

# Università degli Studi di Napoli “Federico II”



## Dipartimento di Agraria

Dottorato di Ricerca in Food Science

### Interferenti endocrini e microbiota del lattante: analisi cross-sectional

PhD Supervisor:

*Prof.ssa Rachele De Giuseppe*

PhD Co-Supervisor:

*Prof.ssa Paola Vitaglione*

PhD:

*Dott.ssa Luana Voto*

PhD Coordinator:

*Prof.ssa Amalia Barone*

Anno Accademico 2021/2022

# Indice

|  |    |
|--|----|
| 1.Introduzione.....  | 9  |
| 1.1 I primi 1000 giorni.....   | 9  |
| 1.2 Esposizione a fattori materni e infantili durante i primi 1000 giorni.....             | 10 |
| 1.3 Microbiota intestinale.....  | 13 |
| 1.4 Fattori che influenzano il microbiota intestinale.....                                 | 18 |
| 1.5 Interferenti Endocrini (Endocrine Disruptors Chemicals, EDCs).....                     | 22 |
| 1.6 Bisfenolo A (BPA) e ftalati.....   | 24 |
| 1.7 Esposizione infantile agli EDCs nei primi 1000 giorni.....                             | 26 |
| 1.8 Meccanismi che influenzano la composizione del microbiota da parte degli EDCs.....     | 28 |
| 2.Obiettivi.....   | 31 |
| 2.1 Setting della ricerca.....   | 31 |
| 3.Materiali e metodi.....  | 33 |
| 3.1 Popolazione oggetto di studio.....   | 33 |
| 3.2 Parametri antropometrici materni e infantili.....                                      | 34 |
| 3.3 Valutazione delle abitudini alimentari materne e infantili.....                        | 35 |
| 3.4 Valutazione dei determinanti dell'esposizione materna giornaliera a ftalati e BPA..... | 36 |
| 3.5 Determinazione dei livelli di ftalati, BPA e creatinina.....                           | 37 |
| 3.6 Clusterizzazione dei bambini in funzione dell'esposizione materna agli EDCs.....       | 37 |
| 3.7 Analisi del microbiota intestinale infantile.....                                      | 38 |
| 3.7.1 Raccolta ed elaborazione del campione per l'analisi del microbiota intestinale.....  | 38 |
| 3.7.2 Analisi della composizione del microbiota intestinale dei neonati.....               | 39 |
| 3.8 Analisi statistiche.....   | 40 |
| 3.8.1 Valutazione dell'esposizione materna agli EDCs.....                                  | 40 |

|   |    |
|---|----|
| 3.8.2 Valutazione dell'associazione tra i diversi EDCs e la composizione del microbiota infantile.              | 41 |
| 4. Risultati.....   | 42 |
| 4.1 Popolazione di studio.....  | 42 |
| 4.2 Associazione dei livelli di EDCs urinari materni e composizione del microbiota intestinale dei neonati..... | 44 |
| 4.3 Esposizione infantile a BPA e ftalati.....  | 46 |
| 4.4 Profilazione retrospettiva del microbiota intestinale dei neonati.....                                      | 48 |
| 4.5 Potenziali biomarcatori microbici intestinali di esposizione ad alto rischio a EDCs in età pediatrica.....  | 50 |
| 5. Discussione.....   | 52 |
| 6. Conclusioni.....   | 58 |
| 7. Bibliografia.....  | 59 |

## ABSTRACT

I primi 1000 giorni di vita di un bambino, che vanno dal momento del concepimento fino ai 2 anni di età, sono un periodo unico in cui si gettano le basi per una salute, una crescita e uno sviluppo ottimali per tutta la durata della vita. Diversi studi presenti in letteratura dimostrano, infatti, come questo periodo sia critico non solo per lo sviluppo di malattie croniche riguardanti l'infanzia, ma di patologie non trasmissibili (Noncommunicable diseases, NCDs) che si possono manifestare lungo tutto l'arco della vita. In particolare, i fattori esterni, comprendenti fattori materni, infantili e ambientali, possono influire in modo permanente sullo sviluppo biologico e metabolico dell'individuo e portare ad alterazioni fisiopatologiche adattive più avanti nella vita, quali obesità, diabete di tipo 2, cancro, malattie respiratorie e patologie neurodegenerative. Durante questa complessa fase della vita oltre ai fattori di rischio prenatali (p. es., indice di massa corporea pre-gravidanza elevato, eccessivo aumento di peso gestazionale, diabete gestazionale, esposizione al tabacco) e post-natali (p. es., elevato peso alla nascita del neonato, aumento accelerato del peso del neonato), ci sono anche i fattori ambientali, quali l'esposizione ad inquinanti, prodotti contenenti interferenti endocrini (Endocrine-Disrupting Chemicals, EDCs), l'utilizzo di farmaci, l'esposizione ad allergeni, lo stato socio/economico della famiglia che possono influenzare la salute del bambino. In particolare, gli EDCs hanno suscitato un interesse a causa della possibile associazione tra una precoce esposizione a queste sostanze chimiche e un aumento eccessivo dell'adiposità. Pochi studi, invece, hanno riportato come gli EDCs possono avere effetto sul microbiota intestinale e possono aumentare il rischio di disturbi metabolici come l'obesità e il diabete. Negli ultimi decenni è cresciuto sempre di più l'interesse nei confronti di questa classe di molecole che prende il nome di Endocrine-Disrupting Chemicals (EDCs), o interferenti endocrini, e dei loro effetti sulla salute umana. US Environmental Protection Agency (EPA) ha definito gli EDCs come "agenti esogeni in grado di interferire con la sintesi, la secrezione, il trasporto, il metabolismo, l'azione legante o l'eliminazione degli ormoni naturalmente presenti nel sangue, che si trovano nel corpo e che sono responsabili dell'omeostasi, della riproduzione e del processo di sviluppo". Questo gruppo di composti chimici è molto eterogeneo: alcuni di questi composti sono riscontrabili in natura come, ad esempio, i fitoestrogeni, presenti nelle piante che hanno attività ormonali, come la genisteina e la daidzeina; alcuni funghi, erbe, legumi e frutti. Tuttavia, la maggior parte sono sostanze chimiche di sintesi riscontrabili in solventi industriali, materie plastiche, plastificanti, fungicidi, pesticidi, metalli pesanti e agenti farmaceutici. Le fonti di esposizione agli EDCs sono numerose e diverse. L'esposizione avviene bevendo acqua contaminata, respirando aria contaminata, ingerendo cibo o

contattando il suolo contaminato. Gli EDCs possono trovarsi in molti prodotti di uso quotidiano, tra cui bottiglie di plastica, lattine per alimenti in metallo, detersivi, ritardanti di fiamma, alimenti, giocattoli e cosmetici e comprendono pesticidi, fungicidi, prodotti chimici industriali, plastificanti, nonilfenoli, metalli, agenti farmaceutici. Per quanto riguarda il meccanismo di azione, essi possono interferire con le funzioni endocrine, attivando o inattivando direttamente i recettori bersaglio endocrini o interrompendo la sintesi degli ormoni o il controllo locale degli ormoni da attivi a inattivi inibendo o attivando i loro enzimi metabolizzanti. Tra i vari EDCs, di particolare interesse ci sono il Bisfenolo A (BPA) e gli ftalati, ampiamente studiati per il loro ruolo di fattori “obesogenici”. La ricerca mostra che gli EDCs possono rappresentare il rischio maggiore durante lo sviluppo prenatale e postnatale precoce quando si stanno formando organi e sistemi neurali. Infatti, il feto, il lattante e il bambino possono avere una maggiore esposizione ad alcuni di essi rispetto agli adulti a causa di differenze adeguate allo sviluppo nella dieta, nel comportamento, nella fisiologia, nell'anatomia e nella tossicocinetica. Ad esempio, i neonati e i bambini possono avere una maggiore esposizione ad alcuni EDCs rispetto agli adulti perché consumano più acqua e maggiori quantità di alimenti specifici e hanno velocità di ventilazione, assorbimento intestinale, rapporti tra superficie e volume più elevati e attività mano-bocca. Inoltre, i bambini allattati al seno possono avere concentrazioni sieriche più elevate di alcuni EDC persistenti rispetto alle loro madri a causa dell'esposizione durante l'allattamento. Il latte materno è il primo alimento che gli esseri umani consumano, dalla nascita fino a un minimo raccomandato di sei mesi, e fornisce tutti i nutrienti necessari. La presenza di queste sostanze all'interno del latte umano può essere influenzata da vari fattori, quali la dieta della madre, l'abitudine al fumo, la località di residenza, l'età, il peso materno e altri. La scoperta di questa trasmissione di EDC dalla mamma al bambino deriva da alcuni studi scientifici in cui è stato effettuato un dosaggio di EDC direttamente nel latte materno, rilevando in esso la presenza di ftalati, in particolare dei composti più idrofobici, tra cui il DEHP e il diisonilftalato (DINP). La rilevazione di queste molecole all'interno del latte materno ha suscitato una particolare preoccupazione circa i potenziali effetti negativi a breve, medio e lungo termine che l'esposizione precoce ad essi possa avere sulla salute infantile, come l'alterazione dell'equilibrio ormonale o dello sviluppo neurologico e l'insorgenza di obesità.

La presente tesi descrive l'analisi osservazionale e trasversale che fa parte di uno degli obiettivi secondari del più ampio progetto longitudinale prospettico A.MA.MI (Alimentazione MAMma e bambino nei primi Mille giorni). Lo studio A.MA.MI, è stato svolto presso il Laboratorio di Dietetica e Nutrizione Clinica (Responsabile Prof.ssa Hellas Cena), Dipartimento di Sanità

Pubblica, Medicina Sperimentale e Forense, Università di Pavia e l'Unità di Neonatologia della Fondazione IRCCS Policlinico S. Matteo di Pavia ed ha valutato la correlazione tra la composizione del microbiota intestinale infantile e lo stile di vita materno/infantile e fattori ambientali, inclusi i livelli urinari materni di EDCs, dal concepimento al primo anno di vita del bambino a diversi follow-up (T0, al parto; T1, un mese dopo il parto; T2, 6 mesi dopo il parto; T3, 12 mesi dopo il parto). Partendo dall'assunzione che attraverso il latte materno vi sia una trasmissione verticale di interferenti endocrini dalla madre al bambino, nella presente analisi sono state considerate le coppie i cui neonati, a 12 mesi di età, ricevevano almeno una poppata/die (n= 20). In particolare, l'obiettivo della presente analisi osservazionale e trasversale è stato quello di analizzare l'associazione tra il pattern microbico intestinale infantile a 12 mesi dal parto e le concentrazioni urinarie materne di BPA e di alcuni ftalati, al medesimo follow-up. Tale analisi è stata applicata retrospettivamente anche ai follow-up precedenti alla nascita (T0), ad 1 mese dal parto (T1) e a 6 mesi dal parto (T2).

Su 45 madri considerate al T3, sono stati analizzati 20 campioni di feci di neonati allattati al seno almeno una volta al giorno. Le abbondanze relative ottenute sono state correlate con l'esposizione materna agli EDC. Filtrando per significatività ( $P < 0.05$ ), BPA correlava positivamente con il genere *Bacteroides*; MEP è stato positivamente associato a *Bacteroides kribbie* e al genere *Lactococcus*. MibP correlava positivamente con il genere *Ruminococcaceae-UBA1819* e *Sutterella*.

I neonati sono stati quindi divisi nel gruppo O (livelli materni di BPA  $>0,96 \mu\text{g/g}$  creatinina; n=8) rispetto al gruppo B (livelli materni di BPA  $\leq 0,96 \mu\text{g/g}$  creatinina; n=12). Le coppie del genere *Ruminococcus* erano più alte ( $P < 0.05$ ) nel gruppo B; *Erysipelatoclostridium*, *Bifidobacterium breve* erano più alti nel gruppo O. I neonati sono stati stratificati per esposizione ad alto rischio (HR, n=12) e basso rischio (LR, n=8) a MEP, MibP, MEHHP, MEHP, MBzP, in base alla presenza di almeno 3 su 5 EDC con una concentrazione superiore al relativo valore mediano; non sono state riscontrate differenze nella composizione del microbiota intestinale tra i gruppi.

Il microbiota intestinale è stato quindi studiato retrospettivamente (T0-T2): il confronto tra gruppo O e gruppo B ha determinato una differenza significativa in termini di  $\beta$ -diversità. L'analisi della dimensione dell'effetto discriminante lineare è stata eseguita considerando T0-T3. L'ordine *Bacteroidales*; i generi *Escherichia-Shigella*, *Saccharimonadaceae TM7x*; le specie *Bacteroides vulgata*, *Streptococcus agalactiae* erano rappresentative del gruppo O; *Enterobacteriaceae*, *Proteus*, *Streptococcus intermedius* erano taxa rappresentativi del gruppo B. Allo stesso modo, l'ordine

*Bacteroidales*; i generi *Bifidobacterium*, *Disgonomonas*; le specie *Bacteroides coprocola*, *Libanicoccus* batterio non coltivato, *Streptococcus anginosus* dominavano nel gruppo HR; i generi *Atopobium*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*; le specie non coltivate di *Eggerthella* dominavano nel gruppo LR.

Gli EDCs, inclusi BPA e ftalati, sono una classe di sostanze chimiche che possono interferire con la normale funzione del sistema endocrino, che è responsabile della regolazione di molti processi corporei come la crescita e lo sviluppo, il metabolismo e la riproduzione. Vi sono prove crescenti che l'esposizione agli EDC possa contribuire allo sviluppo dell'obesità e di altre malattie non trasmissibili (NCD), specialmente nella finestra dei "primi 1000 giorni". Un modo in cui gli effetti degli EDC possono contribuire alle malattie è alterando la composizione del microbiota intestinale. Gli studi hanno dimostrato che l'esposizione agli EDC può alterare la composizione del microbiota intestinale, portando a cambiamenti nel metabolismo energetico e aumento di peso. Considerando i primi 1000 giorni, il latte materno è il principale fattore di esposizione agli EDC per i neonati; infatti, alcune di queste molecole vengono metabolizzate e accumulate nel corpo umano e sono state rilevate nel latte materno, oltre che nel siero e nei capelli, e nella placenta. I risultati attuali hanno supportato l'esistenza di una probabilità che alcuni membri del microbiota possano essere coinvolti in processi che portano ad un aumento del rischio di futura insorgenza di malattie non trasmissibili. Il gruppo *Bacteroidia* e, in particolare, *B. vulgatus* ha riportato varie prove sulla sua potenziale relazione positiva con alti livelli di BPA e ftalati. Il concomitante aumento dell'abbondanza di *Bifidobacterium* e *Libanicoccus* nel microbiota intestinale necessita di ulteriori studi sui possibili ruoli nell'agire come biomarcatori di alti livelli di esposizione a EDC. Tuttavia, considerando l'assenza di grandi prove rispetto all'esposizione agli EDC nei primi anni di vita, varie domande sull'asse EDC-microbiota intestinale sono ancora aperte a una risposta e necessitano di ulteriori ricerche per migliorare la conoscenza dei meccanismi che possono essere coinvolti nell'insorgenza di malattie non trasmissibili in età adulta.

The first 1000 days of a child's life, spanning from conception to age 2, are a unique time to lay the foundation for optimal health, growth and development throughout the lifespan. Several studies in the literature demonstrate, in fact, how this period is critical not only for the development of chronic diseases affecting childhood, but also for non-communicable diseases (NCDs) that can occur throughout life. In particular, external factors, including maternal, child and environmental factors, can permanently affect an individual's biological and metabolic development and lead to adaptive pathophysiological changes later in life, such as obesity, type 2 diabetes, cancer, respiratory diseases and neurodegenerative diseases. During this complex phase of life, in addition to prenatal (eg, high prepregnancy body mass index, excessive gestational weight gain, gestational diabetes, exposure to tobacco) and postnatal (eg, high birth weight of the newborn, accelerated weight gain of the newborn) risk factors, there are also environmental factors, such as exposure to pollutants, products containing EDCs, use of drugs, exposure to allergens, the socio-economic status of the family that may affect the health of the child. In particular, EDCs have aroused interest due to the possible association between early exposure to these chemicals and an excessive increase in adiposity. Few studies, however, have reported how EDCs can affect the gut microbiota and can increase the risk of metabolic disorders such as obesity and diabetes. In recent decades, there has been an increasing interest in this class of molecules called Endocrine-Disrupting Chemicals (EDCs), or endocrine disruptors, and their effects on human health. The US Environmental Protection Agency (EPA) has defined EDCs as “exogenous agents capable of interfering with the synthesis, secretion, transport, metabolism, binding action or elimination of hormones naturally present in the blood, found in the body and which are responsible for the homeostasis, reproduction and development process”. This group of chemical compounds is very heterogeneous: some of these compounds are found in nature such as, for example, phytoestrogens, present in plants that have hormonal activity, such as genistein and daidzein; some mushrooms, herbs, legumes and fruits. However, most are synthetic chemicals found in industrial solvents, plastics, plasticizers, fungicides, pesticides, heavy metals and pharmaceutical agents. The sources of exposure to EDCs are numerous and diverse. Exposure occurs by drinking contaminated water, breathing contaminated air, ingesting food, or touching contaminated soil. EDCs can be found in many everyday products including plastic bottles, metal food cans, detergents, flame retardants, foods, toys and cosmetics and include pesticides, fungicides, industrial chemicals, plasticizers, nonylphenols, metals, pharmaceutical agents. Regarding the mechanism of action, they can interfere with endocrine functions, either by directly activating or inactivating endocrine target receptors or

by disrupting hormone synthesis or local control of active to inactive hormones by inhibiting or activating their metabolizing enzymes. Among the various EDCs, of particular interest are BPA and phthalates, widely studied for their role as "obesogenic" factors. Research shows that EDCs may pose the greatest risk during prenatal and early postnatal development when organs and neural systems are forming. Indeed, the fetus, infant, and child may have greater exposure to some of them than adults due to developmentally appropriate differences in diet, behavior, physiology, anatomy, and toxicokinetics. For example, infants and children may have greater exposure to some EDCs than adults because they consume more water and larger amounts of specific foods and have higher ventilation rates, intestinal absorption, surface area to volume ratios, and hand-to-mouth activity. Additionally, breastfed infants may have higher serum concentrations of some persistent EDCs than their mothers due to exposure during breastfeeding. Breast milk is the first food that humans consume, from birth to a recommended minimum of six months, and provides all the necessary nutrients. The presence of these substances in human milk can be influenced by various factors, such as the mother's diet, smoking habits, place of residence, age, maternal weight and others. The discovery of this transmission of EDC from mother to child derives from some scientific studies in which a dosage of EDC was carried out directly in breast milk, detecting the presence of phthalates in it, in particular of the more hydrophobic compounds, including DEHP and diisonyl phthalate (DINP). The detection of these molecules in breast milk has aroused particular concern about the potential negative effects in the short, medium and long term that early exposure to them may have on infant health, such as the alteration of hormonal balance or neurological development and the onset of obesity.

This thesis describes the observational and cross-sectional analysis that is part of one of the secondary objectives of the broader prospective longitudinal project A.MA.MI (Mother and child nutrition in the first thousand days). The A.MA.MI study was carried out at the Laboratory of Dietetics and Clinical Nutrition (Head Prof. Hellas Cena), Department of Public Health, Experimental and Forensic Medicine, University of Pavia and the Neonatology Unit of the IRCCS Foundation Policlinico S. Matteo di Pavia and evaluated the correlation between infant intestinal microbiota composition and maternal/infant lifestyle and environmental factors, including maternal urinary levels of EDCs, from conception to first year of the child's life at different follow-ups (T0, at delivery; T1, one month after delivery; T2, 6 months after delivery; T3, 12 months after delivery). Starting from the assumption that through breast milk there is a vertical transmission of endocrine disruptors from mother to child, the present analysis considered couples whose infants, at

12 months of age, received at least one feed/day (n= 20). In particular, the aim of this observational and cross-sectional analysis was to analyze the association between the infant intestinal microbial pattern 12 months after delivery and the maternal urinary concentrations of Bisphenol A (BPA) and some phthalates, at the same follow-up. This analysis was also retrospectively applied to follow-ups prior to birth (T0), 1 month after delivery (T1) and 6 months after delivery (T2). The present research involved the evaluation of 45 mother-infant dyads who were evaluated at the child's 12 months of age. For each mother, the following were considered: medical history and demographics, including occupation (housewife or other occupation), educational attainment (tertiary vs. non-tertiary education), and presence of chronic disease (yes vs. no); anthropometric parameters; main determinants of daily exposure to EDCs; frequencies of consumption and eating habits.

Furthermore, a urine sample was collected 12 months after delivery for the analysis of the levels of some endocrine disruptors. In particular, the levels of: bisphenol A (BPA); metabolite of diethyl phthalate (DEP), called monoethyl phthalate (MEP); monoisobutyl phthalate (MIbP) as a metabolite of n-butyl phthalate (DnBP); metabolites of di-(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP), such as mono-(2-ethyl-5-hydroxy-hexyl)-phthalate (MEHHP) and mono-(2-ethylhexyl)-phthalate (MEHP); monobenzyl phthalate (MBzP); butylbenzylphthalate (BBP) metabolite. At the same time, the analysis of urinary creatinine levels was also carried out. For each child, the following were taken into consideration: the anthropometric parameters and some postnatal variables, such as the type of diet and the timing of the introduction of complementary foods. For a subset of infants who were breastfed at least once daily up to 12 months of age, gut microbiota composition was assessed by 16S ribosomal subunit analysis and related to maternal exposure to EDCs.

Out of 45 mothers considered at T3, 20 stool samples of infants breastfed at least once/day were analyzed. The relative abundances obtained were correlated with maternal exposure to EDCs. Filtering for significance ( $P < 0.05$ ), BPA correlated positively with the genus *Bacteroides*; MEP was positively associated with *Bacteroides kribbie* and the genus *Lactococcus*. MIbP correlated positively with the genus *Ruminococcaceae-UBA1819* and *Sutterella*. Infants were then divided into group O (maternal BPA levels  $\leq 0.96$   $\mu\text{g/g}$  creatinine; n=8) vs. group B (maternal BPA levels  $\leq 0.96$   $\mu\text{g/g}$  creatinine; n=12). The genus *Ruminococcus torques* was higher ( $P < 0.05$ ) in B-group; *Erysipelatoclostridium*, *Bifidobacterium breve* were higher in the O-group. Infants were stratified for high-risk (HR, n=12) and low-risk (LR, n=8) exposure to MEP, MIbP, MEHHP, MEHP, MBzP,

according to the co-presence of at least 3 out of 5 EDCs with a higher concentration than the related median value; no differences in gut microbiota composition were found between groups.

Gut microbiota was then studied retrospectively (T0-T2): the comparison between O-group vs. B-group determined a significant difference in terms of  $\beta$ -diversity. The Linear Discriminant Effect Size analysis was run considering T0-T3. The order *Bacteroidales*; genera *Escherichia-Shigella*, *Saccharimonadaceae* TM7x; species *Bacteroides vulgate*, *Streptococcus agalactiae* were representative of O-group; *Enterobacteriaceae*, *Proteus*, *Streptococcus intermedius* were representative taxa of B-group. Similarly, the order *Bacteroidales*; genera *Bifidobacterium*, *Dysgonomonas*; species *Bacteroides coprocola*, *Libanicoccus uncultured bacterium*, *Streptococcus anginosus* dominated in HR- group; the genera *Atopobium*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*; uncultured species of *Eggerthella* dominated in LR-group.

EDCs, including BPA and phthalates, are a class of chemicals that can interfere with the normal function of the endocrine system, which is responsible for regulating many bodily processes such as growth and development, metabolism, and reproduction. There is growing evidence that EDCs exposure may contribute to the development of obesity, and other NCDs, especially in the “First 1000 days” window. One way the EDCs’ effects may contribute to diseases is by altering the composition of the gut microbiota. Studies have shown that exposure to EDCs can alter the composition of the gut microbiota, leading to changes in energy metabolism and weight gain. Considering the first 1000 days, breast milk is the major exposure factor to EDCs for newborns; indeed, some of these molecules are metabolized and accumulated in the human body and have been detected in the mother’s milk, as well as in serum and hair, and in the placenta. The present results supported the existence of a probability that some microbiota members can be involved in processes leading to an increase in the risk of future NCDs onset. *Bacteroidia* and, particularly, *B. vulgatus* group reported various evidence about its potential positive relationship with high BPA and phthalates levels. The concomitant increase of *Bifidobacterium* and *Libanicoccus* abundance in gut microbiota needs further studies about possible roles in acting as biomarkers of high EDCs exposure levels. However, considering the absence of great evidence with respect to EDCs exposure in the first years of life, various questions about the EDCs-gut microbiota axis are still open to answer and need further research to improve knowledge of the mechanisms that may be involved in the NCDs onset in adulthood.

# 1. INTRODUZIONE

## 1.1 I primi 1000 giorni

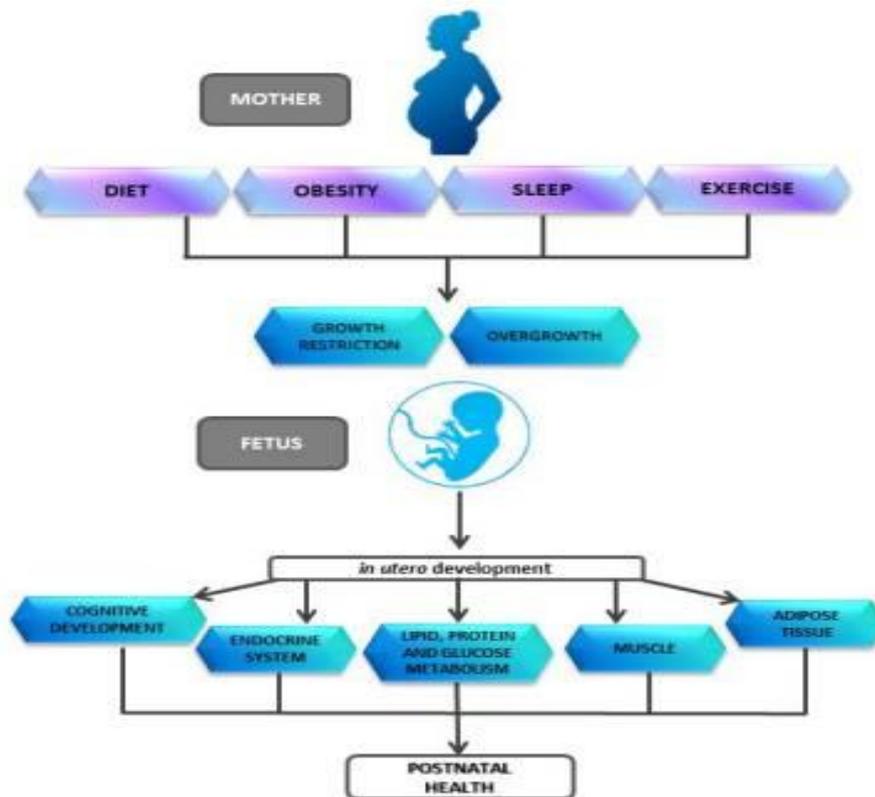
I primi 1000 giorni di vita di un bambino, che vanno dal momento del concepimento fino ai 2 anni di età, sono un periodo unico in cui si gettano le basi per una salute, una crescita e uno sviluppo ottimali per tutta la durata della vita (*Brines J, et al., 2022; Georgiadis A, et al., 2022*). I primi 1000 giorni racchiudono sia grandi possibilità che grandi fragilità nella vita di un bambino (*Likhar A, et al., 2022*) in quanto è un periodo di rapida crescita e sviluppo neurologico, di elevate esigenze nutrizionali e di elevata sensibilità agli effetti della programmazione e, di conseguenza, è anche un periodo di grande vulnerabilità (*Martorell R, 2017*). Diversi studi presenti in letteratura dimostrano infatti come questo periodo sia critico non solo per lo sviluppo di malattie croniche riguardanti l'infanzia, ma di patologie non trasmissibili (Non-Communicable diseases, NCDs) che si possono manifestare lungo tutto l'arco della vita (*Hoffman DJ, et al., 2017*). In particolare, i fattori esterni, comprendenti fattori materni, infantili e ambientali, possono influire in modo permanente sullo sviluppo biologico e metabolico dell'individuo e portare ad alterazioni fisiopatologiche adattive più avanti nella vita, come lo sviluppo di NCDs, quali obesità, diabete di tipo 2, cancro, malattie respiratorie e patologie neurodegenerative (*Mameli C, et al., 2016; Hoffman DJ, et al., 2017*). Il legame tra ambiente intrauterino e rischio di malattia in età adulta è stato studiato per la prima volta negli anni '80, dimostrando che vi era una maggiore mortalità per malattie cardiovascolari nei neonati con basso peso alla nascita, dato poi confermato da studi che hanno trovato anche un'associazione tra basso peso alla nascita e un aumentato rischio di obesità, diabete mellito di tipo 2 e ipertensione (*Tarry-Adkins JL, et al., 2011; Lillycrop KA, et al., 2012; Wang G, et al., 2013*). Sulla base di questi risultati, Barker ha proposto l'ipotesi del "thrifty phenotype hypothesis", nota anche come "ipotesi di Barker" (*Hales CN, et al., 2001*), riportando che l'esposizione a un'alimentazione inadeguata durante la gravidanza e l'infanzia predispone la prole allo sviluppo del diabete mellito di tipo 2. L'ulteriore sviluppo di questa ipotesi ha dato origine alla "the theory of the origin of health and disease" (The Developmental Origins of Health and Disease, DOHaD) (*Lee HS, 2015; Wang G, et al., 2013; Fall CHD, 2013*), stabilendo che il feto ha la capacità di effettuare adattamenti basati su segnali provenienti dall'ambiente in utero, consentendo così di migliorare la sopravvivenza immediata in un ambiente postnatale avverso. Se gli adattamenti in utero non sono corretti o si verificano cambiamenti significativi nell'ambiente dopo la nascita, si causerebbe una discrepanza tra la programmazione prenatale e la vita postnatale e, quindi, indurrebbe un aumento del rischio di malattia in età adulta (*Vickers MH, 2014*).

## 1.2 Esposizione a fattori materni e infantili durante i primi 1000 giorni

Le evidenze scientifiche confermano che gli eventi che si verificano nelle prime fasi della vita svolgono un ruolo fondamentale nel favorire lo sviluppo di malattie croniche durante tutto il corso della vita, indicando l'elevata rilevanza dell'impatto "dell'ambiente materno" sulla vita del futuro bambino (Mameli C, et al., 2016; Cena H, et al., 2018). Durante questa complessa fase della vita ci sono numerosi fattori di rischio prenatali (p. es., indice di massa corporea pre-gravidanza elevato, eccessivo aumento di peso gestazionale, diabete gestazionale, esposizione al tabacco) e post-natali (p. es., elevato peso alla nascita del neonato, aumento accelerato del peso del neonato) (Woo Baidal JA, et al., 2016) che possono portare ad un aumentato rischio di patologie cardiometaboliche da parte del nascituro (Pietrobelli A, et al., 2017). In particolare, una dieta inadeguata, che non fornisce i principali nutrienti nella giusta quantità durante la gravidanza, può alterare in modo irreversibile le funzioni cerebrali e il comportamento della prole. In questo senso Coo e colleghi (Coo H, et al., 2019) hanno riportato modeste associazioni tra obesità materna e quoziente di intelligenza delle prestazioni della prole, con un debole effetto biologico dell'adiposità materna in gravidanza sul quoziente di intelligenza delle prestazioni della prole. In questo caso, i meccanismi sottostanti possono essere spiegati perché il sovrappeso in gravidanza aumenta le concentrazioni di insulina, interleuchina-6 e leptina e il trasferimento placentare di glucosio che aumenta il rischio di disturbi neurocomportamentali, inducendo una funzione metabolica materna disturbata, che potrebbe aumentare il rischio di sviluppare disturbi comportamentali nei bambini (Rodriguez A, 2020; Grissom NM et al., 2013). Anche la malnutrizione durante la gravidanza può avere effetti sul feto e provocare un ritardo della crescita intrauterina, inducendo un basso peso alla nascita ed effetti dannosi sullo sviluppo e sul successivo funzionamento degli organi, che interessano il sistema renale, cardiovascolare, respiratorio ed endocrino (Salam RA, et al., 2014; Bacchetta J, et al., 2009; Visentin S, et al., 2013). L'obesità materna potrebbe indurre una situazione critica nota come "eccessiva nutrizione fetale" (Fall CHD, 2013), che aumenta il rischio di obesità e complicanze nella prole. Ci sono molti studi sugli animali e studi osservazionali sugli esseri umani, che supportano questa ipotesi (Fall CHD, 2013; Godfrey KM, et al., 2017; Woo Baidal JA, et al., 2016; Bianco ME, et al., 2019). Sono state identificate associazioni coerenti (Woo Baidal JA, et al., 2016) tra aumento dell'adiposità nella prole con indice di massa corporea materno prima della gravidanza, aumento del peso gestazionale, diabete gestazionale e peso eccessivo alla nascita. Tra i fattori materni è stato suggerito che un'attività fisica moderata sia necessaria per prevenire possibili disturbi metabolici nella prole e

possa anche avere una correlazione positiva con il neurosviluppo e il linguaggio della prole. In questo modo, l'esercizio può prevenire le anomalie della placenta, una delle cause alla base della preeclampsia che porta alla diminuzione della perfusione cellulare e all'ipossia placentare.

Anche la durata e la qualità del sonno materno hanno un impatto sulla prole; infatti i disturbi del sonno durante la gravidanza possono essere dannosi sia per la madre che per la prole promuovendo un aumento del rischio a livello comportamentale, elettrofisiologico, metabolico ed epigenetico e sono associati ad alcuni cambiamenti ormonali, tra cui: aumento dei livelli di progesterone, aumento dei livelli di estrogeni, alterazioni nella secrezione di cortisolo, alterazioni nei livelli di prolattina (*Pires GN, et al., 2020; Parra O, et al., 2015*) (Fig. 1). Inoltre, l'esposizione al fumo di sigaretta in utero espone il feto a un rischio maggiore di esiti avversi per la salute, inclusa la limitazione della crescita (*Orleans CT, et al., 2009; Kramer MS, 1987*). Anche l'alimentazione del bambino durante i suoi primi 1000 giorni di vita rappresenta un fattore in grado di influenzare lo sviluppo. I bambini che ricevono una corretta alimentazione nei primi 1000 giorni hanno un rischio ridotto di sviluppare una serie di malattie e disturbi, come l'obesità e il diabete di tipo 2 e beneficiare di una migliore salute. Anche i fattori ambientali, quali l'esposizione ad inquinanti, prodotti contenenti interferenti endocrini (Endocrine-Disrupting Chemicals, EDCs), l'utilizzo di farmaci, l'esposizione ad allergeni, lo stato socio/economico della famiglia (*Monasta L, et al., 2010; Ribeiro CM, et al., 2020*) possono influenzare la salute del bambino. In particolare, gli EDCs hanno suscitato un interesse a causa della possibile associazione tra una precoce esposizione a queste sostanze chimiche e un aumento eccessivo dell'adiposità. La revisione sistematica condotta da Ribeiro e colleghi ha preso in esame studi che valutavano l'esposizione a differenti molecole, quali il bisfenolo A (BPA), gli idrocarburi policiclici aromatici (IPA), i parabeni, le sostanze polifluoroalchiliche, l'acido benzoico e altre. Complessivamente, è risultato che l'esposizione agli EDCs rappresenta un potenziale rischio di aumento di peso corporeo, sottolineando quindi l'importanza di ridurre l'esposizione a queste sostanze chimiche (*Ribeiro CM, et al., 2020*). Tutti i fattori sopraelencati possono contribuire a modulare lo sviluppo dell'individuo, rappresentando quegli elementi su cui è possibile intervenire attraverso strategie di prevenzione (*Raspini B, et al., 2020*).



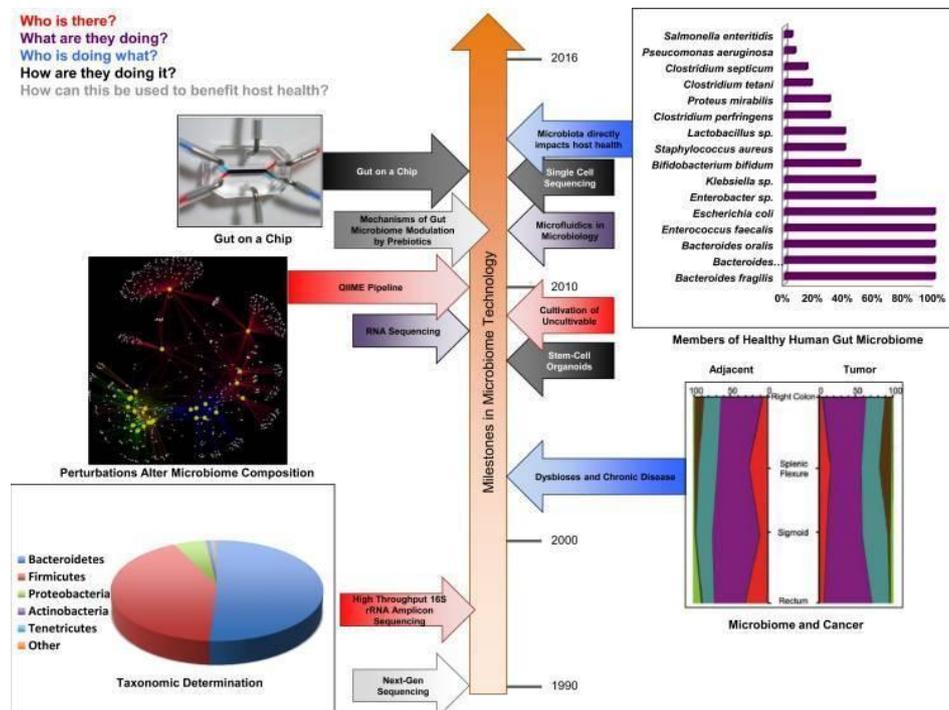
**Figura 1.** Influenza di diversi fattori sullo sviluppo della prole (Moreno-Fernandez J, et al.,2020).

### 1.3 Microbiota intestinale

A partire dai primi istanti di vita, il corpo umano è colonizzato da un'ampia varietà di microrganismi (Dominguez-Bello MG, et al., 2010; Borre YE, et al., 2014) che coesistono con l'ospite per scopi di mutuo beneficio (Milani C, et al., 2017). Questi microrganismi colonizzano la pelle e varie cavità della mucosa (orale, nasale, vaginale e polmonare), tuttavia la maggior parte di essi si trova all'interno del tratto gastrointestinale (GI) e viene definita microbiota intestinale (Ursell LK, et al., 2012) che è un denso ecosistema dominato dai batteri (Derrien M, et al., 2019) e ha uno straordinario potenziale metabolico, svolgendo un ruolo fondamentale nella salute umana (De Vos W, et al., 2012). Gli esseri umani sono associati in una relazione simbiotica con un massimo di  $10^{14}$  microrganismi (Savage DC, 1977). Il microbiota intestinale migliora la risposta dell'ospite all'invasione di agenti patogeni (Kau AL, et al., 2011), modula l'espressione genica dell'ospite e la risposta immunitaria e, in ultima analisi, influisce sulla salute generale (Sobhani I, et al., 2011; Carding S, et al., 2015; Kabeerdoss J, et al., 2015). Le perturbazioni della composizione del microbiota (disbiosi) sono state associate a malattie tra cui obesità (Shen J, et al., 2013), diabete (Naseer MI, et al., 2014), cancro del colon-retto (Azcarate-Peril MA, et al., 2013) e allergie (Panzer AR, et al., 2015).

Human Microbiome Project (HMP) e Metagenomics of the Human Intestinal Tract (MetaHIT) sono stati i primi progetti incentrati sul microbiota umano su larga scala, grazie ai quali sono state definite la composizione e le funzioni del microbiota di un soggetto sano. Questi studi hanno rappresentato la base per la comprensione del ruolo delle comunità microbiche associate all'ospite, sia nella salute che nella malattia. Grazie all'introduzione di nuove tecniche, quali il sequenziamento di nuova generazione (Next Generation Sequencing, NGS), il sequenziamento shotgun dell'intero genoma (Whole Genome Sequencing, WGS), le analisi metabolomiche e le strategie computazionali avanzate, insieme ai progressi effettuati a livello delle tecnologie di coltura, come l'introduzione di modelli animali gnotobiotici umanizzati e sistemi organoidi umani basati sulla coltura, la comprensione del microbioma sta rapidamente progredendo (Ruan W, et al., 2020; Arnold JW, et al., 2016) (Fig.2). Nel 2012, lo Human Microbiome Consortium (HMC) mediante l'uso del sequenziamento dell'rRNA 16S (Caporaso JG, et al., 2010), ha mostrato che i taxa microbici dominanti nell'intestino umano sono principalmente batteri anaerobici che includono *Proteobacteria* ma anche un numero limitato di *Archaea*, virus, protozoi e funghi. *Bacteroidetes* e *Firmicutes* rappresentano circa il 90% delle popolazioni batteriche individuate a livello intestinale, mentre il restante 10% è costituito principalmente da *Actinobacteria* e *Proteobacteria*. Il phylum *Firmicutes* è rappresentato da più di

200 generi differenti, tra i quali citiamo: *Lactobacillus*, *Bacillus*, *Enterococcus*, *Ruminococcus* e *Clostridium*. Tra questi il genere *Clostridium* rappresenta il 95% del phylum di cui fa parte. Il phylum *Bacteroidetes* consiste essenzialmente in due generi predominanti, *Bacterioides* e *Prevotella*. Il phylum *Actinobacteria* è proporzionalmente meno abbondante ed è rappresentato principalmente dal genere *Bifidobacterium* (Iebba V, et al., 2016; Carbone EA, et al., 2020; Rinninella E, et al., 2019).

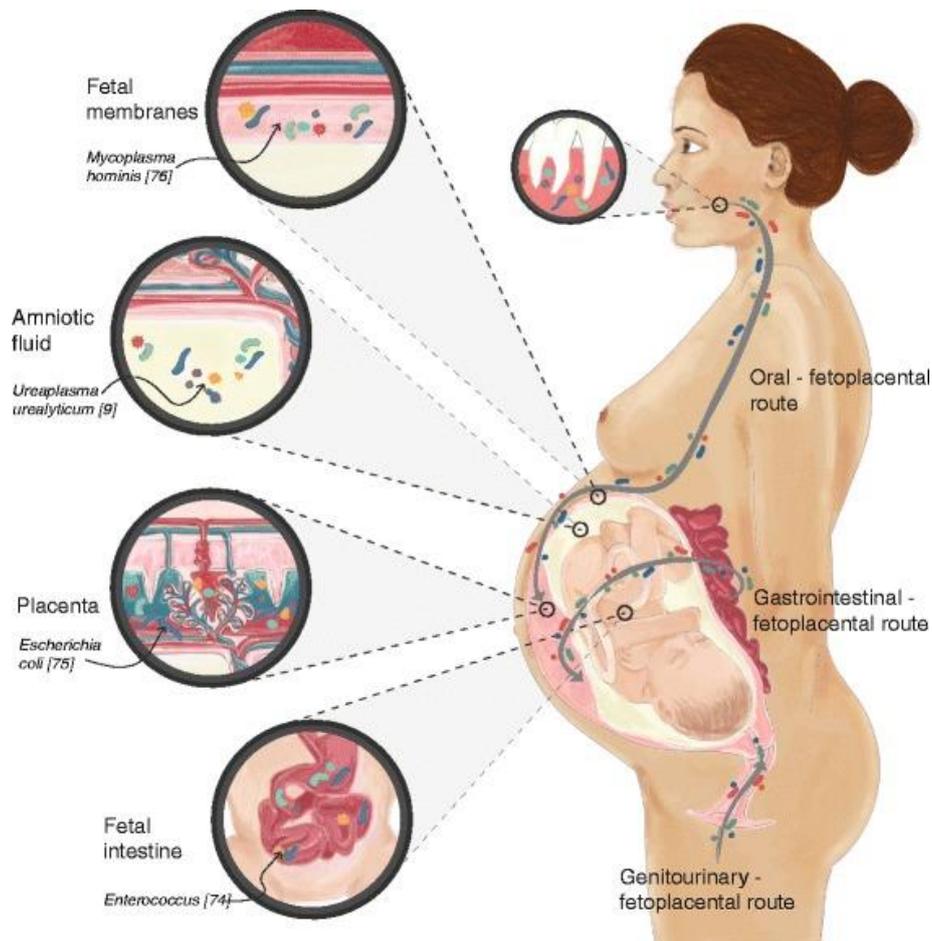


**Figura 2.** Cronologia dei principali progressi negli studi sul microbiota intestinale. La ricerca incentrata sul sequenziamento di nuova generazione a basso costo e ad alto rendimento ha iniziato a emergere negli ultimi 10 anni. Questi progressi hanno fornito l'opportunità di studiare comunità complesse e il loro impatto sulla salute dell'ospite, e il culmine di queste tecnologie sta guidando il campo verso un futuro di medicina personalizzata (Arnold JW, et al., 2016).

Lo sviluppo del microbiota intestinale è regolato da una complessa interazione tra l'ospite e i fattori ambientali, tra cui la dieta e lo stile di vita (Rothschild D, et al., 2018). Si ritiene che la composizione del microbiota intestinale si assesti in gran parte dopo la nascita, influenzata da eventi della prima infanzia come la modalità del parto (Dominguez-Bello MG, et al., 2010), l'alimentazione della prima infanzia (Pannaraj PS, et al., 2017), e l'esposizione agli antibiotici (Dierikx T, et al., 2020). Prove

emergenti suggeriscono, inoltre, che la colonizzazione dei microrganismi nel corpo umano durante la prima infanzia gioca un ruolo fondamentale nella creazione e nella maturazione dei percorsi di sviluppo e che l'interruzione di questa successione microbica ottimale può contribuire a deficit permanenti e intergenerazionali nella crescita e nello sviluppo (*Tamburini S, et al., 2016*).

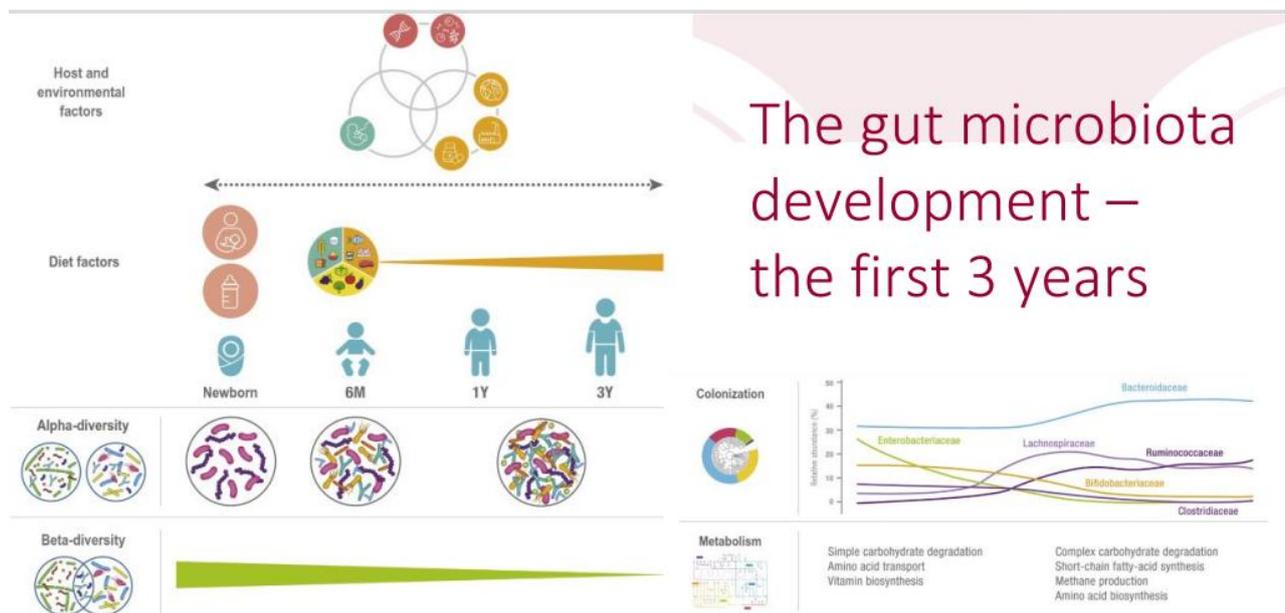
Il processo di colonizzazione batterica è un fenomeno complesso che inizia nell'utero; storicamente si è pensato che il feto e l'ambiente intrauterino fossero sterili. Secondo questo concetto, che è stato indicato come il paradigma dell'utero sterile (*Funkhouser LJ, et al., 2013*), i microrganismi vengono acquisiti sia verticalmente (dalla madre) che orizzontalmente (da altri esseri umani o dall'ambiente) durante e dopo la nascita. Tuttavia, ora c'è una moltitudine di studi recenti che impiegano moderne tecnologie di sequenziamento che hanno sfidato la visione tradizionale dell'acquisizione del microbioma umano. Questi studi suggeriscono che né il feto, né la placenta, né il liquido amniotico sono sterili e che l'acquisizione e la colonizzazione del tratto gastrointestinale umano inizia in utero (*Jiménez E, et al., 2008; Aagaard K, et al., 2014; Collado MC, et al., 2016*). Per quanto riguarda le modalità di colonizzazione microbica durante la gravidanza, sono stati ipotizzati meccanismi distinti. Il primo consiste in un'ascensione verticale dei batteri dalla vagina e/o dal tratto urinario verso l'utero materno, mentre il secondo meccanismo consiste in una traslocazione per via ematica attraverso la placenta o tramite il trasporto attivo da parte delle cellule del sistema immunitario dei microrganismi derivanti dal tratto digestivo, ovvero dall'intestino o dalla cavità orale (Fig. 3) (*Kapourchali FR, et al., 2020; Perez- Muñoz ME, et al., 2017*).



**Figura 3.** Il microbioma fetoplacentare di una gravidanza sana e le sue origini. I batteri e i loro geni sono stati isolati dalla placenta umana, dal liquido amniotico, dalle membrane fetali e dal tratto gastrointestinale fetale in gravidanze sane e normali. Questi batteri hanno tre principali vie di ingresso: la via oro-fetoplacentare, la via gastrointestinale-fetoplacentare e la via genitourinario-fetoplacentare. Sono indicati esempi di batteri specifici (Kuperman AA, et al., 2016).

Anche se la colonizzazione batterica intestinale inizia quando il feto si trova nella parte inferiore dell'utero, il microbiota intestinale di un bambino viene stabilito dopo la nascita. La creazione di un microbiota intestinale stabile generalmente accompagna due grandi transizioni nell'infanzia. La prima transizione avviene subito dopo la nascita, durante l'allattamento, e determina un microbiota dominato da *Enterobacteriaceae* e *Staphylococcus* (Matsuki T, et al., 2016). Successivamente, il microbiota intestinale di un neonato è dominato dal *Bifidobacterium* e da alcuni batteri dell'acido lattico (Mitsuoka T, 2014). Il microbiota dominato dal *Bifidobacterium*, chiamato "Bifidus flora", viene mantenuto fino all'introduzione del cibo solido (Vallès Y, et al., 2014; Palmer C, et al., 2007) dove si ha la seconda transizione, con l'introduzione di alimenti solidi e la prosecuzione dell'allattamento

al seno, (Bergström A, et al., 2014; Mitsuoka T, 2014; Bäckhed F, et al., 2015; Dogra S, et al., 2015; Dogra S, et al., 2015) e si traduce in un microbiota formato dai microrganismi di tipo adulto, rappresentati principalmente da batteri dei generi *Bacteroides*, *Prevotella*, *Ruminococcus*, *Clostridium* *Veillonella*, che colonizzano l'intestino di un neonato (Vallès Y, et al., 2014). Alla fine, a circa tre anni di età, si stabilisce un tipico microbiota intestinale di tipo adulto (Yatsunenko T, et al., 2012) (Fig.4).



**Figura 4.** Riepilogo dello sviluppo del microbiota nei primi 3 anni di vita. La diversità alfa batterica e la complessità funzionale aumentano con l'età, mentre le variazioni interindividuali (diversità beta) diminuiscono (Derrien M, et al., 2019).

## 1.4 Fattori che influenzano il microbiota intestinale

Ci sono diversi fattori in grado di influenzare lo sviluppo e la maturazione del microbiota intestinale. Questi comprendono fattori perinatali legati all'ospite e fattori esterni. Tra i fattori che possono modulare la composizione del microbiota intestinale materno e di conseguenza avere un impatto sul microbiota del feto e successivamente del neonato sono: le abitudini alimentari della mamma, il suo BMI (Body Mass Index o IMC, Indice di Massa Corporea) e l'aumento di peso durante la gravidanza. In particolare, l'eccessivo aumento di peso durante la gravidanza è noto per essere uno dei fattori materni che influenzano la composizione microbica intestinale del neonato dal parto fino all'età adulta (*Stanislowski MA, et al., 2017*). Diversi studi hanno evidenziato una differente composizione microbica tra bambini nati da madri affette da obesità e neonati di madri normopeso, rilevando un aumento dei livelli di *Clostridium* e *Staphylococcus* e una diminuzione di *Bifidobacterium* in coloro che erano nati da madri in sovrappeso o affette da obesità. Queste differenze potrebbero influire negativamente sullo stato di salute della madre e del bambino, favorendo la trasmissione di un microbiota "obesogeno" (*Singh S, et al., 2017; Santacruz A, et al., 2010; Collado MC, et al., 2010*). Oltre alla presenza di obesità nella madre, anche un aumento di peso eccessivo durante la gravidanza può contribuire allo sviluppo di obesità tramite un meccanismo che prevede il coinvolgimento del microbiota intestinale. Infatti, è stato dimostrato che i bambini nati da madri caratterizzate da un elevato aumento di peso durante il periodo gestazionale hanno una ridotta ricchezza microbica e una ridotta abbondanza relativa dei microrganismi dominanti e quindi una lieve complessità individuale del microbiota intestinale (*Robinson A, et al., 2017; Dreisbach C, et al., 2020*). Un altro fattore importante e consolidato che influenza la composizione microbica intestinale del neonato sono le abitudini alimentari materne durante la gravidanza (*Myles IA, et al., 2019; Ma J, et al., 2014*) e ci sono prove evidenti che un'alimentazione non corretta prima e durante la gestazione influenzi la gravidanza, il parto, gli esiti infantili, tra cui lo sviluppo e la crescita dell'embrione e successivamente del feto (*Grech A, et al., 2021*). Un altro elemento determinante che influisce sullo sviluppo del microbiota intestinale è rappresentato dall'età gestazionale al momento del parto. Nello specifico, un neonato viene definito pretermine quando nasce prima della 37a settimana di gestazione. La condizione di prematurità è un fattore di rischio per la morbilità e la mortalità infantile, che può portare a numerosi effetti negativi, che differiscono in base al grado di prematurità (*Ruiz L, et al., 2016*). Diversi studi hanno dimostrato una differente composizione del microbiota intestinale nei bambini nati a termine e in coloro che sono prematuri, in quanto in questi ultimi si assiste a una mancata crescita naturale del microbiota intestinale e ad una colonizzazione da parte di batteri nosocomiali che presentano geni di resistenza

agli antibiotici (Kumbhare SV, et al., 2019). Quello che si osserva tendenzialmente nei bambini nati precocemente è un arricchimento in batteri opportunisti e potenzialmente patogeni, quali *Enterobacter*, *Enterococcus* e *Staphylococcus* (Korpela K, et al., 2018). Diversi studi hanno identificato la presenza di diversi profili microbici intestinali tra i bambini nati per via vaginale e quelli nati con taglio cesareo, con una minore ricchezza e diversità di microbioma tra i bambini nati da taglio cesareo elettivo rispetto a quelli nati per via vaginale (Masukume G et al., 2018). In particolare, è interessante notare che il microbiota intestinale di un neonato assomiglierà molto al microbiota che ha incontrato durante la nascita. Nei neonati con parto vaginale, il microbiota intestinale assomiglia al microbiota vaginale delle loro madri, che è dominato da *Lactobacillus*, *Prevotella* o *Sneathia*, mentre il microbiota dei bambini nati con taglio cesareo è molto simile al microbiota cutaneo, che è dominato da *Staphylococcus*, *Corynebacterium* e *Propionibacterio*. Inoltre, gli stessi studi hanno dimostrato che i bambini nati con taglio cesareo elettivo presentavano una diversità batterica particolarmente bassa (Azad MB, et al., 2013) e quindi il parto cesareo è stato associato ad un aumentato rischio di disturbi immunitari come rinite allergica, asma e malattia celiaca (Decker E, et al., 2011; Marcobal A, et al., 2010; Renz-Polster H, et al., 2005). La colonizzazione del microbiota intestinale dei neonati è modulata anche dal tipo di alimentazione del bambino stesso, per cui varia a seconda che il neonato sia allattato al seno, piuttosto che assuma latte in formula. Grazie agli effetti positivi del latte materno, l'allattamento al seno viene considerato come il gold standard per la nutrizione infantile. Infatti, l'OMS raccomanda l'allattamento esclusivo al seno fino al sesto mese di vita; inoltre, il latte materno dovrebbe essere assunto anche in seguito all'introduzione di alimenti complementari, fino ai due anni di età e oltre (Ministero della salute, 2021). Inizialmente si pensava che il latte materno fosse sterile e che i batteri che venivano isolati fossero contaminanti della pelle della madre e della cavità orale del bambino, ma successivamente, le evidenze scientifiche hanno dimostrato che il latte materno è distinto dalla presenza di un suo specifico microbiota. I principali generi isolati nel latte materno sono: *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Weissella*, alcune specie di *Bifidobacterium*, *Pseudomonas*, *Veillonella*, *Leptotrichia* e *Prevotella* (Fitzstevens JL, et al., 2016; Lyons KE, et al., 2020). È stato ipotizzato che i batteri presenti nel latte materno raggiungano l'intestino del neonato attraverso una trasmissione verticale dalla madre, svolgendo quindi un ruolo fondamentale per la colonizzazione batterica intestinale del bambino dopo la nascita. Nello specifico, è stato stimato che il latte materno contenga diverse centinaia di specie batteriche a concentrazioni di circa 1.000 unità formanti colonia (UFC) /ml e che i bambini allattati al seno ingeriscano fino a  $8 \times 10^5$  batteri ogni giorno (Fehr K, et al., 2020;

*Fernández L, et al., 2020*). La modalità con cui si stabilisce il microbiota del latte materno non è chiara. È stata presentata l'ipotesi della via enteromammaria, che propone una colonizzazione selettiva della ghiandola mammaria da parte delle cellule del sistema immunitario. Questa traslocazione fisiologica potrebbe avvenire attraverso diversi meccanismi, tra i quali la migrazione dei batteri del microbiota intestinale materno verso le ghiandole mammarie attraverso una via cellulare endogena, ad opera di cellule dendritiche e cellule CD18+ che assorbono i batteri non patogeni dal lume intestinale e li trasportano in altri distretti del corpo tramite la circolazione linfatica e sanguigna (*Le Doare K, et al., 2018; Korpela K, et al., 2018; Nyangahu DD, et al., 2019; Rautava S, 2020*). Un'altra ipotesi consiste nella contaminazione del latte materno ad opera dei microrganismi della pelle o da parte di altre fonti microbiche ambientali, in quanto i principali costituenti del microbiota del latte umano, che sono stati isolati maggiormente dai campioni di latte, sono specie anaerobiche facoltative o prevalentemente aerobiche (*Streptococcus* e *Staphylococcus*), insieme a gruppi batterici cutanei o ambientali (*Propionibacterium* e generi della famiglia *Enterobacteriaceae*) (*Biagi E, et al., 2017*). Quindi i bambini allattati al seno hanno un microbioma costituito prevalentemente da *Lactobacillus*, *Staphylococcus* e *Bifidobacterium*, mentre i bambini alimentati con latte artificiale hanno un microbioma coerente con *Roseburia*, *Clostridium* e *Anaerostipes* (*Ihekweazu FD, et al., 2018; Bäckhed F, et al., 2015*). La cessazione dell'allattamento al seno induce cambiamenti marcati. Il microbioma di un bambino di un anno che interrompe l'allattamento al seno si evolve verso uno più simile a quello dell'adulto ed è costituito da microbi che degradano le fibre alimentari e producono acidi grassi a catena corta (SCFA) (*Bäckhed F, et al., 2015*). I neonati nutriti con latte artificiale possono avere una maturazione più rapida del loro microbioma rispetto a quello di un adulto, ed è stato dimostrato che hanno più organismi associati all'infiammazione (*Ihekweazu FD, et al., 2018*). Anche l'uso materno di antibiotici durante la gravidanza è stato associato ad alterazioni del microbioma materno ed è accompagnato da squilibri nell'ecosistema batterico neonato, aumentando il rischio infantile di sviluppare allergie, otite media e obesità (*Romano-Keeler J, et al., 2022*). Le evidenze scientifiche riportano, inoltre, un'elevata suscettibilità allo sviluppo di sovrappeso e di obesità infantile in seguito all'esposizione al fumo di tabacco durante il periodo fetale e la prima infanzia. Nello specifico, il fumo materno è correlato a un basso peso alla nascita del bambino con un conseguente veloce recupero della crescita che può portare allo sviluppo di obesità. L'esposizione al fumo di tabacco, così come a diversi tipi di inquinanti ambientali, induce una condizione di disbiosi intestinale, la quale compromette lo sviluppo infantile, rappresentando un fattore di rischio per disturbi di tipo neurologico, malattie respiratorie e infezioni, insieme al

sovrappeso. Nei figli di madri fumatrici è possibile osservare una maggiore abbondanza di *Enterobacteriaceae* nel meconio e un'elevata presenza di *Bacteroides* e *Staphylococcus* a 6 mesi di età. Pochi studi, invece, hanno riportato come gli EDCs possono avere effetto sul microbiota intestinale e possono aumentare il rischio di disturbi metabolici come l'obesità e il diabete (*Gálvez-Ontiveros Y, et al., 2020*). È stato dimostrato che l'esposizione agli EDCs interrompe il microbioma, il che può provocare disbiosi e l'induzione di percorsi correlati a xenobiotici, geni associati al microbioma, enzimi e produzione di metaboliti, che possono svolgere un ruolo cruciale nella biotrasformazione dell' EDCs (*Velmurugan G, et al., 2017*). I prodotti e i sottoprodotti rilasciati in seguito al metabolismo microbico degli EDCs possono essere assorbiti dall'ospite, avendo quindi un impatto sulla sua salute e sullo sviluppo di malattie (*Claus SP et al., 2016*).

## 1.5 Interferenti Endocrini (Endocrine Disruptors Chemicals, EDCs)

Negli ultimi decenni è cresciuto sempre di più l'interesse nei confronti di una classe di molecole che prendono il nome di Endocrine-Disrupting Chemicals (EDCs), o interferenti endocrini, e dei loro effetti sulla salute umana (Zoeller RT et al., 2012). La US Environmental Protection Agency (EPA) ha definito gli EDCs come “agenti esogeni in grado di interferire con la sintesi, la secrezione, il trasporto, il metabolismo, l'azione legante o l'eliminazione degli ormoni naturalmente presenti nel sangue, che si trovano nel corpo e che sono responsabili dell'omeostasi, della riproduzione e del processo di sviluppo” (United States Environmental Protection Agency, EPA; Diamanti-Kandarakis E, et al., 2009). Questo gruppo di composti chimici è molto eterogeneo: alcuni di questi composti sono riscontrabili in natura come, ad esempio, i fitoestrogeni presenti nelle piante che hanno attività ormonali, come la genisteina e la daidzeina, che si trovano nei prodotti a base di soia come il tofu o il latte di soia (Patisaul HB, et al., 2010); alcuni funghi, erbe, legumi e frutti. Tuttavia la maggior parte sono sostanze chimiche di sintesi riscontrabili in solventi industriali, materie plastiche, plastificanti, fungicidi, pesticidi, metalli pesanti e agenti farmaceutici (Elobeid MA, et al., 2008; Di Napoli I, et al., 2021; Diamanti-Kandarakis E, et al., 2009; Damstra T, 2002).

Le fonti di esposizione agli EDCs sono numerose e diverse e la situazione è in continua evoluzione perché alcuni EDCs sono stati vietati decenni fa mentre altri più recentemente, con differenze significative tra i paesi. Le aree industrializzate sono tipicamente caratterizzate dalla contaminazione da un'ampia gamma di prodotti chimici industriali che possono filtrare nel suolo e nelle acque sotterranee. Queste miscele complesse entrano nella catena alimentare e si accumulano negli animali più in alto nella catena alimentare come gli umani. L'esposizione avviene bevendo acqua contaminata, respirando aria contaminata, ingerendo cibo o contattando il suolo contaminato (Diamanti-Kandarakis E, et al., 2009). Gli effetti tossici degli EDCs hanno portato alla restrizione del loro uso nei paesi in cui le prove di un'ampia esposizione sono ampie (Knez J, 2013). In alcuni paesi occidentali è stato vietato l'uso di alcuni EDCs, come i bifenili policlorurati o gli eteri di difenile polibromurati. Tuttavia, in alcuni casi l'esposizione umana è inevitabile, poiché tali sostanze chimiche sono utilizzate in numerose occupazioni e/o sono ampiamente disperse nell'ambiente. Delle migliaia di prodotti chimici fabbricati, si stima che circa 1000 possano avere proprietà ad azione endocrina (Gore AC, et al., 2014). Ad esempio, le diossine sono un sottoprodotto della produzione di erbicidi, dello sbiancamento della carta o della combustione dei rifiuti, mentre il perclorato è un prodotto secondario dell'industria aerospaziale, delle armi e farmaceutica che si trova frequentemente

nell'acqua potabile (*Rathoure AK, 2018; Maffini M, et al., 2016*). Gli EDCs possono trovarsi in molti prodotti di uso quotidiano, tra cui bottiglie di plastica, lattine per alimenti in metallo, detersivi, ritardanti di fiamma, alimenti, giocattoli e cosmetici e comprendono pesticidi, fungicidi, prodotti chimici industriali, plastificanti, nonilfenoli, metalli, agenti farmaceutici (*Nadal M, et al., 2013*). Per quanto riguarda il meccanismo di azione, gli EDCs possono interferire con le funzioni endocrine, attivando o inattivando direttamente i recettori bersaglio endocrini o interrompendo la sintesi degli ormoni o il controllo locale degli ormoni da attivi a inattivi inibendo o attivando i loro enzimi metabolizzanti. I bersagli classici degli EDCs sono i recettori nucleari come i recettori degli estrogeni (ER), i recettori degli androgeni (AR), i recettori dei mineralcorticoidi (MR), i recettori del progesterone (PR), i recettori dei glucocorticoidi (GR), i recettori della tiroide (TR) e i recettori attivati dal proliferatore del perossisoma (PPAR) (*Yang FJ, et al., 2015; Kapur P, et al., 2010*). Inoltre, gli studi dimostrano la capacità di questi composti di agire sugli enzimi che metabolizzano gli ormoni e di influenzare le risposte dei recettori nucleari alterando la disponibilità di ormoni attivi (*Giulivo M, et al., 2016*).

## 1.6 Bisfenolo A e ftalati

Tra i vari EDCs, di particolare interesse ci sono il Bisfenolo A (BPA) e gli ftalati, ampiamente studiati per il loro ruolo di fattori “obesogenici” (*Filardi T, et al., 2020*). Il BPA è utilizzato nella produzione di polycarbonato plastico (PC) e resine epossifenoliche per prodotti non alimentari (vernici, rivestimenti superficiali di imballaggi, inchiostri da stampa, carta autocopiante e termica, produzione di pneumatici, sigillanti utilizzati in odontoiatria, ecc.) nonché per applicazioni alimentari (piatti da forno a microonde, contenitori per la conservazione, contenitori per acqua ricaricabili, rivestimenti interni protettivi per lattine per alimenti e bevande, ecc.). L’esposizione a BPA è molto frequente e dal 2011 l’Unione Europea ha vietato l’uso del BPA in alcuni prodotti per l’infanzia quali biberon in polycarbonato. Il BPA è stato recentemente rimosso da molti prodotti di consumo, sostituito dai suoi analoghi strutturali Bisphenol-S (BPS) e Bisphenol-F (BPF). Tuttavia, BPS e BPF hanno effetti dannosi simili al BPA, come citotossicità, genotossicità, tossicità riproduttiva, effetti diossina-simili e neurotossicità. Il BPA, una volta assorbito dal tratto digerente, viene metabolizzato dal microbiota intestinale e dal fegato e le urine rappresentano la matrice ottimale per il suo dosaggio (*Rolfo A, et al., 2020; Wu Y, et al., 2022*). Interagisce con l’attività delle vie degli estrogeni, ma recentemente è stato dimostrato che è coinvolto nella segnalazione degli androgeni e degli ormoni tiroidei, causando effetti negativi sullo sviluppo sessuale e sull’omeostasi dell’ormone tiroideo (*Alonso-Magdalena P, et al., 2012*); influisce anche sui processi metabolici, come la secrezione di insulina pancreatica (*Soriano S, et al., 2012*), che possono portare all’insorgenza di diabete di tipo 2 e obesità (*Alonso-Magdalena P, et al., 2011; Ben-Jonathan N, et al., 2009; Neel BA, et al., 2011; Sun Q, et al., 2014*).

Un’altra importante classe di molecole che interferiscono con il sistema endocrino è rappresentata dagli ftalati, diesteri dell’acido ftalico, e classificati in ftalati ad alto e basso peso molecolare e a lunga e corta catena. La prima categoria comprende diversi composti che sono ampiamente adottati per aumentare la flessibilità e la durata della plastica; tra questi, l’additivo più comunemente impiegato è il di (2-etilesil) ftalato (DEHP). Gli ftalati a basso peso molecolare, come il dietil ftalato (DEP), sono utilizzati principalmente nei prodotti per la cura della persona e nei cosmetici, ma si possono trovare anche nei pesticidi e negli imballaggi alimentari (*Wang Y, et al., 2019*). Dopo l’esposizione a queste sostanze attraverso l’ingestione di alimenti contaminati, il contatto diretto con la pelle o attraverso la loro inalazione, vengono assorbiti, metabolizzati molto velocemente e convertiti in diversi composti biologicamente attivi, attraverso una reazione di idrolisi di fase I e di coniugazione di fase II per poi essere escreti attraverso l’urina, le feci e il latte materno. All’interno dell’organismo, gli ftalati

subiscono una rapida biotrasformazione ad opera di lipasi o esterasi non specifiche e vengono trasformati in monoesteri, i quali a loro volta vengono escreti come monoesteri liberi o coniugati, in seguito ad una reazione di glucuronazione. In particolare, gli ftalati a catena corta sono per lo più escreti nelle urine come monoesteri, mentre gli ftalati a ramificazione lunga, come il DEHP, vanno incontro a diverse reazioni di ossidazione per produrre differenti prodotti ossidativi, ovvero vengono trasformati in composti solubili in acqua prima della loro eliminazione. Nel caso specifico del DEHP, per esempio, la molecola iniziale viene rapidamente convertita nel principale metabolita attivo, ovvero il mono-(2-etilesil) ftalato (MEHP) attraverso una reazione catalizzata da una lipasi non specifica (Fromme H, et al., 2011; Wei X, et al., 2022). Dal momento che il metabolismo e l'escrezione degli ftalati avvengono rapidamente, l'analisi dell'esposizione umana a queste sostanze attraverso l'esame delle urine risulta essere piuttosto complessa (Panagiotou EM, et al., 2021). BPA e ftalati sono noti anche per interferire con i processi regolatori del metabolismo e del controllo della funzione degli adipociti, con conseguenti squilibri nella regolazione del peso corporeo, che possono portare all'obesità (Heindel JJ, et al., 2014; Janesick AS, et al., 2016; Nappi F, et al., 2016) e perciò definiti "obesogeni" (Grun F, et al., 2006; Heindel JJ, et al., 2015). Gli obesogeni causano aumento di peso alterando l'omeostasi lipidica per promuovere l'adipogenesi e l'accumulo di lipidi, e ciò può avvenire attraverso molteplici meccanismi; attraverso l'aumento del numero di adipociti, l'aumento delle dimensioni degli adipociti o l'alterazione delle vie endocrine responsabili del controllo dello sviluppo del tessuto adiposo. In generale, i primi cambiamenti dello sviluppo (in utero o postnatale) comportano un aumento del numero di adipociti, mentre i cambiamenti successivi nella vita durante l'età adulta tendono a comportare principalmente un aumento delle dimensioni degli adipociti (Spalding KL, et al., 2008). Le prove attuali suggeriscono che il numero di adipociti è stabilito entro la fine dell'infanzia e che qualsiasi aumento del numero di adipociti nei primi anni di vita tende a essere permanente (Spalding KL, et al., 2008). Ciò ha profonde conseguenze per la tempistica dell'esposizione agli obesogeni poichè implica che le alterazioni durante la prima infanzia sarebbero trasmesse all'età adulta. Altri meccanismi di interferenza da parte degli obesogeni possono comportare l'alterazione degli ormoni che regolano l'appetito, la sazietà e le preferenze alimentari, l'alterazione del metabolismo basale o l'alterazione del bilancio energetico per favorire l'immagazzinamento delle calorie. Infine, i meccanismi possono comportare alterazioni della sensibilità all'insulina e del metabolismo lipidico nei tessuti endocrini come il pancreas, il tessuto adiposo, il fegato, il tratto gastrointestinale, il cervello o il muscolo. A livello molecolare, gli obesogeni possono agire interferendo con i regolatori trascrizionali nucleari che controllano il flusso

lipidico e/o la proliferazione/differenziazione degli adipociti, come i recettori attivati dal proliferatore del perossisoma (PPAR $\alpha$ , PPAR- $\delta$  e PPAR- $\gamma$ ) e i recettori degli ormoni steroidei. Questi recettori funzionano tutti come fattori di trascrizione attivati dal ligando in quanto, dopo aver legato i ligandi, sono in grado di legarsi agli elementi di risposta nel DNA e agire per regolare specifici pattern di espressione genica. Quindi questi EDCs sono al centro dell'attenzione della comunità scientifica, dal momento che, oltre a rappresentare un grave problema a livello ambientale, ad essi viene in parte attribuito il danneggiamento della salute metabolica a livello globale (Papalou O, et al., 2019).

### **1.7 Esposizione infantile agli EDCs nei primi 1000 giorni**

Negli ultimi decenni è stato dimostrato che diverse sostanze chimiche determinano alterazioni nello sviluppo, nella crescita e nella riproduzione causando condizioni mediche che possono non diventare evidenti fino a molti anni dopo l'esposizione. L'esposizione chimica inizia nell'utero, anche, potenzialmente, nelle fasi precedenti al concepimento, e può avere un effetto drammatico più avanti nella vita; alcuni inquinanti chimici ambientali possono causare tali effetti settimane, mesi o addirittura anni dopo l'esposizione (Encarnação T, et al., 2019). Quindi gli esseri umani sono esposti a questa vasta gamma di sostanze chimiche attraverso percorsi diversi (Nadal M, et al., 2013). L'esposizione umana agli EDCs avviene principalmente per ingestione e in una certa misura per inalazione e assorbimento cutaneo (Gore AC, et al., 2015). La ricerca mostra che gli EDCs possono rappresentare il rischio maggiore durante lo sviluppo prenatale e postnatale precoce quando si stanno formando organi e sistemi neurali (Yilmaz B, et al., 2020). Il feto, il lattante e il bambino possono avere una maggiore esposizione ad alcuni EDCs rispetto agli adulti a causa di differenze adeguate allo sviluppo nella dieta, nel comportamento, nella fisiologia, nell'anatomia e nella tossicocinetica (Miller MD, et al., 2002). Ad esempio, i neonati e i bambini possono avere una maggiore esposizione ad alcuni EDCs rispetto agli adulti perché consumano più acqua e maggiori quantità di alimenti specifici e hanno velocità di ventilazione, assorbimento intestinale, rapporti tra superficie e volume più elevati e attività mano-bocca (Selevan SG, et al., 2000). Inoltre, i bambini allattati al seno possono avere concentrazioni sieriche più elevate di alcuni EDC persistenti rispetto alle loro madri a causa dell'esposizione durante l'allattamento (Grandjean P, et al., 2004). Il latte materno è il primo alimento che gli esseri umani consumano, dalla nascita fino a un minimo raccomandato di sei mesi, e fornisce tutti i nutrienti necessari (Goldman AS, 2012). La presenza di queste sostanze all'interno del latte umano può essere influenzata da vari fattori, quali la dieta della madre, l'abitudine al fumo, la località

di residenza, l'età, il peso materno e altri (Witczak A, et al., 2021). La scoperta di questa trasmissione di EDC dalla mamma al bambino deriva da alcuni studi scientifici in cui è stato effettuato un dosaggio di EDC direttamente nel latte materno, rilevando in esso la presenza di ftalati, in particolare dei composti più idrofobici, tra cui il DEHP e il disonilftalato (DINP) (Genuis SJ, et al., 2012). La rilevazione di queste molecole all'interno del latte materno ha suscitato una particolare preoccupazione circa i potenziali effetti negativi a breve, medio e lungo termine che l'esposizione precoce a questi EDC possa avere sulla salute infantile, come l'alterazione dell'equilibrio ormonale o dello sviluppo neurologico e l'insorgenza di obesità (Iribarne- Durán LM, et al., 2021).

Oltre alla maggiore esposizione ad alcuni EDC, il feto, il lattante e il bambino possono essere più sensibili agli effetti degli EDC rispetto agli adulti per due motivi. In primo luogo, le differenze nella tossicocinetica possono comportare concentrazioni circolanti o tissutali più elevate di un EDC per una data dose. In secondo luogo, ci sono molti processi sincronizzati e dipendenti dal tempo programmati durante lo sviluppo iniziale che potrebbero aumentare il rischio di malattie infantili se perturbati. Pertanto, vi è la preoccupazione che l'esposizione precoce agli EDC possa aumentare il rischio di malattie infantili, compresi i disturbi dello sviluppo neurologico e l'obesità (Schug TT, et al., 2015; Heindel JJ, et al., 2015). Gli EDC possono aumentare il rischio di disturbi del neurosviluppo infantile interferendo con la segnalazione o il metabolismo dell'ormone tiroideo nella prima infanzia. Gli ormoni tiroidei svolgono un ruolo fondamentale nella migrazione neuronale, nella sinaptogenesi e nella mielinizzazione durante la gestazione e l'infanzia (Zoeller RT, et al., 2004). Anche le variazioni clinicamente non significative dei livelli di tiroxina materna o di ormone stimolante la tiroide (TSH) durante la gravidanza sono associate a ridotte capacità cognitive, (Henrichs J, et al., 2013) sintomi del disturbo da deficit di attenzione e iperattività (ADHD) (Modesto T, et al. 2015) e aumento del rischio di autismo (Henrichs J, et al., 2013; Modesto T, et al. 2015; Roman GC, et al., 2013; Ghassabian A, et al., 2011). Le esposizioni di EDC nella prima infanzia possono perturbare i sistemi neuroendocrini coinvolti nella crescita, nel metabolismo energetico, nell'appetito, nell'adipogenesi e nell'omeostasi del glucosio-insulina per promuovere l'obesità infantile, la disfunzione cardiometabolica e la disfunzione epatica (Gillman MW, 2010; Ornoy A, 2011; Painter RC, et al., 2005; Barker DJP, 2012). Queste perturbazioni possono portare a un "fenotipo parsimonioso" che promuove un accumulo di energia più efficiente, un rapido aumento di peso nei primi anni di vita e un eccesso di massa adiposa (Barker DJ, 2004; Adair LS, et al., 2009; Druet C, et al., 2012; Monteiro PO, et al., 2005; Gishti O, et al., 2014; Chomtho S, et al., 2008; De Rolfé EL, et al., 2010). La rapida crescita e l'eccesso di adiposità portano ad un aumento dei livelli

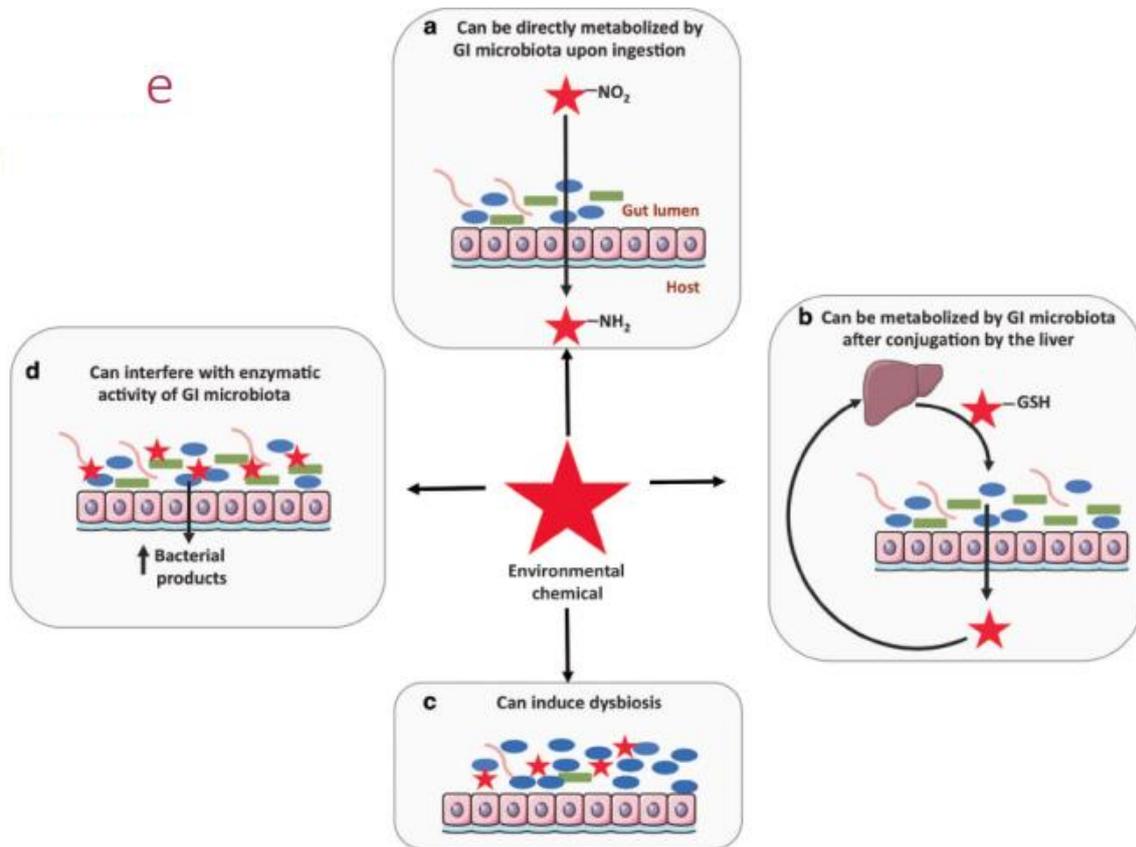
circolanti di acidi grassi liberi, provocando a loro volta una cascata di cambiamenti metabolici che riducono la capacità del fegato e dei muscoli di assorbire, immagazzinare e metabolizzare il glucosio, (Grundy SM, et al., 2004; Kahn BB, et al., 2000; Reaven GM, 1995) che a sua volta causa un aumento della secrezione e della resistenza dell'insulina pancreatica. Quindi quando si valutano le conseguenze degli EDC sulla salute umana, si deve considerare che gli esseri umani sono esposti a un gran numero di sostanze chimiche, che ognuno ha modalità di azione specifiche e che le interazioni tra di loro possono portare a risultati diversi rispetto ai singoli composti (Bliatka D, et al., 2017). Pertanto, la tossicità degli EDC è un processo che dipende dal tempo e l'esposizione ad essi durante le fasi critiche dello sviluppo può avere effetti drammatici più avanti nella vita (Herbst AL, et al., 1971).

### **1.8 Meccanismi che influenzano la composizione del microbiota da parte degli EDCs**

Prove emergenti suggeriscono interazioni tra gli EDCs e la composizione del microbiota intestinale, influenzando pertanto la salute dell'ospite. È stata suggerita una triade chiave tra l'esposizione agli EDCs, il genotipo dell'ospite, le risposte fenotipiche e il microbioma intestinale (Rosenfeld CS, 2017). È stato dimostrato che l'esposizione agli EDC altera il microbioma, il che può provocare disbiosi e l'induzione di percorsi correlati a xenobiotici, geni associati al microbioma, enzimi e produzione di metaboliti, che possono svolgere un ruolo cruciale nella biotrasformazione dell' EDCs (Velmurugan G, et al., 2017). I prodotti e i sottoprodotti rilasciati in seguito al metabolismo microbico degli EDCs possono essere assorbiti dall'ospite, avendo quindi un impatto sulla salute dell'ospite e sullo sviluppo di malattie. In particolare, le sostanze chimiche ambientali e il microbiota gastrointestinale (GI) interagiscono attraverso molteplici meccanismi; sono stati identificati quattro diversi tipi di interazione: in primo luogo, il GI può metabolizzare una varietà di sostanze chimiche ambientali, direttamente dopo l'ingestione o dopo la loro coniugazione da parte del fegato. Reciprocamente, i prodotti chimici ambientali possono interferire con la composizione e/o attività metabolica del GI con conseguenze deleterie per l'ospite (Claus SP, et al., 2017). I microrganismi gastrointestinali sono noti da decenni per essere coinvolti nella biotrasformazione degli xenobiotici e il tratto gastrointestinale è la via principale attraverso la quale essi entrano nel corpo umano. Le sostanze chimiche ambientali possono essere scarsamente assorbite dopo l'ingestione, venendo successivamente trasportate nell'intestino tenue distale e nel cieco dalla peristalsi. In alternativa, essi o i loro metaboliti possono ripartirsi dal sangue attraverso la parete intestinale. Di conseguenza, un certo numero di sostanze

chimiche viene metabolizzato direttamente dal GI mentre altre possono essere escrete nella bile (Fig.5).

Lai e colleghi (Lai K, et al., 2016) hanno utilizzato il sequenziamento del gene 16S rRNA del microbiota fecale di topi maschi CD-1 per analizzare gli effetti dell'assunzione di BPA nella dieta sulla composizione e sulla fisiologia del microbiota. I topi con una dieta ricca di grassi e saccarosio erano i controlli positivi. I risultati hanno mostrato che l'esposizione alimentare al BPA era correlata a una diminuzione della diversità delle specie di microbiota. I cambiamenti strutturali del microbiota intestinale esposto al BPA nella dieta erano simili a quelli riscontrati nei topi con diete ad alto contenuto di grassi e saccarosio. Inoltre, il confronto tra BPA e dieta ricca di grassi ha rivelato un aumento dei Proteobatteri in entrambi i gruppi. La maggiore abbondanza di *Proteobatteri* è stata correlata a diverse condizioni come disturbi metabolici e malattie infiammatorie intestinali (Zhang L et al., 2006). Hu e colleghi (Hu J et al., 2016) hanno riferito invece che l'esposizione postnatale a basse dosi al dietil ftalato (DEP) nei ratti Sprague-Dawley dalla nascita fino all'età adulta ha indotto cambiamenti nella composizione del microbiota intestinale, ma questi cambiamenti sono stati osservati solo nei ratti adolescenti. I cambiamenti includono una maggiore abbondanza relativa di *Bacteroidetes (Prevotella) Elusimicrobia* e una diminuzione di *Firmicutes (Bacilli)* nei ratti esposti rispetto ai controlli. Sorprendentemente, questi cambiamenti indotti dal DEP sono diminuiti nell'età adulta nonostante l'esposizione continua, il che suggerisce che gli effetti dell'esposizione a sostanze chimiche ambientali sono più gravi negli adolescenti. Per quanto riguarda gli studi epidemiologici sull'uomo, le informazioni sono scarse. Yang e colleghi (Yang Y et al., 2019) hanno dimostrato in un recente studio epidemiologico che mostra che l'esposizione al DEHP nei neonati ha comportato cambiamenti nella composizione del microbiota, con una diminuzione di *Rothia sp.* e *Bifidobacterium longum*.



**Figura 5.** Meccanismi attraverso cui le sostanze chimiche ambientali interagiscono con il microbiota intestinale: (a) le molecole scarsamente assorbite dopo l'ingestione possono essere direttamente metabolizzate dal microbiota gastrointestinale; (b) le sostanze chimiche apolari vengono assorbite dal tratto gastrointestinale, trasportate dal sangue portale al fegato, dove vengono ossidate, formando coniugati con acido glucuronico, solfato o glutatione, che possono essere escreti nella bile ed entrare nell'intestino dove vengono metabolizzati dal microbiota; (c) l'interazione delle sostanze chimiche ambientali con il microbiota intestinale può portare a conseguenze dannose per la salute dell'ospite; (d) gli inquinanti possono anche modificare il metabolismo dei microrganismi del tratto gastrointestinale, andando ad influenzare l'attività dei metaboliti endogeni o la tossicità di altri xenobiotici metabolizzati dal microbiota stesso (Claus SP, et al., 2017).

## 2. OBIETTIVI

La presente tesi descrive l'analisi osservazionale e trasversale che fa parte di uno degli obiettivi secondari del più ampio progetto longitudinale prospettico A.MA.MI (Alimentazione MAMma e bambino nei primi Mille giorni) (*Raspini B, et al., 2020*),

Di seguito una breve descrizione del progetto A.MA.MI, setting dell'analisi.

### 2.1 Setting della ricerca

Lo studio A.MA.MI, è stato registrato su ClinicalTrials.gov: NCT0412261 2 ed è stato svolto presso il Laboratorio di Dietetica e Nutrizione Clinica (Responsabile Prof.ssa Hellas Cena), Dipartimento di Sanità Pubblica, Medicina Sperimentale e Forense, Università di Pavia e l'Unità di Neonatologia della Fondazione IRCCS Policlinico S. Matteo di Pavia.

Lo studio è stato approvato dal Comitato Etico Umano della Fondazione IRCCS Policlinico S. Matteo di Pavia (numero di protocollo: 20180022618; 6/12/2018; addendum, numero di protocollo: 20190068597, 1/8/2019) ed è stato condotto in conformità alle linee guida di Buona Pratica Clinica. Il disegno completo dello studio è stato precedentemente descritto da Raspini e colleghi (*Raspini B, et al., 2020*). Il presente studio ha ottenuto un finanziamento da Fondazione Umberto Veronesi (research fellowship, 2018-2021).

In breve, A.MA.MI ha valutato la correlazione tra la composizione del microbiota intestinale infantile e lo stile di vita materno/infantile e fattori ambientali, inclusi i livelli urinari materni di EDCs, dal concepimento al primo anno di vita del bambino (Fig.6) a diversi follow-up (T0, al parto; T1, un mese dopo il parto; T2, 6 mesi dopo il parto; T3, 12 mesi dopo il parto). Per tale finalità sono state arruolate 63 coppie madre-neonato (diadi), dalla nascita (T0) al 1° anno di età del bambino (T1), afferenti al reparto di Neonatologia della Fondazione IRCCS Policlinico San Matteo, Pavia (Italia), in base ai seguenti **criteri di inclusione**: neonati di entrambi i sessi nati con parto naturale o cesareo; età gestazionale compresa tra 37 e 42 settimane; genitori in grado di parlare la lingua italiana; capacità del genitore/tutore di dare il consenso informato; capacità della madre di rispondere all'intervista strutturata/questionari; **criteri di esclusione**: neonati o madri con malattie genetiche/congenite; neonati ricoverati in unità di terapia intensiva neonatale immediatamente dopo la nascita; neonati selezionati per altri studi clinici; presenza di diabete gestazionale; presenza di ipertiroidismo durante

la gravidanza. Gli obiettivi specifici dello studio A.MA.MI, come riportato da protocollo (Raspini B, et al., 2020), sono stati quelli di:

1. indagare lo sviluppo del microbioma intestinale dei neonati (età: 0-11,99 mesi), attraverso: i) l'identificazione dell'abbondanza relativa dei microrganismi dominanti, ii) la valutazione della diversità microbica e iii) la valutazione della variazione interindividuale (**OBIETTIVO PRIMARIO**);

2. esplorare la possibile correlazione tra i fattori materni prima della gravidanza (stato ponderale), le esposizioni gestazionali (dieta materna, attività fisica, stato ponderale), le modalità di parto, la modalità di alimentazione (latte in formula o allattamento al seno), l'esposizione all'ambiente (inclusa l'esposizione materna ad EDCs), l'alimentazione del bambino, la qualità del sonno e la composizione del microbioma intestinale del bambino, durante il primo anno di vita a diversi follow-up: immediatamente dopo il parto (non più di 2 giorni dopo il parto (T0); 1 mese dopo la nascita (T1); 6 mesi dopo la nascita (T2); 12 mesi dopo la nascita (T3) (**OBIETTIVI SECONDARI**).

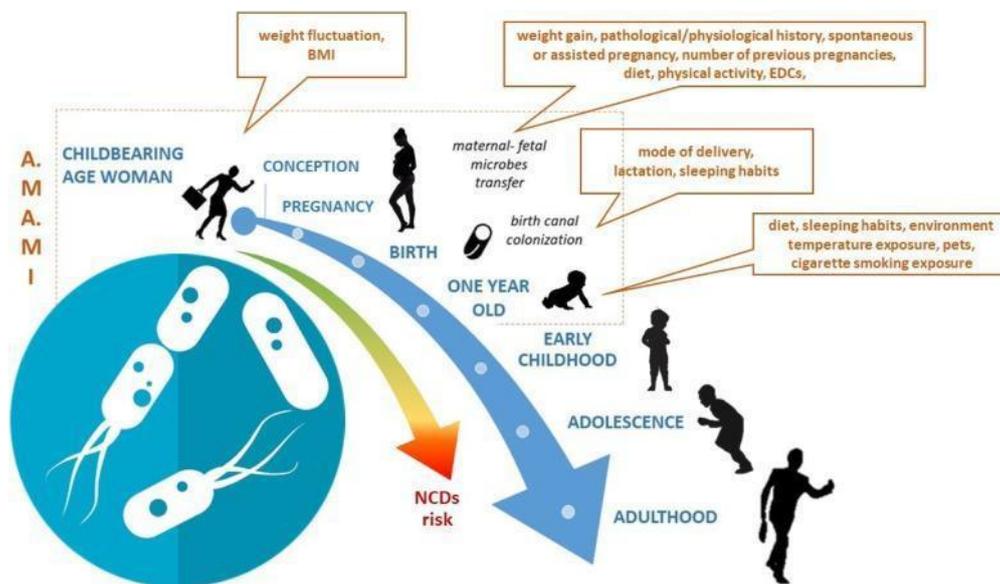


Figura 6. A.MA.MI – Alimentazione MAmma e bambino nei primi Mille giorni.

### 3. Materiali e metodi

#### 3.1 Popolazione oggetto di studio

Delle 62 coppie madre-bambino arruolate nello studio A.MA.MI, afferenti all'Unità di Neonatologia della Fondazione IRCCS Policlinico S. Matteo di Pavia, la presente ricerca ha previsto la valutazione di 45 diadi madre-neonato (drop-out pari al 28%) che sono state valutate a 12 mesi di età del bambino (corrispondente al terzo tempo di campionamento, T3) come previsto da uno degli obiettivi secondari del progetto A.MA.MI) (*Raspini B, et al., 2020*). I genitori/tutori legali hanno firmato il consenso informato e il Comitato Etico ha approvato questa procedura dopo averne accertato la conformità ai dettami della Dichiarazione di Helsinki (IV adattamento).

Per ciascuna **madre**, in generale e come da protocollo, a **T3 (un anno dal parto)** sono stati presi in considerazione:

- anamnesi e dati demografici, compresa l'occupazione (casalinga o altra occupazione), il livello di istruzione (istruzione terziaria vs. istruzione non terziaria) e presenza di malattie croniche (sì vs. no);
- parametri antropometrici;
- principali determinanti dell'esposizione giornaliera agli EDCs;
- frequenze di consumo e abitudini alimentari

Inoltre, per ciascuna madre è stato raccolto un campione di urine (mitto estemporaneo) a 12 mesi dal parto per l'analisi dei livelli di alcuni interferenti endocrini. In particolare, sono stati valutati i livelli di: bisfenolo A (BPA); metabolita del dietilftalato (DEP), denominato monoetilftalato (MEP); monoisobutilftalato (MIbP) come metabolita dell'n-butilftalato (DnBP); metaboliti del di-(2-etil-esil) ftalato (DEHP), come il mono-(2- etil-5-idrossi-esil)-ftalato (MEHHP) e il mono-(2-etilesil)-ftalato (MEHP); monobenzilftalato (MBzP); metabolita del butilbenzilftalato (BBP). Contestualmente è stata fatta anche l'analisi dei livelli di creatinina urinaria.

Per ciascun **bambino**, in generale e come da protocollo, a **T3 (12 mesi di vita)** sono stati presi in considerazione: i parametri antropometrici e alcune variabili postnatali, quali il tipo di alimentazione e i tempi di introduzione di alimenti complementari.

Ai fini degli obiettivi della presente ricerca, sono stati identificati i bambini che erano **stati allattati al seno** almeno una volta al giorno fino ai 12 mesi di età (popolazione, n=20).

La presente analisi si è pertanto concentrata su questo sottogruppo per il quale è stata presa in considerazione la composizione del microbiota intestinale mediante l'analisi della subunità ribosomiale 16S ed è stata messa in relazione all'esposizione materna agli EDCs.

### 3.2 Parametri antropometrici materni e infantili

A T3 (un anno dal parto), per i parametri antropometrici **materni** sono stati considerati l'altezza (cm), il peso (kg) e la circonferenza vita (WC) (cm), misurati secondo procedure standardizzate. È stato inoltre calcolato il BMI ( $\text{Kg}/\text{m}^2$ ). In breve, il peso corporeo è stato misurato con le madri che indossavano solo la biancheria intima e senza scarpe, per mezzo di una bilancia a stadera (precisione  $\pm 100$  g); l'altezza corporea è stata misurata su madri senza scarpe per mezzo di uno stadiometro (precisione  $\pm 1$  mm). La circonferenza della vita è stata misurata al centimetro più vicino con un metro a nastro flessibile in acciaio con le partecipanti in piedi, a braccia incrociate, appoggiando le mani sulle spalle opposte. Dopo aver espirato delicatamente, la circonferenza vita addominale è stata misurata sul piano orizzontale tra la parte più bassa della gabbia toracica e il bordo laterale superiore dell'ileo destro (*NHANES, 2016*). Il BMI è stato calcolato come rapporto tra peso e altezza al quadrato, con il peso in chilogrammi e l'altezza in metri (*NHANES, 2016*).

Per i parametri antropometrici **infantili**, a 12 mesi di vita del bambino (T3) sono stati presi in considerazione il peso del bambino (kg), la lunghezza (cm) e la circonferenza cranica (cm), misurati (T0-T3) con procedure standardizzate (*NHANES, 2016*). Il peso corporeo è stato misurato con il bambino nudo mediante una bilancia a stadera (precisione  $\pm 100$  g). La lunghezza è stata misurata adagiando il bambino su un infantometro con i piedi rivolti verso la pedana mobile e la testa contro la pedana fissa. L'esaminatore ha posizionato i piedi e si è assicurato che la testa fosse posizionata sul piano orizzontale di Frankfort. Se non era possibile ottenere entrambe le gambe tese nella posizione corretta, l'esaminatore si assicurava che almeno una gamba fosse dritta con il piede flesso contro la pedana. La circonferenza della testa dei bambini è stata misurata (con precisione al mm), utilizzando un nastro di misurazione non elastico, che è stato posizionato intorno alla testa del neonato, facendolo aderire alle ossa frontali del cranio, leggermente sopra le sopracciglia, perpendicolarmente all'asse lungo del viso, sopra le orecchie e sopra la prominenza occipitale nella parte posteriore della testa, e muovendolo in alto e in basso sulla parte posteriore della testa per individuare la circonferenza massima, in base al metodo di valutazione standard (*NHANES, 2016*).

### 3.3 Valutazione delle abitudini alimentari materne e infantili

Delle nove sezioni di un questionario dietetico autosomministrato, precedentemente validato (Turconi G, et al., 2003), sono state utilizzate due sezioni per indagare la frequenza di consumo degli alimenti e le abitudini alimentari **materne** (Allegato 1). Il questionario è stato originariamente tratto da uno sviluppato e validato su una popolazione giovanile italiana (Turconi G, et al., 2003) e poi adattato da due dietisti alla popolazione adulta, prima della sua somministrazione. La nuova versione è stata precedentemente testata su un campione di 24 soggetti e rivista di conseguenza (Cena H, et al., 2016). La sezione relativa alle "Frequenze alimentari" (Food Frequency, FF) (18 domande) valutava il consumo giornaliero di alimenti e bevande tipici come pane, pasta, cereali, frutta e verdura, latte e yogurt, tè e caffè e il consumo settimanale di altri alimenti come carne e salumi, pesce, uova, formaggi, legumi e dolci (Turconi G, et al., 2003). È stata anche analizzata l'assunzione di bevande alcoliche (Turconi G, et al., 2003). Ciascuna sezione consisteva in domande con risposte a scelta multipla con le seguenti categorie di risposta: sempre, spesso, qualche volta, mai. Il punteggio assegnato a ciascuna risposta variava da 0 a 3, con il punteggio massimo assegnato all'abitudine più salutare e il punteggio minimo assegnato a quella meno salutare (Turconi G, et al., 2003). La sezione relativa alle "Abitudini alimentari" (Dietary Habit, DH) (14 domande) è stata progettata per indagare le abitudini alimentari, tra cui il consumo della prima colazione, il numero giornaliero di pasti, l'assunzione di frutta e verdura e il consumo di bevande analcoliche o alcoliche (Turconi G, et al., 2003). In questa sezione, alcune domande erano finalizzate a valutare se il numero di porzioni consumate soddisfacesse le raccomandazioni (Turconi G, et al., 2003). Otto delle domande prevedevano le seguenti categorie di risposta: sempre, spesso, a volte, mai; il punteggio assegnato a ciascuna risposta variava da 0 a 3. Le altre sei domande avevano invece quattro categorie di risposta strutturate in modo diverso e il punteggio variava da 1 a 4. In entrambi i casi, il punteggio massimo è stato assegnato alla risposta più sana e il punteggio minimo a quella meno sana; il punteggio totale della sezione FH era di 56 (Turconi G, et al., 2003). Il punteggio totale è stato poi suddiviso in terzi, dove il più basso si riferiva ad "abitudini alimentari inadeguate", il medio si riferiva ad "abitudini alimentari parzialmente soddisfacenti" e quello più alto ad "abitudini alimentari soddisfacenti", secondo le Linee Guida Dietetiche Nazionali (CREA, 2018).

*NOTA BENE: I risultati circa le abitudini alimentari e frequenze di consumo degli alimenti materne dello studio A.MA.MI sono stati recentemente pubblicati da Di Napoli et al. (Di Napoli I, et al. 2021) e verranno brevemente discussi nella sezione discussione*

Per quanto riguarda le abitudini alimentari del **bambino** (Allegato 2), a T3, madri/genitori sono state intervistati da personale addestrato per informarsi sul tipo e la durata dell'alimentazione (allattamento al seno esclusivo, allattamento al seno non esclusivo, non allattamento al seno) e abitudini alimentari in termini di diversità e frequenza dei gruppi di alimenti consumati dal neonato al 12 mesi di età, utilizzando il questionario sviluppato dall'International Fetal and Newborn Growth Consortium (*Papageorgiou AT, et al., 2018*).

### **3.4 Valutazione dei determinanti dell'esposizione materna giornaliera a ftalati e BPA**

I determinanti dell'esposizione a BPA e ftalati sono stati rilevati attraverso un'intervista telefonica condotta da personale qualificato e formato. In particolare, alcune domande sono state estrapolate da un questionario ideato nell'ambito del progetto LIFE PERSUADED (“Phthalates and bisphenol A biomonitoring in Italian mother– child pairs: link between exposure and juvenile diseases”) (*La Rocca C, et al., 2018*), finanziato dalla Commissione europea (nell'ambito dell'accordo di sovvenzione LIFE13 ENV/IT/000482). Nello specifico il questionario LIFE PERSUADED in originale valutava l'associazione tra variabili demografiche e stile di vita che potevano essere correlate all'esposizione a DEHP/BPA e i livelli di EDC presenti nei bambini e nelle loro madri (*La Rocca C, et al., 2018*). Pertanto, nello studio A.MA.MI, sono stati utilizzati alcuni elementi del questionario LIFE PERSUADED per raccogliere informazioni sull'esposizione ambientale, lo stile di vita e le abitudini alimentari delle madri come fonte di EDCs, per indagare l'esposizione materna a ftalati e BPA.

*NOTA BENE: I risultati circa i livelli di esposizione materna giornaliera a ftalati e BPA dello studio A.MA.MI sono stati recentemente pubblicati da Di Napoli et al. (Di Napoli I, et al. 2021) e verranno brevemente discussi nella sezione discussione*

### 3.5 Determinazione dei livelli di ftalati, BPA e creatinina

I livelli di BPA e di ftalati (MEP, MIBP, MEHHP, MBzP, MEHP) sono stati misurati in campioni di urine (mitto estemporaneo), secondo le procedure precedentemente da noi descritte (*De Giuseppe R, et al., 2022*), presso il Dipartimento di Farmacia dell'Università di Salerno (Fisciano, Salerno). Sono state valutate anche le concentrazioni urinarie di creatinina. In breve, i campioni di urina sono stati raccolti in contenitori di polipropilene per urinocoltura, e conservati in un luogo fresco fino al momento del trasporto. I campioni di urina sono stati trasportati refrigerati, quindi aliquotati in provette realizzate con materiali privi di ftalati e conservati a - 80°C fino al momento dell'analisi. I livelli di BPA e ftalati sono stati misurati mediante UHPLC-MS/MS (Shimadzu, Milano, Italia). Il sistema UHPLC era composto da due pompe LC 30 AD, un autocampionatore SIL 30 AC, un forno a colonna CTO 20 AC, un controllore CBM 20 A. Il sistema è stato accoppiato online a un triplo quadrupolo LCMS 8050 (Shimadzu, Kyoto, Giappone) dotato di una sorgente di ionizzazione electrospray (ESI). I livelli di creatinina sono stati misurati con metodi di routine mediante un analizzatore Atellica® CH (Siemens Healthcare Diagnostics Inc., Tarrytown, NY, USA) ed espressi in µmol/L. Tutti i campioni urinari sono stati considerati accettabili in quanto le concentrazioni di creatinina erano comprese nell'intervallo 0,3-3,0 g/L (*WHO, 1996*).

### 3.6 Clusterizzazione dei bambini in funzione dell'esposizione materna agli EDCs

I bambini sono stati, suddivisi in diversi gruppi, in base ai livelli materni di BPA e ftalati urinari (MEP, MIBP, MEHHP, MBzP, MEHP) che indicavano l'esposizione materna agli EDCs e che erano stati precedentemente descritti da Di Napoli et al. nella coorte A.MA.MI (*Di Napoli I, et al.2021*).

In particolare:

- bambini di madri che hanno riportato livelli urinari di BPA superiori al valore mediano della coorte A.MA.MI (0,96 µg/g creatinina) (**neonati di madri altamente esposte a BPA, gruppo O**);
- bambini di madri che hanno riportato livelli di BPA urinario pari o inferiori al valore mediano della coorte A.MA.MI (0,96 µg/g creatinina) (**neonati di madri con una bassa esposizione al BPA, gruppo B**);
- bambini di madri che presentavano livelli superiori al valore mediano relativo per almeno 3 ftalati su 5 (**neonati di madri altamente esposte agli ftalati, gruppo HR**);

- bambini di madri che avevano livelli pari o inferiori al valore mediano relativo per almeno 3 ftalati su 5 (**neonati di madri con una bassa esposizione agli ftalati, gruppo LR**).

Per i livelli di ftalati i valori mediani sono stati riportati come segue, MEP: 7,73 µg/g creatinina; MIbP: 0,89 µg/g creatinina; MEHHP: 1,24 µg/g di creatinina; MBzP: 0,64 µg/g di creatinina.

### **3.7 Analisi del microbiota intestinale infantile**

#### **3.7.1 Raccolta ed elaborazione del campione per l'analisi del microbiota intestinale**

Come da protocollo A.MA.MI, per ogni neonato sono stati raccolti campioni di feci a differenti follow-up (T0-T3) in 2 diversi contenitori con tappo a vite ed etichettati con il numero identificativo del neonato. I campioni sono stati conservati a - 80 °C presso l'Unità di Terapia Intensiva Neonatale, IRCCS Policlinico San Matteo (Pavia, Italia), fino al momento dell'analisi. In particolare, il genitore/tutore legale è stato istruito su come raccogliere autonomamente i campioni di feci a casa. I genitori sono stati contattati da un membro del team di ricerca 1-2 giorni prima della visita programmata per verificare lo stato di salute del neonato; inoltre, è stato chiesto loro di presentare un campione di feci in un altro momento se: il bambino fosse stato malato con febbre, malattie respiratorie o malattie gastrointestinali in quel momento; il bambino avesse avuto una malattia diarroica di durata superiore alle 24 ore nei precedenti 7 giorni; il bambino fosse stato trattato con antibiotici nei precedenti 7 giorni.

I campioni sono stati spediti in ghiaccio secco a Genomix-4Life Srl (C/O Laboratorio di Medicina Molecolare e Genomica-Campus di Medicina e Chirurgia, Baronissi, Salerno, Italia, spin-off dell'Università di Salerno, Fisciano, (Genomix4life)), dove è stata effettuata l'analisi degli ampliconi del gene 16S rDNA. Il DNA totale è stato estratto dalle feci con il kit Invimag Stool (Stratec Molecular GmbH, Berlino, Germania), seguendo le istruzioni del produttore e utilizzando acqua distillata sterilizzata come controllo negativo per l'estrazione. Per garantire la privacy, non è stata inclusa alcuna informazione clinica o personale, con l'unica eccezione del numero di identificazione assegnato ai campioni. L'amplificazione del gene 16S rDNA è stata eseguita con i primer: Forward 5'-CCTACGGGNGGCWGCAG-3' e Reverse 5'-GACTACHVGGGTATCTAATCC-3', che avevano come bersaglio le regioni ipervariabili V3-V4 del gene 16S rDNA. I protocolli seguiti utili per ottenere i file di sequenza grezzi (Fast file) e per filtrarli in base a un controllo di qualità (FastQC) sono stati precedentemente descritti in modo dettagliato (*Raspini B, et al., 2020*). L'analisi

metabarcoding del 16S rDNA è stata effettuata con QIIME2 e il database tassonomico SILVA 138 per definire la tassonomia batterica.

### **3.7.2 Analisi della composizione del microbiota intestinale dei neonati**

L'analisi metagenetica 16S è stata condotta utilizzando la piattaforma Illumina MiSeq. La regione V3- V4 del gene 16S rRNA è stata amplificata per l'analisi della diversità a livello dei domini batterici (Klindworth A, et al., 2013). Le analisi di PCR e sequenziamento sono state condotte secondo il protocollo di Genomix4life. Il controllo di qualità (Quality control, QC) e le assegnazioni tassonomiche sono stati eseguiti in base al QIIME e al Ribosomal Database Project Bayesian classifier in combinazione con una serie di pipeline informatiche disegnate implementate da Genomix4life per l'analisi delle comunità microbiche. L'attribuzione tassonomica è stata effettuata utilizzando la ricerca BLAST nel database delle sequenze di RNA ribosomiale 16S dell'NCBI (Altschul SF, et al., 1990). La percentuale di ciascuna unità tassonomica operativa (OTU) batterica è stata analizzata separatamente per ogni campione, fornendo i dati di abbondanza relativa tra i campioni, basati sul numero relativo di reads all'interno di ognuno (Altschul SF, et al., 1990). La diversità alfa (specie osservate, ricchezza di Chao1 e indici di diversità di Shannon) è stata calcolata utilizzando Qiime Variations (Andreotti R, et al., 2011; Chao A, et al., 2002) nelle comunità microbiche tra i gruppi; le comunità microbiche sono state studiate utilizzando la distanza metrica non ponderata basata sulla filogenesi (Chao A, et al., 2002).

## 3.8 Analisi statistiche

### 3.8.1 Valutazione dell'esposizione materna agli EDCs

Le analisi statistiche sono state effettuate utilizzando il software IBM SPSS Statistics 25 (IBM, Armonk, NY, USA). La normalità della distribuzione dei dati è stata valutata mediante il test di Shapiro-Wilk. Le variabili sono state riportate rispettivamente come media e deviazione standard (SD), media geometrica (GM) e SD geometrica (GSD). Quando le concentrazioni urinarie di EDCs erano inferiori al limite di rilevabilità (LOD), è stato utilizzato un valore pari a LOD/2. Data l'assenza di valori anomali con un'influenza eccessiva sui modelli con variabili non trasformate o log-trasformate, il coefficiente di correlazione univariata di Pearson è stato calcolato come valori logaritmici. Per valutare la relazione complessiva tra le tre sostanze chimiche altamente correlate (MEHHP, MBZP e MEHP), è stato utilizzato un modello di analisi delle componenti principali (PCA) con le seguenti opzioni: comunaltà sempre vicina allo 0,7, varianza complessiva al di sopra del 50%. Infine, per esplorare le principali fonti di esposizione agli EDC, sono stati eseguiti diversi modelli di regressione. Ogni modello includeva come variabili dipendenti le concentrazioni urinarie degli EDC e il punteggio del fattore risultante dalla PCA e come potenziali predittori tutte le covariate rilevanti che mostravano significato nell'analisi univariata. Sono state incluse solo le variabili con un fattore di inflazione della varianza (VIF)  $< 2$  per escludere la multicollinearità. Nel modello BPA, le covariate erano la creatinina, il consumo di cibo cotto da asporto e la sezione frequenza del consumo degli alimenti. Nel modello MEP, sono stati inclusi i livelli di creatinina e il consumo di salse o condimenti in contenitori di plastica. Nel modello Fattore 1, le covariate erano la creatinina e la frequenza di consumo di cibo in scatola (o tetrapacked). La significatività è stata fissata per p-value  $< 0,05$ .

### **3.8.2 Valutazione dell'associazione tra i diversi EDCs e la composizione del microbiota infantile**

L'analisi dei dati è stata condotta presso il Dipartimento di Scienze del Suolo, della Pianta e degli Alimenti (Di.S.S.P.A) dell'Università di Bari Aldo Moro (Bari). In breve, i dati sono stati riassunti utilizzando statistiche descrittive, come mediana, intervallo interquartile (IQR) e valori minimo (min.) e massimo (max.). Per indagare l'associazione tra le abbondanze relative del microbiota intestinale dei neonati allattati al seno almeno una volta al giorno a 1 anno (12 mesi) di età e le concentrazioni urinarie materne di EDC, è stata effettuata una analisi di correlazione di Spearman. Gli indici di diversità alfa sono stati confrontati secondo un test di Mann-Whitney a due code calcolando i valori p esatti (qval o pval esatto) dopo la correzione per confronti multipli utilizzando GraphPad Prism versione 8.0.1 (GraphPad Software, San Diego, California, USA). L'associazione multivariabile tra abbondanze 16S rDNA-seq e le variabili (metadati) sono state eseguite utilizzando il pacchetto MaAsLin2 R (<https://huttenhower.sph.harvard.edu/maaslin/>; accesso 27 settembre 2021), che consente di indagare metadati come effetti fissi o casuali. È stata effettuata un'analisi delle componenti principali (PCA) per valutare la diversità beta che si verifica tra i campioni dopo una specifica stratificazione della nostra coorte. Per tutte le analisi statistiche, sono stati notati i valori  $p < 0,05$ , anche se la significatività lo era solo per valori p corretti (riportati come qval o exact val)  $< 0,05$ .

## 4. Risultati

### 4.1 Popolazione di studio

Nella presente analisi sono state considerate 45 madri al follow-up T3 (12 mesi dal parto). Come prostrato in Tabella 1, l'età gestazionale media delle donne era pari a 39,95 e il numero medio di gravidanze pregresse era di 1,49. Il 58,1% delle donne aveva completato un livello di istruzione terziaria e la maggior parte di esse aveva un'occupazione (12,9% delle donne era casalinga e l'87,1% aveva un'altra occupazione), trascorrendo 8 ore al giorno al lavoro.

Il 50% delle donne arruolate aveva un'età inferiore ai 36 anni e il 12,9% era affetto da malattie croniche (artrite reumatoide, emicrania cronica, ipotiroidismo o era portatore sano di beta-talassemia).

Complessivamente le madri avevano un peso corporeo e una distribuzione dell'adipe che erano indicatori di un basso rischio di malattie metaboliche e cardiovascolari. Infatti, per quanto riguarda lo stato ponderale, il 62,8% del campione riportava un BMI all'interno del range di normopeso, il 79,5% aveva una circonferenza vita inferiore a 88 cm (Waist Circumference, WC) (valore di cut-off <88,0 cm) mentre il rapporto vita/fianchi (Waist to Hip Ratio, WHR) era inferiore a 0,85 in tutte le madri (valore di cutoff <0.85). Inoltre, per il 55,8% delle donne, il Waist to height ratio (WHtR) era inferiore o uguale a 0,48 (valore di cutoff <0,5).

| <b>Variabili<br/>(valori di cut-off o intervallo di riferimento)</b>  | <b>Media <math>\pm</math> SD; %</b> |
|---|-------------------------------------|
| <b>Età (anni)</b>   | 36                                  |
| <b>BMI (Kg/m<sup>2</sup>)</b><br>Normopeso (18,5 $\leq$ BMI < 25)<br>Sovrappeso (25 $\leq$ BMI < 30)<br>Obesità (BMI $\geq$ 30) | 22,4 $\pm$ 4,2                      |
| <b>WC (&lt;88 cm)</b>   | 77,9 $\pm$ 4,5                      |
| <b>WHR (0,85)</b>   | 0,49 $\pm$ 0,08                     |
| <b>WHtR (0,5)</b>   | 0,48 $\pm$ 0,07                     |
| <b>Soggetti con patologie croniche</b>  | 12,9%                               |
| <b>Età gestazionale</b>   | 39,95 $\pm$ 1,19                    |
| <b>Numero di gravidanze pregresse</b>   | 1,49 $\pm$ 0,66                     |
| <b>Tempo trascorso nel posto di lavoro</b><br>$\leq$ 8h/giorno<br>> 8h/giorno   | 73,9%<br>26,1%                      |
| <b>Tipologia di lavoro</b><br>Casalinga<br>Altro  | 12,9%<br>87,1%                      |
| <b>Livello di istruzione</b><br>< Università<br>$\geq$ Università   | 41,9%<br>58,1%                      |

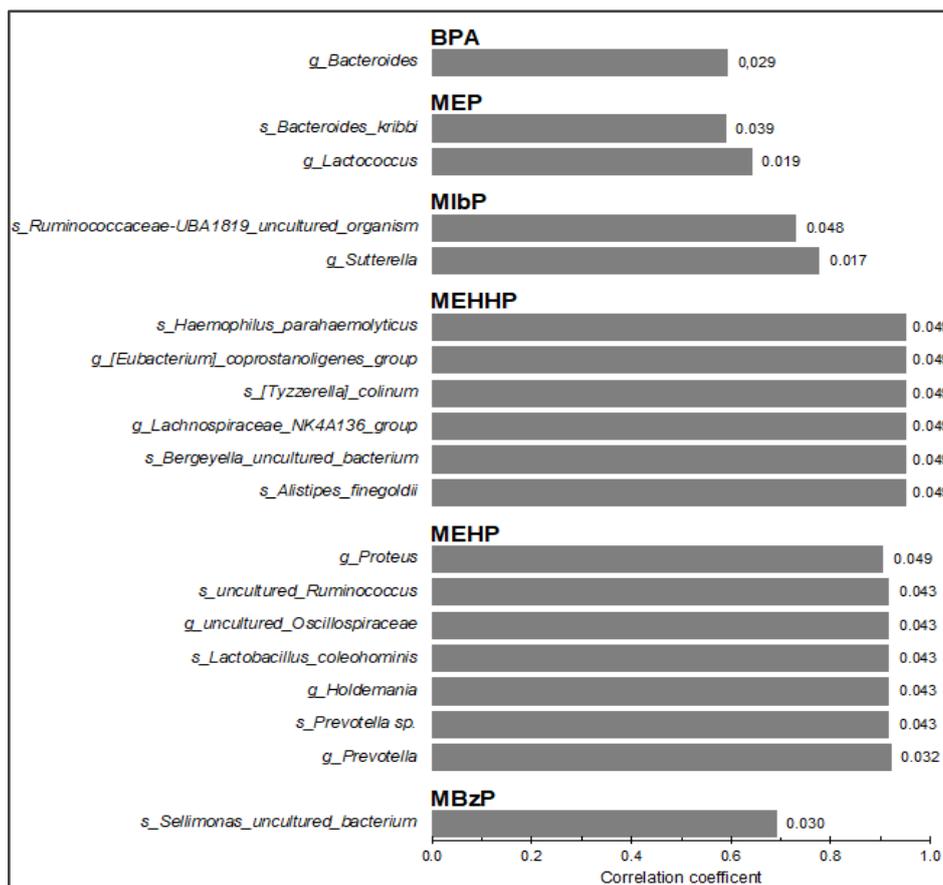
**Tabella 1.** Caratteristiche generali delle madri incluse nello studio e valutate a T3 (n = 45). I dati sono stati riportati come media, deviazione standard (SD), o frequenza dei soggetti espressa in percentuale (%).

Legenda. BMI, Body Mass Index; WC, waist circumference; WHR, waist to hip ratio; WHtR, waist-to-height ratio.

#### 4.2 Associazione dei livelli di EDCs urinari materni e composizione del microbiota intestinale dei neonati.

Delle 45 coppie mamma-bambino arruolate, sono stati presi in considerazione i campioni fecali di 20 neonati allattati al seno almeno una volta al giorno fino ai 12 mesi di età (n=20) ed è stata effettuata l'analisi della composizione del microbiota intestinale. In particolare, le abbondanze relative (*amplicon sequence variants*, ASV) ottenute, sono state correlate con le concentrazioni di EDCs trovate nelle urine materne (Fig.7).

Filtrando per significatività ( $p < 0,05$ ), il BPA è risultato essere correlato positivamente con il genere *Bacteroides* ( $p=0,029$ ). Il MEP era associato positivamente a due diversi taxa, *Bacteroides kribbie* ( $p=0,039$ ) il genere *Lactococcus* ( $p=0,019$ ). Il MIBP correlava positivamente con specie assegnate al genere *Ruminococcaceae-UBA1819* ( $p=0,048$ ) e con il genere *Sutterella* ( $p=0,017$ ). MEHHP e MEHP (metaboliti del DEHP), hanno mostrato il maggior numero di correlazioni positive con i differenti taxa microbici intestinali; in particolare, il MEHHP è risultato associato a 2 generi (*Eubacterium coprostanoligenes* ( $p=0,049$ ) e NK4A136 delle *Lachnospiraceae* ( $p=0,049$ )) e a 4 specie (*Haemophilus parahaemolyticus*,  $p=0,049$ ; *Tyzzelerella colinum*,  $p=0,049$ ; *Bergeyella spp.*,  $p=0,049$ ; *Alistipes finegoldii*,  $p=0,049$ ), mentre il MEHP è emerso essere correlato a 4 generi (*Proteus*,  $p=0,049$ ; *Oscillospiraceae* non coltivate,  $p=0,043$ ; *Holdemania*,  $p=0,043$ ; *Prevotella*,  $p=0,032$ ) e 2 specie (*Ruminococcaceae* non coltivate,  $p=0,043$ ; *Prevotella sp.*,  $p=0,043$ ). Una correlazione positiva è stata trovata per il MBzP con una specie non coltivata appartenente al genere *Sellimonas* ( $p=0,030$ ).



**Figura 7.** Punteggi di correlazione significativi ( $p < 0,05$ , Spearman's rank correlation) tra l'abbondanza relativa di microrganismi intestinali trovati nei campioni fecali di neonati allattati al seno almeno una volta al giorno fino ad 12 mesi di età e le concentrazioni di EDCs trovate nei campioni di urine delle rispettive madri. **Legenda.** BPA (Bisfenolo A), MEP (monoetilftalato), MibP (mono-isobutilftalato), MEHHP (mono-(2-etil-5-idrossi-esil)-ftalato, MEHP (mono-(2-etilesil)-ftalato), MBzP (monobenzilftalato). Prima del nome del taxon, è indicato il livello tassonomico della relativa ASV (g, genere; s, specie).

### 4.3 Esposizione infantile a BPA e ftalati

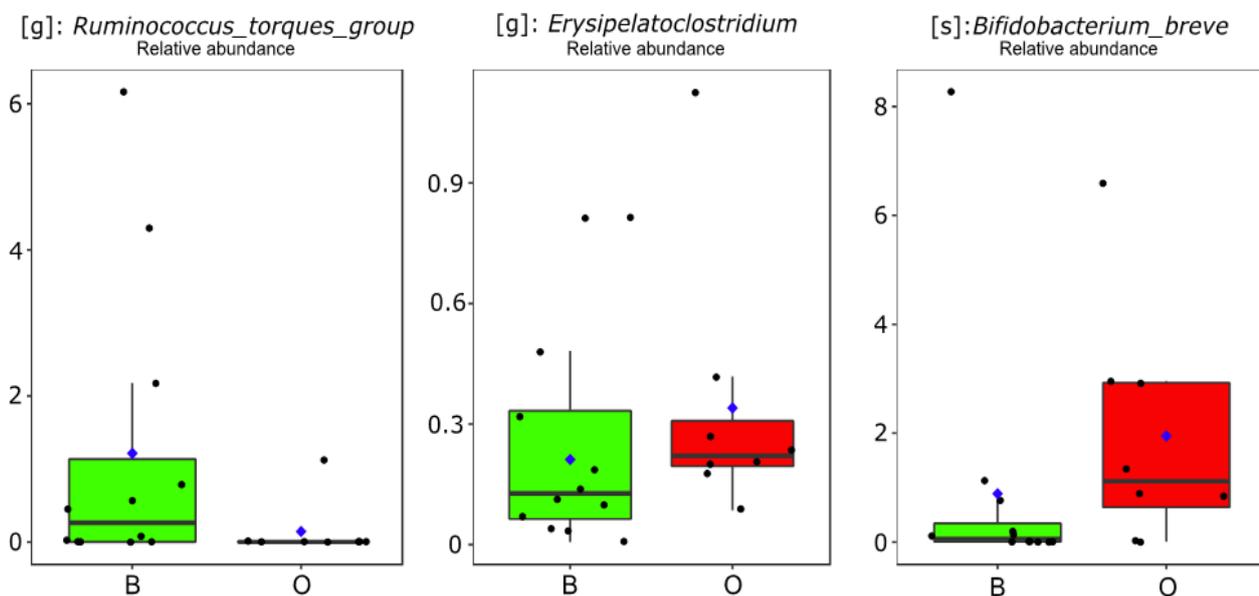
Successivamente, i neonati sono stati suddivisi in due gruppi diversi in base alla concentrazione di BPA misurata nel rispettivo campione di urina materna. Sulla base dei risultati ottenuti è stato calcolato il valore mediano di BPA (0,96  $\mu\text{g/g}$  di creatinina) (Tabella 2) che ha permesso di raggruppare i neonati come segue:

1. **gruppo O (over; n=8)**, neonati da madre con elevata esposizione al BPA (BPA nelle urine materne  $>0,96 \mu\text{g/g}$  di creatinina)
2. **gruppo B (below; n=12)** neonati da madre con bassa esposizione al BPA (BPA nelle urine materne  $<0,96 \mu\text{g/g}$  di creatinina).

|         | BPA                           | MEP                           | MiBP                          | MEHHP                         | MEHP                          | MBzP                          |
|---------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
|         | $\mu\text{g/g}$ di creatinina |
| Median  | 0,96                          | 7.73                          | 0.89                          | 1.24                          | 0,30                          | 0.64                          |
| Min-Max | 0,34-2,98                     | 0.01–83.67                    | 0–10.4                        | 0.1–10.28                     | 0,03-5,16                     | 0.16–6.77                     |
| IQR     | 0,73-1,63                     | 3.05–12.84                    | 0–2.99                        | 0.79–2.23                     | 0,13 - 0,70                   | 0.42–1.03                     |

**Tabella 2.** Concentrazione urinaria ( $\mu\text{g/g}$  di creatinina) di BPA (Bisfenolo A), MEP (monoetilftalato), MiBP (mono-isobutilftalato), MEHHP (mono-(2-etil-5-idrossi-esil)-ftalato), MEHP (mono-(2-etilesil)-ftalato), MBzP (monobenzilftalato) delle madri che allattavano al seno almeno 1 volta al giorno fino ai 12 mesi di età del bambino. **Legenda:** IQR: range interquartile (Inter-quartile range, corrispondente al 25° – 75° percentile). Min: valore minimo; Max: valore massimo.

Quindi, confrontando le abbondanze relative (ASV) del gruppo O con quelle del gruppo B, sono stati identificati 3 taxa che differivano in modo significativo (Fig.8). In particolare, *Ruminococcus torques* è risultato più abbondante ( $p<0,05$ ) nei neonati appartenenti al gruppo B, mentre *Erysipelaclostridium* e *Bifidobacterium breve* hanno mostrato un'abbondanza relativa più elevata nei campioni fecali dei neonati del gruppo O.



**Figura 8.** Differenze nella composizione del microbiota intestinale tra i bambini appartenenti al gruppo B e al gruppo O.

Seguendo un approccio simile, in funzione delle concentrazioni urinarie di ftalati delle madri, i neonati sono anche stati suddivisi in due gruppi.

1. **gruppo con alto rischio di esposizione (HR, n=12):** neonati, le cui madri mostravano la compresenza di almeno 3 ftalati su 5 (MEP, MIbP, MEHHP, MEHP e MBzP) con una concentrazione superiore al relativo valore mediano (Tabella 2).
2. **gruppo con basso rischio di esposizione (LR, n=8):** tutti i neonati che non rientravano nel gruppo HR.

Tuttavia, la composizione del microbiota intestinale non differiva significativamente tra i due gruppi (HR vs.LR).

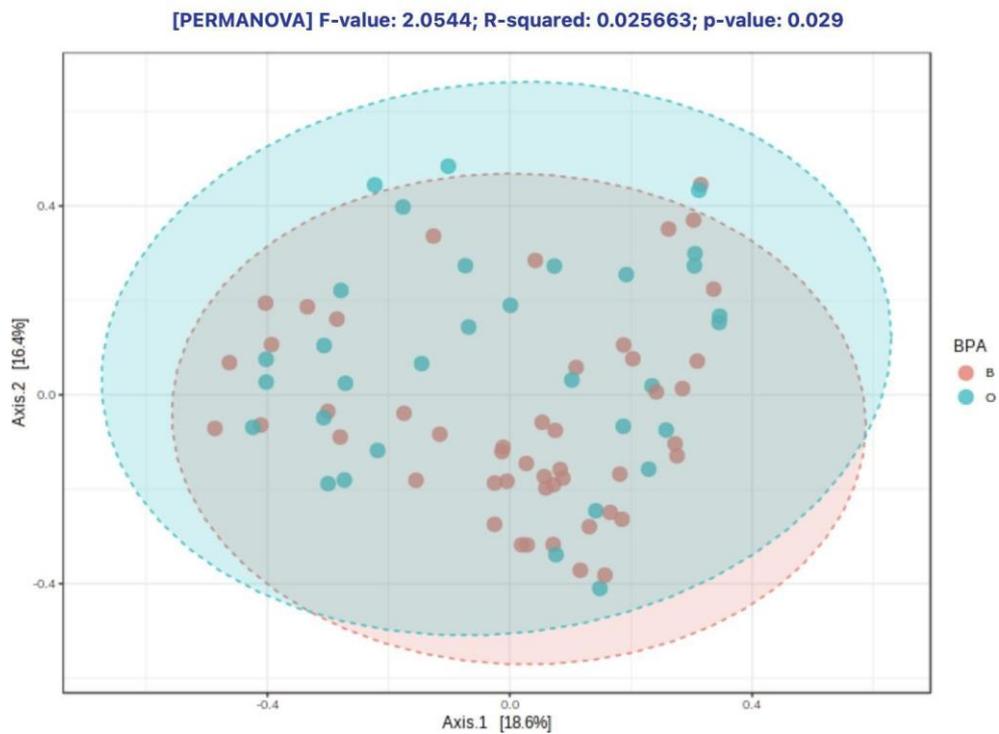
#### 4.4 Profilazione retrospettiva del microbiota intestinale dei neonati

Mantenendo la stessa suddivisione in sottogruppi (inizialmente O vs. B e, successivamente, HR vs. LR), sono state indagate le differenze della composizione del microbiota intestinale tra i diversi gruppi in modo retrospettivo, ovvero a 6 mesi dal parto (T2), a 1 mese dal parto (T1), immediatamente dopo il parto (T0, analisi del meconio). L'indice di Jaccard è stato scelto per valutare la  $\beta$ -diversità nel confronto tra i vari gruppi: O vs. B e HR vs. LR, a tutti i livelli tassonomici (Tabella 3). Sebbene specificamente limitato al livello di genere, ancora una volta, il confronto tra il gruppo O e il gruppo B ha determinato una differenza significativa ( $p=0,049$ ) tra la  $\beta$ -diversità, a livello di genere (Tabella 3 e Fig.9).

Al contrario, nessuna differenza è stata riscontrata confrontando la  $\beta$ -diversità del gruppo HR vs. LR per tutti i livelli tassonomici.

| Livello tassonomico | O   vs   B |           |                   | HR   vs   LR |               |         |
|---------------------|------------|-----------|-------------------|--------------|---------------|---------|
|                     | F-value    | R-squared | p-value           | F-value      | R-squared     | p-value |
| Phylum              | 1.6<br>87  | 0.021     | 0.1<br>50         | 1.5<br>74    | 0.<br>01<br>9 | 0.161   |
| Classe              | 1.1<br>91  | 0.015     | 0.2<br>99         | 1.6<br>62    | 0.<br>02<br>0 | 0.113   |
| Ordine              | 1.0<br>36  | 0.013     | 0.4<br>05         | 1.4<br>18    | 0.<br>01<br>7 | 0.144   |
| Famiglia            | 1.1<br>33  | 0.014     | 0.3<br>19         | 1.5<br>39    | 0.<br>01<br>9 | 0.105   |
| Genere              | 1.7<br>16  | 0.021     | <b>0.0<br/>49</b> | 1.4<br>83    | 0.<br>01<br>8 | 0.090   |
| Specie              | 1.2<br>63  | 0.015     | 0.2<br>39         | 1.3<br>60    | 0.<br>01<br>7 | 0.178   |

**Tabella 3.**  $\beta$ -diversità (indice di Jaccard) (PERMANOVA) basato sull'analisi delle coordinate principali (Principal Coordinate Analysis, PCoA) tra i campioni fecali dei neonati consegnati in momenti diversi (meconio, T0; 1 mese di età, T1; 6 mesi di età, T2; e 12 mesi di età, T3). I bambini sono stati stratificati in esposti ad alte (O) e basse (B) concentrazioni di BPA attraverso l'allattamento al seno, nonché in esposti ad alto rischio (HR) o a basso rischio (LR) ad altri EDC attraverso l'allattamento al seno. La significatività è stata raggiunta per valori di  $p < 0,05$ .

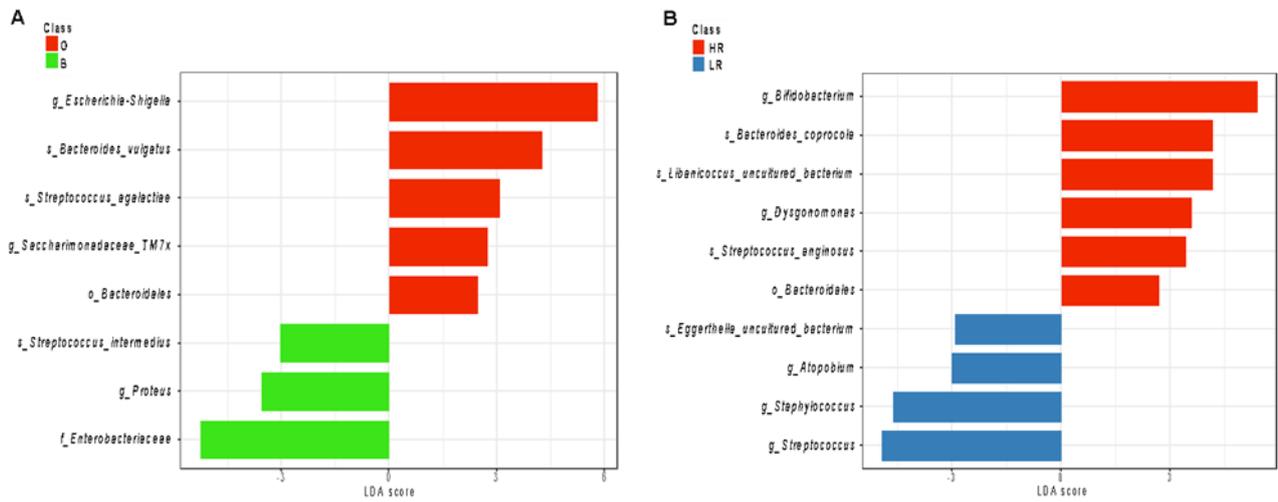


**Figura 9.** Distribuzione dei campioni appartenenti ai gruppi O e B, secondo le due componenti principali ottenute dall'analisi della PCA.

#### 4.5 Potenziali biomarcatori microbici intestinali di esposizione ad alto rischio a ECDs in età pediatrica

Infine, è stata eseguita un'analisi della dimensione dell'effetto discriminante lineare (LEfSe) utilizzando tutti i campioni fecali ai differenti follow-up (T0, T1, T2 e T3). Impostando come soglia LDA-score > 2 con  $p < 0,05$ , sono stati identificati 8 taxa che differivano significativamente nel confronto tra O vs. B (Fig. 10A). Allo stesso modo, sono stati identificati 10 taxa che differivano in modo significativo nel confronto tra HR vs. LR (Fig. 10B).

Considerando tutti i follow-up, l'ordine *Bacteroidales*, due generi (*Escherichia-Shigella*, *Saccharimonadaceae TM7x*) e due specie *Bacteroides vulgatus* e *Streptococcus agalactiae* erano significativamente rappresentativi dei neonati appartenenti al gruppo O (Fig. 10A). Al contrario, *Enterobacteriaceae*, *Proteus* e *Streptococcus intermedius* erano i taxa più rappresentativi dei neonati appartenenti al gruppo B (Fig. 10A). Valutando le differenze nel microbiota intestinale tra neonati HR vs. LR, l'ordine di *Bacteroidales*, con i generi *Bifidobacterium*, *Dysgonomonas* e con le specie *Bacteroides coprocola*, *Libanicoccus uncultured bacterium* e *Streptococcus anginosus* erano significativamente rappresentativi del gruppo HR (Fig. 10B). Il gruppo LR era invece significativamente rappresentato dalla presenza di 3 diversi generi, *Atopobium*, *Staphylococcus* e *Streptococcus*, e di una specie non coltivata di *Eggerthella* (Fig. 10B).



**Figura 10.** Pannello A: differenze metatassonomiche (metodo LefSe) nel microbiota fecale di neonati allattati al seno da madri che mostrano concentrazioni di BPA urinario superiori (O) o inferiori (B) al valore mediano di BPA. Pannello B: differenze metatassonomiche (metodo LefSe) nel microbiota fecale di neonati esposti ad alto rischio (HR) e basso rischio (LR) a ECD. Punteggi LDA osservati per i singoli ASV che hanno superato la soglia di significatività LefSe.

## 5. Discussione

I primi “1000 giorni di vita”, rappresentano quel periodo di tempo che va dal concepimento ai primi due anni di età del bambino, ed è un intervallo temporale di fondamentale importanza per lo sviluppo e la salute del bambino e del futuro adulto (*Mameli C, et al., 2016*). Durante questa finestra temporale possono intervenire diversi fattori ambientali in grado di influenzare la salute a lungo termine. Si tratta quindi di un momento critico per lo sviluppo delle NCDs (*Hoffman DJ, et al., 2017*) e dell'obesità (*Oussaada SM, et al., 2019*).

Il National Institute of Environmental Health Science (NIH) definisce gli EDCs quali fattori esogeni che interferiscono con l'assetto ormonale dell'individuo portando ad un aumento del rischio di esiti avversi per la salute (*La Merrill MA, et al., 2020*). Allo stesso modo, la comunità polimicrobica che abita l'ambiente del colon ha dimostrato il suo ruolo nella modulazione della secrezione ormonale (*Neuman H, et al., 2015*). Pertanto, l'attuale letteratura assegna sia al microbiota intestinale che agli EDCs un ruolo fondamentale nell'insorgenza dell'ampio spettro di NCDs (quali ad esempio obesità, diabete di tipo 2 e cancro) (*Ahn J, et al., 2021*). La conoscenza di come le esposizioni ad EDCs in età adulta possano causare conseguenze negative sulla salute è ampiamente riconosciuta, ma è stato dimostrato che le esposizioni nella prima infanzia hanno effetti più gravi e che persistono per tutta la vita (*Birnbaum LS, et al., 2003; Rubin BS, et al., 2009*). Dalla nascita, il microbiota intestinale interagisce con gli ospiti sulla base di una relazione bidirezionale; tuttavia, il modo in cui lo sviluppo del microbiota intestinale sia modellato da diversi livelli di esposizione all'EDC è ancora scarsamente studiato. Infatti, in seguito all'esposizione a queste sostanze chimiche, può andare incontro ad una modificazione della sua composizione e del suo funzionamento, sviluppando una condizione di disbiosi (*Velmurugan G, et al., 2017*). Questa interazione è dovuta alla facoltà dei microrganismi intestinali di metabolizzare queste sostanze, i cui sottoprodotti ne determinano un'alterazione, andando così a compromettere la salute dell'ospite (*Gálvez- Ontiveros Y, et al., 2020*). Tuttavia, mancano, studi che indagano la suscettibilità agli EDCs nei “primi 1000 giorni” di vita, periodo di tempo in cui le fonti di esposizione dipendono principalmente dall'ambiente familiare e dal latte materno. In particolare, nel caso del latte materno i composti lipofili si accumulano a livello delle ghiandole mammarie e vengono secreti insieme al latte, costituendo così un potenziale rischio per la salute del lattante (*Witczak A, et al., 2021*). La scoperta della presenza di queste molecole nel latte umano ha suscitato una forte preoccupazione a causa dei potenziali effetti avversi che questa

esposizione così precoce possa avere sulla salute del bambino e del futuro adulto (*Iribarne- Durán LM, et al., 2022*).

La presente tesi illustra una analisi osservazionale e trasversale che fa parte di uno degli obiettivi secondari del più ampio progetto longitudinale prospettico A.MA.MI (Alimentazione MAMma e bambino nei primi Mille giorni) (*Raspini B, et al., 2020*) il quale ha avuto l'obiettivo di indagare lo sviluppo del microbiota intestinale dei neonati mediante la determinazione dell'abbondanza relativa dei microrganismi principali, la diversità microbica e la variazione interindividuale. Inoltre, ha studiato la possibile correlazione tra i fattori materni, infantili e ambientali e la composizione microbica intestinale del bambino durante il primo anno di vita (*Raspini B, et al., 2020*).

Partendo dall'assunzione che attraverso il latte materno vi sia una trasmissione verticale di EDCs dalla mamma al neonato, l'analisi oggetto della presente tesi, ha indagato l'associazione tra il profilo microbico a 12 mesi di età (follow-up T3) dei bambini che assumevano almeno una poppata al giorno e le concentrazioni di BPA e di ftalati (MEP, MibP, MEHHP, MEHP, MBzP) nelle urine materne, al medesimo follow-up. In un secondo momento, sono state indagate retrospettivamente le differenze a livello della composizione del microbiota intestinale dei lattanti, subito dopo il parto (T0, analisi del meconio), ad 1 mese dalla nascita (T1) e a 6 mesi dalla nascita.

In generale, l'esposizione agli EDCs delle madri dei neonati valutati nella presente tesi è stata precedentemente determinata e analizzata sia mediante questionari dedicati, che attraverso la misurazione diretta della concentrazione di BPA e ftalati nelle urine materne unitamente ad una valutazione delle abitudini alimentari e dello stile di vita, come descritto nel lavoro di Di Napoli et al. (2021). Qui la popolazione campione era caratterizzata da abitudini di vita complessivamente sane, comprese abitudini alimentari moderatamente adeguate e in linea con le indicazioni nazionali fornite dalle "Linee Guida per una sana Alimentazione" (Linee guida CREA) (*CREA, 2018*) D'altra parte, un'alta percentuale di donne arruolate sembrava potenzialmente esposta a fonti comuni di BPA e ftalati, poiché era abituata a consumare e conservare cibo in contenitori di plastica, cibo avvolto in pellicola e cibo in scatola e contenitori di plastica esposti ad alte temperature. infatti, più del 60% utilizzava regolarmente prodotti in plastica per la cura quotidiana della persona (lozioni, trucchi, cure odontoiatriche, occhiali, guanti), in linea con la prevalenza dell'84,2% per l'uso settimanale di olio e creme dermici e il 59,6% dell'uso settimanale di cosmetici stimati in una coorte di donne spagnole sane (18-50 anni) da Duran et al. (*Iribarne-Durán LM, et al., 2020*). Inoltre, si è osservato, che quasi tutti i partecipanti consumavano cibo pre-preparato in contenitori di plastica o alimenti avvolti in

pellicola (o in scatola) e circa il 90% utilizzava frequentemente contenitori o pellicole di plastica per la conservazione del cibo, con oltre il 70% dei soggetti che utilizzava il microonde o puliva i contenitori di plastica attraverso la lavastoviglie. Infine, il consumo di acqua da bottiglie di plastica è stato osservato nel 64,5% delle donne e quasi il 70% delle donne ha consumato salse o condimenti in contenitori di plastica. Dal momento che i materiali che sono a contatto con gli alimenti rappresentano una possibile fonte di esposizione agli EDC, questi risultati relativi alle abitudini delle donne arruolate, hanno suggerito un'elevata esposizione del campione a queste sostanze chimiche. Questi risultati erano quindi in linea con il diffuso utilizzo di prodotti contenenti queste molecole, come dimostrato da studi precedenti (*Iribarne-Durán LM, et al., 2020*). L'analisi delle concentrazioni urinarie di MEP, MEHHP, MBzP, MEHP, MibP e BPA, ha evidenziato la presenza di livelli misurabili nella totalità del campione, confermando un'esposizione diffusa della popolazione di studio a questi composti. Inoltre, analizzando le abitudini alimentari quali potenziali “fattori di esposizione” agli EDCs, è stato riscontrato che i livelli urinari di MEP il consumo di salse o condimenti in contenitori di plastica era significativamente associato ai

Partendo dallo studio ancillare di Di Napoli *et al.* (*Di Napoli I, et al. 2021*), la presente tesi ha successivamente analizzato la composizione del microbiota intestinale in un sottogruppo di bambini che assumevano almeno una poppata al giorno ad un anno di età e ha correlato le abbondanze relative risultanti con le concentrazioni di BPA e di ftalati riscontrate nelle urine delle rispettive madri. Per quanto riguarda l'asse EDCs-microbiota intestinale, la maggior parte della letteratura disponibile è stata fornita da studi su modelli animali (*Liu R, et al., 2022; Javurek AB, et al., 2016; Chen L, et al., 2018; Lai KP, et al., 2016*) e, in media, questi lavori si sono concentrati profondamente su pochi e specifici interferenti endocrini.

In questo studio, invece, per la prima volta, abbiamo considerato in concomitanza cinque diverse sostanze chimiche, tra le quali anche il BPA che è stato analizzato a parte rispetto ad altri in quanto risulta essere il più studiato tra gli EDCs (*Rogers JA, et al., 2013*).

In questo caso, il BPA è correlato positivamente con *Bacteroidia* a diversi livelli tassonomici, vale a dire, dall'ordine alla specie, dove *B. vulgatus* è emerso come il taxon maggiormente rappresentativo di questa relazione. BPA e *Bacteroides* condividevano caratteristiche comuni dimostrando entrambi un ruolo obesogenico, come precedentemente riportato da altri autori (*Chen L, et al., 2018*). Per quanto riguarda *B. vulgatus*, è stato suggerito anche come biomarcatore per i pazienti con T2D (*Leite AZ, et al., 2018*). Oltre alle malattie metaboliche, il potenziale contributo cancerogeno del BPA è un

ulteriore argomento di ricerca in corso (Wang Y, et al., 2023) ma, al giorno d'oggi, la letteratura non è completamente d'accordo sulla sua correlazione con la diagnosi tumorale a causa della presenza di numerosi limiti sia nel disegno che nella metodologia generale degli studi che aumentano il rischio di ottenere risultati distorti (Prueitt RL, et al., 2023). Al contrario, studi di popolazione hanno destato una notevole attenzione a *Bacteroides spp.*, e in particolare ai gruppi *B. vulgatus* e *B. fragilis*, che sono stati trovati come i principali biomarcatori di patologia tumorale (Shi F, et al., 2023). Sulla base di queste considerazioni, sembra possibile ipotizzare un possibile effetto di potenziamento fornito da alcuni specifici taxa del microbiota intestinale nell' esacerbare il rischio di obesità, malattie metaboliche e insorgenza di cancro come risultato di un'elevata esposizione al BPA.

L'analisi delle concentrazioni di BPA nei campioni di urine materne è stato rilevato un valore mediano di 0,96 µg/g di creatinina; sulla base della concentrazione di BPA rilevata la coorte è stata suddivisa in due gruppi distinti, a seconda che la concentrazione fosse superiore (over, gruppo O) o inferiore (below, gruppo B) a 0,96 µg/g di creatinina. Successivamente è stato eseguito un confronto tra la composizione microbica intestinale dei bambini appartenenti al gruppo ad alta esposizione e quelli del gruppo a bassa esposizione al fine di indagare eventuali differenze microbiche. Sulla base della stratificazione di coorte in diversi gruppi, il confronto tra neonati esposti a bassi livelli di BPA (gruppo B) e alti livelli di BPA (gruppo O) ha portato a valutare come il gruppo *Ruminococcus torques* fosse l'unico taxon che mostrava un aumento significativo nei neonati di cui le madri riportavano una concentrazione urinaria di BPA inferiore ai valori mediani. In uno studio precedente che indagava la permeabilità paracellulare dell'intestino tenue e lo sviluppo del sistema immunitario in bambini sani durante i primi due anni di vita, il gruppo *Ruminococcus torques* era significativamente associato a cambiamenti nei livelli di calprotectina (Kaczmarczyk M, et al., 2021). Considerando che anche il gruppo *Ruminococcus torques* è coinvolto nei processi di degradazione della mucina (Glover JS, et al., 2022), gli autori hanno concluso suggerendo un possibile coinvolgimento del gruppo *Ruminococcus torques* nel supportare la maturazione del sistema immunitario nelle prime fasi della vita (Kaczmarczyk M, et al., 2021).

Una tendenza opposta è stata, invece, rilevata per le abbondanze di *Erysipelatoclostridium* e *Bifidobacterium breve* nella coorte oggetto dello studio. Entrambi questi taxa hanno colonizzato maggiormente il microbiota intestinale dei bambini esposti ad alte concentrazioni di BPA. I membri del genere *Erysipelatoclostridium* hanno dimostrato un elevato potenziale immunogenico e resistenza contro un ampio spettro di antibiotici (Palm NW, et al., 2014). Inoltre, Chen e colleghi, (Chen G, et al., 2022) hanno recentemente discusso la possibile associazione tra *Erysipelatoclostridium* sia con

l'obesità che con la permeabilità intestinale in modelli murini. La conclusione fornita da questo lavoro era in linea con prove precedenti (*Kaakoush NO, 2015*) che, rivedendo la letteratura, assegnavano a *Erysipelatoclostridium* un ruolo chiave in un ampio spettro di processi infiammatori.

Nessuna evidenza è, invece, disponibile per comprendere la relazione esistente tra *Bifidobacterium* ed EDCs. I membri di questo genere sono, infatti, riconosciuti come promotori di salute nei neonati e principalmente coinvolti, in concomitanza con l'allattamento al seno esclusivo per i primi sei mesi di vita del bambino, nello sviluppo del sistema immunitario (*Saturio S, et al., 2021; Henrick BM, et al., 2021*). Sostituendo l'abbondanza di *Firmicutes*, il *Bifidobacterium* può essere coinvolto nell'assorbimento di energia dagli alimenti (*O'Callaghan A, et al., 2016*). In un recente studio la composizione del microbiota intestinale di una coorte di soggetti provenienti dal Pakistan affetti da diabete mellito di tipo 2, l'abbondanza di *Bifidobacterium* era positivamente correlata con *Libanicoccus spp.*, ed entrambi i taxa erano associati alla presenza di malattia (*Saleem A, et al., 2022*). Successivamente la popolazione di neonati è stata suddivisa in due gruppi sulla base delle concentrazioni di ftalati (MEP, MIBP, MEHHP, MEHP e MBzP) rilevate nelle urine materne. La suddivisione è stata eseguita considerando il valore mediano di concentrazione di ciascuna delle 5 molecole di ftalati analizzate: se le madri mostravano una concentrazione superiore al valore mediano per almeno 3 ftalati su 5, i rispettivi bambini venivano considerati ad alto rischio di esposizione (gruppo HR, High Risk); al contrario, se presentavano una concentrazione inferiore al valore mediano per almeno 3 ftalati su 5, i corrispondenti neonati erano considerati a basso rischio di esposizione (gruppo LR, Low Risk). Tuttavia, il confronto dei due gruppi non ha mostrato delle differenze statisticamente significative. La mancanza di significatività potrebbe essere dovuta alla ridotta numerosità campionaria, dal momento che in alcuni studi su modelli murini è stata evidenziata un'associazione tra l'esposizione ad alte dosi di DEHP, precursore di MEHHP e MEHP, e la composizione del microbiota intestinale. Lo studio condotto da Fu e colleghi (*Fu X, et al., 2021*) ha osservato infatti un aumento di *Firmicutes* e una riduzione di *Bacteroidetes* nei topi esposti al DEHP per 30 giorni rispetto al gruppo di controllo.

Infine, il presente studio, mantenendo la stessa suddivisione dei neonati in gruppi, sulla base della concentrazione urinaria materna di BPA prima e di ftalati dopo, ha analizzato in maniera retrospettiva il microbiota intestinale dei bambini ai follow-up precedenti al T3 (meconio raccolto alla nascita, T0; a 1 mese dalla nascita, T1; a 6 mesi dalla nascita, T2). L'analisi della dimensione dell'effetto discriminante lineare (LEfSe) del presente studio ha fornito una proiezione simile sia di *Bifidobacterium* che di *Libanicoccus* nei neonati appartenenti al gruppo con madri esposte a elevati

livelli di ftalati (gruppo HR). Studi recenti hanno evidenziato come *Libanicoccus* fosse associato ad aterosclerosi (Zhu S, et al., 2021; Wang Z, et al., 2022). Risultati controversi, invece, hanno coinvolto i *Proteobacteria*. Infatti, l'elevata esposizione al BPA ha portato al punteggio LEfSe più alto per il genere *Escherichia-Shigella*, mentre la famiglia *Enterobacteriaceae*, supportata dal contributo del genere *Proteus*, ha mostrato il contrario. Sebbene i cambiamenti nei proteobatteri e, a sua volta, nel metabolismo proteolitico siano ampiamente riconosciuti nello spettro degli squilibri intestinali associati a esiti avversi dovuti alla presenza di patogeni opportunisti all'interno di questo phylum (Verburgt CM, et al., 2023; Zhong W, et al., 2022), non sono state rilevate correlazioni dirette tra l'abbondanza di proteobatteri e le concentrazioni di BPA quando sono stati analizzati campioni di sangue, urina o feci in uno studio precedente (Mao W, et al., 2023).

## 6. Conclusione

Sebbene i risultati riproducano parzialmente quelli forniti da studi precedenti, questi non possono essere considerati conclusivi a causa di diversi limiti che possono aver influenzato la presente ricerca. Tra i primi limiti c'è il fatto di aver considerato solo il time point ultimo senza poter effettuare uno studio longitudinale mentre uno dei limiti più importanti è la mancanza di una quantificazione dei livelli di dell' EDCs nei fluidi biologici dei neonati. Pur considerando questa limitazione, il presente studio ha sostenuto l'esistenza che alcuni membri del microbiota possano essere coinvolti in processi che portano ad aumentare il rischio di futura insorgenza di NCD. Il gruppo *Bacteroidia* e, in particolare, *B. vulgatus* ha riportato varie prove sulla sua possibile relazione positiva con alti livelli di esposizione a BPA e EDC. Il concomitante aumento dell'abbondanza di *Bifidobacterium* e *Libanicoccus* nel microbiota intestinale necessita di ulteriori studi sui possibili ruoli nell'agire come biomarcatori di alti livelli di esposizione a EDC. Tuttavia, considerando l'assenza di grandi prove rispetto all'esposizione all' EDC nei primi anni di vita, sono ancora aperte varie domande sull'asse EDC - microbiota intestinale e sono necessarie ulteriori ricerche per migliorare la conoscenza dei meccanismi che possono essere coinvolti nell'insorgenza di NCD in età adulta.

## 7. Bibliografia

- Aagaard K, et al. The placenta harbors a unique microbiome. *Sci Transl Med*. 2014;6:237ra65.
- Adair LS, et al. Size at birth, weight gain in infancy and childhood, and adult blood pressure in 5 low- and middle-income-country cohorts: when does weight gain matter? *Am J Clin Nutr*. 2009;89:1383–1392.
- Ahn J, et al. Environmental Influences on the Human Microbiome and Implications for Noncommunicable Disease. *Annu Rev Public Health*. 2021 Apr 1;42:277-292.
- Alonso-Magdalena P, et al. Bisphenol-A acts as a potent estrogen via non-classical estrogen triggered pathways. *Mol Cell Endocrinol*. 2012;355:201–207.
- Alonso-Magdalena P, et al. Endocrine disruptors in the etiology of type 2 diabetes mellitus. *Nat Rev Endocrinol*. 2011;7:346–353.
- Altschul SF, et al. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol*. 1990;215:403–10.
- Andreotti R, et al. Assessment of bacterial diversity in the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* through tag-encoded pyrosequencing. *BMC Microbiol*. 2011;11:6.
- Arnold JW, et al. Emerging Technologies for Gut Microbiome Research. *Trends Microbiol*. 2016;24:887-901.
- Azad MB, et al. Gut microbiota of healthy Canadian infants: profiles by mode of delivery and infant diet at 4 months *CMAJ*, 185 (2013), pp. 385-394.
- Azcarate-Peril MA, et al. The intestinal microbiota, gastrointestinal environment and colorectal cancer: a putative role for probiotics in prevention of colorectal cancer? *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2011;301(3):G401–24.
- Bacchetta J, et al. Both extrauterine and intrauterine growth restriction impair renal function in children born very preterm. *Kidney Int*. 2009;76:445–452.
- Barker DJP. Developmental origins of chronic disease. *Public Health*. 2012;126:185–189.
- Barker DJ. The developmental origins of adult disease. *J Am Coll Nutr*. 2004;23:588S–595S.

- Ben-Jonathan N, et al. Effects of bisphenol A on adipokine release from human adipose tissue: implications for the metabolic syndrome. *Mol Cell Endocrinol*. 2009;304:49–54.
- Bergström A, et al. Establishment of intestinal microbiota during early life: a longitudinal, explorative study of a large cohort of Danish infants *Appl Environ Microbiol*, 80 (2014), pp. 2889-2900.
- Biagi E, et al. The Bacterial Ecosystem of Mother's Milk and Infant's Mouth and Gut. *Front Microbiol*. 2017;8:1214.
- Bianco ME, et al. Hyperglycemia During Pregnancy and Long-Term Offspring Outcomes. *Curr. Diab. Rep.* Borre YE, et al. Microbiota and neurodevelopmental windows: Implications for brain disorders. *Trends Mol. Med*. 2014;20:509–518.
- Birnbaum LS, et al. Cancer and developmental exposure to endocrine disruptors. *Environ Health Perspect*. 2003 Apr;111(4):389-94.
- Bliatka D, et al. Effect of endocrine disruptors on male reproduction in humans: why the evidence is still lacking? *Andrology-U.S* 2017; 5: 404–407.
- Brines J, et al. The First 1000 Days of Infant. *Healthcare (Basel)*. 2022 Jan 6;10(1):106.
- Caporaso JG, et al. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nat Methods*. 2010;7(5):335–6.
- Carbone EA, et al. A systematic review on the role of microbiota in the pathogenesis and treatment of eating disorders. *Eur Psychiatry*. 2020;64:e2.
- Carding S, et al. Dysbiosis of the gut microbiota in disease. *Microb Ecol Health Dis*. 2015;26:26191.
- Cena H, et al. Nutrition in pregnancy: three crucial periods for mothers and newborns. *Italian J Gynaecol Obstetrics*. 2018;30(2):27–37.
- Chao A, et al. Estimating the number of species in a stochastic abundance model. *Biometrics*. 2002;58:531–9.

- Chen G, et al. Fluoride induced leaky gut and bloom of *Erysipelatoclostridium ramosum* mediate the exacerbation of obesity in high-fat-diet fed mice. *J Adv Res.* 2022 Oct 29:S2090-1232(22)00239-9.
- Chen L, et al. Dysbiosis of gut microbiota by chronic coexposure to titanium dioxide nanoparticles and bisphenol A: Implications for host health in zebrafish. *Environ Pollut.* 2018 Mar;234:307-317.
- Chomtho S, et al. Infant growth and later body composition: evidence from the 4-component model. *Am J Clin Nutr.* 2008;87:1776–1784.
- Claus SP, et al. The gut microbiota: a major player in the toxicity of environmental pollutants? *NPJ Biofilms Microbiomes.* 2017 May 4;2:16003.
- Collado MC, et al. Human gut colonisation may be initiated in utero by distinct microbial communities in the placenta and amniotic fluid. *Sci Rep.* 2016;6:23129.
- Collado MC, et al. Effect of mother's weight on infant's microbiota acquisition, composition, and activity during early infancy: a prospective follow-up study initiated in early pregnancy. *Am J Clin Nutr.* 2010;92(5):1023–1030.
- Coo H., et al. Are observed associations between a high maternal prepregnancy body mass index and offspring IQ likely to be causal? *J. Epidemiol. Community Health.* 2019;73:920–928.
- CREA. Consiglio per la Ricerca in Agricoltura e L'analisi Dell'economia Agraria. Linee Guida per una Sana Alimentazione 2018. Available online: <https://www.crea.gov.it/web/alimenti-e-nutrizione/-/linee-guida-per-una-sana-alimentazione-2018>.
- Damstra T. Potential effects of certain persistent organic pollutants and endocrine disrupting chemicals on the health of children. *Clinical Toxicology.* 2002;40(4):457–465.
- Decker E, et al. Stockinger Cesarean delivery is associated with celiac disease but not inflammatory bowel disease in children *Gut Microbes*, 2 (2011), pp. 91-98.
- De Giuseppe R, et al. LIMIT: Lifestyle and Microbiome InTeraction Early Adiposity Rebound in Children, a Study Protocol. *Metabolites.* 2022;12:809.

- De Rolfe EL, et al. Association between birth weight and visceral fat in adults. *Am J Clin Nutr.* 2010;92:347–352.
- Derrien M, et al. The Gut Microbiota in the First Decade of Life. *Trends Microbiol.* 2019 Dec;27(12):997-1010.
- De Vos W, et al. Role of the intestinal microbiome in health and disease: from correlation to causation. *Nutr Rev.* 2012;70:45–56.
- Diamanti-Kandarakis E, et al. Endocrine-disrupting chemicals: an Endocrine Society scientific statement. *Endocr Rev.* 2009;30:293-342.
- Dierikx T, et al. The influence of prenatal and intrapartum antibiotics on intestinal microbiota colonisation in infants: A systematic review. *J. Infect.* 2020;81:190–204.
- Di Napoli I, et al. Lifestyle Habits and Exposure to BPA and Phthalates in Women of Childbearing Age from Northern Italy: A Pilot Study. *Int J Environ Res Public Health.* 2021;18:9710.
- Dogra S, et al. Rate of establishing the gut microbiota in infancy has consequences for future health *Gut Microbes*, 6 (2015), pp. 321-325.
- Dogra S, et al. Dynamics of Infant gut microbiota are influenced by delivery mode and gestational duration and are associated with subsequent *Gut Microbes*, 6 (2015), pp. 1-9.
- Dominguez-Bello MG, et al. Delivery mode shapes the acquisition and structure of the initial microbiota across multiple body habitats in newborns. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2010;107:11971–11975.
- Dreisbach C, et al. Influence of Maternal Prepregnancy Obesity and Excessive Gestational Weight Gain on Maternal and Child Gastrointestinal Microbiome Composition: A Systematic Review. *Biol Res Nurs.* 2020;22:114-125.
- Druet C, et al. Prediction of childhood obesity by infancy weight gain: an individual-level meta-analysis. *Paediatr Perinat Epidemiol.* 2012;26:19–26.
- Elobeid MA, et al. Putative environmental-endocrine disruptors and obesity: a review. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes.* 2008 Oct;15(5):403-8.

- Encarnação T, et al. Endocrine disrupting chemicals: Impact on human health, wildlife and the environment. *Sci Prog.* 2019 Mar;102(1):3-42.
- Fall CHD. Fetal programming and the risk of noncommunicable disease. *Indian J. Pediatrics.* 2013;80(Suppl. 1):S13–S20.
- Fehr K, et al. Breastmilk Feeding Practices Are Associated with the Co-Occurrence of Bacteria in Mothers' Milk and the Infant Gut: the CHILD Cohort Study. *Cell Host Microbe.* 2020 ;28:285-297.e4.
- Fernández L, et al. The Microbiota of the Human Mammary Ecosystem. *Front Cell Infect Microbiol.* 2020;10:586667.
- Filardi T, et al. Bisphenol A and Phthalates in Diet: An Emerging Link with Pregnancy Complications. *Nutrients.* 2020;12:525.
- Fitzstevens JL, et al. Systematic Review of the Human Milk Microbiota. *Nutr Clin Pract.* 2017;32:354-364
- Funkhouser LJ, et al. Mom knows best: the universality of maternal microbial transmission. *PLoS Biol.* 2013;11:e1001631.
- Fromme H, et al. Phthalates and their metabolites in breast milk--results from the Bavarian Monitoring of Breast Milk (BAMBI). *Environ Int.* 2011;37:715-22.
- Fu X, et al. Di-(2-ethylhexyl) phthalate exposure induces female reproductive toxicity and alters the intestinal microbiota community structure and fecal metabolite profile in mice. *Environ Toxicol.* 2021;36:1226-1242.
- Gálvez-Ontiveros Y, et al. Endocrine Disruptors in Food: Impact on Gut Microbiota and Metabolic Diseases. *Nutrients.* 2020;12:1158.
- Genuis SJ, et al. Human elimination of phthalate compounds: blood, urine, and sweat (BUS) study. *ScientificWorldJournal.* 2012;2012:615068.
- Georgiadis A, et al.. Child undernutrition: opportunities beyond the first 1000 days. *Lancet.*2022.

- Ghassabian A, et al. Maternal thyroid function during pregnancy and behavioral problems in the offspring: the generation R study. *Pediatr Res.* 2011;69:454–459.
- Gillman MW. Early infancy as a critical period for development of obesity and related conditions. *Nestle Nutr Workshop Ser Pediatr Program.* 2010;65:13–20.
- Gishti O, et al. Fetal and infant growth patterns associated with total and abdominal fat distribution in school-age children. *J Clin Endocrinol Metab.* 2014.
- Giulivo M, et al. Human exposure to endocrine disrupting compounds: Their role in reproductive systems, metabolic syndrome and breast cancer. A review. *Environ Res.* 2016 Nov;151:251-264.
- Glover JS, et al. Characterizing the mucin-degrading capacity of the human gut microbiota. *Sci Rep.* 2022 May 19;12(1):8456.
- Godfrey KM, et al. Influence of maternal obesity on the long-term health of offspring. *Lancet. Diabetes Endocrinol.* 2017;5:53–64.
- Goldman AS. Evolution of immune functions of the mammary gland and protection of the infant. *Breastfeed Med.* 2012;7:132–142.
- Gore AC, et al. Introduction to endocrine disrupting chemicals (EDCs). 2014.
- Gore AC, et al. EDC-2: the Endocrine Society's second scientific statement on endocrine-disrupting chemicals. *Endocr Rev.* 2015;36(6):E1–e150.
- Grandjean P, et al. Breastfeeding and the weanling's dilemma. *Am J Public Health.* 2004;94:1075. author reply 1075.
- Grech A, et al. Maternal exposures and the infant gut microbiome: a systematic review with meta-analysis. *Gut Microbes.* 2021;13:1-30.
- Grissom NM, et al. Gestational overgrowth and undergrowth affect neurodevelopment: Similarities and differences from behavior to epigenetics. *Int. J. Dev. Neurosci. Off. J. Int. Soc. Dev. Neurosci.* 2013;31:406–414.

- Grundy SM, et al. Definition of metabolic syndrome: Report of the National Heart, Lung, and Blood Institute/American Heart Association conference on scientific issues related to definition. *Circulation*. 2004;109:433–438.
- Grun F, et al. Environmental obesogens: organotins and endocrine disruption via nuclear receptor signalling. *Endocrinol*. 2006;147(Suppl 6):S50–5.
- Hales CN, et al. The thrifty phenotype hypothesis: Type 2 diabetes. *Br. Med. Bull*. 2001;60:5–20.
- Heindel JJ, et al. Parma consensus statement on metabolic disruptors. *Environ Health*. 2015;14:54.
- Heindel JJ, et al. Endocrine disruptors and obesity. *Nat Rev Endocrinol*. 2015;11:653–661.
- Heindel JJ, et al. The obesogen hypothesis: current status and implications for human health. *Curr Environ Health Rpt*. 2014;1:333–40.
- Henrichs J, et al. Maternal hypothyroxinemia and effects on cognitive functioning in childhood: how and why? *Clin Endocrinol (Oxf)* 2013;79:152–162.
- Henrick BM, et al. Bifidobacteria-mediated immune system imprinting early in life. *Cell*. 2021 Jul 22;184(15):3884-3898.e11.
- Herbst AL, et al. Adenocarcinoma of vagina – association of maternal stilbestrol therapy with tumor appearance in young women. *New Engl J Med* 1971; 284: 878.
- Hoffman DJ, et al. Developmental origins of health and disease: current knowledge and potential mechanisms. *Nutr Rev*. 2017;75:951–970.
- Hu J, et al. Effect of Postnatal Low-Dose Exposure to Environmental Chemicals on the Gut Microbiome in a Rodent Model. *Microbiome*. 2016;4:26.
- Iebba V, et al. Eubiosis and dysbiosis: the two sides of the microbiota. *New Microbiol*. 2016;39:1-12.
- Ihekweazu FD, et al. Development of the Pediatric Gut Microbiome: Impact on Health and Disease. *Am J Med Sci*. 2018;356(5):413–423.

- Iribarne-Durán LM, et al. Concentrations of bisphenols, parabens, and benzophenones in human breast milk: A systematic review and meta-analysis. *Sci Total Environ.* 2022;806(Pt 1):150437.
- Janesick AS, et al. Obesogens: an emerging threat to public health. *Am J Ob Gynecol.* 2016;214:559–65.
- Javurek AB, et al. Effects of exposure to bisphenol A and ethinyl estradiol on the gut microbiota of parents and their offspring in a rodent model. *Gut Microbes.* 2016 Nov;7(6):471–485.
- Jiménez E, et al. Is meconium from healthy newborns actually sterile? *Res Microbiol.* 2008;159:187–93.
- Kaakoush NO. Insights into the Role of Erysipelotrichaceae in the Human Host. *Front Cell Infect Microbiol.* 2015 Nov 20;5:84.
- Kabeerdoss J, et al. Alterations of mucosal microbiota in the colon of patients with inflammatory bowel disease revealed by real time polymerase chain reaction amplification of 16S ribosomal ribonucleic acid. *Indian J Med Res.* 2015;142(1):23–32.
- Kaczmarczyk M, et al. The gut microbiota is associated with the small intestinal paracellular permeability and the development of the immune system in healthy children during the first two years of life. *J Transl Med.* 2021 Apr 28;19(1):177.
- Kahn BB, et al. Obesity and insulin resistance. *J Clin Invest.* 2000;106:473–481.
- Kapourchali FR, et al. Early-Life Gut Microbiome-The Importance of Maternal and Infant Factors in Its Establishment. *Nutr Clin Pract.* 2020;35:386–405.
- Kapur P, et al. The *Cimicifuga racemosa* special extract BNO 1055 prevents hot flashes in ovariectomized rats. *Phytomedicine.* 2010 Sep;17(11):890–4.
- Kau AL, et al. Human nutrition, the gut microbiome and the immune system. *Nature.* 2011;474(7351):327–36.
- Klindworth A, et al. Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. *Nucleic Acids Res.* 2013; 41:e1.

- Knez J. Endocrine-disrupting chemicals and male reproductive health *Reprod. Biomed. Online*. (2013).
- Korpela K. Impact of Delivery Mode on Infant Gut Microbiota. *Ann Nutr Metab.* 2021;1-9.
- Korpela K, et al. Intestinal microbiota development and gestational age in preterm neonates. *Sci Rep.* 2018;8:2453.
- Kramer MS. Determinants of low birth weight: methodological assessment and meta-analysis. *Bull World Health Organ.* 1987;65:663–737.
- Kumbhare SV, et al. Factors influencing the gut microbiome in children: from infancy to childhood. *J Biosci.* 2019;44:49.
- Kuperman AA, et al. Antibiotic use during pregnancy: how bad is it? *BMC Med.* 2016;14:91.
- Lai KP, et al. Bisphenol A Alters Gut Microbiome: Comparative Metagenomics Analysis. *Environ. Pollut.* 2016;218:923–930.
- La Rocca C, et al. LIFE PERSUADED Project Group. The LIFE PERSUADED project approach on phthalates and bisphenol A biomonitoring in Italian mother-child pairs linking exposure and juvenile diseases. *Environ Sci Pollut Res Int.* 2018;25:25618-25625.
- Le Doare K, et al. Mother's Milk: A Purposeful Contribution to the Development of the Infant Microbiota and Immunity. *Front Immunol.* 2018 ;9:361.
- Lee HS. Impact of Maternal Diet on the Epigenome during In Utero Life and the Developmental Programming of Diseases in Childhood and Adulthood. *Nutrients.* 2015;7:9492–9507.
- Leite AZ, et al. Detection of Increased Plasma Interleukin-6 Levels and Prevalence of *Prevotella copri* and *Bacteroides vulgatus* in the Feces of Type 2 Diabetes Patients. *Front Immunol.* 2017 Sep 15;8:1107.
- Likhar A, et al. Importance of Maternal Nutrition in the First 1,000 Days of Life and Its Effects on Child Development: A Narrative Review. *Cureus.* 2022 Oct 8;14(10):e30083.

- Lillycrop KA, et al. Epigenetic mechanisms linking early nutrition to long term health. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* 2012;26:667–676.
- Liu R, et al. Effects of Bisphenol A on reproductive toxicity and gut microbiota dysbiosis in male rats. *Ecotoxicol Environ Saf.* 2022 Jul 1;239:113623.
- Lyons KE, et al. Breast Milk, a Source of Beneficial Microbes and Associated Benefits for Infant Health. *Nutrients.* 2020;12:1039.
- Maffini MV, et al. Perchlorate and Diet: Human Exposures, Risks, and Mitigation Strategies. *Curr. Environ. Health Rep.* 2016;3:107–117.
- Ma J, et al. High-fat maternal diet during pregnancy persistently alters the offspring microbiome in a primate model. *Nat Commun.* 2014;5:3889.
- Mameli C, et al. Nutrition in the first 1000 days: the origin of childhood obesity. *J Environ Res Public Health.* 2016;13(9):838.
- Mao W, et al. Influence of Gut Microbiota on Metabolism of Bisphenol A, a Major Component of Polycarbonate Plastics. *Toxics.* 2023 Mar 31;11(4):340.
- Marcobal A, et al. Consumption of human milk oligosaccharides by gut-related microbes *J Agric Food Chem*, 58 (2010), pp. 5334-5340.
- Martorell R. Improved nutrition in the first 1000 days and adult human capital and health. *Am J Hum Biol.* 2017;29:e22952.
- Masukume G, et al. The impact of caesarean section on the risk of childhood overweight and obesity: new evidence from a contemporary cohort study. *Sci Rep.* 2018;8(1):15113.
- Matsuki T, et al. A key genetic factor for fucosyllactose utilization affects infant gut microbiota development *Nat Commun*, 7 (2016), p. 11939.
- Milani C, et al. The First Microbial Colonizers of the Human Gut: Composition, Activities, and Health Implications of the Infant Gut Microbiota. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2017;81:e00036-17.

- Miller MD, et al. Differences between children and adults: implications for risk assessment at California EPA. *Int J Toxicol.* 2002;21:403–418.
- Ministero della salute, 2021.  
<https://www.salute.gov.it/portale/allattamento/dettaglioContenutiAllattamento.jsp?lingua=italiano&id=5249&area=allattamento&menu=comefare>
- Mitsuoka T. Development of functional food Biosci Microbiota Food Health, 33 (2014), pp. 117-128.
- Modesto T, et al. Maternal Mild Thyroid Hormone Insufficiency in Early Pregnancy and Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder Symptoms in Children. *JAMA Pediatr.* 2015.
- Monasta L, et al. Early-life determinants of overweight and obesity: a review of systematic reviews. *Obes Rev.* 2010;11:695-708.
- Monteiro PO, et al. Rapid growth in infancy and childhood and obesity in later life--a systematic review. *Obes Rev.* 2005;6:143–154.
- Moreno-Fernandez J, et al. Impact of Early Nutrition, Physical Activity and Sleep on the Fetal Programming of Disease in the Pregnancy: A Narrative Review. *Nutrients.* 2020 Dec 20;12(12):3900.
- Myles IA, et al. Parental dietary fat intake alters offspring microbiome and immunity. *J Immunol.* 2013;191(6):3200–3209.
- Nadal M, et al. Sources of Human Exposure. In: Carpenter DO, editor. *Effects of Persistent and Bioactive Organic Pollutants on Human Health.* Wiley; 2013. p. 8–25.
- Nappi F, et al. Endocrine aspects of environmental “obesogen” pollutants. *Int J Environ Res Public Health.* 2016;13:765.
- Naseer MI, et al. Role of gut microbiota in obesity, type 2 diabetes and Alzheimer's disease. *CNS Neurol Disord Drug Targets.* 2014;13(2):305–11.
- National Health and Nutrition Examination Survey: Anthropometry Procedure Manuals, 2016.
- Neel BA, et al. The paradox of progress: environmental disruption of metabolism and the diabetes epidemic. *Diabetes.* 2011;60:1838–1848.

- Neuman H, et al. Microbial endocrinology: the interplay between the microbiota and the endocrine system. *FEMS Microbiol Rev.* 2015 Jul;39(4):509-21.
- Nyangahu DD, et al. Influence of maternal microbiota during pregnancy on infant immunity. *Clin Exp Immunol.* 2019;198:47-56.
- O'Callaghan A, et al. Bifidobacteria and Their Role as Members of the Human Gut Microbiota. *Front Microbiol.* 2016 Jun 15;7:925.
- Orleans CT, et al. Helping pregnant smokers quit: meeting the challenge in the next decade. *Tob Control.* 2000;9(Suppl 3):III6–III11.
- Ornoy A. Prenatal origin of obesity and their complications: Gestational diabetes, maternal overweight and the paradoxical effects of fetal growth restriction and macrosomia. *Reproductive Toxicology (Elmsford, NY)* 2011;32:205–212.
- Oussaada SM, et al. The pathogenesis of obesity. *Metabolism.* 2019;92:26-36.
- Painter RC, et al. Prenatal exposure to the Dutch famine and disease in later life: an overview. *Reprod Toxicol.* 2005;20:345–352.
- Palmer C, et al. Development of the human infant intestinal microbiota *PLoS Biol*, 5 (2007), pp. 1556-1573.
- Palm NW, et al. Immunoglobulin A coating identifies colitogenic bacteria in inflammatory bowel disease. *Cell.* 2014 Aug 28;158(5):1000-1010.
- Panagiotou EM, et al. Phthalates, ovarian function and fertility in adulthood. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2021;35:101552
- Pannaraj PS, et al. Association Between Breast Milk Bacterial Communities and Establishment and Development of the Infant Gut Microbiome. *JAMA Pediatr.* 2017;171:647–654.
- Panzer AR, et al. Influence and effect of the human microbiome in allergy and asthma. *Curr Opin Rheumatol.* 2015;27(4):373–80.
- Papageorghiou AT, et al. International Fetal and Newborn Growth Consortium for the 21(st) Century (INTERGROWTH-21(st)). The INTERGROWTH-21st fetal growth standards: toward

the global integration of pregnancy and pediatric care. *Am J Obstet Gynecol.* 2018 Feb;218(2S):S630-S640.

- Papalou O, et al. Endocrine Disrupting Chemicals: An Occult Mediator of Metabolic Disease. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2019;10:112.
- Parra O, et al. Efficacy of continuous positive airway pressure treatment on 5-year survival in patients with ischaemic stroke and obstructive sleep apnea: A randomized controlled trial. *J. Sleep Res.* 2015;24:47–53.
- Patisaul HB, et al. The pros and cons of phytoestrogens. *Front. Neuroendocrinol.* 2010;31:400–419.
- Perez-Muñoz ME. A critical assessment of the "sterile womb" and "in utero colonization" hypotheses: implications for research on the pioneer infant microbiome. *Microbiome.* 2017;5:48.
- Pietrobelli A, et al. Nutrition in the First 1000 Days: Ten Practices to Minimize Obesity Emerging from Published Science. *Int J Environ Res Public Health.* 2017 Dec 1;14(12):1491.
- Pires GN, et al. Effects of sleep modulation during pregnancy in the mother and offspring: Evidences from preclinical research. *J. Sleep Res.* 2020;n/a:e13135.
- Prueitt RL, et al. Systematic review of the potential carcinogenicity of bisphenol A in humans. *Regul Toxicol Pharmacol.* 2023 Aug;142:105414.
- Raspini B, et al. Prenatal and postnatal determinants in shaping offspring's microbiome in the first 1000 days: study protocol and preliminary results at one month of life. *Ital J Pediatr.* 2020;46:45.
- Rathoure AK. Dioxins source origin and toxicity assessment. *Biodivers. Int. J.* 2018;2.
- Rautava S. Milk Microbiome and Neonatal Colonization: Overview. *Nestle Nutr Inst Workshop Ser.* 2020;94:65-74.
- Reaven GM. Pathophysiology of insulin resistance in human disease. *Physiol Rev.* 1995;75:473–486.

- Renz-Polster H, et al. Caesarean section delivery and the risk of allergic disorders in childhood Clin Exp Allergy, 35 (2005), pp. 1466Rodriguez A. Maternal pre-pregnancy obesity and risk for inattention and negative emotionality in children. J. Child. Psychol. Psychiatry. 2010;51:134–143.
- Ribeiro CM, et al. Exposure to endocrine-disrupting chemicals and anthropometric measures of obesity: a systematic review and meta-analysis. BMJ Open. 2020;10:e033509.
- Rinninella E, et al. What is the Healthy Gut Microbiota Composition? A Changing Ecosystem across Age, Environment, Diet, and Diseases. Microorganisms. 2019;7:14Ruan W, et al. Healthy Human Gastrointestinal Microbiome: Composition and Function After a Decade of Exploration. Dig Dis Sci. 2020;65:695-705.
- Robinson A, et al. Association of Maternal Gestational Weight Gain With the Infant Fecal Microbiota. J Pediatr Gastroenterol Nutr. 2017;65:509-515.
- Rogers JA, et al. Review: Endocrine disrupting chemicals and immune responses: a focus on bisphenol-A and its potential mechanisms. Mol Immunol. 2013 Apr;53(4):421-30.
- Rolfo A, et al. Fetal-Maternal Exposure to Endocrine Disruptors: Correlation with Diet Intake and Pregnancy Outcomes. Nutrients. 2020;12:1744.
- Roman GC, et al. Association of gestational maternal hypothyroxinemia and increased autism risk. Ann Neurol. 2013;74:733–742.
- Romano-Keeler J, et al. The First 1000 Days: Assembly of the Neonatal Microbiome and Its Impact on Health Outcomes. Newborn (Clarksville). 2022;1(2):219-226.
- Rosenfeld CS. Gut Dysbiosis in Animals due to Environmental Chemical Exposures. Front. Cell. Infect. Microbiol. 2017;7:396.
- Rothschild D, et al. Environment dominates over host genetics in shaping human gut microbiota. Nature. 2018 Mar 8;555(7695):210-215.
- Rubin BS, et al. Bisphenol A: Perinatal exposure and body weight. Mol Cell Endocrinol. 2009 May 25;304(1-2):55-62.

- Ruiz L, et al. Perinatal Microbiomes' Influence on Preterm Birth and Preterms' Health: Influencing Factors and Modulation Strategies. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2016;63:e193-e203.
- Salam RA, et al. Impact of intrauterine growth restriction on long-term health. *Curr. Opin Clin. Nutr. Metab. Care.* 2014;17:249–254.
- Saleem A, et al. Unique Pakistani gut microbiota highlights population-specific microbiota signatures of type 2 diabetes mellitus. *Gut Microbes.* 2022 Jan-Dec;14(1):2142009.
- Santacruz A, et al. Gut microbiota composition is associated with body weight, weight gain and biochemical parameters in pregnant women. *Br J Nutr.* 2010;104:83-92.
- Saturio S, et al. Role of Bifidobacteria on Infant Health. *Microorganisms.* 2021 Nov 23;9(12):2415.
- Savage DC. Microbial ecology of the gastrointestinal tract. *Annu Rev Microbiol.* 1977;31:107.
- Schug TT, et al. Elucidating the Links between Endocrine Disruptors and Neurodevelopment. *Endocrinology.* 2015.
- Selevan SG, et al. Identifying critical windows of exposure for children's health. *Environ Health Perspect.* 2000;108(Suppl 3):451–455.
- Shen J, et al. The gut microbiota, obesity and insulin resistance. *Mol Aspects Med.* 2013;34(1):39–58.
- Shi F, et al. Altered gut microbiome composition by appendectomy contributes to colorectal cancer. *Oncogene.* 2023 Feb;42(7):530-540.
- Singh S, et al. Charting the Maternal and Infant Microbiome: What Is the Role of Diabetes and Obesity in Pregnancy? *Curr Diab Rep.* 2017;17:11.
- Sobhani I, et al. Microbial dysbiosis in colorectal cancer (CRC) patients. *PLoS One.* 2011;6(1):e16393.
- Soriano S, et al. Rapid insulinotropic action of low doses of bisphenol-A on mouse and human islets of Langerhans: role of estrogen receptor beta. *PLoS One.* 2012;7:e31109.

- Spalding KL, et al. Dynamics of fat cell turnover in humans. *Nature*. 2008;453:783–7.
- Stanislowski MA, et al. Pre-pregnancy weight, gestational weight gain, and the gut microbiota of mothers and their infants. *Microbiome*. 2017;5(1):113.
- Sun Q, et al. Association of urinary concentrations of bisphenol A and phthalate metabolites with risk of type 2 diabetes: a prospective investigation in the Nurses' Health Study (NHS) and NHSII cohorts. *Environ Health Perspect*. 2014;122:616.
- Tamburini S, et al. The microbiome in early life: implications for health outcomes. *Nat Med*. 2016 Jul 7;22(7):713-22.
- Tarry-Adkins JL, et al.. Mechanisms of early life programming: Current knowledge and future directions. *Am. J. Clin. Nutr*. 2011;94:1765s–1771s.
- United States Environmental Protection Agency, EPA.  
[https://cfpub.epa.gov/si/si\\_public\\_record\\_Report.cfm?Lab=NRMRL&dirEntryId=65320#:~:text=Description%3A,interest%20to%20the%20environmental%20community](https://cfpub.epa.gov/si/si_public_record_Report.cfm?Lab=NRMRL&dirEntryId=65320#:~:text=Description%3A,interest%20to%20the%20environmental%20community) US  
 Environmental Protection Agency, 2010.
- Ursell LK, et al. Defining the human microbiome. *Nutr. Rev*. 2012;70:S38–S44.
- Vallès Y, et al. Microbial succession in the gut: directional trends of taxonomic and functional change in a birth cohort of Spanish infants *PLoS Genet*, 10 (2014), p. e1004406.
- Velmurugan G, et al. Gut Microbiota, Endocrine-Disrupting Chemicals, and the Diabetes Epidemic. *Trends Endocrinol. Metab*. 2017;28:612–625  
 Vickers MH. Early life nutrition, epigenetics and programming of later life disease. *Nutrients*. 2014;6:2165–2178.
- Verburgt CM, et al. Successful Dietary Therapy in Paediatric Crohn's Disease is Associated with Shifts in Bacterial Dysbiosis and Inflammatory Metabotype Towards Healthy Controls. *J Crohns Colitis*. 2023 Jan 27;17(1):61-72.
- Visentin S, et al. Developmental programming of cardiovascular risk in intrauterine growth-restricted twin fetuses according to aortic intima thickness. *J. Ultrasound Med. Off. J. Am. Inst. Ultrasound Med*. 2013;32:279–284.

- Wang G, et al.. Epigenetics and early life origins of chronic noncommunicable diseases. *J. Adolesc. Health.* 2013;52:S14–S21.
- Wang Y, et al. Bisphenol A interacts with DLGAP5 and regulates IL-6/JAK2/STAT3 signaling pathway to promote tumorigenesis and progression of osteosarcoma. *Chemosphere.* 2023 Jan;312(Pt 1):136545.
- Wang Y, et al K. A Review of Biomonitoring of Phthalate Exposures. *Toxics.* 2019;7:21.
- Wang Z, et al. Gut Microbiota, Plasma Metabolomic Profiles, and Carotid Artery Atherosclerosis in HIV Infection. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2022 Aug;42(8):1081-1093.
- Wei X, et al. Di-(2-ethylhexyl) phthalate increases plasma glucose and induces lipid metabolic disorders via FoxO1 in adult mice. *Sci Total Environ.* 2022;842:156815.
- Witczak A, et al. Endocrine-Disrupting Organochlorine Pesticides in Human Breast Milk: Changes during Lactation. *Nutrients.* 2021;13:229.
- Woo Baidal JA, et al. Risk factors for childhood obesity in the first 1000 days: A systematic review. *Sono. J. Prec. Med.* 2016; 50 :761-779.
- World Health Organization: Biological Monitoring of Chemical Exposure in the Workplace; WHO: Geneva, Switzerland, 1996.
- Wu Y, et al. Maternal exposure to endocrine disrupting chemicals (EDCs) and preterm birth: A systematic review, meta-analysis, and meta-regression analysis. *Environ Pollut.* 2022;292(Pt A):118264.
- Yang FJ, et al., Y410 of Rhizobium sp. Strain NGR234 Is a Symbiotic Determinant Required for Symbiosome Differentiation. *J Bacteriol.* 2015 Sep;197(18):3026.
- Yang Y, et al. Phthalate Exposure Alters Gut Microbiota Composition and IgM Vaccine Response in Human Newborns. *Food Chem. Toxicol.* 2019;132:110700.
- Yatsunenکو T, et al. Human gut microbiome viewed across age and geography *Nature*, 486 (2012), pp. 222-227

- Yilmaz B, et al. Endocrine disrupting chemicals: exposure, effects on human health, mechanism of action, models for testing and strategies for prevention. *Rev Endocr Metab Disord*. 2020 Mar;21(1):127-147.
- Zhang L, et al. Nongastric Helicobacter Species Detected in the Intestinal Tract of Children. *J. Clin. Microbiol*. 2006;44:2276–2279.
- Zhong W, et al. Gut dysbiosis promotes prostate cancer progression and docetaxel resistance via activating NF- $\kappa$ B-IL6-STAT3 axis. *Microbiome*. 2022 Jun 16;10(1):94.
- Zhu S, et al. The gut microbiome in subclinical atherosclerosis: a population-based multiphenotype analysis. *Rheumatology (Oxford)*. 2021 Dec 24;61(1):258-269.
- Zoeller RT, et al. Endocrine-disrupting chemicals and public health protection: a statement of principles from the Endocrine Society. *Endocrinology*. 2012;153(9):4097–110.
- Zoeller RT, et al. Timing of thyroid hormone action in the developing brain: clinical observations and experimental findings. *J Neuroendocrinol*. 2004;16:809–818.

## **Ringraziamenti**

Il lavoro di tesi di Dottorato è stato uno dei più impegnativi, perché frutto di un percorso formativo nel quale si sceglie di mettersi personalmente in gioco.

Ringrazio sinceramente il mio Tutor, Prof.ssa Rachele De Giuseppe che insieme alla Prof.ssa Hellas Cena mi hanno dato l'opportunità di entrare a far parte del loro gruppo di ricerca e di avermi guidata, anche se solo nella parte conclusiva nel mio percorso di dottorato, con preziosi consigli.

Un ringraziamento speciale è rivolto al Coordinatore del dottorato di ricerca in Food Scienze, la Prof.ssa Amalia Barone e al mio Co-Tutor, la Prof.ssa Paola Vitaglione, che mi hanno permesso di concludere questo percorso.

Un grazie speciale a Gennaro, che, anche se entrato da pochi mesi nella mia vita, è stato capace di capirmi e di sostenermi nei momenti difficili.

Ringrazio per ultimo, non per importanza, la mia Famiglia, fonte di sostegno e di coraggio. Non sarei mai potuta arrivare così lontano senza il vostro incoraggiamento.

# Allegato 1. Abitudini alimentari della madre

## ISTRUZIONI PER LA COMPILAZIONE DEL QUESTIONARIO

Il questionario deve essere compilato in ogni sua parte, rispondendo ad ogni domanda con una sola risposta. Non lasciare nessuna domanda senza risposta.

Si garantisce che i dati rilevati verranno utilizzati a solo scopo di ricerca nel rispetto della legge sulla "privacy" (tutela delle persone e di altri soggetti rispetto al trattamento dei dati personali secondo la legge 675/1996).

### SEZIONE A. FREQUENZE DI CONSUMO DI ALIMENTI

Le domande si riferiscono alle sue abitudini alimentari attuali

Quando più alimenti compaiono insieme, è sufficiente consumarne anche uno solo per rispondere alla domanda

- A. 1** Quante volte a settimana consuma **latte/cappuccino/caffèlatte/ yogurt** ?
- tutti i giorni
  - quasi tutti i giorni (4-5)
  - talvolta (2-3)
  - mai o quasi mai (0-1)
- A. 2** Quante *porzioni* al giorno?
- 1
  - 2
  - 3
  - 4
- A. 3** Quante volte a settimana consuma **pasta/riso/pane/patate/pizza?**
- tutti i giorni
  - quasi tutti i giorni (4-5)
  - talvolta (2-3)
  - mai o quasi mai (0-1)
- A. 4** Quante *porzioni* al giorno ?
- 1-2
  - 3-4
  - 5-6
  - più di 6
- A. 5** Quante volte a settimana consuma **frutta/verdura?**
- tutti i giorni
  - quasi tutti i giorni (4-5)
  - talvolta (2-3)
  - mai o quasi mai (0-1)
- A. 6** Quante *porzioni* al giorno ?
- 1-2
  - 3-4
  - 5-6
  - più di 6
- A. 7** Quante volte a settimana consuma **carne?**
- tutti i giorni
  - quasi tutti i giorni (4-5)
  - talvolta (2-3)
  - mai o quasi mai (0-1)
- A. 8** Quante volte a settimana consuma **pesce?**
- tutti i giorni
  - quasi tutti i giorni (4-5)
  - talvolta (2-3)
  - mai o quasi mai (0-1)

- A. 9** Quante volte a settimana consuma **uova**?
- tutti i giorni
  - quasi tutti i giorni (4-5)
  - talvolta (2-3)
  - mai o quasi mai (0-1)
- A. 10** Quante volte a settimana consuma **formaggio**?
- tutti i giorni
  - quasi tutti i giorni (4-5)
  - talvolta (2-3)
  - mai o quasi mai (0-1)
- A. 11** Quante volte a settimana consuma **salumi/insaccati**?
- tutti i giorni
  - quasi tutti i giorni (4-5)
  - talvolta (2-3)
  - mai o quasi mai (0-1)
- A. 12** Quante volte a settimana consuma **piatti a base di legumi**?
- tutti i giorni
  - quasi tutti i giorni (4-5)
  - talvolta (2-3)
  - mai o quasi mai (0-1)
- A. 13** Quante volte a settimana consuma **dolciumi in genere**?
- tutti i giorni
  - quasi tutti i giorni (4-5)
  - talvolta (2-3)
  - mai o quasi mai (0-1)
- A. 14** Quante volte a settimana consuma **patatine fritte**?
- tutti i giorni
  - quasi tutti i giorni (4-5)
  - talvolta (2-3)
  - mai o quasi mai (0-1)
- A. 15** Quante volte a settimana consuma **vino/birra** ?
- tutti i giorni
  - quasi tutti i giorni (4-5)
  - talvolta (2-3)
  - mai o quasi mai (0-1)
- A. 16** Quanti *bicchieri* al giorno?
- 0
  - 1
  - 2
  - 3
- A. 17** Quante volte a settimana consuma **aperitivi/cocktail alcolici/superalcolici**?
- tutti i giorni
  - quasi tutti i giorni (4-5)
  - talvolta (2-3)
  - mai o quasi mai (0-1)
- A. 18** Quanti *bicchieri* al giorno?
- 0
  - 1
  - 2
  - 3

## SEZIONE B. ABITUDINI ALIMENTARI

Le risposte si devono riferire a quella che è la situazione “più abituale”

- B. 1** Fa la prima colazione ?
- sempre
  - spesso
  - raramente
  - mai
- B. 2** Quale bevanda consuma a colazione ?
- latte/yogurt/caffèlatte/cappuccino
  - succo di frutta/spremuta
  - tè/caffè
  - cioccolata
- B. 3** La sua colazione è a base principalmente di:
- biscotti/fette biscottate/merendine/ cereali da prima colazione/pane
  - frutta
  - salumi, formaggi, uova
  - pizza/focaccia/toast
- B. 4** Consuma almeno due porzioni di frutta al giorno ?
- sempre
  - spesso
  - raramente
  - mai
- B. 5** Consuma almeno due porzioni di verdura al giorno ?
- sempre
  - spesso
  - raramente
  - mai
- B. 6** Consuma almeno un bicchiere di latte o un vasetto di yogurt al giorno?
- sempre
  - spesso
  - raramente
  - mai
- B. 7** Consuma almeno 1-1,5 litri di acqua al giorno?
- sempre
  - spesso
  - raramente
  - mai
- B. 8** I suoi pasti si concludono abitualmente con un dessert o un dolce?
- sempre
  - spesso
  - raramente
  - mai
- B. 9** Ai suoi pasti, oltre all'acqua, beve abitualmente vino o birra ?
- sempre
  - spesso
  - raramente
  - mai
- B. 10** Consuma abitualmente tutti i giorni: colazione, pranzo e cena ?
- sempre
  - spesso
  - raramente
  - mai

**B. 11** La sua alimentazione giornaliera :

- varia ogni giorno
- varia solo qualche volta alla settimana
- varia solo nel fine settimana
- varia raramente in quanto è molto monotona

**B. 12** La sua alimentazione giornaliera è a base principalmente di :

- alimenti ad alto contenuto proteico (carne, pesce, uova, formaggi, legumi secchi)
- alimenti ad alto contenuto di grassi (salumi, focacce, patatine fritte, dolci a base di panna e crema)
- alimenti ad alto contenuto di carboidrati (pane, pasta, riso, patate, biscotti, fette biscottate, crostate)
- alimenti vari

**B. 13** I suoi spuntini consistono principalmente in :

- frutta/spremute/succhi di frutta/frullati/yogurt
- fette biscottate/biscotti/crackers/pane/grissini
- patatine fritte/pop corn/noccioline
- caramelle/cioccolatini/gelati/dolci/bibite

**B. 14** Le bevande che consuma più spesso fuori pasto sono :

- acqua
- bibite zuccherine (cola, aranciata, tè freddo, gassosa, acqua tonica, ecc.)
- birra/vino
- succhi di frutta/spremute/frullati

## **SEZIONE C. ATTIVITA' FISICA E IMPIEGO DEL TEMPO LIBERO**

**C. 1** Svolge regolarmente qualche attività fisica ?

- sempre, tutto l'anno
- solo in alcune stagioni
- talvolta
- mai

**C. 2** Quanto tempo dedica all'attività fisica ?

- 1h-2h alla settimana
- 3h-4h alla settimana
- più di 4h alla settimana
- non svolgo nessuna attività fisica

**C. 3** Quando ha del tempo libero, cosa preferisce fare ?

- ascoltare musica/ leggere/ usare il computer/ guardare la TV/andare a cinema, teatro
- praticare sport
- visitare mostre, musei
- passeggiare, fare shopping

**C. 4** Quanto tempo trascorre davanti al computer e/o televisore e/o in automobile ?

- 1h-2h al giorno
- 3h-4h al giorno
- 5h-6h al giorno
- più di 6h al giorno

**C. 5** Il suo stile di vita, secondo lei, è :

- molto sedentario
- sedentario
- moderatamente attivo
- molto attivo

| <b>SEZIONE D. FUMO</b>                                 |   |
|--|---|
| <b>D. 1</b> Lei è:                                     | <input type="checkbox"/> fumatore<br><input type="checkbox"/> ex fumatore<br><input type="checkbox"/> non fumatore            |
| <b>D. 2</b> Se fumatore, da quanto tempo:              | <input type="checkbox"/> da 5 anni<br><input type="checkbox"/> da 10 anni<br><input type="checkbox"/> da più di 10 anni       |
| <b>D. 3</b> Quando ha iniziato a fumare?               | <input type="checkbox"/> 12-18 anni<br><input type="checkbox"/> 19-40 anni<br><input type="checkbox"/> più di 40 anni         |
| <b>D. 4</b> Quante sigarette fuma al giorno?           | <input type="checkbox"/> meno di 10<br><input type="checkbox"/> 10-20<br><input type="checkbox"/> più di 20                   |
| <b>D. 5</b> Se ex fumatore, da quanto tempo ha smesso? | <input type="checkbox"/> da qualche anno<br><input type="checkbox"/> da 10 anni<br><input type="checkbox"/> da più di 10 anni |
| <b>D. 6</b> Quante sigarette fumava al giorno?         | <input type="checkbox"/> meno di 10<br><input type="checkbox"/> 10-20<br><input type="checkbox"/> più di 20                   |

**Codice univoco di madre/mamma/figlio relativo al paziente**

# Allegato 2. Questionario di Frequenza Alimentare (FFQ), Studio di Follow-up postnatale – Visita ad 1 anno

(Tradotto da: <https://www.intergrowth21.org.uk/protocol.aspx?lang=1/> <https://www.medscinet.net/Intergrowth/patientinfodocs/PIFS1%20-%20IFU%20-%20final.pdf>)

Codice mamma-bambino \_\_\_\_\_

Data di nascita 

|   |   |   |   |   |   |
|---|---|---|---|---|---|
| G | G | M | M | A | A |
| G | G | M | M | A | A |

Data della visita 

|   |   |   |   |   |   |
|---|---|---|---|---|---|
| G | G | M | M | A | A |
| G | G | M | M | A | A |

Per favore, risponda a tutte le domande si/no mettendo una 'x' in corrispondenza della casella

## Sezione 1. Alimentazione di suo/a figlio/a nel primo anno di vita

1. Alle dimissioni dall'ospedale, suo/a figlio/a:
  - era esclusivamente allattato al seno?  Se si, vada alla D2
  - oppure - ha rievuto un allattamento misto?  Se si, vada alla D2
  - oppure - era esclusivamente con latte artificiale?  Se si, vada alla D6
2. Durante il primo anno di vita, ha mai dato a suo/a figlio/a latte tirato dal seno?  si  no
3. Se sta ancora allattando suo/a figlio/a, quanti pasti al giorno (incluso il latte tirato dal seno)?    
 N.pasti/giorno

4. Che età aveva suo/a figlio/a quando ha smesso di allattarlo esclusivamente al seno? 

|   |   |
|---|---|
| M | M |
|---|---|

 Mesi 

|   |
|---|
| S |
|---|

 Settimane
5. Che età aveva suo/a figlio/a quando ha iniziato a dargli il latte in formula? 

|   |   |
|---|---|
| M | M |
|---|---|

 Mesi 

|   |
|---|
| S |
|---|

 Settimane

6. Che tipo di latte in formula ha dato a suo/a figlio/a (barra il maggior numero possibile)?

|                  |                     |                                    |                        |                                |
|------------------|---------------------|------------------------------------|------------------------|--------------------------------|
| Formula standard | Formula idrolizzata | Formula ad alto contenuto calorico | Formula a base di soia | Altri tipi di latte in formula |
|------------------|---------------------|------------------------------------|------------------------|--------------------------------|

7. A che età ha iniziato a dare a suo figlio/a altri tipi di latte? 

|   |   |
|---|---|
| M | M |
|---|---|

 mesi 

|   |
|---|
| S |
|---|

 settimane
8. Se si, che tipo/i di latte?   
 Vaccino Screm.  Vaccino parz. Screm.  Vaccino Intero  Latte di soia  Altri latti veg  Altro

9. Che età avevo suo/a figlio/a quando sono stati introdotti I primi cibi solidi? 

|   |   |
|---|---|
| M | M |
|---|---|

 mesi 

|   |
|---|
| S |
|---|

 settimane

10. In generale, dove è preparata la maggior parte del cibo di suo/a figlio/a?   
 a casa  famiglia/amici  ristorante  negozio

11. Chi dà da mangiare principalmete a suo/a figlio/a?   
 Madre  Padre  Nonna/o  baby-sitter  altro

12. Suo/a figlio/a segue una dieta speciale?   
 Vegetariana  Senza glutine  basso contenuto di lattosio  basso contenuto di fenilalanina  Altro  Nessuna

Studio di Follow-up postnatale – Visita ad 1 anno  
**Questionario di Frequenza Alimentare**

Codice Diade  
 mamma/figlio \_\_\_\_\_

Data della vista \_\_\_\_\_

Per favore indichi con una 'X' nella tabella quanto spesso suo/a figlio/a ha consumato questi cibi negli ultimi 28 giorni

**Sezione 2: Questionario Frequenza Alimentare**

| Negli ultimi 28 giorni, quanto spesso il/la bambino/a ha consumato...?   | MAI | Volte/mese | Volte/settimana |           | Volte/giorno |           | Non applicabile |
|--|-----|------------|-----------------|-----------|--------------|-----------|-----------------|
|  |     | 1-3 volte  | 1-3 volte       | > 3 volte | 1-3 volte    | > 3 volte |                 |
| 13. Latte materno  |     |            |                 |           |              |           |                 |
| 14. Formula/latte soia/altro latte                                       |     |            |                 |           |              |           |                 |
| 15. Latte animale  |     |            |                 |           |              |           |                 |
| 16. Succhi/spremute/centrifugati di Frutta/verdure                       |     |            |                 |           |              |           |                 |
| 17. Bevande zuccherate   |     |            |                 |           |              |           |                 |
| 18. Bevenade con dolcificanti (ipocalorici)                              |     |            |                 |           |              |           |                 |
| 19. Acqua  |     |            |                 |           |              |           |                 |
| 20. Zuppa (brodo di carne/pesce/verdure)                                 |     |            |                 |           |              |           |                 |
| 21. Latticini  |     |            |                 |           |              |           |                 |
| 22. Cereali cotti (es porridge)  |     |            |                 |           |              |           |                 |
| 23. Cereali da colazione   |     |            |                 |           |              |           |                 |
| 24. Frutta e verdura ricca in Vit A(es: carote, spinaci albicocche, ecc) |     |            |                 |           |              |           |                 |
| 25. Altra frutta   |     |            |                 |           |              |           |                 |
| 26. Altra verdura  |     |            |                 |           |              |           |                 |
| 27. Cereali in chicco (es.riso)  |     |            |                 |           |              |           |                 |
| 28. Legumi (es fagioli lenticchie)                                       |     |            |                 |           |              |           |                 |
| 29. Tuberi (es patate)   |     |            |                 |           |              |           |                 |
| 30. Pasta  |     |            |                 |           |              |           |                 |
| 31. Pane / crackers  |     |            |                 |           |              |           |                 |
| 32. Biscotti / snacks dolci  |     |            |                 |           |              |           |                 |
| 33. Patatine / snacks salati   |     |            |                 |           |              |           |                 |
| 34. Dolci / caramelle  |     |            |                 |           |              |           |                 |
| 35. Uova   |     |            |                 |           |              |           |                 |
| 36. Carne rossa / interiora (es.: Manzo/fegato)                          |     |            |                 |           |              |           |                 |
| 36/A Prosciutto cotto/maiale   |     |            |                 |           |              |           |                 |
| 37. Pesce  |     |            |                 |           |              |           |                 |
| 38. Pollame-carne Bianca (es: pollo, tacchino, coniglio, agnello)        |     |            |                 |           |              |           |                 |
| 39. Cibo Take-away food (es. pizza...)                                   |     |            |                 |           |              |           |                 |
| 40. Burro  |     |            |                 |           |              |           |                 |
| 41. Margarina/oli vegetali   |     |            |                 |           |              |           |                 |
| 42. Olio di Oliva/Extraverg.   |     |            |                 |           |              |           |                 |

NOME E FIRMA DEL RICERCATORE \_\_\_\_\_