il Dimetil ftalato è un irritante.

e. Quadro legislativo di riferimento

La Comunità Europea ha adottato una decisione che vieta l'immissione sul mercato di giocattoli e articoli di puericultura destinati ad essere messi in bocca da bambini d'età inferiore a tre anni e fabbricati in PVC morbido contenenti una o più sostanze con ftalati (Direttiva 79/769/CEE).

4. DISEGNO SPERIMENTALE

Il progetto si articola in due fasi operative.

a. Fase 1:

Analisi di campioni di liquidi amniotici (L.A.) residui, già disponibili (50 - 100) allo scopo di implementare e validare le metodiche analitiche e valutare in quale range di concentrazioni si collocano i livelli di contaminazione.

Sui L.A. sono state effettuate determinazioni quantitative dei seguenti metaboliti di sostanze cancerogene:

- 1-idrossipirene, metabolita urinario del pirene, utilizzato come indicatore di esposizione ad IPA.
- Acido t,t-muconico e acido S-fenilmercapturico, indicatori di esposizione a benzene
- Cotinina urinaria, metabolita della nicotina, parametro dimostratosi efficace nella distinzione tra soggetti fumatori o esposti a fumo passivo e non.

Per la determinazione quantitativa di questi quattro metaboliti si utilizza la cromatografia liquida ad alta prestazione (HPLC) accoppiata con un rivelatore a spettrometria di massa tandem (MS/MS) mediante la tecnica della diluizione isotopica, e un primo obiettivo è stato lo studio di fattibilità e la messa a punto di una nuova metodica analitica che ne consenta l'analisi simultanea.

Per quanto riguarda invece le sostanze in grado di interagire con il sistema endocrino, vengono determinati simultaneamente, con una analoga metodica analitica, i principali metaboliti monoesteri degli ftalati: per il di-etil-esilftalato (DEHP) il mono (2etilesil)ftalato (MEHP) e il mono(2etil-5idrossiesil)ftalato (MEHHP), per il dietilftalato (DEP) il monoetilftalato (MEP), per l'n-butyl-ftalato(DnBP) il monobutylftalato (MnBP) e per il butil-benzilftalato (BBzP) il monobenzilftalato (MBzP).

b. Fase 2:

Nella seconda fase, previo accordo con una struttura sanitaria presso la quale vengano effettuate le amniocentesi di routine, si è proceduto al reclutamento di almeno 100 gestanti volontarie, che previo consenso informato hanno fornito un campione di urina prelevato al momento dell'amniocentesi e compilato un questionario appositamente realizzato. I risultati delle analisi effettuate sul L.A. e sulle urine sono stati correlati fra loro e con le informazioni del questionario. E' stato inoltre richiesto di ottenere ulteriori informazioni al termine della gravidanza, riguardanti il sesso e lo stato di salute del neonato (follow-up).

E' stato quindi necessario:

1. Intervistare le gestanti mediante un questionario che raccolga dati personali correlabili con i livelli espositivi (occupazione, fumo, zona di residenza, alimentazione ecc.)
2. Prelevare contestualmente all'amniocentesi campioni di urina delle gestanti.
3. Analizzare i campioni di urina e L.A. analogamente alla fase 1.
4. Correlare i risultati delle analisi effettuate sul L.A. e sulle urine fra loro e con le informazioni del questionario.
5. Elaborare i risultati ottenuti e divulgarli tramite rapporti specifici, partecipazione a convegni e pubblicazioni scientifiche.

Successivi sviluppi del progetto prevedono la realizzazione di una campagna informativa sui risultati allo scopo di sensibilizzare le gestanti alla riduzione di comportamenti a rischio con particolare riferimento alle fonti degli inquinanti più frequentemente riscontrati e la raccolta di informazioni sullo stato di salute del bambino alla nascita e sul suo sviluppo (da chi ne abbia fornito il consenso) per un follow up.

5. SVOLGIMENTO DELLA FASE 1

a. Campagna di campionamento dei liquidi amniotici

La prima fase del progetto è stata avviata con l'analisi di 59 campioni di liquido amniotico prelevato durante l'amniocentesi di pazienti anonime presso Centro per

la Tutela della Salute della Donna e del Bambino "S. Anna" dell'azienda USL Roma A. Il prelievo viene effettuato generalmente alla 16 -17 settimana di gestazione: vengono prelevati 20 ml di liquido che vengono sottoposti a centrifugazione alla velocità di 1500 g/min. Il sovrantante non-cellulare viene decantato e immediatamente congelato a -25 °C e conservato fino alla nascita del bambino, dopo la quale sono è reso disponibile per la sperimentazione. Su questi campioni è stata determinata la concentrazione dei principali metaboliti monoesteri degli ftalati seguenti: per il di-etil-esilftalato (DEHP) il mono (2-etilesil)ftalato (MEHP) e il mono(2-etil-5idrossiesil)ftalato (MEHHP), per il dietilftalato (DEP) il monoetilftalato (MEP), per il dietilftalato (DEP) il monoetilftalato (MEP), per l'n-butyl-ftalato(DnBP) il monobutilftalato (MnBP) e per il butil-benzilftalato (BBzP) il monobenzilftalato (MBzP) (Figura 4).

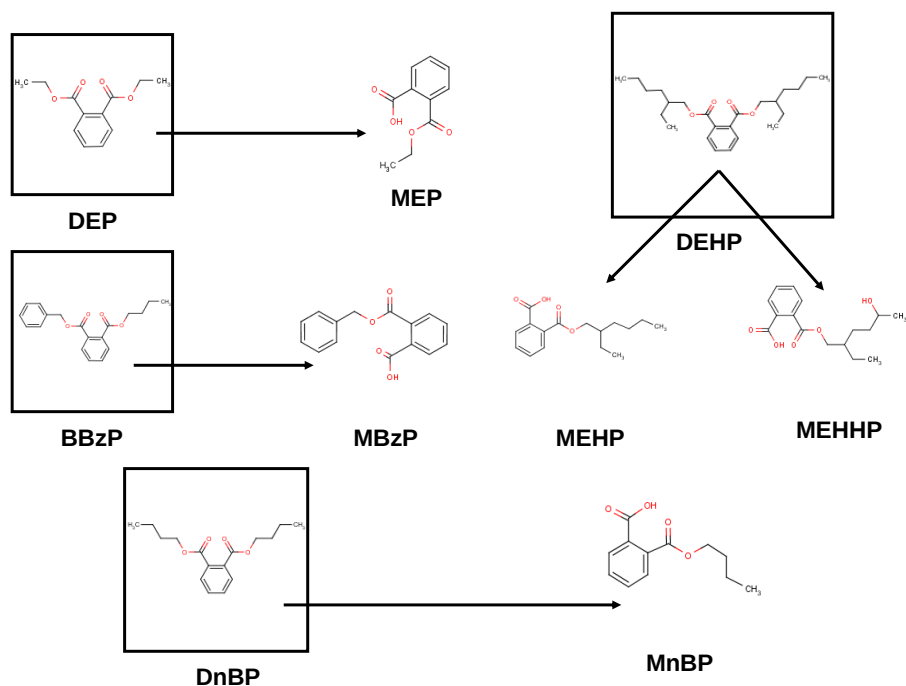


Figura 4: Formule di struttura dei dietilftalati e metaboliti monoesteri corrispondenti

b. Messa a punto della metodica analitica HPLC/MS/MS per l'analisi dei metaboliti degli ftalati.

Per la determinazione dei questi cinque metaboliti sopra indicati è stata messa a punto una metodica analitica che utilizza l'HPLC con rivelazione a spettrometria di massa con triplo quadrupolo (API 4000, Applied Biosystem) con il metodo della diluizione isotopica, un metodo che utilizza un analogo dell' analita marcato con un isotopo come standard interno. Per l'analisi quantitativa dei cinque metaboliti sono stati utilizzati come standard interni i composti marcati ^{13}C -4 Mono-etilftalato(MEP- ^{13}C) per l'analisi dell'analogo nativo ed il ^{13}C -4 Mono-benzilftalato per i rimanenti quattro picchi (MBzP- ^{13}C); le transizioni monitorate in modalità negativa con sorgente Turbo Ion Spray sono riportate in tabella 3.

Tabella 3: transizioni ioniche padre-figlio monitorate per ciascun metabolita

MEP	m/z	-193.2	→	m/z	-120.9
MEHP	m/z	-277.2	→	m/z	-134.1
MEHHP	m/z	-293	→	m/z	-120.9
MBzP	m/z	-255	→	m/z	-183
MnBP	m/z	-221.1	→	m/z	-120.9
MEP- ^{13}C	m/z	-195.2 →	→	m/z	-122.9
MBzP- ^{13}C	m/z	-257.0 →	→	m/z	-185.0

La separazione è stata effettuata con un sistema HPLC Perkin-Elmer serie 200, con colonna in fase inversa Sinergi Polar da 150 x 4.6 mm, particle size 4 μm (Chemtek Analitica, Anzola, Bologna). La fase mobile era costituita da un gradiente di acetonitrile (Fase A) ed acido acetico allo 0,5% v/v in acqua (Fase B): 1 minuto di equilibratura con 30% di A e 70 % di B, 1 minuto isocratico 30% A e 70 % B, un gradiente lineare fino a 90% di A e 10% di B in 7 minuti, ritorno alle condizioni iniziali con gradiente lineare in 2 minuti, flusso 1 mL/min, tempo totale di analisi 10 minuti. I tempi di ritenzione sono in ordine di uscita 4,6 min per il MEP, 5,4 min per il MEHHP, 5,85 min per il MnBP, 6,1 min per il MBzP e 7,25 min per il MEHP (figura 5).

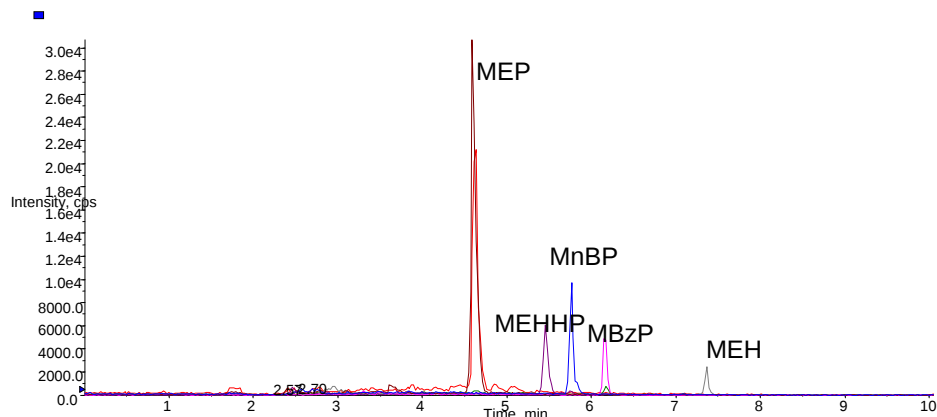


Figura 5: Cromatogramma tipo di un campione di urina, che evidenzia la presenza di tutti e 5 i metaboliti considerati.

La tabella 3 confronta i limiti di rivelabilità (LOD) e di quantificazione (LOQ) raggiunti nelle due diverse matrici liquido amniotico ed urina. I risultati indicano che nel liquido amniotico si ha un maggiore rapporto segnale/rumore in quanto si tratta di una matrice meno complessa dell'urina materna, e conseguentemente una maggiore sensibilità strumentale.

Tabella 3: limiti di rivelabilità e di quantificazione dei cinque metaboliti in liquido amniotico e in urina.

Matrice metabolita	Liquido amniotico		Urina	
	LOD	LOQ	LOD	LOQ
	µg/L	µg/L	µg/L	µg/L
MnBP	0.40	0.80	0.80	2.50
MEP	0.05	0.10	3.00	8.00
MBzP	0.05	0.10	1.20	4.30
MEHP	0.07	0.25	0.15	0.45
MEHHP	0.02	0.07	0.05	0.50

c. Procedimento per l'analisi dei campioni biologici

I campioni di urina o di liquido amniotico vengono purificati mediante SPE con cartucce OASIS HBL 6 cc (200 mg), previa idrolisi dei metaboliti glucuronidati con incubazione a 37°C per 2 ore in presenza di enzima β -glucuronidasi da E.coli; sono

acidificati con acido acetico al 2% v/v in acqua e addizionati con gli standard interni. Le cartucce pretrattate con alcol metilico e poi con acido acetico allo 0,5% v/v in acqua, sono eluite con acetonitrile. L'eluato, filtrato su membrana inorganica Anotop 10 I.C. da 0,2 μm , è iniettato nel sistema HPLC. Le concentrazioni vengono determinate usando una curva di calibrazione ottenuta mediante analisi di soluzioni standard dei composti puri e degli standard interni in acetonitrile in un range di concentrazioni da 1 a 50 $\mu\text{g/L}$ per i liquidi amniotici e da 10 a 500 $\mu\text{g/L}$ per le urine.

d. Risultati ottenuti su 59 campioni di liquido amniotico

Il metodo analitico utilizzato, che ottimizza quelli descritti in letteratura risulta semplice e rapido: infatti il tempo di analisi è di 10 minuti, e tutta la procedura, compresa l'idrolisi e la preparazione del campione, è stata completata in meno di 4 ore. La distribuzione della concentrazione dei cinque metaboliti determinati dopo idrolisi enzimatica con glucuronidasi nei 59 campioni è riportata nella tabella 4.

Tabella 4: Distribuzione della concentrazione di ftalati monoesteri (ng/ml) in 59 campioni di liquido amniotico sovranatante.

	MnBP	MEP	MBzP	MEHP	MEHHP
Min	<0.40	<0.30	<0.10	<0.07	<0.02
Max	13.33	3.21	0.48	6.75	0.15
Percentili					
10	1.01	<0.30	<0.10	0.47	<0.02
25	1.37	<0.30	0.08	0.56	<0.02
50	1.75	<0.30	0.19	0.72	0.02
75	3.03	0.86	0.33	1.02	0.03
90	5.18	1.86	0.41	1.51	0.05
95	6.16	2.25	0.45	2.23	0.09

Quasi tutti i campioni di liquido amniotico analizzati contengono concentrazioni misurabili dei metaboliti monoesteri degli ftalati considerati, anche se notevolmente inferiori ai valori riscontrati nell'urina umana (20).

La tabella 5 confronta i valori medi ottenuti sui 59 campioni analizzati effettuando l'idrolisi enzimatica con glucuronidasi secondo la metodica validata, e analizzati invece senza effettuare l'idrolisi, allo scopo di verificare la percentuale libera di ciascun metabolita presente nel liquido amniotico.

La conoscenza di questa informazione permetterà nella seconda fase del progetto, nel confronto con l'analisi delle urine materne prelevate nello stesso giorno dell'amniocentesi, di fare delle ipotesi sulla trasmissione attraverso la placenta e sull'eventuale metabolismo fetale per queste sostanze.

Tabella 5 - Valori medi della concentrazione di ftalati monoesteri con e senza idrolisi

Metabolita	dopo idrolisi	n. dati maggiori del LOD	senza idrolisi	% libera	n.datì validi per calcolo della %
	µg/L		µg/L		
MnBP	2.68	58	2.41	97.89	49
MEP	0.56	30	0.49	77.92	24
MBzP	0.20	49	0.07	25.72	40
MEHP	1.02	58	0.85	106.66	49
MEHHP	0.02	36	0.02	105.75	32

Come si può dedurre dai risultati, i livelli di MnBP, MEHP e MEHHP nel liquido amniotico non aumentano significativamente con l'idrolisi enzimatica, quindi sono presenti solo nella forma libera. Si può ipotizzare quindi che i metaboliti non passino attraverso la placenta in forma coniugata nè vengano coniugati dal metabolismo placentare.

Da questi risultati preliminari sembrerebbe che solo due dei metaboliti determinati (MEP e MBzP) fossero presenti in una percentuale significativa nella forma coniugata. Il dato relativo al MEP è però inficiato dal basso numero di dati utilizzabili per il calcolo della percentuale, che dipende a sua volta dal numero di valori maggiori di zero. MBzP è presente in forma legata in una percentuale di circa il 75%, facendo ipotizzare un passaggio attraverso la barriera placentare in forma coniugata o una coniugazione con acido glucuronico da parte del metabolismo placentare. Una ulteriore possibile ipotesi è che gli ftalati attraversino la barriera placentare come diesteri e vengano idrolizzati a monoesteri dal metabolismo fetale.

Nella tabella 6 sono riportati i valori medi della concentrazione di ftalati monoesteri ottenuta sia con che senza idrolisi enzimatica, stratificati secondo il genere del feto, identificato con l'amniocentesi:

Tabella 6 - Valori Medi stratificati per genere

Metabolita	FEMMINE n=38					MASCHI n=21				
	dopo idrolisi	n. dati >LOD	senza idrolisi	% libera	n.dati validi per calcolo della %	dopo idrolisi	n. dati >LOD	senza idrolisi	% libera	n.dati validi per calcolo della %
	µg/L		µg/L			µg/L		µg/L		
MnBP	2.52	37	2.19	100.92	31	2.96	21	2.80	92.65	18
MEP	0.562	20	0.45	94.03	15	0.562	9	0.55	51.08	9
MBzP	0.21	31	0.08	27.65	26	0.20	17	0.05	22.13	14
MEHP	1.14	38	0.89	108.69	31	0.80	21	0.80	103.16	18
MEHHP	0.03	25	0.03	112.86	21	0.01	11	0.01	92.18	11

I dati (sia prima che dopo l'idrolisi enzimatica) non si distribuiscono normalmente (test di Shapiro-Wilk $p < 0.05$). Per verificare differenze tra maschi e femmine è stato quindi usato il test non parametrico di Mann-Whitney che non mostra differenze significative ($p > 0.05$) nei valori medi dei metaboliti fra il gruppo dei feti maschi e quello dei feti femmine. E' confermato per entrambi i generi dei feti che il

metabolita del butil-benzilftalato, MBzP, si presenta per meno del 30% in forma libera ed aumenta significativamente con l'idrolisi enzimatica.

e. Messa a punto dell'analisi dei metaboliti dei cancerogeni ambientali

Per quanto riguarda l'analisi dei metaboliti degli inquinanti cancerogeni (IPA e benzene) è stato messo a punto un metodo analitico mediante HPLC/MS/MS con diluizione isotopica per l'analisi simultanea dell'1-idrossipirene (1-OHPy) indicatore di esposizione ad IPA (figura 6), dei metaboliti del benzene acido S-fenilmercapturico (SPMA) e acido trans,trans-muconico (t,t-MA) (figura 7), e della cotinina, metabolita di eliminazione della nicotina (figura 8), indicatore di esposizione al fumo di sigaretta attivo e passivo, presenti in fluidi biologici quali urina e liquido amniotico.

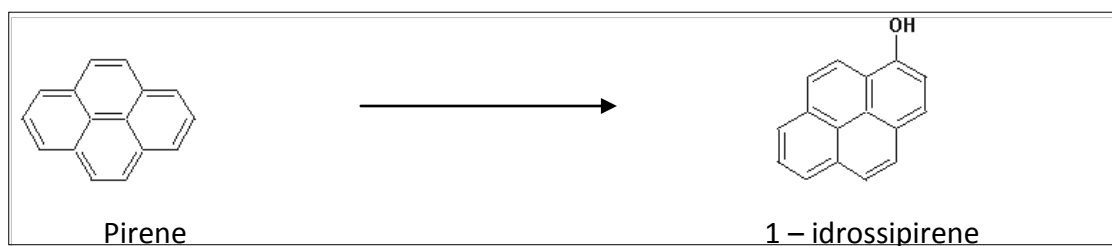


Figura 6: formule di struttura del pirene e del suo metabolita urinario

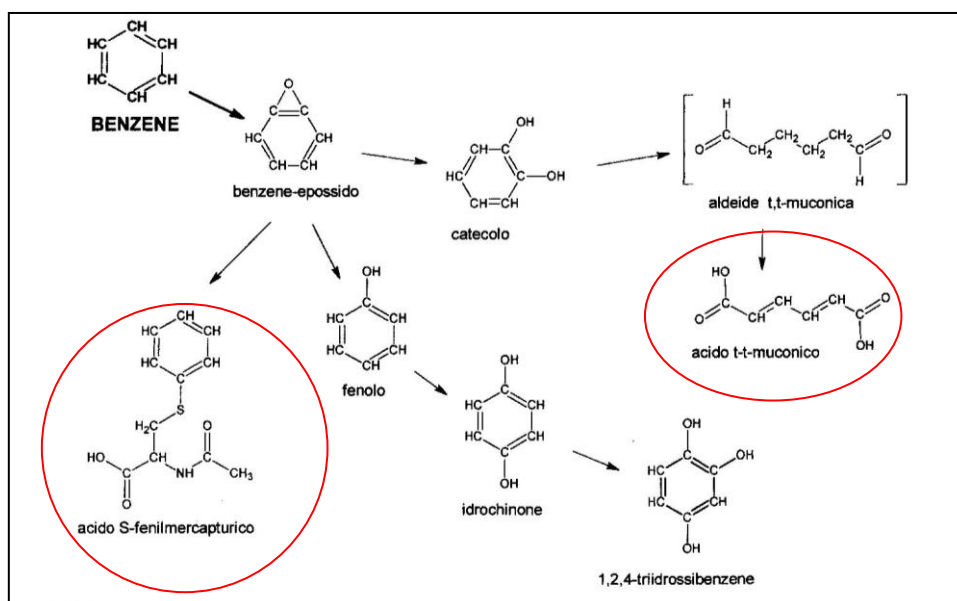


Figura 7: formazione metabolica di SPMA e ttMA dal benzene

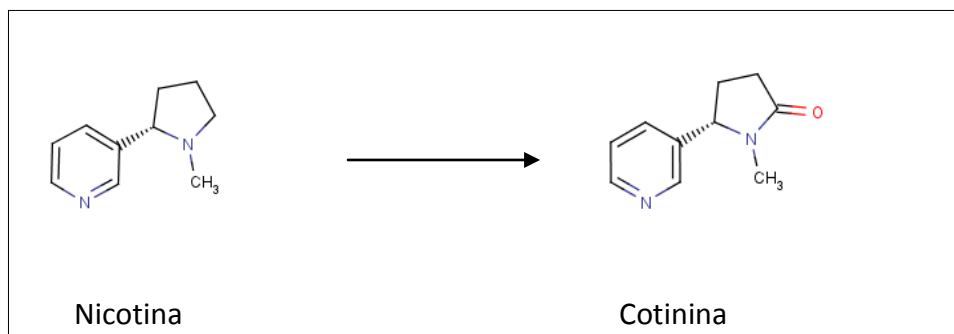


Figura 8: formula di struttura della nicotina e del suo metabolita urinario cotinina.

f. Materiali e metodi

5 ml di urina, conservata congelata a -25°C dal momento del prelievo, sono acidificati a pH 5 con acido cloridrico 6N ed incubati per 16 ore a 38 °C con 25 µl di enzima β-glucuronidasi-arilsolfatasi da Elix Pomatia (Roche Diagnostics), allo scopo di idrolizzare l'1-OHPy legato all'acido glucuronico; vengono quindi aggiunti gli standard interni deuterati, Cotinina-D3, t,t-MA-D4, SPMA-D2, 1-OHPy-D9 (CDN Isotopes), ed il campione è ulteriormente acidificato a pH 2 mediante aggiunta di HCl 6N (circa 50 µl). Per la successiva purificazione del campione sono utilizzate cartucce per estrazione in fase solida (SPE) Sep-pak C18, 360 mg (Waters), condizionate con 3 ml di metanolo e 3 ml di acido acetico al 2% v/v in acqua con la seguente procedura: dopo caricamento del campione la colonnina viene lavata con 3 ml di acido acetico al 2% v/v in acqua, e l'eluato complessivo ottenuto dal caricamento e dal lavaggio viene portato a pH 8 mediante aggiunta di ammoniaca 30% v/v. Le cartucce vengono quindi eluite con 1,5 ml di metanolo ed a seguire con 1 ml di etile acetato, ottenendo l'eluato "A", contenente i metaboliti acidi, ovvero SPMA, t,t-MA e 1-OHPy; la precedente aliquota di eluato alcalinizzato a pH 8 viene ricaricata sulla cartuccia, precedentemente ricondizionata con 3 ml di metanolo e 3 ml di acqua; segue un lavaggio con 3 ml di acqua e infine l'eluizione con 2,5 ml di metanolo, ottenendo l'eluato B, contenente la cotinina. I due eluati sono miscelati, ottenendo circa 5 ml di campione. Dopo filtrazione su microfiltri a membrana inorganica Anotop 10 I.C. da 0.2 µm, il campione viene quindi analizzato mediante

un HPLC Perkin Elmer series 200, accoppiato ad un rivelatore MS/MS API-4000 (Applied Biosystem) con sorgente Turbo Ion Spray. L'analisi mediante HPLC è stata effettuata utilizzando una colonna Synergi Fusion-RP 80A, 150 x 4.6 mm (Phenomenex) mediante un gradiente di acetonitrile (fase A) e acido acetico 1% v/v in acqua (fase B) come segue: 2 min di equilibratura con 10% di A e 90% di B, quindi 12 min a gradiente lineare fino a 100% di A; a seguire 2 min di isocratica, e ritorno con gradiente lineare alle condizioni iniziali in 2 min. La colonna è stata termostata a 40°C. Il flusso è stato mantenuto a 600 $\mu\text{l min}^{-1}$ per i primi 12 min, portato a 1000 $\mu\text{l min}^{-1}$ per i successivi 2 min, quindi riportato a 600 $\mu\text{l min}^{-1}$. Il volume iniettato è stato di 20 μl . Le transizioni ioniche monitorate sono state: +177.3/80.1 per la cotinina, (+180.3/80.1 per la cotinina D3); -141/97 per il t,t-MA (-145/100.0 per il t,t-MA D4); -238.1/109 per l'SPMA (-240.1/109.1 per l'SPMA D2); -217.1/189.0 per l'1-OHPy (-226.0/198.1 per l'1-OHPyD9); l'analisi MS/MS è costituita da 2 periodi, il primo di 4 min in modalità positiva per l'analisi della cotinina, il secondo di 12 min in modalità negativa per l'analisi degli altri metaboliti, con tempo totale di 16 min.

g. Risultati e discussione

L'acido S-fenilmercapturico è presente nelle urine in parte sotto forma del suo precursore (pre-SPMA), in percentuale dipendente dal pH dell'urina stessa; l'acidificazione consente di idrolizzare tale precursore trasformandolo in SPMA ed uniformando i valori analitici ottenuti, altrimenti dipendenti dal diverso pH di ogni urina. Il metodo di determinazione del solo SPMA prevede una idrolisi con acido solforico 9M (21) che non può essere utilizzata in questo metodo, poiché determinerebbe la rapida degradazione del t,t-MA; il pH 2 si è dimostrato invece un valido compromesso fra l'esigenza di uniformare i risultati ottenuti per l'SPMA ed effettuarne la misura insieme al t,t-MA (22).

Parte essenziale di questo metodo è la fase preliminare di purificazione mediante SPE, che permette di concentrare i metaboliti da analizzare, eliminando nel contempo la maggior parte delle sostanze interferenti. La separazione preliminare

mediante SPE si basa sulle diverse caratteristiche acido-base delle molecole: operando ad un pH adatto è possibile trattenere sulla cartuccia, avente caratteristiche lipofile, la molecola indissociata (cioè nella forma meno polare); quindi si utilizza nella prima fase un ambiente acido per trattenere e poi eluire le molecole acide (SPMA, t,t-MA e, 1-OHPy). Alcalinizzando l'eluato del primo caricamento contenente la cotinina, che ha caratteristiche basiche, è possibile nella seconda fase trattenerla sulla cartuccia e poi mediante un solvente organico in grado di desorbire la molecola, eluirla. Le due frazioni vengono poi riunite per permettere l'analisi cromatografica in simultanea.

Nella figura 9 è mostrato il cromatogramma relativo ad un campione di urina arricchito con standard puri dei metaboliti in esame, in concentrazioni riscontrabili in un soggetto fumatore: cotinina $500 \mu\text{g l}^{-1}$, t,t-MA $100 \mu\text{g l}^{-1}$, SPMA $5 \mu\text{g l}^{-1}$, 1-OHPy $1 \mu\text{g l}^{-1}$; il campione arricchito è stato sottoposto al procedimento di purificazione SPE ed è stato analizzato secondo il metodo sopra riportato.

I picchi di eluizione risultano ben risolti e separati dai pochi interferenti ancora presenti nel campione purificato: i tempi di ritenzione sono per la cotinina 3,15 minuti, per l'acido trans,trans-muconico 5,59 minuti, per l'acido S-fenilmercapturico 8,23 minuti, ed per l'1-OHPy 12,40 minuti. La notevole differenza di intensità evidente fra i picchi relativi ai 4 metaboliti è dovuta alle differenze di concentrazione dei metaboliti aggiunti, che rispecchia quella attesa nei campioni reali, dove ad esempio la cotinina arriva a mostrare una concentrazione oltre 2 ordini di grandezza maggiore di quella dell'1-OHPy, in soggetti fumatori.

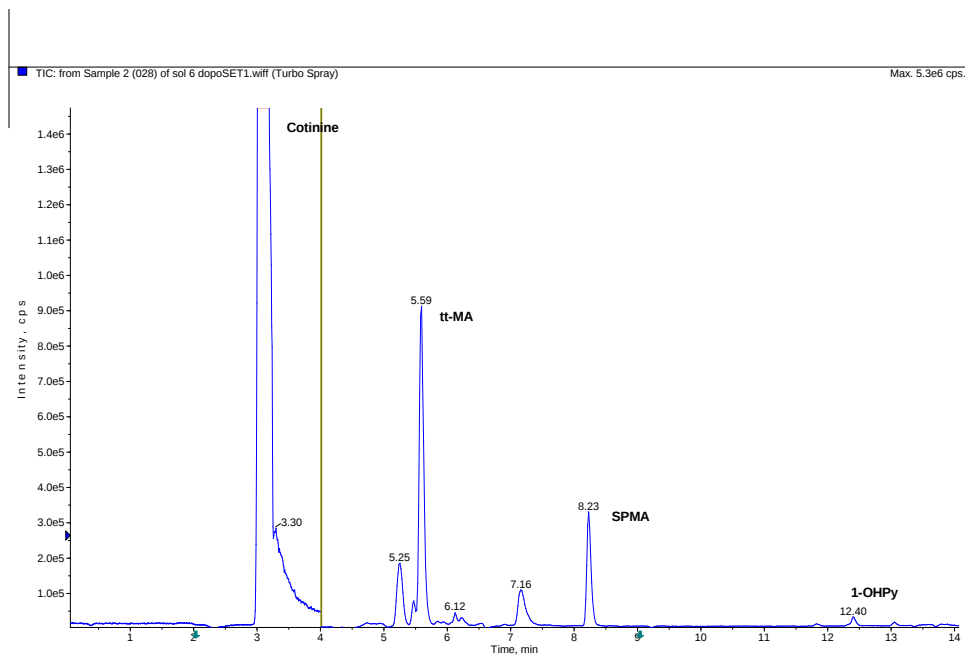


Figura 9: Cromatogramma di un campione di urina arricchito con tutti e 4 i metaboliti considerati.

Il metodo è stato utilizzato per l'analisi di circa 50 campioni di liquido amniotico prelevato durante l'amniocentesi di pazienti anonime.

Tutti i metaboliti cercati sono risultati assenti nei campioni di liquido amniotico (o presenti in concentrazioni inferiori al LOD).

6. SVOLGIMENTO DELLA FASE 2

a. Reclutamento delle gestanti volontarie

Alle gestanti che si rivolgono al Centro per la Tutela della Salute della Donna e del Bambino "S. Anna" dell'azienda USL Roma A, una struttura sanitaria del S.S.N. presso la quale vengano effettuate le amniocentesi di routine, è stato proposto, a partire dal mese di Ottobre 2010, di partecipare alla ricerca.

Alle volontarie è stata sottoposta una richiesta di consenso informato e un questionario appositamente elaborato (Allegato 1) nel corso della consulenza preliminare al prelievo, ed inoltre è stato consegnato loro il contenitore per il campione di urina, da portare nel giorno previsto per il prelievo del liquido amniotico.

Nel corso di due anni, sono state 70 le gestanti volontarie che hanno dato il loro consenso a partecipare al progetto. I risultati delle analisi effettuate sul L.A. e sulle urine sono stati correlati fra loro e con le informazioni del questionario. Nel questionario viene inoltre richiesta alle volontarie l'eventuale disponibilità a fornire ulteriori informazioni al termine della gravidanza, riguardanti il sesso e lo stato di salute del neonato (follow-up) indicando un indirizzo e-mail dove essere contattate.

b. Risultati delle analisi dei metaboliti dei cancerogeni ambientali

I campioni di liquido amniotico delle volontarie contengono concentrazioni dei metaboliti dei cancerogeni ambientali IPA e benzene inferiori al LOD del metodo utilizzato, indicando una esposizione fetale da sorgenti ambientali non significativa. Questo ha ovviamente reso non praticabile lo studio delle eventuali correlazioni con le concentrazioni presenti nell'urina materna. Inoltre, benché dati di letteratura riportino la possibile presenza della cotinina nel liquido amniotico (11), dai questionari è risultato che il 90% delle le volontarie erano non fumatrici, o avevano smesso di fumare in occasione della gravidanza, mentre il rimanente 10% aveva notevolmente ridotto il numero di sigarette fumate. Per quanto riguarda l'eventuale esposizione a fumo passivo, i limiti di rivelabilità del metodo simultaneo, che è ovviamente meno sensibile dei metodi ottimizzati per ciascun singolo analita, lo rendono evidentemente non adatto a valutare questo tipo di esposizione.

c. Risultati delle analisi dei metaboliti nelle urine e nei liquidi amniotici

I risultati medi ottenuti su campioni di urina delle 70 gestanti volontarie utilizzando il metodo analitico completo, cioè con l'idrolisi, espressi in $\mu\text{g/l}$ e in $\mu\text{g/g}$ di creatinina sono riportati nella tabella 7. Le concentrazioni urinarie vengono generalmente espresse in funzione della creatininuria, ed i risultati espressi in unità di peso per mg di creatinina, allo scopo di confrontare risultati ottenuti su campioni di urina con diversi gradi di diluizione. La creatinina viene determinata con il metodo di Jaffè (23) che prevede il legame della creatinina con i picrati alcalini e il dosaggio di essa con metodi colorimetrici. Poiché invece le concentrazioni nei liquidi

amniotici sono espresse in µg/l, allo scopo del confronto anche i valori urinari sono espressi con la medesima unità di misura.

Tabella 7: risultati medi ottenuti sui campioni di urina di 70 gestanti

URINE	MnBP	MEP	MBzP	MEHP	MEHHP	MnBP	MEP	MBzP	MEHP	MEHHP
	µg/l					µg /g di creatinina				
MEDIA	29,87	71,24	3,09	4,08	16,18	45,20	99,11	3,88	5,57	22,34
DEV.STD.	23,91	104,75	3,43	7,44	21,75	59,42	144,63	4,65	9,93	26,33
MEDIANA	24,20	37,85	1,76	1,06	9,16	32,66	55,48	2,25	1,59	12,90
MIN	3,13	3,65	1,20	0,20	0,78	6,51	7,59	1,31	0,11	0,76
MAX	136,50	748,00	12,90	41,10	156,00	472,63	1022,19	22,89	42,59	161,66
N dati > Loq	69	68	59	51	69	69	68	59	51	69

Questi risultati possono essere confrontati con quelli ottenuti in uno studio effettuato su 157 volontari sani, di cui 83 di genere femminile, riportati nella tabella 8 (24).

Tabella 8: Valori di riferimento (VR) per i metaboliti urinari degli ftalati considerati

Metabolita	Media Geometrica (DS) µg/g creatinina	Intervallo di confidenza del 95% (IC)	Mediana	Numero di gestanti con valore > IC
MnBP	20,26 (56,21)	8,17- 28,43	26,70	36/70
MEP	72,94 (355,91)	3,63 - 149,51	65,80	12/70
MBzP	14,74 (53,19)	2,94- 17,68	14,34	4/70
MEHP	3,37 (5,70)	1,85 - 4,89	3,03	15/70
MEHHP	12,74 (15,29)	9,45- 22,19	14,29	17/70

Nell'ultima colonna è riportato il numero di gestanti aventi un valore urinario maggiore del limite superiore dell'intervallo di confidenza (IC) del 95% dei Valori di Riferimento (VR), che risulta piuttosto elevato, nel caso dell'MnBP pari al 50% del campione.

I risultati ottenuti analizzando i liquidi amniotici delle volontarie espressi in µg/l sono riportati nella tabella 9.

Tabella 9: risultati ottenuti su campioni di liquido amniotico di 70 gestanti

	MnBP	MEP	MBzP	MEHP	MEHHP
	µg/l				
MEDIA	3,53	0,41	0,08	2,09	0,25
DEV.STD.	2,33	0,55	0,06	7,73	0,20
MEDIANA	3,18	0,15	0,05	0,54	0,41
MIN	0,78	0,05	0,05	0,14	0,02
MAX	9,15	3,65	0,20	50,20	0,48
N dati> LOD	58	48	55	41	40

Questi risultati sono confrontabili con quelli ottenuti dai campioni analizzati nel 2010 da gestanti non note, e perciò si possono esaminare complessivamente allo scopo di avere un'informazione sui valori medi dei metaboliti in un maggior numero di campioni (Tabella 10).

Tabella 10. Risultati medi ottenuti su 129 campioni di liquido amniotico

	MnBP	MEP	MBzP	MEHP	MEHHP
	µg/l				
MEDIA	3,13	0,69	0,16	1,47	0,15
DEV.STD.	2,38	0,76	0,12	5,03	0,18
MEDIANA	2,30	0,46	0,14	0,67	0,03
MIN	0,64	0,05	0,1	0,14	0,02
MAX	13,33	3,65	0,48	50,20	0,48
N dati> Lod	116	76	103	99	76

La figura 10 mostra in forma grafica il confronto fra le concentrazioni urinarie medie dei cinque ftalati monoesteri considerati con quelle riscontrate nei liquidi amniotici corrispondenti. E' interessante notare come la concentrazione espressa in $\mu\text{g/g}$ di creatinina sia mediamente più alta di quella espressa in $\mu\text{g/litro}$, mostrando che le urine delle gestanti presentano un elevato grado di diluizione.

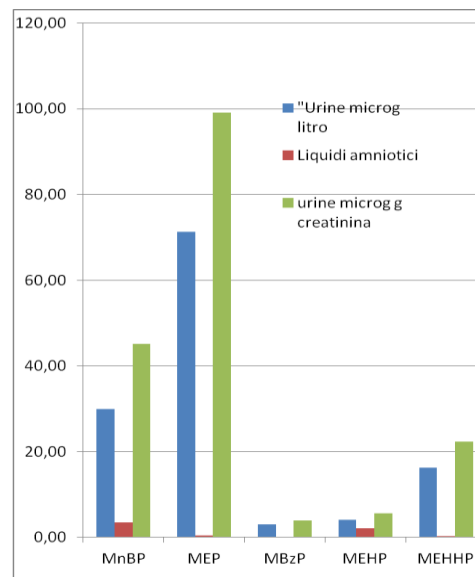


Figura 10. concentrazioni medie dei cinque ftalati monoesteri nelle urine e nei liquidi amniotici.

Si conferma che le concentrazioni nei liquidi amniotici sono molto inferiori a quelle delle urine materne e che i metaboliti significativamente presenti nel liquido amniotico sono MnBP e MEHP.

I risultati concordano con dati di letteratura che riportano i risultati di analisi simili ma benché le concentrazioni siano dello stesso ordine di grandezza, i valori qui riportati sono mediamente più bassi: è necessario ricordare che l'esposizione è un fenomeno che presenta variabilità dovuta sia a fattori individuali che ambientali.

d. Correlazione fra liquido amniotico e urina materna

Allo scopo di esaminare per ciascun metabolita la possibile correlazione fra la concentrazione rilevata nelle urine materne con quella nel liquido amniotico ed

inoltre le possibili correlazioni con le informazioni estratte dal questionario sono stati selezionati tutti i soggetti che avessero sia compilato il questionario che consegnato entrambi i campioni. I soggetti che soddisfano queste condizioni sono 57/70 e i risultati analitici sono riepilogati nelle tabelle che seguono.

La Tabella 1 è relativa alle concentrazioni di metaboliti riscontrate nei campioni di urina, analizzati con la procedura completa, che prevede l'idrolisi enzimatica dei coniugati glucuronati, e la tabella 12 alle concentrazioni di metaboliti riscontrate nei liquidi amniotici analizzati con la stessa metodica.

Analizzando i dati con il test di Shapiro-Wilk questi non risultano distribuiti normalmente ($p < 0.05$) e pertanto nelle tabelle sono state riportate le mediane e i valori minimo e massimo.

Tabella 11: risultati ottenuti sui campioni di urina (n.= 57)

	Urine ($\mu\text{g/g creatinina}$)		Urine ($\mu\text{g/L}$)	
	Mediana	Range min - max	Mediana	Range min - max
MnBP	32,66	4,42 - 472,63	23,5	3,06 - 122,5
MEP	58,38	Lod - 1022,19	31,2	Lod - 748
MBzP	1,39	Lod - 22,89	0,94	Lod - 10,1
MEHP	1,45	Lod - 62,29	0,69	Lod - 28,3
MEHHP	14,45	0,76 - 92,23	9,44	0,78 - 63,7

Tabella 12: risultati ottenuti sui campioni di liquido amniotico (n.= 57)

	Liquido amniotico (µg/L)	
	Mediana	Range min - max
MnBP	2,88	Lod - 9,15
MEP	0,15	Lod - 3,65
MBzP	0,05	Lod - 0,2
MEHP	0,45	Lod - 50,20
MEHHP	0,01	Lod - 0,48

E' stato quindi utilizzato il test Rho di Spearman per esaminare la correlazione non parametrica fra i singoli valori riscontrati nell'urina materna, sia espressi per volume di urina che normalizzati per il contenuto di creatinina, e del liquido amniotico, non riscontrando significatività ($p > 0.05$).

In assenza di tale correlazione è stata valutato il rapporto percentuale fra la concentrazione di ftalati monoesteri nel liquido amniotico rispetto alla concentrazione rilevata nell'urina materna, nei soli campioni per i quali fosse stata riscontrata una concentrazione superiore ai limiti di rilevabilità in entrambi i casi, e i valori sono riportati nella tabella 13.

Tabella 13: rapporto percentuale fra la concentrazione di ftalati monoesteri nel liquido amniotico e nell'urina materna

R% LA/U	MnBP	MEP	MBzP	MEHP	MEHHP
MEDIANA	17.44	0.77	2.79	67.74	2.61
MIN	3.34	0.02	0.50	1.60	0.03
MAX	97.55	17.88	195.31	525.72	11.37
N dati	39	39	30	22	39

Dei due metaboliti maggiormente rappresentati l'MnBP è presente in una concentrazione pari al 20% circa di quella presente nell'urina materna, mentre il MEHP benchè presente in quantità inferiore, si ritrova mediamente nel liquido amniotico in una concentrazione pari al 50% di quella dell'urina materna.

Tuttavia, considerando che i metaboliti urinari sono stati determinati dopo idrolisi enzimatica della forma coniugata con acido glucuronico e che nel liquido amniotico gli ftalati monoesteri sono presenti prevalentemente in forma libera, è sembrato maggiormente significativo esaminare anche la relazione fra le forme libere nei due tipi di campione. Per effettuare questo esperimento è stato però necessario estendere la raccolta richiedendo nuovi campioni di urina e liquido amniotico ad un ulteriore gruppo di gestanti.

In questa fase il numero di volontarie che ha aderito allo studio è stato più basso che in precedenza (n = 25) sia a causa del minor tempo a disposizione, sia a causa delle diverse modalità adottate dalla struttura sanitaria per effettuare le consulenze, che sono state effettuate per gruppi anziché singolarmente, il che ha evidentemente determinato una minore sensibilizzazione nei riguardi dello studio proposto.

Le concentrazioni degli ftalati liberi sono riportate nella tabella 14.

Tabella 14: risultati ottenuti sui campioni di urina e di liquido amniotico senza idrolisi enzimatica

Metabolita	Urine non idrolizzate (µg/L)			Liquido amniotico (µg/L)		
	Media (DS)	Mediana	Range	Media (DS)	Mediana	Range
MnBP	1,65 (2,2)	0,98	Lod - 9,46	0,94 (0,21)	0,91	0,58 - 1,53
MEP	39,94 (45,71)	28,75	Lod - 205	0,17 (0,18)	0,14	Lod - 0,66
MBzP	0,06 (0,08)	0,01	Lod - 0,28	0,16 (0,04)	0,16	Lod - 0,2
MEHP	0,53 (0,8)	0,04	Lod - 2,39	0,4 (0,65)	0,1	Lod - 1,53
MEHHP	0,44 (0,3)	0,44	0,05 - 1,24	0,1(0,05)	0,05	Lod - 0,12

I risultati confermano che , come riportato in letteratura, solo l'MEP è presente nelle urine umane in concentrazione significativa nella forma non glucuronata (25). Anche in questo caso essendo risultata la distribuzione dei dati non normale, è stata esaminata la correlazione non parametrica Rho di Spearman fra i singoli valori riscontrati nell'urina materna e del liquido amniotico: sono stati riscontrati risultati significativi per MnBP e MEP ($p < 0.05$, Figure 11 e 12) e MEHP ($p < 0.01$, figura 13)

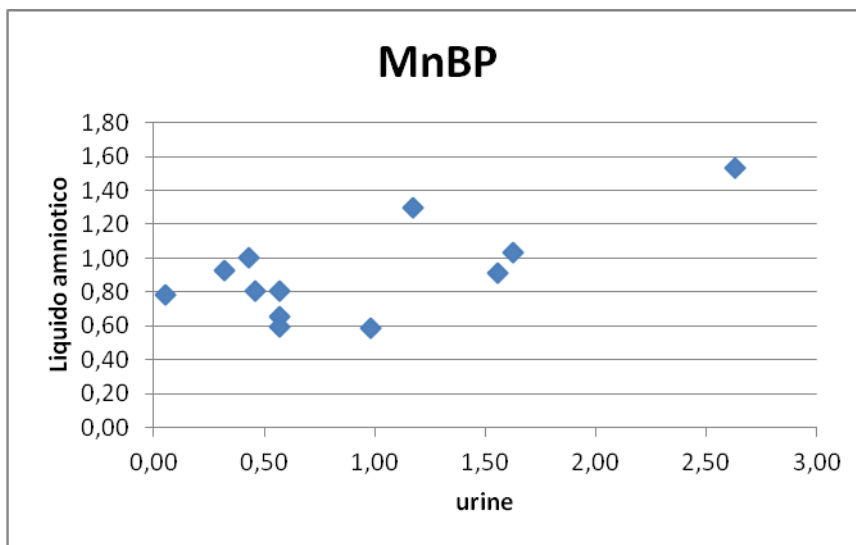


Figura 11 :correlazione fra le concentrazioni di MnBP in urina e liquido amniotico senza idrolisi enzimatica

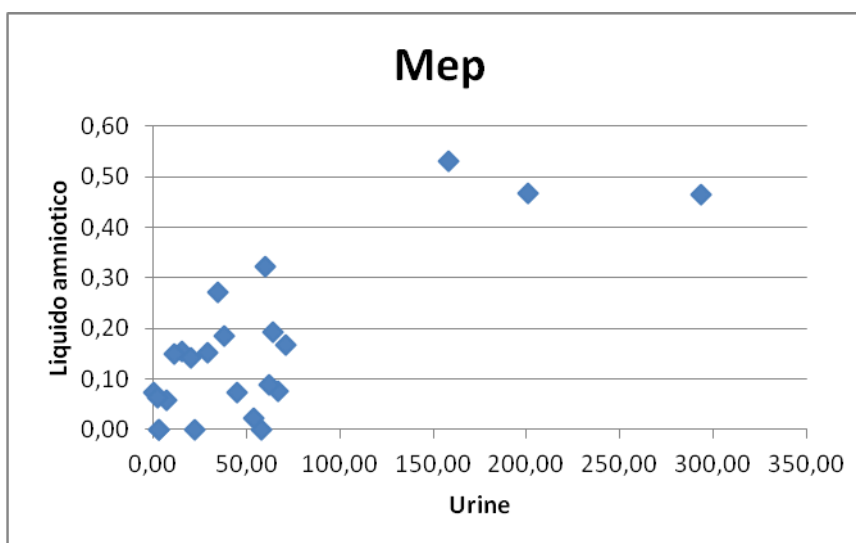


Figura 12 :correlazione fra le concentrazioni di MEP in urina e liquido amniotico senza idrolisi enzimatica

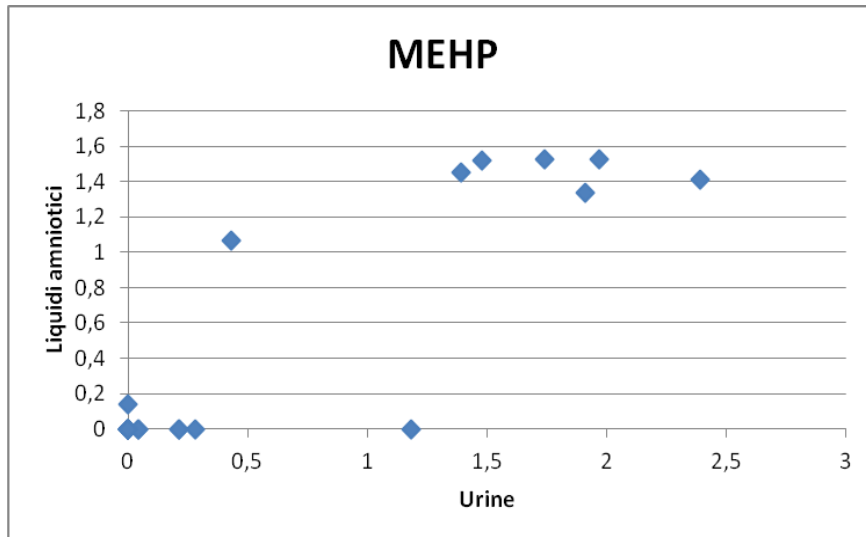


Figura 13 :correlazione fra le concentrazioni di MEHP in urina e liquido amniotico senza idrolisi enzimatica.

Tali correlazioni avvalorano l'ipotesi che i metaboliti degli ftalati considerati attraversino la barriera placentare solo se in forma libera, a scapito dell'ipotesi di una idrolisi in situ dei diesteri corrispondenti.

7. ANALISI DEI QUESTIONARI

I dati rilevati tramite questionario (allegato1) sono stati inseriti in un database e su quelli relativi alle 57 volontarie che hanno completato il protocollo sono stati analizzati utilizzando il software statistico SPSS versione 19.0 (IBM® Corporation, Armonk, NY, USA).

a. Descrizione del campione

Le informazioni anagrafiche su tutte le gestanti che hanno completato il questionario (n= 70) e sul consumo di prodotti potenzialmente contenenti ftalati sono riassunte nelle tabelle 15 e 16.

Tabella 15: informazioni anagrafiche

Età	Media ± DS	38,31±3,1
		Frequenze (%)
Settimana di gravidanza	13	1,8
	14	12,3
	15	10,5
	16	33,3
	17	26,3
	18	7
	Non risposto	8,8
Residenza	Urbana	91,2
	Rurale	5,3
	Costiera	1,8
	Rurale+ costiera	1,8
Fumo	Si	10,5
	Ex	19,3
	No	70,2
Alcol	Occasionalmente	36,8
	No	59,6
	Si	3,5

Tabella 16: Abitudini alimentari e utilizzo materiali plastici

		Frequenze (%)
Utilizzo contenitori di plastica	Mai	12,3
	Raramente	31,6
	Spesso	56,1
Utilizzo pellicola	Mai	8,8
	Raramente	43,9
	Spesso	47,4
Utilizzo piatti di plastica	Mai	28,1
	Raramente	50,9
	Spesso	21,1
Utilizzo bicchieri di plastica	Mai	29,8
	Raramente	49,1
	Spesso	21,1
Consumo acqua in bottiglie di plastica	Mai	7
	Raramente	15,8
	Spesso	21,1
	Regolarmente	56,1
Utilizzo guanti di gomma	Mai	36,8
	Raramente	33,3
	Spesso	29,8
Utilizzo insetticidi	Mai	54,4
	Raramente	45,6

Lo studio delle correlazioni fra le informazioni del questionario e le concentrazioni di ftalati monoesteri nelle urine materne e nei liquidi amniotici corrispondenti è stato invece effettuato solo sul gruppo che ha completato il protocollo (n=57).

Inizialmente si è verificata la normalità delle distribuzioni dei metaboliti, incrociati con le variabili dedotte dai questionari somministrati, attraverso il test di Shapiro-Wilk.

Il test ha evidenziato che i cinque metaboliti non si distribuiscono normalmente ($p < 0.05$)

Pertanto si sono utilizzati dei test non parametrici per verificare differenze statisticamente significative dei vari metaboliti nei diversi gruppi derivati dalle classi di risposta del questionario. Nello specifico son stati utilizzati i test non parametrici di Kruskal-Wallis, per confronti tra più di due gruppi e di Mann-Whitney per confronti tra due soli gruppi.

Nelle tabelle seguenti (17 e 18) sono descritti i valori delle concentrazioni riscontrate nei metaboliti, sia nelle urine che nei liquidi amniotici, analizzati in relazione ad abitudini alimentari, uso di materiali plastici in cucina e utilizzo di insetticidi, tramite il test di Kruskal-Wallis e di Mann-Whitney, considerando significativi i valori di $p < 0.05$.

Tabella 17 : metaboliti urinari ($\mu\text{g/g}$ di creatinina)

		MnBP Media (DS)	MEP Media (DS)	MBzP Media (DS)	MEHP Media (DS)	MEHHP Media (DS)
Utilizzo contenitori di plastica	Mai	70,16 (80,68)	223,29 (236,95)	3,72 (5,65)	9,69 (23,2)	42,1 (37,41)
	Raramente	36,2 (23,95)	98,01 (114,84)	2,55 (3,04)	5,52 (7,67)	14,51 (12,74)
	Spesso	54,17 (88,63)	107,67 (212,26)	3,15 (5,21)	5,96 (12,62)	23,19 (21,87)
Significatività test di Kruskal-Wallis		p=0,402	p=0,053	p=0,839	p=0,44	p=0,077
Utilizzo pellicola	Mai	42,43 (13,91)	78,35 (90,28)	1,94 (1,63)	3,97 (2,15)	18,37 (3,03)
	Raramente	44,64 (50,7)	119,65 (165,22)	3,98 (5,77)	6,95 (13,63)	24,52 (26,5)
	Spesso	57,33 (94,92)	125,55 (227,75)	2,34 (3,65)	6,09 (13,51)	21,97 (22,15)
Significatività test di Kruskal-Wallis		p=0,598	p=0,913	p=0,774	p=0,433	p=0,58
Utilizzo piatti di plastica	Mai	31,47 (18,11)	135,8 (253,02)	3,02 (5,98)	5,77 (9,82)	24,62 (25,1)
	Raramente	58,41 (92,82)	99,94 (151,59)	2,5 (3,61)	5,51 (11,52)	21,84 (22,25)
	Spesso	56,54 (63,94)	141,79 (195,61)	4,31 (4,95)	8,8 (19,08)	22,56 (24,2)
Significatività test di Kruskal-Wallis		p=0,361	p=0,542	p=0,27	p=0,756	p=0,993
Utilizzo bicchieri di plastica	Mai	48,26 (57,25)	178,97 (279,04)	4,13 (6,55)	9,05 (16,69)	29,09 (29,41)
	Raramente	49,98 (86,13)	78,49 (99,72)	1,59 (1,74)	3,21 (3,75)	19,22 (18,08)
	Spesso	54,68 (64,75)	127,73 (196,21)	4,82 (5,32)	9,48 (18,86)	22,09 (23,6)
Significatività test di Kruskal-Wallis		p=0,661	p=0,494	p=0,292	p=0,966	p=0,836

Consumo acqua in bottiglia	Mai	86,98 (111,15)	222,57 (337,2)	10,07 (11,25)	25,3 (30,11)	38,94 (41,15)
	Raramente	38,32 (35,7)	191,67 (323,87)	3,82 (4,54)	4,71 (5,86)	26,98 (26,59)
	Spesso	56,84 (65,8)	187,01 (215,59)	2,61 (4,52)	6,39 (17,69)	25,09 (26,39)
	Regolarmente	46,91 (79,66)	59,79 (55,7)	2,08 (2,49)	4,3 (6,31)	18,7 (17,63)
Significatività test di Kruskal-Wallis		p=0,737	p=0,249	p=0,69	p=0,461	p=0,72
Utilizzo guanti di gomma	Mai	32,33 (18,88)	120,07 (219,97)	3,16 (5,27)	5,03 (10,18)	17,42 (13,61)
	Raramente	71,63 (111,56)	115,33 (181,62)	3,17 (4,7)	6,52 (14,25)	27,94 (30,64)
	Spesso	49,19 (57,31)	121,17 (173,92)	2,7 (3,9)	7,55 (14,74)	23,6 (22,52)
Significatività test di Kruskal-Wallis		p=0,537	p=0,934	p=0,898	p=0,427	p=0,723
Utilizzo insetticidi	Mai	48,34 (57,53)	113,47 (179,47)	4,14 (5,9)	8,5 (16,93)	23,43 (26,19)
	Raramente	52,98 (89,34)	125,2 (207,61)	1,7 (1,66)	3,63 (3,64)	21,99 (19,21)
Significatività test di Mann-Whitney		p=0,724	p=0,575	p=0,625	p=0,341	p=0,527

Tabella 18: metaboliti nel liquido amniotico (µg/l)

		MnBP Media (DS)	MEP Media (DS)	MBzP Media (DS)	MEHP Media (DS)	MEHHP Media (DS)
Utilizzo contenitori di plastica	Mai	3,55 (2,52)	0,16 (0,13)	0,1 (0,06)	7,73 (18,73)	0,13 (0,2)
	Raramente	2,43 (2,21)	0,3 (0,28)	0,11 (0,06)	0,77 (0,7)	0,16 (0,2)
	Spesso	3,05 (2,18)	0,36 (0,67)	0,09 (0,06)	0,75 (0,6)	0,15 (0,19)
Significatività test di Kruskal-Wallis		P=0,368	P=0,409	P=0,689	P=0,984	P=0,867
Utilizzo pellicola	Mai	3,26 (2,47)	0,3 (0,33)	0,09 (0,06)	0,85 (0,46)	0,27 (0,22)
	Raramente	2,5 (2,12)	0,37 (0,73)	0,1 (0,06)	2,8 (10,12)	0,09 (0,17)
	Spesso	3,25 (2,29)	0,27 (0,29)	0,09 (0,06)	0,73 (0,64)	0,17 (0,2)
Significatività test di Kruskal-Wallis		P=0,536	P=0,897	P=0,856	P=0,932	p=0,048
Utilizzo piatti di plastica	Mai	3,45 (2,42)	0,47 (0,93)	0,08 (0,05)	4,1 (12,76)	0,17 (0,2)
	Raramente	2,38 (1,92)	0,2 (0,21)	0,11 (0,06)	0,73 (0,63)	0,13 (0,19)
	Spesso	3,52 (2,5)	0,39 (0,27)	0,09 (0,07)	0,69 (0,64)	0,15 (0,2)
Significatività test di Kruskal-Wallis		P=0,127	P=0,078	P=0,117	P=0,732	P=0,901
Utilizzo bicchieri di plastica	Mai	3,2 (2,14)	0,45 (0,9)	0,08 (0,05)	3,87 (12,37)	0,16 (0,2)
	Raramente	2,67 (2,28)	0,21 (0,23)	0,11 (0,06)	0,68 (0,64)	0,13 (0,18)
	Spesso	3,09 (2,34)	0,4 (0,27)	0,09 (0,06)	0,84 (0,6)	0,16 (0,19)
Significatività test di Kruskal-Wallis		P=0,577	P=0,097	P=0,434	P=0,653	P=0,462

Consumo acqua in bottiglia	Mai	3,02 (2,65)	0,13 (0,04)	0,11 (0,06)	0,76 (0,65)	0,01 (0,01)
	Raramente	3,1 (2,25)	0,61 (1,17)	0,1 (0,06)	0,78 (0,69)	0,15 (0,2)
	Spesso	3,5 (2,73)	0,27 (0,25)	0,1 (0,07)	4,78 (14,32)	0,12 (0,18)
	Regolarmente	2,62 (1,99)	0,27 (0,28)	0,1 (0,06)	0,77 (0,61)	0,18 (0,2)
Significatività test di Kruskal-Wallis		P=0,681	P=0,469	P=0,876	P=0,973	P=0,155
Utilizzo guanti di gomma	Mai	3,62 (2,3)	0,32 (0,32)	0,08 (0,05)	0,81 (0,55)	0,17 (0,19)
	Raramente	2,38 (2,31)	0,39 (0,83)	0,11 (0,07)	0,72 (0,75)	0,13 (0,19)
	Spesso	2,61 (1,88)	0,23 (0,24)	0,1 (0,06)	3,78 (12,39)	0,14 (0,19)
Significatività test di Kruskal-Wallis		P=0,156	P=0,377	P=0,28	P=0,721	P=0,518
Utilizzo insetticidi	Mai	3,52 (2,47)	0,37 (0,67)	0,09 (0,06)	2,54 (8,87)	0,15 (0,19)
	Raramente	2,14 (1,6)	0,25 (0,23)	0,1 (0,06)	0,48 (0,53)	0,15 (0,19)
Significatività test di Mann-Whitney		P=0,044	P=0,944	P=0,515	P=0,003	P=0,444

Il medesimo questionario, utilizzato nello studio sui valori di riferimento già citato (24) aveva evidenziato una correlazione positiva dei livelli dei metaboliti considerati con l'uso di contenitori di plastica per la conservazione dei cibi e con il consumo di cibi in scatola e pesci ad elevato contenuto di grassi. Il fatto che tali correlazioni non siano state verificate può essere attribuito alla minore numerosità dello studio (57 contro 168 soggetti studiati) o al fatto che in gravidanza intervengano fattori metabolici che risultano predominanti rispetto alle sorgenti di esposizione.

8. CONCLUSIONI

1. I campioni di liquido amniotico delle volontarie, quasi tutte non fumatrici o deboli fumatrici contengono concentrazioni dei metaboliti dei cancerogeni ambientali IPA e benzene inferiori al LOD del metodo utilizzato.
2. Quasi tutti i campioni di liquido amniotico analizzati contengono concentrazioni misurabili dei monoesteri degli ftalati considerati, anche se notevolmente inferiori ai valori riscontrati nell'urina materna, confermando un'esposizione fetale a questi inquinanti.
3. I livelli dei metaboliti considerati nel liquido amniotico non aumentano significativamente con l'idrolisi enzimatica, quindi sono presenti solo in forma non glucuronidata. Delle due ipotesi possibili, che i metaboliti in forma coniugata non attraversino la placenta o che gli ftalati attraversino la barriera placentare come diesteri e vengano poi idrolizzati a monoesteri, la prima sembra essere sostenuta dai risultati di questo studio.
4. I valori di concentrazione dei metaboliti degli ftalati prima e dopo l'idrolisi enzimatica non differiscono significativamente fra il gruppo dei feti maschi e quello dei feti femmine.
5. I risultati ottenuti su campioni di urina di 70 gestanti volontarie confrontati con i valori di riferimento degli stessi metaboliti nella popolazione generale mostrano che il numero di gestanti aventi un valore maggiore del limite superiore dell'intervallo di confidenza del 95% risulta elevato, nel caso dell'MnBP pari al 50% del campione.

6. I risultati ottenuti analizzando i liquidi amniotici delle volontarie confermano che i metaboliti significativamente presenti nel liquido amniotico sono MnBP, presente in una concentrazione pari al 20% circa di quella del metabolita nell'urina materna, e MEHP che, benchè presente in quantità inferiore, si ritrova in concentrazione percentualmente più elevata nel liquido amniotico.
7. Esaminando la correlazione fra i valori riscontrati nell'urina materna e nel liquido amniotico dopo idrolisi enzimatica non sono state riscontrate significatività ($p > 0.05$). Sono stati riscontrati invece risultati significativi fra le forme libere in entrambi i tipi di campione per MEP, MnBP ($p < 0.05$) e MEHP ($p < 0.01$). I risultati (ottenuti su 25 volontarie) indicano una possibile correlazione fra i valori di concentrazione dei metaboliti monoesteri degli ftalati liberi (non coniugati con acido glucuronico) nell'urina materna con quelli riscontrati nei corrispondenti liquidi amniotici, da confermare su un maggior numero di campioni per poter considerare l'urina materna una misura dell'esposizione fetale.
8. Sono stati applicati il Test di Kruskal-Wallis, tecniche di regressione multivariata, e tabelle di contingenza per i soggetti che presentano valori urinari superiori al limite superiore dell'intervallo di confidenza dei valori di riferimento, ma non sono state evidenziate correlazioni o differenze significative tra le classi di risposta dei questionari sulle abitudini alimentari e gli usi di materie plastiche né per i livelli urinari di metaboliti nè per quelli nel liquido amniotico.

9. BIBLIOGRAFIA

1. Jorgen Angerer, Ulrich Ewers, Michael Wilhelm. Human biomonitoring: State of the art Int. J. Hyg. Environ. Health 210 (2007) 201–228.
2. Dana B. Barr, Amanda Bishop, Larry L. Needham. Concentrations of xenobiotic chemicals in the maternal-fetal unit. Reproductive Toxicology 23 (2007) 260–266.
3. Warren G. Foster, Claude L. Hughes , Siu Chan , Lawrence Platt. Human developmental exposure to endocrine active compounds. Environmental Toxicology and Pharmacology 12 (2002) 75-81.
4. Foster W, Chan S, Platt L, Hughes C. Detection of endocrine disrupting chemicals in samples of second trimester human amniotic fluid. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism Vol. 85, No. 8 (2000).
5. Octavio P. Luzardo , Vikesh Mahtani, Juan M. Troyano, Margarita Alvarez de la Rosa, Ana I. Padilla-Perez, Manuel Zumbado, Maira Almeida, Guillermo Burillo-Putze, Carlos Boada, Luis D. Boada. Determinants of organochlorine levels detectable in the amniotic fluid of women from Tenerife Island (Canary Islands, Spain). Environmental Research 109 (2009) 607–613.
6. Stephanie M. Engel , Brynn Levy , Zhisong Liu , Dana Kaplan , Mary S. Wolff. Xenobiotic phenols in early pregnancy amniotic fluid. Reproductive Toxicology 21 (2006) 110–112.
7. M. J. Silva, J. A. Reidy, A. R. Herbert, J. L. Preau, Jr., L. L. Needham, A. M. Calafat. Detection of Phthalate Metabolites in Human Amniotic Fluid. Bull. Environ. Contam. Toxicol. (2004) 72:1226–1231 .
8. Matthias Wittassek, Juergen Angerer, Marike Koloss-Gehring, Sebastian Daniel Schafer, Walter Klockenbusch, Lorenz Dobler, Andreas K. Gunsel, Antje

Muller, Gerhard Andreas Wiesmuller. Fetal exposure to phthalates—a pilot study. *Int. J. Hyg. Environ. Health* 212 (2009) 492–498.

9. Po-Chin Huang, Pao-Lin Kuo, Yen-Yin Chou, Shio-Jean Lin, Ching-Chang Lee. Association between prenatal exposure to phthalates and the health of newborns. *Environment International* 35 (2009) 14–20.

10. S.H Swan, F. Liu, M. Hines, R.L. Kruse, C. Wang, J.B. Redmon, A. Sparks and B. Weiss: Prenatal phthalate exposure and reduced masculine play in boys. *International Journal of Andrology*, 2009, 32: 1 – 9.

11. Dobek D, Karmowski A, Sobiech KA, Terpiłowski L, Miś-Michałek M. Average quantitative concentration of cotinine within the system pregnant woman-baby. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. 1998;46(1):59-61.

12. http://apps.echa.europa.eu/registered/data/dossiers/DISS-9d862eda-63cd-4c78-e044-00144f67d249/DISS-9d862eda-63cd-4c78-e044-00144f67d249_DISS-9d862eda-63cd-4c78-e044-00144f67d249.html

13. INRS Fiches Toxicologique n.49

14. IARC. Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Man. Geneva: World Health Organization, International Agency for Research on Cancer, 1972-present.

15. Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). 1995. Toxicological profile for polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). Atlanta, GA: U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service.)

16. Klaus Weissermel, Hans-Jürgen Arpe, Charlet R. Lindley, "Industrial organic chemistry", ed.4, Wiley-VCH, 2003, pp.140-141. ISBN 3527305785)

17. Jan L. Lyche, Arno C. Gutleb, Åke Bergman, Gunnar S. Eriksen, AlberTinka J. Murk, Erik Ropstad, Margaret Saunders, Janneche U. Skaare. Reproductive and

developmental toxicity of phthalates. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B*, 12:225–249, 2009 .

18. Koo J.H., Lee M.B. “ Human monitoring of phthalates and risk assessment.” *J. of Toxicology and Environ. Health, part A*, 68, 1379-1392, 2005.

19. Hauser R., “Urinary phthalate metabolites and semen quality: a review of a potential biomarker of susceptibility.”. *Int. J. of androl.* 31, 112-117, 2008

20. Blount, B.C. et al. Levels of seven urinary phthalate metabolites in a human reference population. *Environ Health Perspect* 108:979-82; 2000.

21. Paci E., Pigni D., Cialdella A. M., Faranda P. & Tranfo G. Determination of free and total S-phenylmercapturic acid by HPLC/MS/MS in the biological monitoring of benzene exposure. *Biomarkers*, March - April 2007; 12 (2): 111 -122.

22. Sterz K., Köhler D., Schettgen T., Scherer G. Enrichment and properties of urinary pre-S-phenylmercapturic acid (pre-SPMA). *J. Chromatogr. B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 2010, 878 (27), 2502-5.

23. Jaffè M. Über den Niederschlag welchen pikrinsäure in normalen Harn erzeugt und über eine neue Reaction des Kreatinins. *Z Physiol Chem.* 1886;10:391-400.

24. Giovanna Tranfo, Bruno Papaleo, Daniela Pigni, Federica Corsetti, Lidia Caporossi, Mariangela De Rosa, Silvia Capanna, Enrico Paci Urinary metabolite concentrations of phthalate metabolites in Central Italy healthy volunteers determined by a validated HPLC/MS/MS analytical method. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, DOI 10.1016/j.ijheh.2012.11.003, in press.

25. Silva MJ, Barr DB, Reidy JA, Kato K, Malek NA, Hodge CC, Hurtz D 3rd, Calafat AM, Needham LL, Brock JW. Glucuronidation patterns of common urinary and serum monoester phthalate metabolites. *Arch Toxicol.* 2003 Oct;77(10):561-7.

ALLEGATO 1 – CONSENSO INFORMATO E QUESTIONARIO

Progetto di ricerca

Valutazione del rischio di esposizione fetale ad agenti cancerogeni ed interferenti endocrini mediante analisi del liquido amniotico

Informativa ex art. 13 D.lgs. 196/2003 e consenso informato

L'esposizione umana ad agenti chimici è considerata un fattore di rischio rilevante per la salute pubblica. L'effettuazione routinaria dell'amniocentesi su donne in gravidanza fra la 14° e la 23° settimana di gestazione ha reso possibile lo studio dell'esposizione dei feti poichè i contaminanti ambientali e i loro metaboliti, in quanto molecole di piccole dimensioni, sono in grado di attraversare la placenta.

Il presente progetto si propone di valutare i livelli di concentrazione dei metaboliti di inquinanti diffusi in campioni di liquidi amniotici e di correlarli con quelli riscontrati nell'urina materna, allo scopo di approfondire i meccanismi di esposizione fetale e identificare eventuali comportamenti a rischio nelle gestanti. Sulla base delle informazioni ottenute sarà possibile realizzare una campagna di sensibilizzazione volta prevenire le conseguenze negative dell'esposizione agli agenti chimici considerati nella fase di sviluppo fetale.

Gentile Signore/a,

le informazioni raccolte verranno trattate in conformità al D.lgs. n. 196 del 30 giugno 2003 ("Codice in materia di protezione dei dati personali") che prevede la tutela delle persone e di altri soggetti rispetto al trattamento dei dati personali.

Secondo la normativa indicata, tale trattamento sarà improntato ai principi di correttezza, liceità e trasparenza e di tutela della Sua riservatezza e dei Suoi diritti.

Ai sensi dell'articolo 13 del D.lgs. n.196/2003, pertanto, Le forniamo le seguenti informazioni:

1. I dati da Lei forniti verranno trattati per le seguenti finalità:scientifico/clinico/diagnostico
2. Il conferimento dei dati è facoltativo e l'eventuale rifiuto di fornire tali dati non ha alcuna conseguenza.
3. I dati singoli non saranno comunicati ad altri soggetti, né saranno oggetto di diffusione.
4. I dati anonimi e collettivi di tutti coloro che accetteranno il consenso saranno utilizzati per divulgazione scientifica di ricerca a fini preventivi.

Ulteriori informazioni sullo studio e sui risultati potranno essere richiesti a:

dott. Giovanna Tranfo, Istituto Superiore per la Prevenzione e la Sicurezza del Lavoro, Dipartimento Medicina del Lavoro, Via di Fontana Candida 1, 00040 Monteporzio Catone (RM)
tel. 0697896045, email : giovanna.tranfo@ispesl.it

RingraziandoLa per la sua attenzione La preghiamo di voler sottoscrivere la Sua disponibilità a partecipare a questa iniziativa

Firma

GENERALITA'

Codice Identificativo

Cognome Nome(facoltativi)

Età

Settimana di gravidanza:

Time to pregnancy:

Numero di precedenti gravidanze a termine

Numero di gravidanze pretermine

Numero di aborti spontanei

Data di compilazione del questionario

Risiede in ambiente

☐ Urbano

☐ Rurale

☐ Costiero

Nella zona di residenza rileva la presenza di

☐ Industrie chimiche

☐ Industrie della plastica

☐ Industrie siderurgica

☐ Aziende agricole, campi coltivati

☐ Inceneritori o centri di smaltimento rifiuti

Fuma?

☐ Si

Iniziato a fumare dal Quante sigarette al giorno

☐ No

☐ Mai fumato

☐ Ex fumatore per anni SMESSO di fumare dal

Assume alcolici / super-alcolici

☐ SI

☐ NO

☐ Occasionalmente

Assume farmaci ?

☐ Occasionalmente :

.....

☐ Regolarmente:

.....

.....

Mangia cibo in scatola con quale frequenza?

☐ giornaliera

☐ settimanale

☐ mensile

☐ raramente

☐ mai

Mangia pesce e crostacei , in particolare sgombero, aringa, anguilla, salmone, aringa affumicata e halibut, con quale frequenza?

☐ giornaliera

☐ settimanale

☐ mensile

☐ raramente

☐ mai

Con quale frequenza consuma cibi cucinati alla brace?

- ☐ giornaliera
- ☐ settimanale
- ☐ mensile
- ☐ raramente
- ☐ mai

Con quale frequenza consuma cibi affumicati (speck, aringhe, salmone, ecc..)?

- ☐ giornaliera
- ☐ settimanale
- ☐ mensile
- ☐ raramente
- ☐ mai

Usa contenitori in plastica per conservare cibi grassi (pietanze condite con oli o grassi, sughi, formaggi, etc..)?

- ☐ spesso
- ☐ raramente
- ☐ mai

Usa la pellicola trasparente per la conservazione dei cibi?

- ☐ spesso
- ☐ raramente
- ☐ mai

Usa piatti di plastica?

- ☐ spesso
- ☐ raramente
- ☐ mai

Usa bicchieri di plastica?

- ☐ spesso
- ☐ raramente
- ☐ mai

Consuma acqua minerale in bottiglie di plastica?

- ☐ regolarmente
- ☐ spesso
- ☐ raramente
- ☐ mai

Usa guanti di gomma?

- ☐ spesso
- ☐ raramente
- ☐ mai

Usa insetticidi per la casa?

- ☐ spesso
- ☐ raramente
- ☐ mai

Indicare quali di questi prodotti personali usa frequentemente:

- ☐ balsamo per capelli
- ☐acca per capelli
- ☐smalto per unghie
- ☐ profumo
- ☐ deodorante
- ☐ fondotinta
- ☐ repellente per insetti

Attività lavorativa:

Dal:

Nello svolgimento della sua attività, viene in contatto con sostanze chimiche?

☐ spesso

☐ raramente

☐ mai

Se sì, quali?

.....

.....

.....

Nello svolgimento della sua attività lavorativa o di un hobby, viene in contatto con:

☐ vernici

☐ colle

☐ resine

☐ plastificanti

☐ antiparassitari

E' disponibile a fornirci informazioni via e-mail dopo la nascita del bambino (sesso, tipo di parto, altre eventuali informazioni significative)?

☐ SI email.....

☐ NO

**ALLEGATO 2 – elenco dei lavori che concorrono allo sviluppo della tesi pubblicati
nel corso del dottorato dalla dott.ssa Giovanna Tranfo:**

1. Urinary phthalate monoesters concentration in couples with infertility problems. Giovanna Tranfo, Lidia Caporossi, Enrico Paci, Cesare Aragona, Daniela Romanzi, Caterina De Carolis, Mariangela De Rosa, Silvia Capanna, Bruno Papaleo, Alessandra Pera. Toxicology Letters Volume 213, Issue 1, 13 August 2012, Pages 15–20. DOI: 10.1016/toxlet.2011.11.033.
2. Biological monitoring to assess low levels exposure to benzene, in workers and in the general population. Enrico Paci, Giovanna Tranfo. Chapter 12 in “Benzene and its derivatives: new uses and impact on environment and human health.” ISBN978-1-62100-026-6. Edited by Giovanna Tranfo, pp. 283 – 292 © 2012, Nova Science Publishers, Inc.
3. Giovanna Tranfo, Bruno Papaleo, Daniela Pigni, Federica Corsetti, Lidia Caporossi, Mariangela De Rosa, Silvia Capanna, Enrico Paci Urinary metabolite concentrations of phthalate metabolites in Central Italy healthy volunteers determined by a validated HPLC/MS/MS analytical method. International Journal of Hygiene and Environmental Health, DOI 10.1016/j.ijheh.2012.11.003, in press.
4. Concentration of phthalate esters in amniotic fluid samples G. Tranfo, C. De Carolis, E. Paci, G. Gelli, M. C. Muzi, Toxicology Letters Volume 205S, Abstracts of the 47th Congress of the European Society of Toxicology (EUROTOX 2011) pag S 136, doi: 10.1016/j.toxlet.2011.05.485.
5. Studio preliminare per l’analisi simultanea mediante HPLC/MS/MS dei metaboliti urinari di Benzene, IPA e nicotina. Paci Enrico, Tranfo Giovanna. Ital. J. Occup. Environ. Hyg., 2012, 3(2), 99-102. 2/2012.