

Sessione Semiplenaria
VALUTAZIONE DEL RISCHIO DA ESPOSIZIONE
A BENZENE: AGGIORNAMENTI E PROSPETTIVE

Maurizio Manno

Il benzene oggi: da tossico industriale a cancerogeno ambientale

Sezione di Medicina del lavoro, Dipartimento di Sanità Pubblica, Università degli Studi di Napoli Federico II, Napoli

RIASSUNTO. Il benzene, importante composto chimico industriale mielotossico ad alte dosi nei lavoratori, è oggi un inquinante pressoché ubiquitario. È inoltre un cancerogeno genotossico privo di dose soglia che causa leucemia acuta ed altre forme di tumori linfoematopoietici. Sebbene il meccanismo d'azione non sia del tutto chiarito, tossicità e cancerogenicità dipendono dalla sua attivazione metabolica a metaboliti reattivi. Si ritiene dunque che i polimorfismi degli enzimi attivanti e detossificanti (CYP, GST, NQO1) giochino un ruolo importante nella suscettibilità individuale al benzene. Ulteriori fattori di incertezza nella valutazione dell'esposizione alle basse dosi sono la limitata sensibilità e specificità degli indicatori biologici, la coesposizione ad altri composti organici volatili (COV) e la presenza di fonti di esposizione non professionali, come fumo di sigaretta e traffico veicolare. Obiettivo di questa relazione è introdurre i principali elementi di criticità nella valutazione del rischio e nel monitoraggio biologico dell'esposizione occupazionale a basse dosi di benzene.

Parole chiave: benzene, valutazione del rischio, cancerogeno ambientale.

ABSTRACT. UPDATE ON BENZENE: FROM INDUSTRIAL TOXICANT TO ENVIRONMENTAL CARCINOGEN. Benzene, an industrial chemical myelotoxic at high doses in workers, is now an almost ubiquitous pollutant. It is also a no-threshold genotoxic carcinogen causing acute leukemia and other lymphoematological tumours. Although its mechanism of action has not been fully clarified, benzene toxicity and carcinogenicity depend on metabolic activation. Polymorphism of activating and detoxifying enzymes (CYP, GST, NQO1) may be critical, therefore, in modulating individual susceptibility to benzene. Further uncertainty factors in assessing low level benzene exposure are the limited sensitivity and specificity of most exposure biomarkers, the frequent coexposure to other volatile organic chemicals (VOC), and the presence of non occupational sources of exposure, such as cigarette smoke and vehicular traffic. The aim of this presentation is to introduce the main current critical issues in the risk assessment and the biological monitoring of occupational exposure to benzene at low doses.

Key words: benzene, risk assessment, environmental carcinogen.

Introduzione

La medicina del lavoro è stata da sempre il "laboratorio" naturale nello studio degli effetti dei tossici ambientali. Il benzene, un agente industriale mielotossico e cancerogeno che in passato veniva largamente usato come solvente nell'industria delle vernici, delle colle e della gomma, con conseguente notevole esposizione dei lavoratori, ne è un classico esempio. Il benzene è oggi un importante inquinante ambientale, pressoché ubiquitario, la cui esposizione è dovuta essenzialmente alle emissioni provenienti dagli scarichi veicolari non catalizzati e al fumo di sigaretta. Il benzene peraltro è tuttora usato, soprattutto come materia prima, per la sintesi di polimeri, resine, detersivi, coloranti, pesticidi, farmaci ed è presente in percentuali non trascurabili nelle benzine (<1%). L'esposizione occupazionale si associa spesso a quella ad altri composti organici volatili (COV), quali toluene, xilene ed altri ancora, che condividono le stesse vie metaboliche di attivazione e detossificazione. Le possibili interazioni tossicocinetiche e tossicodinamiche tra il benzene e questi COV sono dunque importanti per una corretta valutazione sia della dose assorbita che del rischio. In questo contesto si inserisce la presente sessione, il cui obiettivo è duplice: da un lato esaminare i fattori, sia genetici che ambientali, che modulano gli indicatori biologici di esposizione, di effetto e di suscettibilità in soggetti professionalmente esposti a basse dosi di benzene e dall'altro valutare le implicazioni in termini di valutazione del rischio e limiti di esposizione.

Effetti e meccanismo d'azione

L'esposizione umana a dosi elevate di benzene provoca seri danni, sia deterministici che stocastici, al midollo osseo, in particolare anemia aplastica e leucemia acuta (1). Il benzene è infatti classificato cancerogeno umano dall'Agenzia Internazionale di Ricerca sul Cancro (2) e dalle altre principali agenzie internazionali. Nonostante la gran quantità di studi effettuati, il meccanismo alla base della tossicità e cancerogenicità del benzene non è stato ancora del tutto chiarito. Oltre al danno genotossico, largamente documentato da alterazioni cromosomiche e di altro tipo de-

scritte anche in soggetti esposti a concentrazioni molto basse, e allo stress ossidativo, pure ben documentato, sono state ipotizzate altre modalità d'azione, tra cui più recentemente anche meccanismi epigenetici, quali disfunzione del sistema immunitario, inibizione della comunicazione intercellulare via gap junction, alterazioni della metilazione del DNA o del pool delle cellule staminali (3). Gli effetti epigenetici dell'esposizione professionale a basse dosi di benzene sono discussi in una relazione specifica (4). La comprensione del meccanismo di tossicità è dunque fondamentale, soprattutto alle basse dosi, per una valutazione razionale del rischio ed una corretta definizione dei valori limite, sia ambientali che biologici.

Ruolo del metabolismo nella tossicità del benzene

Quale che sia il meccanismo d'azione, in particolare alle basse dosi, è comunque acclarato che il metabolismo gioca un ruolo fondamentale. Sebbene l'organo bersaglio sia il midollo osseo, tossicità e cancerogenicità del benzene dipendono in larga misura dalla sua attivazione a benzene epossido (BE) ed altri metaboliti reattivi, come o e p-benzochinoni, muconaldeide ed altri ancora (3). Il solvente, sia nell'uomo che nell'animale, è inizialmente attivato a BE dal CYP2E1 epatico, l'isoforma responsabile dell'attivazione metabolica di un gran numero di COV (5). Il ruolo del CYP2E1 è confermato dall'osservazione che i fattori che ne aumentano o diminuiscono l'attività enzimatica modulano anche la mielotossicità del benzene. Il pretrattamento dei ratti ad esempio con etanolo, noto in-

duttore del CYP 2E1, ma non con fenobarbital, che induce invece altre isoforme CYP, aumenta il metabolismo e la tossicità del benzene. Al contrario, ratti privi del gene CYP 2E1 esposti a benzene hanno bassi livelli di metaboliti e non mostrano effetti genotossici. Recentemente è stato da noi osservato che il benzene induce il CYP2E1 nel fegato e in linfociti periferici di ratto (6).

Il BE segue poi varie vie metaboliche (Figura 1): a) coniugazione col glutatione per formare gli acidi mercapturici, in particolare l'acido S-fenilmercapturico (SPMA) escreto nelle urine; b) riarrangiamento a fenolo che a sua volta viene ossidato a catecolo e idrochinone; c) idratazione da parte dell'eossido idrolasi a diidrodiole e d) apertura dell'anello a formare muconaldeide, probabile agente mielotossico, e da questi l'altro importante metabolita urinario, l'acido t,t-muconico (tt-MA). La glutazione transferasi (GST), anch'essa un enzima polimorfico presente soprattutto nel fegato, è coinvolta invece nella detossificazione del benzene a metaboliti meno tossici, sia in vivo che in vitro. Questi ed altri dati suggeriscono che i fenolo/genotipi metabolici CYP2E1 e GST possano condizionare la suscettibilità agli effetti tossici del benzene anche nell'uomo. Per un'analisi più dettagliata sui fattori di suscettibilità, genetici e ambientali, nell'esposizione a benzene si rimanda altrove in questo volume (7).

Fattori di incertezza nella valutazione del rischio

È noto che gli effetti tossici di molti inquinanti occupazionali ed ambientali (xenobiotici) sono il risultato della

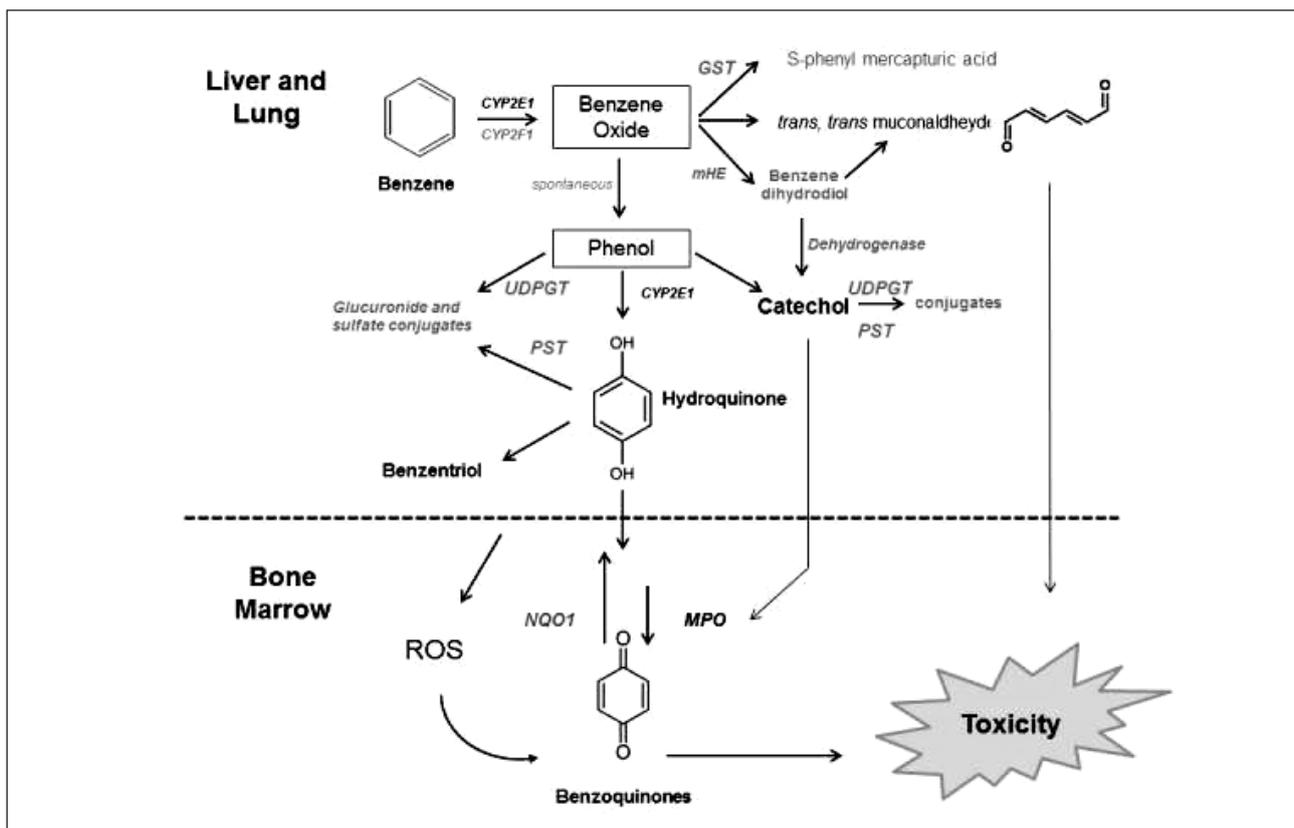


Figura 1. Principali vie metaboliche coinvolte nella tossicità/cancerogenicità del benzene

loro attivazione metabolica nel fegato e in altri organi. Il principale sistema enzimatico responsabile dell'attivazione di molti xenobiotici, tra cui il benzene, è il citocromo P-450 (CYP), una superfamiglia di circa 1.000 emoproteine presenti in quasi tutti gli organismi viventi, di cui almeno 50 nell'uomo, situate nel reticolo endoplasmatico degli epatociti e di altre cellule (8). Uno dei principali sistemi deossificanti del benzene sono invece le glutatione transferasi (GST), una famiglia di enzimi che metabolizzano un largo spettro di composti tossici e cancerogeni. Sia CYP che GST sono polimorfici e le differenze individuali nella loro attività metabolica possono spiegare, almeno in parte, la variabilità umana nella risposta al benzene.

Un ulteriore elemento di incertezza nella valutazione del rischio è la difficoltà di caratterizzare il ruolo dei fattori di esposizione non occupazionali, sia individuali che ambientali, quali dieta, fumo di sigaretta, zona di residenza ed altri ancora. Ognuno di questi può mascherare o modulare i livelli degli indicatori non solo di esposizione, ma anche di effetto, ad esempio genotossico, rendendo molto difficile, se non impossibile, l'interpretazione del risultato nei singoli lavoratori. Inoltre, come già detto, l'esposizione avviene quasi sempre in presenza di altri COV che possono modificarne in modo significativo tossicocinetica e tossicodinamica. È quindi importante studiare anche gli effetti della presenza di questi composti sugli indicatori biologici di esposizione e di risposta a benzene.

Il problema della curva dose-risposta alle basse dosi

Nonostante i notevoli sforzi dei ricercatori e la mole di studi, sia sperimentali che epidemiologici, effettuati per definire la forma della curva dose-risposta del benzene alle basse dosi, la questione è tuttora irrisolta. Le implicazioni in termini di incertezza per la valutazione del rischio sono evidenti. Alcuni organismi nazionali ed internazionali, tra cui l'Agenzia di Protezione dell'Ambiente Americana (EPA), assume che il metabolismo del benzene abbia una cinetica di prim'ordine non saturabile per concentrazioni anche elevate. Su questo assunto l'EPA basa l'estrapolazione del rischio cancerogeno dalle alte alle basse dosi. Tuttavia, poiché sulla base degli effetti stocastici (leucemia) né l'epidemiologia né gli studi sperimentali sull'animale sono stati in grado sinora di confermare questo punto, alcuni ricercatori propongono (per cercare di chiarire l'andamento della curva alle basse dosi) di utilizzare parametri di tipo deterministico, come ad esempio gli indicatori biologici di effetto o le alterazioni ematologiche non di tipo neoplastico (3). L'evidenza sinora disponibile tuttavia non supporta l'ipotesi della presenza di una dose-soglia, neppure per concentrazioni dell'ordine del TLV® (0,5 ppm), suggerendo che anche per esposizioni molto basse vi sia effettivamente un rischio per la salute, rischio che potrebbe poi manifestarsi concretamente nei soggetti che presentassero particolare suscettibilità individuale. È questo il motivo per cui è importante la valutazione dell'esposizione anche alle basse dosi.

Importanza del monitoraggio biologico nella valutazione del rischio

Il ruolo del monitoraggio biologico, ed in particolare degli indicatori di esposizione, nella valutazione del rischio benzene è stato recentemente oggetto di revisione (9). Gli autori concludono che, sebbene nessun singolo indicatore risulti sicuramente correlato agli effetti sulla salute (e quindi predittivo), è comunque giustificato utilizzare il monitoraggio biologico nel suo complesso per una migliore valutazione del rischio alle basse dosi. Essi calcolano che i valori medi di benzene ematico e urinario e dell'acido S-felilmercapturico urinario riscontrati nei soggetti non fumatori e professionalmente non esposti corrispondono alla concentrazione ambientale di riferimento stimato dall'EPA per la popolazione generale (30 µg/m³) ma superano il valore corrispondente ad un eccesso di rischio cancerogeno considerato accettabile per la popolazione generale e pari a 1×10^{-5} (2,9 µg/m³). Considerando che il valore limite ambientale per i lavoratori raccomandato ad esempio dall'ACGIH (TLV-TWA, 1,6 mg/m³) è di circa tre ordini di grandezza maggiore, è evidente che il livello di rischio considerato oggi "accettabile" per i lavoratori può essere facilmente criticato sotto il profilo etico. Nella valutazione del rischio da esposizione a benzene dunque, il monitoraggio biologico può giocare un ruolo particolarmente importante nel caso di soggetti esposti a "basse dosi", in quanto quest'ultime potrebbero essere in realtà associate a livelli di rischio significativi. Lo stato dell'arte sul monitoraggio, sia ambientale che biologico, dell'esposizione a benzene è oggetto di specifica trattazione in questo volume (10, 11).

S. Rappaport dell'UCB, ha mostrato recentemente che il metabolismo del benzene a basse dosi è circa tre volte più efficiente di quanto non si sia creduto e che pertanto anche il rischio ad esso associato è maggiore (12). Se questa osservazione dovesse essere confermata, i limiti per l'esposizione occupazionale a benzene (e quindi anche quelli per l'esposizione negli ambienti di vita in generale) dovrebbero essere adeguatamente ridotti per renderli effettivamente basati sulla salute (health-based). I valori limite occupazionali per il benzene raccomandati dai vari organismi internazionali e le valutazioni di carattere scientifico e pratico che ne derivano sono oggetto di una relazione ad hoc (13).

Considerazioni finali

La valutazione del rischio per l'esposizione a benzene è complessa e richiede la conoscenza dei meccanismi d'azione del solvente alle basse dosi, dei livelli di esposizione e di dose interna, e dei molti fattori di suscettibilità individuale in gioco. Se è vero che il ruolo del metabolismo nella tossicità e cancerogenicità del benzene è sufficientemente documentato, è altrettanto vero che altri fattori critici, quali il singolo contributo dei vari metaboliti e dei relativi enzimi metabolici, la forma della curva dose-risposta alle basse dosi (in particolare la presenza o meno di una dose-soglia), e gli effetti biologici più sensi-

bili e specifici, rimangono oggi ampiamente indefiniti. Lo studio di questi aspetti non può essere affrontato se non con un approccio, sperimentale ed epidemiologico, multidisciplinare. In questo contesto una priorità per la medicina del lavoro è l'individuazione di nuovi indicatori biologici di esposizione, effetto e suscettibilità per il benzene, più sensibili e specifici di quelli oggi disponibili. Tali indicatori, se opportunamente validati, potranno da un lato migliorare la valutazione del rischio nei lavoratori esposti e dall'altro suggerire una più ampia base dati per la definizione di valori limite occupazionali e ambientali più validi scientificamente ma anche eticamente più accettabili.

Bibliografia essenziale

- 1) Snyder R. Leukemia and benzene. *Int J Environ Res Public Health* 2012; 9: 2875-93.
- 2) International Agency for Research on Cancer. Benzene. *IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum* 1989; 45: 1-322.
- 3) Smith M. Advances un understanding benzene health effects and susceptibility. *Annu Rev Public Health* 2010; 31: 133-148.
- 4) Fustinoni S, Bollati V, Bertazzi PA. Modificazioni epigenetiche nell'esposizione a basse dosi di benzene. *G Ital Med Lav Erg* 2013; questo volume.
- 5) Lucas D, Ferrara R, Gonzales E, Albores A, Manno M, Berthou F. Cytochrome CYP2E1 phenotyping and genotyping in the evaluation of health risks from exposure to polluted environments. *Toxicol Lett* 2001; 124: 71-81.
- 6) Gonzalez-Jasso E, Lopez T, Lucas D, Berthou F, Manno M, Ortega A, Albores A. CYP2E1 regulation by benzene and other small organic chemicals in rat liver and peripheral lymphocytes. *Toxicol Lett* 2003; 144: 55-67.
- 7) De Palma G, Mutti A, Spatari G, Andreoli R, Mozzoni P, Carrieri M, Manno M, Apostoli P. Indicatori di effetto e di suscettibilità alle basse dosi di benzene. *G Ital Med Lav Erg* 2013, questo volume.
- 8) Manno M, Saia B. Biotrasformazione in medicina del lavoro: Ruolo del citocromo P-450 epatico nel meccanismo d'azione e nel monitoraggio biologico dei tossici occupazionali. *Med Lav* 1994; 85: 11-21.
- 9) Arnold SM, Angerer J, Boogaard PJ, Hughes MF, O'Lone RB, Robinson SH, Schnatter AR. The use of biomonitoring data in exposure and human health risk assessment: benzene case study. *CRT* 2103; 43: 119-153.
- 10) Lovreglio P, Carrieri M, Barbieri A, Sabatini L, Fustinoni S, Andreoli R, D'Errico MN, Basso A, Bartolucci GB, Soleo L. Il monitoraggio dell'esposizione occupazionale ed ambientale a basse dosi di benzene. *G Ital Med Lav Erg* 2013, questo volume.
- 11) Tranfo G, Paci E, Fustinoni S, Barbieri A, Carrieri. Aspetti metodologici nel monitoraggio ambientale e biologico dell'esposizione a basse dosi di benzene: criticità e possibili soluzioni. *G Ital Med Lav Erg* 2013, questo volume.
- 12) Rappaport SM, Kim S, Lan Q, Vermuelen R, Waidyanatha S, Zhang L, Li G, Yin S, Hayes RB, Rothman N, Smith MT. Evidence that humans metabolize benzene via two pathways. *Environ Health Perspect* 2009; 117: 946-952.
- 13) Scapellato ML, Aprea C, Moretto A, Bartolucci GB, Manno M. Considerazioni sui valori limite per il benzene. *G Ital Med Lav Erg* 2013, questo volume.

Corrispondenza: Maurizio Manno, Sezione di Medicina del lavoro, Dipartimento di Sanità Pubblica, Università degli Studi di Napoli Federico II, Via S. Pansini 5, 80131 Napoli, Italy

Piero Lovreglio¹, Mariella Carrieri², Anna Barbieri³, Laura Sabatini³, Silvia Fustinoni⁴, Roberta Andreoli⁵,
Maria Nicolà D'Errico¹, Antonella Basso¹, Giovanni Battista Bartolucci², Leonardo Soleo¹

Il monitoraggio dell'esposizione occupazionale ed ambientale a basse dosi di benzene

¹ Dipartimento Interdisciplinare di Medicina, Sezione di Medicina del Lavoro "E.C. Vigliani", Università di Bari "A. Moro", Bari

² Dipartimento di Medicina Molecolare, Università di Padova, Padova

³ Unità Operativa di Medicina del Lavoro, Università di Bologna, Bologna

⁴ Dipartimento di Scienze Cliniche e di Comunità, Università di Milano e Fondazione IRCCS Ca' Granda Ospedale Maggiore, Milano

⁵ Laboratorio di Tossicologia Industriale, Dipartimento di Medicina Clinica e Sperimentale, Università di Parma, Parma

RIASSUNTO. Obiettivo: Verificare quali tra i diversi indicatori biologici di dose interna del benzene possono essere ritenuti affidabili per il monitoraggio biologico dell'esposizione alle basse concentrazioni attualmente presenti negli ambienti di lavoro e di vita.

Materiali e Metodi: È stata analizzata la letteratura specifica per valutare l'affidabilità dei diversi indicatori biologici di dose interna.

Risultati e Conclusioni: L'acido t,t-muconico è un indicatore non specifico per il benzene, valido per esposizioni a concentrazioni fino ad un ordine di grandezza inferiori al valore limite di 3250 µg/m³. L'acido S-fenilmercapturico (SPMA) è un indicatore affidabile anche per esposizioni a concentrazioni due ordini di grandezza inferiori al valore limite di 3250 µg/m³ e può essere considerato l'indicatore di scelta per il monitoraggio biologico dei lavoratori esposti a benzene. Il benzene urinario non sembra presentare reali vantaggi rispetto all'SPMA per il monitoraggio dell'esposizione occupazionale a benzene, mentre sembra essere più affidabile rispetto all'SPMA per la valutazione dell'esposizione a concentrazioni prossime a quelle presenti negli ambienti di vita. L'abitudine al fumo di sigarette influenza l'eliminazione urinaria di tutti gli indicatori descritti e, per gli attuali livelli di esposizione occupazionale e ambientale a benzene, deve essere tenuta in considerazione nell'interpretazione dei risultati del monitoraggio biologico.

Parole chiave: esposizione occupazionale, esposizione ambientale, indicatori biologici.

ABSTRACT. MONITORING OF THE OCCUPATIONAL AND ENVIRONMENTAL EXPOSURE TO LOW DOSES OF BENZENE.

Aim: To verify which of the various biomarkers of internal dose of benzene can be considered reliable for biological monitoring of exposure to the low concentrations present nowadays in working and living environments.

Materials and Methods: The specific literature was analyzed to assess the reliability of the different biomarkers of internal dose.

Results and Conclusions: t,t-muconic acid is a non specific biomarker for benzene, valid for exposure to concentrations up to one order of magnitude less than the threshold limit of 3250 µg/m³. S-phenylmercapturic acid (SPMA) is a reliable marker even for exposure to concentrations up to two orders below the threshold value of 3250 µg/m³, and can be considered the biomarker of choice for biological monitoring of workers exposed to benzene. Urinary benzene does not seem to have any real advantages over SPMA for monitoring occupational exposure to benzene, but it does seem to be more

Introduzione

Il benzene è un idrocarburo aromatico che nei paesi occidentali è stato largamente utilizzato fino agli anni '60 del secolo scorso con esposizioni lavorative piuttosto elevate, fino a centinaia di ppm. In quegli anni l'evidenza nei lavoratori esposti di effetti leucemogeni e mielotossici gravi ha comportato una progressiva sostituzione del benzene con altri solventi meno tossici con conseguente riduzione dell'esposizione (1). Un'esposizione occupazionale a basse concentrazioni di benzene tuttavia è attualmente ancora presente nell'industria petrolchimica, nelle cokerie, nell'industria chimica di sintesi. I livelli di esposizione presenti in questi ambienti di lavoro sono generalmente inferiori al valore limite ambientale di 3250 µg/m³ riportato nell'allegato XLIII del D.Lgs 81/08 e s.m.i. (Decreto 81), pari al doppio del TLV-TWA di 1600 µg/m³ raccomandato dall'ACGIH (2, 3).

Il benzene è anche un inquinante pressoché ubiquitario degli ambienti di vita, nei quali viene immesso in particolare con il fumo di sigarette e con gli scarichi autoveicolari. Questi ultimi sono i principali responsabili dell'inquinamento da benzene in tutte le aree urbane, mentre altre fonti quali gli stabilimenti industriali, le discariche di rifiuti pericolosi, la combustione domestica del legno, l'evaporazione durante il rifornimento di carburanti contribuiscono a determinare l'inquinamento outdoor da benzene solo limitatamente ad alcune aree urbane (1).

La valutazione dell'esposizione occupazionale e ambientale a benzene attraverso il monitoraggio ambientale e biologico consente rispettivamente la determinazione periodica e sistematica delle concentrazioni di benzene presenti nell'aria degli ambienti di lavoro e di vita e la misura della dose interna di benzene introdotta nell'organismo umano attraverso le diverse vie di assorbimento utilizzando specifici indicatori biologici, soprattutto urinari, rappresentati da prodotti del suo metabolismo (fenolo, catecolo, idrochinone, acido t,t-muconico - t,t-MA, acido S-fenilmercapturico - SPMA) o dal benzene urinario tal quale. Di questi indicatori biologici è stata valutata l'affidabilità per il monitoraggio biologico dell'esposizione alle basse concentrazioni attualmente presenti negli ambienti di lavoro e di vita.

reliable than SPMA to assess exposure to concentrations like those present in living environments. A smoking habit influences the urinary excretion of all the described biomarkers, and for the current low levels of occupational and environmental exposure to benzene, must be taken into account when interpreting the results of biological monitoring.

Key words: occupational exposure, environmental exposure, biomarkers.

Risultati

Nei paesi europei, compresa l'Italia, l'esposizione occupazionale alle basse concentrazioni di benzene osservate negli ultimi 10 anni è stata raggiunta effettuando negli impianti industriali interventi tecnici e organizzativi che hanno via via comportato una sua riduzione. Così nell'industria petrolchimica, la presenza di tecnologie a ciclo chiuso ed una più razionale organizzazione del lavoro ha comportato esposizioni soltanto occasionali e di breve durata a concentrazioni di un ordine di grandezza inferiori rispetto al valore limite del Decreto 81 nella produzione del petrolio greggio (fase 'upstream'), e due ordini di grandezza inferiori al predetto valore limite nella raffinazione e produzione dei prodotti petroliferi (fase 'down-

stream') (tabella I). Concentrazioni più alte, invece, sono state osservate in alcuni stabilimenti petrolchimici dell'est Europa. Per i benzinai nel nostro paese l'esposizione a benzene si è notevolmente ridotta in seguito alla applicazione della legge 413/97, che ha fissato un contenuto massimo di benzene nei carburanti inferiore all'1% della quota totale in volume, alla presenza obbligatoria dei sistemi di recupero dei vapori sulle pompe di benzina e alla diffusione della modalità di rifornimento in self-service (4). Le concentrazioni ambientali di benzene cui sono attualmente esposti i benzinai sono risultate comprese tra 20.9 e 61.0 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ (valori mediani), un ordine di grandezza più basse rispetto ai livelli di esposizione osservati negli anni '90 (5). Per gli autisti di autocisterne che trasportano carburanti sono state osservate concentrazioni di un ordine di grandezza più alte rispetto a quelle osservate nei benzinai, confermando come gli autisti siano la categoria di lavoratori maggiormente esposta nella catena di distribuzione dei carburanti. I lavoratori delle cokerie, infine, hanno mostrato un'esposizione a concentrazioni di benzene solo un ordine di grandezza inferiori al valore limite del Decreto 81.

Il contenimento della presenza di benzene nei carburanti è la principale causa della riduzione delle concentrazioni di benzene nelle aree urbane dei paesi occidentali. Essa ha avuto come conseguenza anche il decremento dell'esposizione occupazionale al tossico di vigili urbani e

Tabella I. Livelli di esposizione occupazionale a benzene in Europa negli ultimi 10 anni

	Lavoratori (N.)	Livelli di benzene ($\mu\text{g}/\text{m}^3$)		Nazione (città)	Autori
		Mediana	Range		
Industria produzione petrolio (upstream)	12	136.5*	<3.2-2236.0	Norvegia	Bratveit <i>et al.</i> 2007
Industria petrolchimica (downstream)	145	9.7	<3.2-910	Italia	Carrieri <i>et al.</i> 2010
	33	27.8	1.7-593.5	Italia	Fracasso <i>et al.</i> 2010
	71	190.0	60-2310	Polonia	Fustinoni <i>et al.</i> 2011
	79	93.0*	0.22-810	Italia	Basso <i>et al.</i> 2011
	28	34.0	2-895	Italia	Carrieri <i>et al.</i> 2012
	33	25.0	6-929	Italia	Fustinoni <i>et al.</i> 2012
	158	1495.0	39-77675	Bulgaria	Seow <i>et al.</i> 2012
Autisti trasporto carburanti	18	246.6	7.4-1017.1	Italia (Bari)	Lovreglio <i>et al.</i> 2010
Benzinai	19	106.0	35.0-564.0	Spagna	Periago e Prado 2005
	61	61.0	11.0-478.0	Italia (Milano)	Fustinoni <i>et al.</i> 2005
	33	37.0	11.0-187.0	Italia (Padova)	Carrieri <i>et al.</i> 2006
	28	40.0	8.0-260.0	Italia (Padova)	Fracasso <i>et al.</i> 2010
	23	20.9	4.5-66.3	Italia (Bari)	Lovreglio <i>et al.</i> 2010
	102	38.3	12.1-107.5	Italia (Parma)	De Palma <i>et al.</i> 2012
Addetti cokerie	10	666.3	227.5-910.0	Gran Bretagna	Colman e Coleman 2006
	Circa 250	-	10.0-2710.0	Polonia	Bienek e Lusiak 2012
Vigili urbani	77	22.0	9.0-313.0	Italia (Milano)	Fustinoni <i>et al.</i> 2005
	126	18.0	2.0-76.0	Italia (Bologna)	Violante <i>et al.</i> 2006
	19	5.9	0.3-12.8	Italia (Parma)	Manini <i>et al.</i> 2008
	128	9.6	5.4-22.5	Italia (Milano)	Campo <i>et al.</i> 2011
	48	13.5	3.4-40.7	Italia (Roma)	Ciarrocca <i>et al.</i> 2012
Autisti autobus urbani	49	9.0	<6.0-46.0	Italia (Genova)	Fustinoni <i>et al.</i> 2005
	50	7.9	2.6-110.0	Rep. Ceca (Praga)	Bagryantseva <i>et al.</i> 2010
Autisti Taxi	37	5.9	-	Italia (Parma)	Manini <i>et al.</i> 2006

* Valori medi

autisti di mezzi di pubblico servizio esposti alle emissioni degli scarichi autoveicolari (tabella I), consentendo nella maggior parte delle città europee di raggiungere progressivamente concentrazioni di benzene generalmente contenute entro il valore obiettivo per la qualità dell'aria di 5 µg/m³ come media annuale, stabilito dalla Direttiva 69/2000 (recepita in Italia dal DM 60/02) (6). Livelli più elevati, tuttavia, sono stati osservati in alcune città italiane, in particolare Napoli (media 9.8 µg/m³ su campionamenti fissi ambientali di 24 ore) e Milano (media 8.5 µg/m³ su campionamenti personali di 72 ore) (7, 8). Deve essere tuttavia considerato nell'interpretazione dei risultati del monitoraggio ambientale che i campionamenti effettuati dalle stazioni fisse di monitoraggio dell'aria tendono a sottostimare l'esposizione personale che avviene nelle aree urbane, e che concentrazioni più elevate rispetto ai valori outdoor sono presenti all'interno dei mezzi di trasporto, quali ad esempio automobili ed autobus, e questo non solo a causa della penetrazione dall'esterno delle emissioni degli scarichi degli altri autoveicoli, ma anche delle perdite dei serbatoi e dei circuiti di distribuzione dei carburanti (9, 10).

Il fumo di sigarette rappresenta la più importante fonte di esposizione non occupazionale a benzene per i fumatori, con concentrazioni di 28.0-105.9 µg/sigaretta nel fumo 'mainstream' e 70.7-134.3 µg/sigaretta nel fumo 'sidestream' (11). Duarte-Davidson *et al.* (12) hanno stimato per un fumatore di 20 sigarette/die una dose di benzene ritenuta nell'organismo di 400 µg/die. Il fumo, quindi, è in grado di determinare un intake del tossico simile o superiore a quello che caratterizza attualmente l'esposizione occupazionale della maggior parte dei lavoratori dei paesi occidentali. Anche il fumo passivo è in grado di provocare una significativa esposizione a benzene, pari a circa il 10% dell'intake totale nei non fumatori, superiore rispetto a quella determinata dall'insieme delle emissioni industriali US nell'atmosfera (12).

Per quanto riguarda gli indicatori biologici da utilizzare nel monitoraggio biologico, l'impiego del fenolo uri-

nario, raccomandato dall'ACGIH fino al 1997, è stato abbandonato a causa della sua non specificità per il benzene, che lo rende un indicatore poco valido per esposizioni a concentrazioni inferiori a 16250 µg/m³ (5 ppm) (13). Allo stesso modo risultano poco utili per gli attuali livelli di esposizione il catecolo e l'idrochinone urinari in quanto poco specifici perché assunti con la dieta e prodotti dal metabolismo degli aminoacidi (13). Il benzene ematico, invece, è un indicatore di esposizione recente a benzene, che sebbene affidabile non viene utilizzato di routine in quanto necessita di una metodica invasiva di raccolta del campione, e presenta problematiche nella fase preanalitica consistenti nella volatilizzazione del tossico dal campione ematico e nella sua facile contaminazione (13).

I biomarcatori di esposizione del benzene che l'ACGIH ha proposto per l'anno 2013 nella lista dei BEI sono il t,t-MA e l'SPMA (3). Il t,t-MA urinario è sicuramente l'indicatore maggiormente utilizzato nella pratica routinaria del monitoraggio biologico, principalmente per la metodica analitica usata per la sua determinazione (HPLC-UV) praticabile in tutti i laboratori di tossicologia industriale e ambientale (tabella II). Esso, tuttavia, non è un biomarcatore specifico del benzene in quanto deriva anche dall'acido sorbico, un comune conservante anti-micotico presente in molti alimenti e nei cosmetici. Sebbene soltanto lo 0.12% dell'acido sorbico assorbito venga biotrasformato a t,t-MA, esso può spiegare il 10-50% dei livelli urinari background di t,t-MA nei non fumatori, fino a determinare in alcuni casi la presenza di concentrazioni urinarie di t,t-MA superiori al BEI anche in soggetti non occupazionalmente esposti a benzene (14, 15). Il fumo di sigaretta, in quanto fonte di benzene, rappresenta l'altro fattore non occupazionale in grado di condizionare l'eliminazione urinaria di t,t-MA con concentrazioni più alte nei fumatori rispetto ai non fumatori, anche in presenza di esposizione occupazionale (14). Nonostante la sua scarsa specificità e l'influenza del fumo, il t,t-MA risulta essere comunque un indicatore affidabile anche per esposizioni occupazionali fino ad un ordine di grandezza al di sotto

Tabella II. Caratteristiche degli indicatori biologici urinari del benzene

Indicatore	Metodologia analitica prevalente	Criticità campionamento	Specificità per il benzene	Fonti diverse dal benzene	Applicabilità in ambito occupazionale	Applicabilità per la popolazione generale	BEI ACGIH 2013	Valori di riferimento popolazione italiana					
								Totale		Fumatori		Non fumatori	
							5°-95°	Range	5°-95°	Range	5°-95°	Range	
Fenolo (mg/L)	HPLC-UV	Nessuna	No	Dieta, farmaci, fumo, fonti endogene	No	No	Non inserito	10-100	-	-	-	-	
Catecolo	HPLC-UV	Nessuna	No	Dieta, fumo, fonti endogene	No	No	Non inserito	-	-	-	-	-	
Idrochinone	HPLC-UV	Nessuna	No	Dieta, fumo	No	No	Non inserito	-	-	-	-	-	
Acido t,t-muconico (µg/g creatinina)	SPE-HPLC-UV	Nessuna	No	Dieta (sorbitolo)	Sì	No	500	15.2 - 163.1	7.4 - 774.4	18.0 - 236.9	11.8 - 600.4	14.4 - 143.1	7.4 - 774.4
SPMA (µg/g creatinina)	LC/MS/MS o GC/MS, sofisticata	Instabilità in urine alcaline (necessario congelamento o acidificazione)	Sì	Nessuna	Sì	Sì	25	-	<0.05 - 35	-	0.1 - 35	-	<0.05 - 14
Benzene urinario (ng/L)	HS-GC, SPME-GC/MS	Volatilizzazione benzene dal campione	Sì	Nessuna	Sì	Sì	Non inserito	-	<15 - 4615	-	42 - 4615	-	<15 - 515

del valore limite del Decreto 81, mentre risulta essere poco affidabile per esposizioni a concentrazioni più basse come quelle presenti negli ambienti di vita (14, 16, 17). Per l'interpretazione dei risultati della sua determinazione, insieme al BEI dell'ACGIH di 500 µg/g creatinina, sono stati recentemente individuati con un accurato studio multicentrico i valori di riferimento per la popolazione generale italiana (tabella II) (18).

L'SPMA urinario è, invece, un biomarcatore specifico per il benzene, con il fumo di sigaretta che rappresenta il principale fattore non-occupazionale in grado di condizionare la sua eliminazione urinaria, mentre l'esposizione a traffico autoveicolare sembra avere una scarsa influenza. L'SPMA urinario sembra essere condizionato anche dal polimorfismo genetico, con una lieve ma significativa riduzione della sua eliminazione urinaria nei soggetti con genotipo nullo dell'enzima GSTT1 e, secondo alcuni autori, di GSTM1 (19, 20). Esso viene determinato in cromatografia liquida con spettrometria di massa e nonostante alcune criticità relative alla fase analitica riguardante la necessità di pre-acidificare le urine prima di effettuare le determinazioni, risulta essere un indicatore sensibile in grado di evidenziare esposizioni a concentrazioni anche di 2 ordini di grandezza inferiori al valore limite del Decreto 81, mentre, pur conservando una sua validità, sembra essere meno affidabile per il monitoraggio dell'esposizione negli ambienti di vita (13, 17, 21). L'ACGIH raccomanda per l'SPMA un BEI di 25 µg/g creatinina, mentre il range dei valori di riferimento per la popolazione generale italiana è stato ottenuto attraverso una valutazione dei dati pubblicati nella letteratura di merito, ottenuti con metodi validati (tabella II) (3, 22).

Il benzene urinario rappresenta un nuovo indicatore biologico, anch'esso specifico per il benzene, ma che risulta essere fortemente influenzato dalle fonti non occupazionali di esposizione a benzene, non solo dal fumo di sigaretta come gli altri indicatori biologici, ma anche dall'esposizione all'inquinamento urbano (17). Esso viene misurato in gas cromatografia con spettrometria di massa e possibili limiti per un suo utilizzo routinario sono conseguenti alla necessità di adottare alcune precauzioni nella fase di raccolta del campione di urine, principalmente per evitare la volatilizzazione del benzene, e nella sua conservazione (13). I dati di letteratura, tuttavia, concordano nel valutare il benzene urinario come un indicatore valido anche per esposizioni a concentrazioni di 2-3 ordini di grandezza inferiori al valore limite del Decreto 81 e prossime al valore obiettivo per la qualità dell'aria, in particolare nei non fumatori (16, 23). L'ACGIH per il benzene urinario non ha ancora definito un BEI, a differenza del toluene urinario, mentre esistono valori di riferimento per la popolazione generale italiana, proposti dalla SIVR attraverso una valutazione di dati presenti in letteratura (tabella II) (23).

Discussione

Le concentrazioni di benzene che attualmente si osservano negli ambienti di lavoro italiani e dei paesi occiden-

tali sono generalmente di 2-3 ordini di grandezza inferiori al valore limite previsto dal Decreto 81 e tendono sempre più ad avvicinarsi ai livelli presenti negli ambienti urbani, peraltro ormai generalmente contenuti o prossimi al valore obiettivo per la qualità dell'aria di 5 µg/m³. Pertanto, l'interpretazione dei risultati del monitoraggio biologico effettuato sui lavoratori esposti a basse concentrazioni di benzene presenta alcune criticità conseguenti alla difficoltà di distinguere l'esposizione occupazionale da quella ambientale, quest'ultima causata dall'inquinamento urbano e soprattutto dal fumo di sigarette che risulta essere la principale fonte non occupazionale di intake di benzene nei fumatori. Per il t,t-MA, inoltre, è necessario anche considerare la sua non specificità per il benzene che lo rende un indicatore valido solo per esposizioni a concentrazioni ambientali fino ad un ordine di grandezza inferiori al valore limite di 3250 µg/m³.

L'SPMA, invece, è un indicatore affidabile anche per esposizioni a concentrazioni basse o molto basse di benzene e deve essere considerato attualmente l'indicatore di scelta per il monitoraggio biologico dei lavoratori esposti. L'utilizzo del benzene urinario in ambito occupazionale, invece, non sembra presentare reali vantaggi rispetto all'SPMA avendo i due biomarcatori una validità sostanzialmente sovrapponibile. Fustinoni *et al.* (21), infatti, hanno descritto una sensibilità (0.83 vs 0.74), specificità (0.69 vs 0.64) e variabilità intra- e inter-individuale (>158% vs 150% e >14 vs 27) simili per il benzene urinario e l'SPMA, mentre la correlazione con il benzene ambientale è risultata più alta per l'SPMA rispetto al benzene urinario ($r = 0.636$ vs $r = 0.456$), in particolare nei fumatori ($r = 0.519$ vs $r = 0.266$). Nella scelta dell'indicatore biologico da utilizzare negli ambienti di lavoro, tuttavia, si deve tenere conto anche di alcuni aspetti critici associati alla fase pre-analitica di raccolta e conservazione del campione per il benzene urinario e alla fase analitica per l'SPMA.

Nella valutazione dell'esposizione a benzene della popolazione generale, invece, il t,t-MA non sembra avere alcuna validità mentre il benzene urinario sembra essere un indicatore biologico più affidabile rispetto all'SPMA, poiché in grado di evidenziare l'esposizione a concentrazioni nell'ordine del valore obiettivo per la qualità dell'aria determinate dalle emissioni autoveicolari, almeno nei non fumatori.

L'abitudine al fumo, infatti, è in grado di influenzare l'eliminazione urinaria di tutti gli indicatori biologici descritti e, per i livelli di benzene attualmente presenti negli ambienti di lavoro e di vita, essa deve essere assolutamente considerata nell'interpretazione dei risultati del monitoraggio biologico. In tal senso il confronto con i valori di riferimento per la popolazione generale dovrebbe essere effettuato in modo differenziato per fumatori e non fumatori.

Bibliografia

- 1) ATSDR. Toxicological profile for benzene. Atlanta, GA: US Department of Health and Human Services, Public Health Service, Agency for Toxic Substances and Disease Registry, 2007.
- 2) D.Lgs 81/08 e s.m.i.: <http://www.lavoro.gov.it/Lavoro/SicurezzaLavoro/MS/Normativa/>

- 3) ACGIH. Threshold limit values and biological exposure indices. Cincinnati, Ohio, USA: American Conference of Governmental Industrial Hygienists, 2013.
- 4) Parlamento Italiano. Legge n. 413 del 4.11.1997. Gazzetta Ufficiale della Repubblica Italiana n. 282 del 3.12.1997, Roma.
- 5) Ghittori S, Ferrari M, Maestri L, Negri S, Zadra P, Gremita P, Imbriani M. Il significato del monitoraggio ambientale e biologico nei lavoratori addetti alle stazioni di servizio dopo la eliminazione del piombo tetraetile dalle benzine. G Ital Med Lav Erg 2005; 27: 137-153.
- 6) Ministero dell'Ambiente e della Tutela del Territorio. DM 2 aprile 2002, n. 60. Gazzetta Ufficiale della Repubblica Italiana n. 87, 13 aprile 2002. Supplemento Ordinario n. 77. Roma.
- 7) Bruinen de Bruin Y, Koistinen K, Kephelopoulos S, Geiss O, Tirendi S, Kotzias D. Characterisation of urban inhalation exposures to benzene, formaldehyde and acetaldehyde in the European Union: comparison of measured and modelled exposure data. Environ Sci Pollut Res Int 2008; 15: 417-430.
- 8) Iovino P, Polverino R, Salvestrini S, Capasso S. Temporal and spatial distribution of BTEX pollutants in the atmosphere of metropolitan areas and neighbouring towns. Environ Monit Assess 2009; 150: 437-444.
- 9) Geiss O, Tirendi S, Barrero-Moreno J, Kotzias D. Investigation of volatile organic compounds and phthalates present in the cabin air of used private cars. Environ Int 2009; 35: 1188-1195
- 10) Violante FS, Barbieri A, Curti S, Sanguinetti G, Graziosi F, Mattioli S. Urban atmospheric pollution: personal exposure versus fixed monitoring station measurements. Chemosphere 2006; 64: 1722-1729.
- 11) IARC. Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans. Vol. 83. Tobacco Smoke and Involuntary Smoking. International Agency for Research on Cancer, Lyon (France), 2004.
- 12) Duarte-Davidson R, Courage C, Rushton L, Levy L. Benzene in the environment: an assessment of the potential risks to the health of the population. Occup Environ Med 2001; 58: 2-13.
- 13) Arnold SM, Angerer J, Boogard PJ, Hughes MF, O'Lone RB, Robinson SH, Schnatter AR. The use of biomonitoring data in exposure and human health risk assessment: benzene case study. Crit Rev Toxicol 2013; 43: 119-153.
- 14) Lovreglio P, Barbieri A, Carrieri M, Sabatini L, Fracasso ME, Doria D, Drago I, Basso A, D'Errico MN, Bartolucci GB, Violante FS, Soleo L. Validity of new biomarkers of internal dose for use in the biological monitoring of occupational and environmental exposure to low concentrations of benzene and toluene. Int Arch Occup Environ Health 2010; 83: 341-356.
- 15) Ruppert T, Scherer, Tricker AR, Adkofer F. Trans,trans-muconic acid as a biomarker of non-occupational environmental exposure to benzene. Int Arch Occup Environ Health 1997; 69: 247-251.
- 16) Fustinoni S, Consonni D, Campo L, Buratti M, Colombi A, Pesatori AC, Bonzini M, Bertazzi PA, Foà V, Garte S, Farmer PB, Levy LS, Pala M, Valerio F, Fontana V, Desideri A, Merlo DF. Monitoring low benzene exposure: comparative evaluation of urinary biomarkers, influence of cigarette smoking, and genetic polymorphisms. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 2005; 14: 2237-2244.
- 17) Lovreglio P, D'Errico MN, Fustinoni S, Drago I, Barbieri A, Sabatini L, Carrieri M, Apostoli P, Soleo L. Biomarkers of internal dose for the assessment of environmental exposure to benzene. J Environ Monit 2011; 13: 2921-2928.
- 18) Aprea C, Sciarra G, Bozzi N, Pagliantini M, Perico A, Bavazzano P, Leandri A, Carrieri M, Scapellato ML, Bettinelli M, Bartolucci GB. Reference Values of Urinary Trans,trans-muconic Acid: Italian Multicentric Study. Arch Environ Contam Toxicol 2008; 55: 329-340.
- 19) Carrieri M, Bartolucci GB, Scapellato ML, Spataro G, Sapienza D, Soleo L, Lovreglio P, Tranfo G, Manno M, Trevisan A. Influence of glutathione S-transferases polymorphisms on biological monitoring of exposure to low doses of benzene. Toxicol Lett 2012; 213: 63-68.
- 20) Manini P, De Palma G, Andreoli R, Mozzoni P, Poli D, Goldoni M, Petyx M, Apostoli P, Mutti A. Occupational exposure to low levels of benzene: Biomarkers of exposure and nucleic acid oxidation and their modulation by polymorphic xenobiotic metabolizing enzymes. Toxicol Lett 2010; 193: 229-235.
- 21) Fustinoni S, Campo L, Mercadante R, Consonni D, Mielzynska D, Bertazzi PA. A quantitative approach to evaluate urinary benzene and S-phenylmercapturic acid as biomarkers of low benzene exposure. Biomarkers 2011; 16: 334-345.
- 22) SIVR. Terza lista dei valori di riferimento per elementi, composti organici e loro metaboliti. Edizione 2011. Società Italiana Valori di Riferimento, 2011. <http://www.valoridiriferimento.it/>
- 23) Campagna M, Satta G, Campo L, Flore V, Ibba A, Meloni M, Tocco MG, Avanteo G, Flore C, Fustinoni S, Cocco P. Biological monitoring of low-level exposure to benzene. Med Lav 2012; 103: 338-346.

Corrispondenza: Dr. Piero Lovreglio, Dipartimento Interdisciplinare di Medicina, Sezione di Medicina del Lavoro "E.C. Vigliani", Università di Bari "A. Moro", Policlinico, Piazza Giulio Cesare 11, 70124 Bari, Italy, Tel. ++390805478218, Fax ++390805478201, E-mail: piero.lovreglio@uniba.it

Giovanna Tranfo¹, Enrico Paci¹, Silvia Fustinoni², Anna Barbieri³, Mariella Carrieri⁴

Aspetti metodologici nel monitoraggio ambientale e biologico dell'esposizione a basse dosi di benzene: criticità e possibili soluzioni

¹ INAIL Ricerca, Dipartimento di Medicina del Lavoro, Monteporzio Catone (RM)

² Dipartimento di Scienze Cliniche e di Comunità, Università degli Studi di Milano e Fondazione IRCCS Ca' Granda Ospedale Maggiore Policlinico, Milano

³ Dipartimento di Scienze Mediche e Chirurgiche (DIMEC) Università di Bologna, Sezione di Medicina del Lavoro, Bologna

⁴ Università di Padova, Dipartimento di Medicina Molecolare, Padova

RIASSUNTO. Il presente lavoro si propone di esaminare alcuni metodi per misurare l'esposizione umana a benzene sia negli ambienti di lavoro che di vita, mediante monitoraggio ambientale e biologico, esaminandone le criticità e le condizioni di utilizzo ottimali. Le prestazioni generali del monitoraggio ambientale, dal punto di vista analitico, dipendono fortemente dalla scelta di una appropriata metodica di campionamento e di analisi. SPMA e t,t-MA urinari sono i biomarcatori indicati dall'ACGIH per valutare l'esposizione lavorativa: la maggior parte degli studi recenti utilizza l'HPLC con spettrometria di massa tandem, ma poiché il t,t-MA è presente nelle urine in quantità maggiori e perciò è determinabile anche con rivelatori UV. Il benzene urinario è un indice non ufficialmente inserito nei BEI ACGIH, ma è utile per valutare l'esposizione e benzene alle basse concentrazioni, quali quelle che più frequentemente si riscontrano oggi negli ambienti di lavoro e di vita.

Parole chiave: esposizione a benzene, monitoraggio ambientale, monitoraggio biologico.

ABSTRACT. *METHODOLOGICAL ASPECTS IN ENVIRONMENTAL AND BIOLOGICAL MONITORING OF EXPOSURE TO LOW DOSES OF BENZENE: PROBLEMS AND POSSIBLE SOLUTIONS. This paper aims to examine some methods to measure human exposure to benzene, both in life and occupational environments, through environmental and biological monitoring, examining the critical issues and optimal conditions of use. The overall performance of environmental monitoring, from the analytical point of view, strongly depend on the choice of an appropriate method of sampling and analysis. Urinary SPMA and t, t-MA are the biomarkers listed by ACGIH to evaluate occupational exposure: most of the recent studies use HPLC with tandem mass spectrometry, but since t, t-MA is present in the urine in larger quantities it is also determinable with UV detectors. The urinary benzene is an index not officially included in the list of the ACGIH BEIs, but it is useful to assess exposure and benzene at low concentrations, that most frequently are found today in the occupational and life environments.*

Key words: benzene exposure, environmental monitoring, biological monitoring.

Introduzione

Il monitoraggio ambientale e biologico sono strumenti per la valutazione del rischio per la salute dovuto all'esposizione a benzene, sia negli ambienti di lavoro che di vita. Secondo la Normativa CEE il benzene non è ammesso in concentrazioni pari o superiori allo 0.1% della massa in sostanze e preparati immessi sul mercato. Il divieto non si applica ai carburanti per i quali il contenuto di benzene non deve superare l'1% in volume, e perciò la maggiore fonte di esposizione ambientale è costituita dai gas di scarico dei veicoli a motore alimentati con benzina. Per tutelare la salute della popolazione generale esiste un limite di qualità dell'aria pari a 5 µg/m³ come valore medio annuale (1), mentre per gli ambienti di lavoro il valore limite è pari a 3,25 mg/m³ (1 ppm) come media ponderale nel turno (D.Lgs 81/08); il valore limite di soglia (TLV-TWA) raccomandato dall'associazione degli igienisti industriali americani (2) è pari a 1,6 mg/m³ (0,5 ppm).

Il primo biomarcatore proposto per l'esposizione occupazionale al benzene fu il fenolo, sostituito, a causa della sua scarsa specificità, dal benzene nell'aria espirata quando il TLV-TWA fu ridotto a 0,5 ppm. Nel 1997 fu adottato l'acido S-fenil-mercaptopurico (SPMA) urinario, metabolita specifico che si forma a seguito della coniugazione con glutazione del benzene epossido, metabolita reattivo del benzene, cui fu aggiunto l'acido trans, trans-muconico urinario (t,t-MA) (2). L'esame della letteratura scientifica rivela numerosi altri indicatori studiati, alcuni dei quali utilizzati con successo per la valutazione dell'esposizione a benzene, sia lavorativa che ambientale, primo fra i quali il benzene urinario. Il fumo di sigaretta è un'importante sorgente di esposizione a benzene per i fumatori attivi (3); recenti studi segnalano che anche l'esposizione a fumo passivo è in grado di influenzare i livelli degli indicatori biologici di esposizione a benzene nei non fumatori (4, 5). Per questa ragione è indispensabile tenere conto di questa abitudine per l'interpretazione i risultati del monitoraggio biologico. Il presente lavoro si propone di esaminare alcuni metodi per misurare l'esposizione a benzene con le relative criticità e le condizioni di utilizzo ottimali.

Metodi per il monitoraggio dell'esposizione ambientale

Le prestazioni generali del monitoraggio ambientale, dal punto di vista analitico, dipendono fortemente dalla scelta di una appropriata metodica di campionamento e di analisi.

Il monitoraggio ambientale viene eseguito con l'ausilio di sistemi di campionamento basati su tubicini o fiale in vetro riempiti di materiale adsorbente (in genere carbone attivo) facendo fluire l'aria mediante l'uso di pompe a portata nota (campionamento attivo), o per diffusione assiale o radiale (campionamento diffusivo). Il campionamento attivo è particolarmente indicato per monitoraggi a breve termine, mentre quello diffusivo per monitoraggi a lungo termine. I campionatori diffusivi, dispositivi piccoli e leggeri, presentano molteplici vantaggi quali la facilità di utilizzo, la possibilità di effettuare un numero elevato di campionamenti contemporaneamente in quanto non necessitano di strumentazione alimentata a batteria nonché la possibilità di effettuare il campionamento in maniera autogestita direttamente dai lavoratori. In particolare il campionatore a simmetria radiale Radiello® (6), data l'elevata portata di campionamento, può essere utilizzato anche per campionamenti di breve durata (0.5 - 6 ore), in ambienti di lavoro sia indoor che outdoor, a bassi livelli di inquinamento ambientale di benzene (ppb). L'affidabilità di questo campionatore è stata confermata sia dalle validazioni ottenute in accordo con gli standard Europei (EN 13528-2:2002) che dalle numerose applicazioni sul campo in studi di esposizione dall'altra (7, 8).

Il desorbimento (chimico o termico) e l'analisi vengono eseguiti successivamente in laboratorio. La tecnica analitica di preferenza, per il benzene e più in generale per i VOCs, è la gascromatografia con rivelatore a ionizzazione di fiamma (FID) o associata alla spettrometria di massa (9-11). Il limite di rivelabilità dipende dalla strumentazione e dalle condizioni analitiche, ma in generale è compreso fra 0,05 e 1 µg/m³ (per esposizioni di 7 giorni). Questo permette di condurre anche campagne di monitoraggio ambientale per valutare la qualità dell'aria e l'esposizione a benzene della popolazione generale. È possibile effettuare anche campionamenti in continuo a lettura diretta con strumentazioni analitiche portatili (12).

Acido S-fenil-mercapturico e trans, trans-muconico urinari

SPMA e t,t-MA sono i biomarcatori indicati dall'ACGIH per valutare l'esposizione lavorativa. Il valore biologico equivalente (BEI) per SPMA, che corrisponde ad una esposizione a benzene pari al TLV-TWA, è di 25 µg/g di creatinina nelle urine di fine turno (2). La maggior parte degli studi pubblicati recentemente utilizza l'HPLC con spettrometria di massa tandem (HPLC/MS/MS) con diluizione isotopica, cioè utilizzando come standard interno la molecola stessa marcata con deuterio o ¹³C, per compensare eventuali effetti della matrice urinaria sulla risposta strumentale (13). Tuttavia più autori ipotizzano nelle urine la presenza di N-acetyl-S(1,2-dihydro-2-hy-

droxyphenyl)-L-cysteine (pre-SPMA) che si converte in SPMA per trattamento con acidi, riducendo la variabilità della quantità di SPMA in campioni di esposti alle medesime concentrazioni di benzene, standardizzando il pH dei campioni e aumentando la quantità di analita da misurare, raggiungendo un limite di rivelabilità di 0.05 mg/l di urina (14). Sterz *et al.* (15) suggeriscono che un pH intorno ad 1 per HCl garantisce la completa conversione. Un pH = 2, benché converta una quantità minore di pre-SPMA in SPMA, garantisce ugualmente la standardizzazione delle condizioni preanalitiche e permette la simultanea determinazione dell'altro metabolita urinario, il t,t-MA (16). Poiché il valore limite ACGIH per l'SPMA è stato stabilito sulla base di metodi che non consideravano il pH un fattore critico, il valore ottenuto è probabilmente inficiato da una notevole variabilità, e potrebbe essere rivisto sulla base delle nuove metodiche pubblicate. In rari casi l'SPMA viene dosato con GC/MS dopo formazione dell'estere metilico con metanolo (17). L'utilizzo di tecniche immunoenzimatiche sovrastima invece i livelli di SPMA (18). Il t,t-MA è presente nelle urine in quantità maggiori e perciò è determinabile in HPLC anche con rivelatori UV, ma la spettrometria di massa tandem con diluizione isotopica offre maggiore specificità. Il BEI ACGIH adottato nel 2000 è di 500 µg/g di creatinina nelle urine di fine turno, ma poiché il t,t-MA è anche un metabolita dell'acido sorbico, molecola contenuta in alcuni frutti e aggiunta come conservante a molti prodotti alimentari, è possibile riscontrare valori maggiori del BEI anche in soggetti non esposti al benzene: questo inconveniente può essere limitato prelevando le urine lontano dai pasti (19). Un'ulteriore indicazione della necessità di rivedere i valori limite è data dal rapporto fra i due metaboliti, il cui valore teorico dovrebbe essere pari a 500/25 = 20 e che nella pratica, alle basse dosi, risulta essere maggiore ed estremamente variabile (20).

Benzene urinario

Il benzene urinario è un indice non ufficialmente inserito nei BEI (2), ma è utile per valutare l'esposizione a benzene alle basse concentrazioni, quali quelle che più frequentemente si riscontrano oggi negli ambienti di lavoro e di vita (21, 5). Viene misurato senza pretrattamento del campione, per campionamento nello spazio di testa di un flacone a tenuta di vapori in cui il campione viene raccolto e conservato. L'analisi viene effettuata con gascromatografia accoppiata con la spettrometria di massa, in presenza di benzene deuterato come standard interno (22). L'elevato livello di automazione della metodica, la buona sensibilità e specificità ne fanno un ottimo strumento per le indagini epidemiologiche. Un elemento critico è la breve vita media dell'indicatore e questo rende indispensabile raccogliere il campione al termine dell'esposizione. Inoltre la volatilità del benzene rende necessario conservare il campione di urina in flaconi sigillati che impediscano la fuoriuscita dei vapori; capovolgere il flacone è una precauzione utile per evitare perdite di analita.

Bibliografia

- 1) D.Lgs 13 agosto 2010, n. 155, "Attuazione della direttiva 2008/50/CE relativa alla qualità dell'aria ambiente e per un'aria più pulita in Europa" G.U. 216 del 15 settembre 2010.
- 2) American Conference of Governmental Industrial Hygienists. Threshold limit values and biological exposure indices, ACGIH. Cincinnati, OH, 2012.
- 3) Fustinoni S, Consonni D, Campo L, Buratti M, Colombi A, Pesatori AC, Bonzini M, Bertazzi PA, Foà V, Garte S, Farmer PB, Levy LS, Pala M, Valerio F, Fontana V, Desideri A. and Merlo DF. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 2005; 14: 2237-2244.
- 4) Protano C, Guidotti M, Manini P, Petyx M, La Torre G, Vitali M. Benzene exposure in childhood. Role of living environments and assessment of available tools. Environ Int 2010; 36: 779-787.
- 5) Fustinoni S, Campo L, Satta G, Campagna M, Ibba A, Tocco MG, Atzeri S, Avataneo G, Flore C, Meloni M, Bertazzi PA, Cocco P. Environmental and lifestyle factors affect benzene uptake bio-monitoring of residents near a petrochemical plant. Environ Int 2012; 39: 2-7.
- 6) <http://www.fsm.it/padova/radielloit.html>
- 7) <http://ec.europa.eu/environment/life/home.html>
- 8) Król S, Zabiegała B, Namieśnik J. Measurement of benzene concentration in urban air using passive sampling. Anal Bioanal Chem 2012; 403 (4): 1067-1082.
- 9) NIOSH. Hydrocarbons, aromatic: method 1501. In: Schlecht PC, O'Connor PF (eds), NIOSH Manual of Analytical Methods. 4th Ed. Cincinnati, Ohio, USA, National Institute of Occupational Safety and Health, 2003.
- 10) Carrieri M, Bonfiglio E, Scapellato ML, Maccà I, Tranfo G, Faranda P, Paci E, Bartolucci GB. Comparison of Exposure Assessment Methods in Occupational Exposure to Benzene in Gasoline Filling-Station Attendants. Toxicol Lett 2006; 162: 146-152.
- 11) Violante FS, Barbieri A, Curti S, Sanguinetti G, Graziosi F, Mattioli S. Urban atmospheric pollution: personal exposure versus fixed monitoring station measurements. Chemosphere 2006; 64 (10): 1722-9.
- 12) Woolfenden E. Sorbent-based sampling methods for volatile and semi-volatile organic compounds in air. Part 2. Sorbent selection and other aspects of optimizing air monitoring methods. J Chromatogr A 2010; 1217 (16): 2685-2694.
- 13) Matuszewski BK, Costanzer ML, Chavez-Eng CM. Strategies for the assessment of matrix effect in quantitative bioanalytical methods based on HPLC-MS/MS. Anal Chem 2003; 75: 3019-3030.
- 14) Paci E, Pignini D, Cialdella AM, Faranda P, Tranfo G. Determination of free and total S-phenylmercapturic acid by HPLC/MS/MS in the biological monitoring of benzene exposure. Biomarkers 2007; 12 (2): 111-122.
- 15) Sterz K, Köhler D, Schettgen T, Scherer G. Enrichment and properties of urinary pre-S-phenylmercapturic acid (pre-SPMA). J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci 2010; 878: 2502-2505.
- 16) Paci E, Tranfo G. Studio preliminare per l'analisi simultanea mediante HPLC/MS/MS dei metaboliti urinari di Benzene, IPA e nicotina. Ital J Occup Environ Hyg 2012; 3 (2): 99-102.
- 17) Van Sittert NJ, Boogaard PJ, Beulink GD. Application of the urinary S-phenylmercapturic acid test as a biomarker for low levels of exposure to benzene in industry. Br J Ind Med 1993; 50: 460-469.
- 18) Tranfo G, Bartolucci GB, Pignini D, Paci E, Scapellato ML, Doria D, Manno M, Carrieri M. Comparison of HPLC/MS/MS and ELISA procedures for the determination of S-phenylmercapturic acid as a biomarker of benzene exposure in human urine. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci 2010; 878: 2529-2533.
- 19) DFG, Deutsche Forschungsgemeinschaft, Essential Biomonitoring Methods - t,t-Muconic Acid, 2006, 327-330.
- 20) Mansi A, Bruni R, Capone P, Paci E, Pignini D, Simeoni C, Gnerre R, Papacchini M, Tranfo G. Low occupational exposure to benzene in a petrochemical plant: Modulating effect of genetic polymorphisms and smoking habit on the urinary t,t-MA/SPMA ratio. Toxicol Lett 2012; 213: 57-62.
- 21) Lovreglio P, D'Errico MN, Fustinoni S, Drago I, Barbieri A, Sabatini L, Carrieri M, Apostoli P, Soleo L. Biomarkers of internal dose for the assessment of environmental exposure to benzene. J Environ Monit 2011; 13 (10): 2921-2928.
- 22) Fustinoni S, Campo L, Mercadante R, Manini P. Methodological issues in biological monitoring of low exposures: the case of urinary benzene and S-phenylmercapturic acid. J Chromatogr B 2010; 878: 2534-2540.

Corrispondenza: Giovanna Tranfo, INAIL Ricerca, Dipartimento di Medicina del Lavoro, Via di Fontana Candida 1, 00040 Monte Porzio Catone (RM), Italy, Tel. +39 06/94181436, Fax +39 06/94181410, E-mail: g.tranfo@inail.it

Giuseppe De Palma¹, Antonio Mutti², Giovanna Spatari³, Roberta Andreoli^{2,4}, Paola Mozzoni^{2,4},
Mariella Carrieri⁵, Maurizio Manno⁶, Pietro Apostoli¹

Indicatori di effetto e di suscettibilità alle basse dosi di benzene

¹ Dipartimento di Specialità Medico-Chirurgiche, Scienze Radiologiche e Sanità Pubblica, Sezione Sanità Pubblica e Scienze Umane, Università degli Studi di Brescia, Brescia

² Dipartimento di Medicina Clinica e Sperimentale, Università degli Studi di Parma, Parma

³ Dipartimento di Scienze dell'Ambiente, della Sicurezza, del Territorio, degli Alimenti e della Salute (S.A.S.T.A.S.), Università degli Studi di Messina, Messina

⁴ Centro Ricerche INAIL (ex ISPESL) di Parma

⁵ Dipartimento di Medicina Molecolare, Università degli Studi di Padova, Padova

⁶ Dipartimento di Sanità Pubblica, Sezione di Medicina del Lavoro, Università degli Studi di Napoli Federico II, Napoli

RIASSUNTO. I livelli attuali di esposizione professionale a benzene sono ridotti di almeno tre ordini di grandezza (da ppm a ppb) rispetto al passato. Poiché la tossicità del benzene è correlata alla sua biotrasformazione e la bioattivazione metabolica del composto sembra essere più efficiente ai più bassi livelli di esposizione, gli effetti a tali concentrazioni potrebbero essere superiori all'atteso. I polimorfismi genetici funzionali degli enzimi della biotrasformazione pertinenti, pur implicati nella modulazione del rischio di effetti avversi [mieloperossidasi e NAD(P)H:chinone ossidoreduttasi] e nella modulazione degli indicatori biologici di dose (Glutazione S-transferasi M1-1, T1-1, A1-1), non sono tuttavia utilizzabili come indicatori di suscettibilità. Tra gli indicatori biologici di effetto precoce, solo la valutazione longitudinale dell'emocromo appare applicabile in protocolli di sorveglianza sanitaria mentre l'utilizzo di indicatori di effetto genotossico (aberrazioni cromosomiche) non è al momento supportato dai dati di letteratura agli attuali livelli di esposizione.

Parole chiave: benzene, polimorfismo genetico, aberrazioni cromosomiche.

ABSTRACT. BIOMARKERS OF EFFECT AND SUSCEPTIBILITY TO LOW DOSES OF BENZENE. Current occupational exposure levels to benzene are reduced by three orders of magnitude (from ppm to ppb) as compared to the past. As benzene toxicity is related to its biotransformation and bioactivation pathways seem to be more active at lower exposure levels, observed effects could be higher than expected. Although the genetic polymorphisms of relevant and functional metabolic enzymes are implied in the modulation of either the risk of adverse effects [myeloperoxidase and NAD(P)H:quinone oxidoreductase] or of the biomarkers of internal dose (glutathione S-transferases M1-1, T1-1, A1-1), they are not applicable as biomarkers of susceptibility. Among biomarkers of early effect, only the longitudinal monitoring of blood cell count seems suitable to be applied in health surveillance protocols, whereas the use of biomarkers of genotoxic effect at current exposure levels is at the present not supported by literature data.

Key words: benzene, genetic polymorphism, chromosomal aberrations.

Introduzione

L'esposizione professionale a benzene (B) è associata al rischio di effetti sul sistema emolinfopoietico, di tipo sia ematotossico (leucopenia, piastrinopenia, anemia, anemia aplastica e pancitopenia), che cancerogeno, particolarmente in forma di leucemia acuta non linfocitica/leucemia mieloide acuta (LMA) e sindromi mielodisplastiche (SMD). Entrambe le categorie di effetti, inizialmente associate a livelli di esposizione pari a decine di ppm (1 ppm = 3,25 mg/m³) (1), sono state più recentemente dimostrate anche per esposizioni a livelli inferiori ad 1 ppm (2) – valore limite di esposizione professionale ponderato sulle 8 ore lavorative individuato dallo SCOEL (3) e recepito dal D.Lgs 81/08 e s.m.i., Allegato XLIII –, nell'ordine dei ppb (µg/m³), che rappresentano gli attuali livelli di esposizione professionale in Italia e nei paesi occidentali.

Metabolismo

È da tempo noto che la tossicità del B è riconducibile alla sua biotrasformazione, che genera specie radicaliche elettrofile, in forma sia di metaboliti specifici [benzene ossido (BO), benzene diidrodioleossido (BDE), idrochinone (HQ), 1,2-, 1,4-, e 1,2,4-benzochinone (BQ), 1,2,4-benzenetriolo (BT), *t,t*-muconaldeide], che di radicali liberi dell'ossigeno (ROS). Le specie radicaliche modificano, dopo legame covalente, le macromolecole cellulari (acidi nucleici, proteine, lipidi), alterandone la funzione. A livelli di esposizione dell'ordine dei ppm, l'ossidazione a benzene ossido (BO) è catalizzata prevalentemente nel fegato da due isoforme dell'ossigenasi a funzione mista citocromo P450-dipendente (CYP), rispettivamente la 2E1 e la 2B1, quest'ultima a minore affinità. A livelli di esposizione inferiori ai 100 ppb (325 µg/m³) la maggior parte (almeno il 75%) del B assorbito sarebbe invece ossidato a livello polmonare da uno o più CYP ad alta affinità, per i quali sono state proposte le isoforme 2F1 e 2A13 (4). Il BO riarrangia spontaneamente a fenolo (FE), convertito dal CYP 2E1 a HQ e quindi a BT, oppure è orto-idrossilato a catecolo (CA). Quest'ultimo può, alternativamente, derivare dall'ossidazione via diidrodiole deidrogenasi del

BD, formato per idratazione del BO ad opera dell'eposido idrolasi microsomiale (EPHX1). A livello dell'organo bersaglio (midollo osseo), i metaboliti HQ, CA e BT sarebbero ulteriormente bioattivati dalla mieloperossidasi (MPO) espressa nei leucociti neutrofili e loro precursori, nei rispettivi BQ (1,4-, 1,2- ed 1,2,4-BQ), più reattivi dei composti di partenza. A livello midollare, eserciterebbe i suoi effetti tossici anche la *t,t*-muconaldeide, derivante dall'apertura dell'anello di ossepina, forma tautomerica del BO, ad opera di un CYP ad alta affinità, quando non convertita in acido *t,t*-muconico (TTMA), eliminato per via urinaria. I BQ possono subire un'ulteriore riduzione bioattivante a singolo elettrone – cosiddetto ciclo *redox* dei chinoni – ad opera della NADPH-CYP-reduttasi, con generazione di semichinoni elettrofili e ROS, oppure una riduzione detossificante a due elettroni nei composti di partenza, ad opera della NAD(P)H:chinone ossidoreduttasi 1 (NQO1), la quale avrebbe l'effetto di controbilanciare la bioattivazione mieloperossidasi. A pH fisiologico, l'1,4-BQ è un substrato migliore per l'NQO1, che per la NADPH-CYP-reduttasi (5). Il BO è in minima parte (circa l'1% per esposizioni tra 0.1 e 10 ppm) detossificato tramite coniugazione con glutazione ad opera delle glutazione *S*-transferasi (GST) M1-1 e T1-1 e successiva conversione in acido *S*-fenilmercapturico (SPMA). I principali meccanismi di detossificazione ed eliminazione del FE e dell'HQ sono ascrivibili alla coniugazione con acidi glucuronico e solforico, mentre i BQ coniugati con glutazione in posizione multiple sono sospettati di generare ROS attraverso *redox* cycling (5). La bioattivazione ossidativa del B sembra essere saturabile, con maggiore produzione percentuale di *t,t*-muconaldeide e HQ alle basse esposizioni (<100 ppb) (6), per cui il rischio ad esse connesso potrebbe essere più elevato di quello stimato estrapolando linearmente a zero quello osservato per esposizioni più elevate. Applicando modelli di meta-regressione è stato in effetti stimato un rischio più che lineare ai bassi livelli di esposizione (7). Sono state dimostrate correlazioni più che lineari tra bassi livelli di esposizione (<1 ppm) e concentrazioni plasmatiche di addotti specifici all'albumina (8), o leucopenia (9). Ai livelli di esposizione attuali, la variabilità determinata dai polimorfismi genetici delle vie molecolari implicate nella tossicità del B potrebbe avere un impatto maggiore, rispetto alle alte dosi, sul rischio di sviluppare effetti avversi (polimorfismi come indicatori di suscettibilità) e sui livelli degli indicatori biologici utilizzati per il monitoraggio biologico dell'esposizione (polimorfismi come modificatori degli indicatori di dose). La disponibilità di indicatori biologici di effetto precoce sufficientemente predittivi potrebbe consentire la tempestiva identificazione di soggetti o gruppi a maggior rischio.

Indicatori di suscettibilità (polimorfismi genetici)

I polimorfismi valutati nei soggetti esposti a B riguardano primariamente gli enzimi della biotrasformazione (polimorfismi metabolici), ma anche quelli della riparazione del danno al DNA, alcuni fattori dell'immunità innata, fattori angiogenetici, citochine, molecole di adesione. Limiteremo l'ambito di trattazione ai soli polimor-

fismi metabolici, sui quali la letteratura è più consolidata. A fine anni '90 del secolo scorso risale la prima dimostrazione di un aumentato rischio ematotossico in soggetti con elevata attività CYP2E1 (fenotipo valutato tramite escrezione frazionale di 6-idrossiclorzoxazone) e genotipo omozigote variante *NQO1 rs1800566* (assenza di attività metabolica) (10). In accordo con l'ipotesi del coinvolgimento di CYP a diversa affinità in base ai livelli di esposizione, alle (basse) concentrazioni attuali non è stata osservata una significativa induzione metabolica sul fenotipo CYP2E1 (11), mentre è stata osservata una significativa riduzione del numero dei leucociti in soggetti con genotipo omozigote selvatico *MPO rs2333227* (normale espressione tissutale) ed almeno un allele variante *NQO1 rs4986998* (ridotta espressione tissutale) (9), osservazione coerente con l'ipotesi di un rischio maggiore nei soggetti con metabolismo sbilanciato verso la produzione di BQ. È stata inoltre dimostrata una significativa interferenza dei polimorfismi *NQO1 rs1800566* e *MPO rs2333227* sull'incidenza di effetti genotossici su linfociti circolanti (12). In un gruppo di taxisti e benzinai italiani, abbiamo dimostrato l'interferenza del polimorfismo *NQO1 rs1800566* sull'eliminazione urinaria di 8-idrossiguanosina (indicatore di stress ossidativo all'RNA) (13). Mentre per i polimorfismi *MPO* ed *NQO1* non è dimostrata una chiara interferenza sui livelli degli indicatori di dose, esiste un certo accordo sulla modulazione dell'escrezione urinaria di SPMA da parte dei polimorfismi *GSTM1* e *GSTT1*, anche agli attuali livelli di esposizione. I soggetti esprimono le attività enzimatiche eliminano livelli significativamente maggiori di SPMA rispetto ai soggetti deficitari delle stesse (13-17). Sembra interferire significativamente anche l'isoforma *GSTA 1-1* (13) e dati preliminari indicano che i soggetti deficitari per le tre attività eliminano circa 40 volte meno SPMA rispetto ai soggetti che esprimono i tre isoenzimi. La modulazione del rischio di effetti ematotossici/cancerogeni da parte dei polimorfismi *GST* è al momento incerta, probabilmente anche a causa del ruolo marginale svolto nella detossificazione del BO e degli effetti non sempre detossificanti sui BQ (5). Contrastanti risultano gli studi che hanno indagato i polimorfismi *CYP2E1* ed *EPHX1* (15, 18-20), in accordo con le incertezze sulle conseguenze funzionali di questi in vivo, evidenziati in particolare per il polimorfismo *CYP2E1* dall'assenza di interferenze nel già citato studio di Rothmann *et al.* (10).

Indicatori di effetto

Sebbene non siano chiariti del tutto i meccanismi tossicologici attraverso cui il B esplica i suoi effetti, numerose evidenze suggeriscono un'interferenza complessa, multimodale, sui meccanismi omeostatici cellulari. Il B causa infatti aberrazioni cromosomiche (aneuploidia, delezioni, traslocazioni) e mutazioni in geni critici con meccanismi diretti da parte dei metaboliti reattivi e dei ROS generati ed indiretti, comprendenti, tra l'altro, l'inibizione della topoisomerasi II e l'interferenza sull'apparato microtubulare; genera stress ossidativo, con effetti di tipo radiomimetico; causa disfunzioni del sistema immunitario, con ridotta immunosorveglianza; altera il pool delle cellule staminali emopoietiche; inibisce la comunicazione in-

tercellulare; interferisce con i meccanismi di regolazione epigenetica dell'espressione genica (metilazione del DNA, sintesi di microRNA) (21). Gli effetti ematotossici sembrano essere sufficientemente precoci e duraturi rispetto alla comparsa effetti cancerogeni, da poter essere utilizzati come indicatori di effetto precoce. Purtroppo, i pochi studi effettuati anche agli attuali livelli di esposizione hanno fornito risultati contraddittori, probabilmente anche per carenze metodologiche (9, 22, 23). Non esiste un generale accordo sulla linea ematopoietica più sensibile da monitorare, non essendo peraltro chiaro se esista un target cellulare privilegiato, staminale o stromale. È stata evidenziata una particolare sensibilità nei progenitori mieloidi circolanti CD34⁺ (9). Il B induce alterazioni citogenetiche linfocitarie simili a quelle riscontrate nelle LMA e SMD "spontanee" ed indotte dalla terapia con agenti alchilanti (melfalan) ed inibitori della topoisomerasi II (etoposide). Per esposizioni a livelli minori di 1 ppm, l'analisi delle aberrazioni cromosomiche (AC) con ibridazione in situ (FISH) ha evidenziato un eccesso di alterazioni sia su linfociti, coinvolgenti in particolare i cromosomi 8 e 21 (monosomie, trisomie, traslocazioni) e con una relazione dose-risposta (24), che su spermatozoi (25). Più recentemente, a livelli di esposizione correnti, non è stato evidenziato un eccesso significativo di AC (26). Il test degli scambi tra cromatidi fratelli (SCE) soffre di una minore sensibilità e specificità, mentre tecniche più sensibili (test del micronucleo, comet test), potenzialmente idonee per gli attuali livelli di esposizione (19, 25, 27), presentano una certa aspecificità ed una minore predittività rispetto alle AC. Per quanto riguarda gli indicatori di stress ossidativo, i quali soffrono tuttavia di una certa aspecificità, agli attuali livelli di esposizione sono state osservate concentrazioni significativamente più elevate, rispettivamente nel sangue periferico e nell'urina, di prodotti di ossidazione avanzata alle proteine circolanti (28) e di addotti del radicale idrossile alla guanina presente sul DNA e sui deossiribonucleotidi (8-idrossi2-deossiguanosina) nonché sull'RNA (8-idrossiguanosina) (13). Nuovi indicatori molecolari potranno derivare dall'utilizzo di approcci di tipo tossicogenomico (n° di copie del DNA mitocondriale, analisi trascrittomiche di espressione genica) (29, 30) o tossicogenetico (spettri mutazionali della p53) (31).

Conclusioni

Sebbene l'evidenza oggi disponibile suggerisca indiscutibilmente un ruolo dei polimorfismi di alcuni enzimi metabolici (*CYP*, *MPO*, *NQO1*, *GST*) nella modulazione degli effetti tossici del B, l'applicazione pratica in medicina del lavoro dei polimorfismi stessi come indicatori di suscettibilità alle basse dosi presenta limiti etico-scientifici importanti (32). A scopo cautelativo, tuttavia, i valori biologici fissati per l'SPMA dall'ACGIH (BEI[®]) e dalla DFG (EKA[®]) potrebbero essere riconsiderati, ad esempio adottando dei valori inferiori, corrispondenti ai livelli di eliminazione del metabolita nei soggetti deficitari per le attività GSTM1-1, GSTT1-1 e GSTA1-1, o quanto meno

evidenziando l'interferenza metabolica. Tra gli indicatori di effetto, in accordo con quanto proposto dalle Linee Guida SIMLII sugli agenti cancerogeni e mutageni (33), il controllo periodico dell'emocromo dovrebbe rientrare nel protocollo di sorveglianza sanitaria, privilegiando, per l'interpretazione dei risultati, in analogia a quanto previsto dalla definizione stessa di monitoraggio biologico finalizzato alla quantificazione della dose assorbita, il controllo longitudinale dei valori individuali, rispetto a quello comparativo tra soggetti a diversa esposizione. Il monitoraggio degli effetti genotossici tramite analisi delle AC con tecnica FISH, benché dotato di sufficiente precocità e predittività, sembra non possedere sufficiente sensibilità agli attuali livelli di esposizione, oltre che essere gravato da costi molto elevati. Altri biomarcatori, potenzialmente più sensibili, quali micronuclei, comet test, indicatori di stress ossidativo, al momento non presentano una sufficiente specificità che ne giustifichi l'uso routinario per la sorveglianza sanitaria dei lavoratori.

Bibliografia

- 1) Infante PF, Rinsky RA, Wagoner JK, Young RJ. Leukaemia in benzene workers. *Lancet* 1977; 2: 76-78.
- 2) Glass DC, Gray CN, Jolley DJ, Gibbons C, Sim MR, Fritschi L, et al. Leukemia risk associated with low-level benzene exposure. *Epidemiology* 2003; 14: 569-577.
- 3) European Commission, Employment, Social Affairs and Inclusion. Recommendation from the Scientific Committee on Occupational Exposure Limits for benzene SCOEL/SUM/140 December 1991.
- 4) Rappaport SM, Kim S, Lan Q, Vermeulen R, Waidyanatha S, Zhang L, et al. Evidence that humans metabolize benzene via two pathways. *Environ Health Perspect* 2009; 117: 946-952.
- 5) Snyder R. Benzene's toxicity: a consolidated short review of human and animal studies by HA Khan. *Hum Exp Toxicol* 2007; 26: 687-696.
- 6) Kim S, Vermeulen R, Waidyanatha S, Johnson BA, Lan Q, Smith MT, et al. Modeling human metabolism of benzene following occupational and environmental exposures. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2006; 15: 2246-2252.
- 7) Vlaanderen J, Portengen L, Rothman N, Lan Q, Kromhout H, Vermeulen R. Flexible meta-regression to assess the shape of the benzene-leukemia exposure-response curve. *Environ Health Perspect* 2010; 118: 526-32.
- 8) Lin YS, Vermeulen R, Tsai CH, Waidyanatha S, Lan Q, Rothman N, et al. Albumin adducts of electrophilic benzene metabolites in benzene-exposed and control workers. *Environ Health Perspect* 2007; 115: 28-34.
- 9) Lan Q, Zhang L, Li G, Vermeulen R, Weinberg RS, Dosemeci M, et al. Hematotoxicity in workers exposed to low levels of benzene. *Science* 2004; 306: 1774-1776.
- 10) Rothman N, Smith MT, Hayes RB, Traver RD, Hoener B, Campleman S, et al. Benzene poisoning, a risk factor for hematological malignancy, is associated with the NQO1 609C→T mutation and rapid fractional excretion of chlorzoxazone. *Cancer Res* 1997; 57: 2839-2842.
- 11) Piccoli P, Carrieri M, Padovano L, Di Mare M, Bartolucci GB, Fracasso ME, et al. In vivo CYP2E1 phenotyping as a new potential biomarker of occupational and experimental exposure to benzene. *Toxicol Lett* 2010; 192: 29-33.
- 12) Kim YJ, Choi JY, Paek D, Chung HW. Association of the NQO1, MPO, and XRCC1 polymorphisms and chromosome damage among workers at a petroleum refinery. *J Toxicol Environ Health A* 2008; 71: 333-341.
- 13) Manini P, De Palma G, Andreoli R, Mozzoni P, Poli D, Goldoni M, et al. Occupational exposure to low levels of benzene: Biomarkers

- of exposure and nucleic acid oxidation and their modulation by polymorphic xenobiotic metabolizing enzymes. *Toxicol Lett* 2010; 193: 229-235.
- 14) Manini P, De Palma G, Andreoli R, Poli D, Mozzoni P, Folesani G, et al. Environmental and biological monitoring of benzene exposure in a cohort of Italian taxi drivers. *Toxicol Lett* 2006; 167: 142-151.
 - 15) Kim S, Lan Q, Waidyanatha S, Chanock S, Johnson BA, Vermeulen R, et al. Genetic polymorphisms and benzene metabolism in humans exposed to a wide range of air concentrations. *Pharmacogenet Genomics* 2007; 17: 789-801.
 - 16) Mansi A, Bruni R, Capone P, Paci E, Pignini D, Simeoni C, et al. Low occupational exposure to benzene in a petrochemical plant: modulating effect of genetic polymorphisms and smoking habit on the urinary t,t-MA/SPMA ratio. *Toxicol Lett* 2012; 213: 57-62.
 - 17) Carrieri M, Bartolucci GB, Scapellato ML, Spatari G, Sapienza D, Soleo L, et al. Influence of glutathione S-transferases polymorphisms on biological monitoring of exposure to low doses of benzene. *Toxicol Lett* 2012; 213: 63-68.
 - 18) Fustinoni S, Consonni D, Campo L, Buratti M, Colombi A, Pesatori AC, et al. Monitoring low benzene exposure: comparative evaluation of urinary biomarkers, influence of cigarette smoking, and genetic polymorphisms. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005; 14: 2237-2244.
 - 19) Angelini S, Kumar R, Bermejo JL, Maffei F, Barbieri A, Graziosi F, et al. Exposure to low environmental levels of benzene: evaluation of micronucleus frequencies and S-phenylmercapturic acid excretion in relation to polymorphisms in genes encoding metabolic enzymes. *Mutat Res* 2011; 719: 7-13.
 - 20) Bergamaschi E, Brustolin A, De Palma G, Manini P, Mozzoni P, Andreoli R, Cavazzini S, Mutti A. Biomarkers of dose and susceptibility in cyclists exposed to monoaromatic hydrocarbons. *Toxicol Lett* 1999; 108: 241-217.
 - 21) International Agency for Research on Cancer. IARC monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans. Benzene. In: *Chemical agents and related occupations 2012*; 100 F, Lyon, France, World Health Organisation, pp 1-46.
 - 22) Pesatori AC, Garte S, Popov T, Georgieva T, Panev T, Bonzini M, et al. Early effects of low benzene exposure on blood cell counts in Bulgarian petrochemical workers. *Med Lav* 2009; 100: 83-90.
 - 23) Maffei F, Hrelia P, Angelini S, Carbone F, Cantelli Forti G, Barbieri A, et al. Effects of environmental benzene: micronucleus frequencies and haematological values in traffic police working in an urban area. *Mutat Res* 2005; 583: 1-11.
 - 24) Kim SY, Choi JK, Cho YH, Chung EJ, Paek D, Chung HW. Chromosomal aberrations in workers exposed to low levels of benzene: association with genetic polymorphisms. *Pharmacogenetics* 2004; 14: 453-463.
 - 25) Marchetti F, Eskenazi B, Weldon RH, Li G, Zhang L, Rappaport SM, et al. Occupational exposure to benzene and chromosomal structural aberrations in the sperm of Chinese men. *Environ Health Perspect* 2012; 120: 229-234.
 - 26) Fracasso ME, Doria D, Bartolucci GB, Carrieri M, Lovreglio P, Ballini A, et al. Low air levels of benzene: correlation between biomarkers of exposure and genotoxic effects. *Toxicol Lett* 2010; 192: 22-28.
 - 27) Basso E, Cevoli C, Papacchini M, Tranfo G, Mansi A, Testa A. Cytogenetic biomonitoring on a group of petroleum refinery workers. *Environ Mol Mutagen* 2011; 52: 440-447.
 - 28) Spatari G, Saitta S, Cimino F, Sapienza D, Quattrocchi P, Carrieri M, et al. Increased serum levels of advanced oxidation protein products and glycation end products in subjects exposed to low-dose benzene. *Int J Hyg Environ Health* 2012; 215: 389-392.
 - 29) Carugno M, Pesatori AC, Dioni L, Hoxha M, Bollati V, Albetti B, et al. Increased mitochondrial DNA copy number in occupations associated with low-dose benzene exposure. *Environ Health Perspect* 2012; 120: 210-215.
 - 30) McHale CM, Zhang L, Lan Q, Vermeulen R, Li G, Hubbard AE, et al. Global gene expression profiling of a population exposed to a range of benzene levels. *Environ Health Perspect* 2011; 119: 628-634.
 - 31) Billet S, Paget V, Garçon G, Heutte N, André V, Shirali P, Sichel F. Benzene-induced mutational pattern in the tumour suppressor gene TP53 analysed by use of a functional assay, the functional analysis of separated alleles in yeast, in human lung cells. *Arch Toxicol* 2010 Feb; 84 (2): 99-107.
 - 32) Van Damme K, Casteleyn L. Ethical, social and scientific problems related to the application of genetic screening and genetic monitoring for workers in the context of a European approach to health and safety at work. *Med Lav* 1998; 89: S3-72.
 - 33) Pira E, Discalzi G, Manzari M, Turbiglio M, Turbiglio P, Apostoli P, Mutti A, Corradi M, Giachino GM, Iavicoli S. Linee Guida Per la Sorveglianza Sanitaria degli Esposti ad Agenti Cancerogeni e Mutageni in Ambiente di Lavoro. Apostoli P, Imbriani M, Soleo L, Abbritti G, Ambrosi L (Eds). Linee guida per la formazione continua e l'accreditamento del medico del lavoro. Tipografia PIME Editrice, Pavia 2007, pp 1-53.

Corrispondenza: Dr. Giuseppe De Palma, Università degli Studi di Brescia, Dipartimento di Specialità Medico-Chirurgiche, Scienze Radiologiche e Sanità Pubblica, Sezione Sanità Pubblica e Scienze Umane, Piazzale Spedali Civili 1, 25123 Brescia, Italy

Silvia Fustinoni, Valentina Bollati, Pier Alberto Bertazzi

Modificazioni epigenetiche nell'esposizione a basse dosi di benzene

Dipartimento di Scienze Cliniche e di Comunità, Università degli Studi di Milano e Fondazione IRCCS Ca' Granda Ospedale Maggiore Policlinico, Milano

RIASSUNTO. La metilazione del DNA, il numero di copie di DNA mitocondriale e la lunghezza dei telomeri sono modificazioni cellulari associate ad un numero crescente di malattie tumorali, cardiovascolari e dell'invecchiamento. Nei nostri studi queste modificazioni sono state valutate in soggetti esposti a bassi livelli di benzene in ambiente di vita e di lavoro. Nei linfociti di sangue periferico è stata evidenziata una diminuzione della metilazione del DNA con l'aumento dell'esposizione a benzene, sia negli elementi ripetuti Alu e LINE-1 che a livello globale; è stato inoltre riscontrato un accorciamento della lunghezza dei telomeri nei soggetti esposti a traffico urbano e un aumento del numero di copie di DNA mitocondriale correlato con l'esposizione a benzene. La metilazione globale del DNA, valutata su campioni ripetuti a distanza di 8 anni, è diminuita in modo più marcato nei soggetti esposti che nella popolazione generale. Questi studi hanno consentito di mettere in luce modificazioni epigenetiche del DNA in soggetti esposti a bassi livelli di benzene.

Parole chiave: benzene, metilazione del DNA, numero di copie di DNA mitocondriale, lunghezza dei telomeri.

ABSTRACT. *EPIGENIC MODIFICATIONS ASSOCIATED WITH LOW BENZENE EXPOSURE. DNA methylation, mitochondrial DNA copy number and telomeres shortening are cellular modifications associated with an increasing number of tumors, cardiovascular and aging diseases. In our studies these modifications were evaluated in subjects occupationally exposed to low levels of benzene and in the general population. In peripheral blood lymphocytes a decrease of DNA methylation with the increase of personal benzene exposure was found, both in Alu and LINE-1 repetitive elements, and in the global DNA. Telomere length shortening in subjects exposed to traffic exhausts and an increase in mitochondrial DNA copy number correlated to benzene exposure was also found. DNA methylation measured in specimen repeats collected at intervals of 8 years decreased more markedly in exposed subjects than in controls. Our studies highlighted the association of epigenetic modifications of DNA with low benzene exposure.*

Key words: benzene, DNA methylation, mitochondrial DNA copy number, telomere shortening.

Introduzione

L'epigenetica studia le modificazioni nell'espressione genica che non comportano cambiamenti diretti alla sequenza del DNA. Il meccanismo epigenetico maggiormente studiato è la metilazione del DNA. La principale conseguenza della metilazione del DNA è l'alterazione del grado di compattezza della cromatina che, più spiralizzata, impedisce l'azione dell'apparato trascrizionale e porta allo spegnimento dell'espressione genica. Il pattern di metilazione di un gene è quindi inversamente correlato al suo grado di espressione. Nei tessuti neoplastici il genoma delle cellule tumorali va incontro ad ipometilazione globale, con il 20-60% di 5-metil-citosine in meno rispetto a cellule normali, e a ipermetilazione delle isole CpG a livello dei promotori di geni specifici (Esteller, 2007). Una diminuzione del livello globale della metilazione del DNA, associata con molti tipi di neoplasia, può contribuire alla mobilitazione di elementi trasponibili che possono causare instabilità cromosomica (Melki and Clark, 2002; Paulsen and Ferguson-Smith, 2001).

Un'altra conseguenza dell'alterazione della metilazione del DNA è l'instabilità cromosomica con conseguente un accorciamento dei telomeri (Chan and Blackburn, 2002). Nella maggior parte delle cellule i telomeri si accorciano ad ogni divisione cellulare a causa di una replicazione incompleta delle molecole di DNA ed all'assenza di meccanismi fisiologici di allungamento. L'eccessivo accorciamento dei telomeri è considerato indicatore di instabilità genetica ed evento precoce nella cancerogenesi (Aviv, 2004; Richter and von Zglinicki, 2007; Wu *et al.*, 2003).

I mitocondri sono il principale bersaglio delle specie reattive dell'ossigeno (ROS), prodotti secondari del metabolismo aerobio che vengono generati anche in condizioni fisiologiche nelle cellule (Han *et al.*, 2001). In ciascuna cellula umana ci sono da alcune centinaia a più di un migliaio di mitocondri (Cavelier *et al.*, 2000). Ognuno di questi contiene da 2 a 10 copie di DNA mitocondriale; il numero di queste copie è associato positivamente al numero e alla dimensione del mitocondrio (Lee and Wei, 2000). In confronto con il DNA nucleare il DNA mitocondriale mostra un minore numero di istoni e una minore capacità di riparo e ciò lo rende particolarmente suscettibile

al danno indotto dai ROS. Cellule stimulate con ROS sintetizzano un numero maggiore di copie di DNA mitocondriale e aumentano il numero dei mitocondri per compensare il danno e la maggiore richiesta respiratoria per la loro eliminazione (Lee and Wei, 2000).

L'esposizione a benzene in ambiente di lavoro è oggi notevolmente ridotta, ma sempre maggiore rilevanza ha assunto l'esposizione nell'ambito di vita della popolazione generale. L'azione leucemogena del benzene a dosi elevate (>100 ppm) è nota da lungo tempo (Vigliani and Saita, 1964). L'interesse attuale riguarda principalmente la sua possibile azione leucemogena alle basse dosi, che possono caratterizzare sia gli ambienti di lavoro che quelli di vita (Forastiere *et al.*, 1994). Particolare rilevanza assumono i risultati di alcuni studi che suggeriscono una possibile ematotossicità del benzene a livelli inferiori a <1 ppm, limite di esposizione occupazionale in Europa (Lan *et al.*, 2004).

Sebbene evidenze sperimentali indichino che gli intermedi reattivi del metabolismo del benzene siano necessari per la sua cancerogenicità, il meccanismo responsabile degli effetti resta ancora da comprendere. Nel tentativo di fare luce su questi meccanismi le nostre ricerche si sono focalizzate sulla relazione esistente tra esposizione a basse dosi di benzene ed insorgenza di alterazioni epigenetiche e molecolari.

Metodi

Popolazione allo studio

La popolazione indagata è stata reclutata a Milano e provincia in due campagne di studio: nel 2000 sono stati arruolati 77 vigili urbani milanesi, 78 benzinai e 58 addetti a lavori d'ufficio; nel 2007/8 sono stati arruolati 89 benzinai, 90 operai addetti alla manutenzione edile e 18 addetti a lavoro. Tra i soggetti dello studio 2007/8, 35 benzinai e 18 lavoratori d'ufficio avevano già partecipato allo studio dell'anno 2000. I soggetti sono stati reclutati in modo che i gruppi risultassero appaiati per sesso, età ed abitudine al fumo di sigaretta. I soggetti hanno ricevuto informazioni sulle finalità della ricerca e hanno dato la loro adesione scritta allo studio attraverso un consenso informato.

Esposizione personale a benzene

L'esposizione a benzene aerodisperso è stata indagata utilizzando campionatori personali indossati da ciascun soggetto in zona respiratoria durante una parte del turno di lavoro (tipicamente dalle 8:00 alle 14:00). Il benzene è stato misurato con tecniche cromatografiche e con limiti di quantificazione pari a 6 e 1 µg/m³ per il primo e il secondo studio (Fustinoni *et al.*, 2005).

Markers epigenetici

Per ciascun soggetto è stato raccolto un campione di sangue dal quale è stato estratto il DNA. La metilazione del DNA in elementi ripetuti Alu e LINE1 è stata quantificata utilizzando il metodo basato su bisulfite-PCR e Pyrosequencing (Bollati *et al.*, 2007). La metilazione di LINE-1 è stata valutata con due procedure leggermente diverse nel 2000 e nel 2007/8 ed in particolare utilizzando 4 posizioni CpGs nel primo studio e solo 3 nel secondo. La metilazione globale è stata effettuata mediante analisi in cromatografia accoppiata con spettrometria di massa (Rossella *et al.*, 2009). La misura della lunghezza telomeric è stata effettuata esclusivamente su vigili urbani e controlli dello studio 2000, attraverso real-time PCR (Hoxha *et al.*, 2009). Il numero relativo di copie di DNA mitocondriale sono state misurate mediante real-time PCR, come precedentemente descritto (Hou *et al.*, 2010).

Analisi statistica

L'analisi statistica è stata effettuata utilizzando il Software Stata versione 8.2. Poiché i parametri non erano distribuiti normalmente, sono stati trasformati nei corrispondenti logaritmi decimali. Per il confronto tra gruppi è stata condotta l'analisi statistica utilizzando i dati trasformati ed impiegando il test t di Student e l'ANOVA. L'analisi di regressione lineare multipla è stata utilizzata per correlare i markers epigenetici con l'esposizione a benzene.

Risultati

Esposizione a benzene

In tabella I sono riportati i livelli di esposizione personale a benzene aerodisperso nei soggetti indagati. I lavo-

Tabella I. Livelli di metilazione (%5mC) globale e gene-specifici, lunghezza dei telomeri e numero relativo di copie di DNA mitocondriale nei soggetti indagati

Occupazione	N	Esposizione a benzene	Metilazione globale	METILAZIONE in elementi ripetuti		Lunghezza telomeri	N relativo copie di DNA mitocondriale
		(µg/m ³) Mediana (min - max)	(%5mC) Mediana (min - max)	LINE-1 (%5mC) Mediana (min - max)	Alu (%5mC) Mediana (min - max)	Mediana (min - max)	Mediana (min - max)
Vigili 2000	77	22 (9 - 316)	-	65.3 (52.3 - 77.6)	26.9 (21.6 - 37.9)	1.08 (0.70 - 2.46)	1.19 (0.59 - 2.57)
Benzinai 2000	78	61 (11 - 478)	5.419 (5.158-5.614)	62.6 (39.7 - 78.4)	25.8 (21.0 - 33.3)	-	0.84 (0.27 - 1.95)
Addetti lavoro d'ufficio 2000	58	6 (<6 - 115)	5.489 (5.314-5.582)	64.5 (51.7 - 77.3)	26.7 (22.5 - 38.3)	1.27 (0.72 - 2.24)	0.79 (0.21 - 2.07)
Benzinai 2007	89	59 (3 - 3246)	5.321 (5.160-5.625)	82.0 (78.5 - 87.7)	23.8 (22.5 - 24.9)	-	-
Operai 2007	90	4 (1 - 48)	5.462 (5.346-5.577)	81.9 (77.0 - 85.6)	24.1 (22.0 - 25.2)	-	-
Addetti lavoro d'ufficio 2008	18	4 (2 - 11)	5.461 (5.281 - 5.569)	-	-	-	-

toratori più esposti risultano i benzinai con valori mediani pari a 61 e 59 µg/m³ nel 2000 e nel 2007; confrontando i due studi non si nota una riduzione di esposizione. Esposizioni molto più basse si riscontrano nei vigili urbani, negli operai e negli addetti a lavoro d'ufficio. In particolare per questa categoria si nota un significativo decremento passando dal 2000 and 2008; questo risultato conferma i dati del monitoraggio della qualità dell'aria della città di Milano.

Metilazione del DNA

Nello studio 2000, la metilazione nell'elemento ripetuto LINE-1 è risultata più bassa nei soggetti esposti a benzene rispetto ai controlli (tabella I) (p = 0.003 per le differenze tra i gruppi professionali). La metilazione di Alu ha mostrato una diminuzione moderata e non significativa nei benzinai (mediana = 25.8%), ma nessun cambiamento tra vigili urbani (mediana = 26.9%) rispetto agli addetti a lavoro d'ufficio (media = 26.9%) (p = 0.12 per la differenza tra i gruppi professionali) (Bollati *et al.*, 2007). La metilazione globale misurata tramite GC/MS è risultata minore nei benzinai, con una mediana di 5.346% rispetto ai controlli, con una mediana di 5.461% (Fustinoni *et al.*, 2012).

Nello studio del 2007, la metilazione di LINE-1 e Alu non è risultata diversa tra benzinai e operai, mentre la metilazione globale misurata tramite GC/MS ha mostrato valori significativamente più bassi nei benzinai rispetto agli addetti a lavoro d'ufficio (5.321% vs. 5.462%, p<0.001) (tabella I).

Nella tabella II sono riportati i parametri della regressione lineare multipla tra i livelli di metilazione del DNA (variabili dipendenti) e l'esposizione personale a benzene aerodisperso, l'età e il genere dei soggetti indagati (variabili indipendenti). Nello studio 2000 si è trovato che tutti i parametri di metilazione diminuiscono all'aumentare dei livelli di benzene aerodisperso. In un modello di regressione lineare che utilizza i livelli di esposizione a benzene, è stato trovato un calo del 2.77% per LINE-1 (p = 0.003), -0.91% per Alu (p = 0.032) e -0.06% per la metilazione globale, stimato per un aumento di 10 volte del benzene

aerodisperso. Il genere influenza i parametri della metilazione anche se in modo difficilmente interpretabile: si sono infatti osservati valori più alti di metilazione globale negli uomini rispetto che nelle donne (+0.13%, p<0.001) e al contrario valori più bassi negli uomini per quanto riguarda la metilazione di Alu (-1.26%, p = 0.049). Si è anche osservata una diminuzione della metilazione globale con l'avanzare dell'età (-0.003%, p = 0.017).

Nello studio del 2007 è stata confermata la diminuzione della metilazione in associazione con l'esposizione a benzene. In questo caso abbiamo trovato un calo dello -0.003% per Alu (p = 0.025), e di -0.006% per la metilazione globale (p<0.001) per un aumento di 10 volte del benzene aerodisperso. Nessuna variazione significativa è stata invece trovata per LINE-1. In concordanza con i risultati già ottenuti nel 2000, negli uomini rispetto che nelle donne è stata anche osservata una metilazione globale più elevata (+0.009, p = 0.001) e, al contrario, valori più bassi per la metilazione di Alu (-0.033, p<0.001).

Analizzando i risultati relativi ai soggetti per cui sono disponibili le misure ripetute si osserva che la metilazione globale misurata tramite GC/MS diminuisce in modo significativo nei campioni raccolti nel 2007/8 rispetto ai campioni 2000 sia nei benzinai che negli addetti a lavori d'ufficio: questa diminuzione è però molto più rilevante nei benzinai, con una diminuzione del 3.1%, rispetto ai controlli, che diminuiscono solo dello 0.43%.

Lunghezza dei telomeri

La quantificazione della lunghezza telomerica è stata effettuata solo per i vigili urbani e i controlli indagati nell'anno 2000 (tabella I). La mediana della lunghezza telomerica, stimata aggiustando per età, sesso, fumo (non fumatore/fumatore), è minore nei vigili urbani (mediana = 1.08) che nei controlli (mediana = 1.27) (p<0.001). Tra i vigili urbani, la lunghezza telomerica è inferiore in chi lavora in zone a più alta densità di traffico (media = 1.02, 95% CI = 0.96-1.09) rispetto a chi lavora in zone a bassa minore densità di traffico (media = 1.02, 95% CI = 0.96-1.09) (p<0.001).

Tabella II. Analisi di regressione multipla per valutare la metilazione del DNA in funzione dell'esposizione personale a benzene aerodisperso, genere ed età nei soggetti dello studio 2000

	Metilazione globale (%5mC)		Alu (%5mC)		LINE-1 (%5mC)		Lunghezza telomeri		N relativo copie di DNA mitocondriale	
	β (SE)	parziale, p	β (SE)	r parziale, p	β (SE)	r parziale, p	β (SE)	r parziale, p	β (SE)	r parziale, p
Costante	5.502 (0.041)	N/A, <0.001	29.413 (1.088)	N/A, <0.001	69.435 (2.436)	N/A, <0.001	0.570 (0.133)	N/A, <0.001	0.285 (0.141)	N/A, 0.044
Esposizione a benzene (µg/m ³)	-0.065 (0.015)	-0.353, <0.001	-0.912 (0.421)	-0.190, 0.032	-2.770 (0.926)	-0.277, 0.003	-0.071 (0.024)	-0.251, 0.004	0.054 (0.023)	0.159, 0.022
Genere										
Femmine	0 (ref.)		0 (ref.)		0 (ref.)		0 (ref.)		0 (ref.)	
Maschi	0.132 (0.023)	0.443, <0.001	-1.266 (0.636)	-0.175, 0.049	-1.448 (1.397)	-0.099, 0.302	0.017 (0.041)	0.037, 0.671	-0.118 (0.059)	-0.138, 0.048
Età (anni)	-0.003 (0.001)	-0.207, 0.017	-0.007 (0.021)	-0.031, 0.732	-0.014 (0.046)	-0.029, 0.764	-0.007 (0.002)	-0.259, 0.003	-0.009 (0.002)	-0.258, <0.001
R ² modello globale	0.274		0.085		0.102		0.095		0.101	
p modello totale	<0.001		0.011		0.008		0.005		0.0001	

ref. = reference group; SE = standard error

La lunghezza telomerica diminuisce con l'aumento dell'esposizione a benzene (-0.071%, $p = 0.004$, tabella II). Considerando il modello di regressione lineare aggiustato per età, sesso, e fumo, ad un aumento del benzene pari alla differenza tra 25° e 75° percentile (differenza interquartile = $11.2 \mu\text{g}/\text{m}^3$) corrisponde una diminuzione del 6.4% (95% CI, 2.1-10.4%) nella lunghezza telomerica (Hoxha *et al.*, 2009). Non sono state osservate differenze della lunghezza dei telomeri in base al genere, ma si è invece osservata una diminuzione della lunghezza dei telomeri con l'aumentare dell'età (-0.007, $p = 0.003$).

Numero di copie di DNA mitocondriale

Nei soggetti reclutati nell'anno 2000 è stato indagato il numero di copie di DNA mitocondriale (tabella I). Questo è risultato più elevato negli esposti a benzene che nei controlli. (p -trend = 0.008) (Carugno *et al.*, 2012).

Il numero di copie di DNA mitocondriale ha mostrato una correlazione positiva con le concentrazioni di benzene (tabella II). Nei modelli di regressione multivariata aggiustata per età, sesso, fumo, e numero di sigarette/giorno, è stato trovato un incremento del 8.2% (95% CI: 2.2, 14.7, $p = 0,008$) nel numero di copie di DNA mitocondriale per aumento dell'esposizione a benzene pari alla differenza tra 25° e 75° percentile (differenza interquartile = $11.2 \mu\text{g}/\text{m}^3$) (Carugno *et al.*, 2012).

Conclusioni

Lo studio ha mostrato come l'esposizione a benzene sia associata a modificazioni della metilazione globale del DNA e degli elementi ripetuti Alu e LINE1, della lunghezza dei telomeri e del numero di copie di DNA mitocondriale. Le evidenze già raccolte nel 2000 sono supportate dai nuovi risultati dello studio 2007/8. In particolare i risultati hanno mostrato una diminuzione della metilazione globale e degli elementi ripetuti Alu e LINE-1, usati per stimare la metilazione globale, in relazione all'aumento dell'esposizione. Questa osservazione è coerente con la ipometilazione globale frequentemente osservata nella leucemia mieloide acuta e collegata ad una maggiore instabilità cromosomica e all'attivazione aberrante di geni importanti per il corretto funzionamento cellulare. Le alterazioni trovate sono comunque di entità ridotta rispetto a quanto osservato nella patologia, e potrebbero rappresentare un iniziale cambiamento indotto dalla esposizione.

Il meccanismo attraverso il quale il benzene interferisce con la metilazione del DNA e le altre modificazioni epigenetiche rimane poco chiaro. Il benzene aumenta la produzione di ossido nitrico nel midollo osseo (Laskin *et al.*, 1996), probabilmente inducendo un aumento post-transcrizionale nell'attività di DNA metiltransferasi, e di specie reattive dell'ossigeno e questo potrebbe giustificare le alterazioni epigenetiche osservate. Va detto che, nonostante sia stata osservata una relazione dose-risposta tra la metilazione del DNA e il benzene nell'aria, non possiamo escludere che gli altri

inquinanti, tra altri inquinanti dell'aria urbana quali il particolato, gli idrocarburi policiclici aromatici, gli ossidi di C e N, possono aver contribuito a determinare i cambiamenti trovati.

Nello studio 2007/8 l'analisi dei campioni ripetuti ha consentito di evidenziare una diminuzione di metilazione con il passare degli anni che si è presentata molto più marcata nei soggetti con esposizione professionale a benzene rispetto ai soggetti di controllo. Questo risultato appare particolarmente interessante in quanto suggerisce una maggiore suscettibilità agli effetti epigenetici indotti dall'età nei soggetti esposti a benzene per motivi professionali.

Bibliografia

- Aviv A. Telomeres and human aging: facts and fibs. *Sci Aging Knowledge Environ* 2004, pe43.
- Bollati V, Baccarelli A, Hou L, Bonzini M, Fustinoni S, Cavallo D, Byun HM, Jiang J, Marinelli B, Pesatori AC, Bertazzi PA, Yang AS. Changes in DNA methylation patterns in subjects exposed to low-dose benzene. *Cancer Reserch* 2007; 67: 876-880.
- Carugno M, Pesatori AC, Dioni L, Hoxha M, Bollati V, Albetti B, Byun H-M, Bonzini M, Fustinoni S, Cocco P, Satta G, Zucca M, Merlo DF, Cipolla M, Bertazzi PA, Baccarelli A. Increased Mitochondrial DNA Copy Number in Occupations Associated with Low-Dose Benzene Exposure. *Environmental Health Perspectives* 2012; 120: 210-215.
- Cavelier L, Johannisson A, Gyllensten U. Analysis of mtDNA copy number and composition of single mitochondrial particles using flow cytometry and PCR. *Exp Cell Res* 2000; 259: 79-85.
- Chan SW, Blackburn EH. New ways not to make ends meet: telomerase, DNA damage proteins and heterochromatin. *Oncogene* 2002; 21: 553-563.
- Esteller M. Aberrant DNA methylation as a cancer-inducing mechanism. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2007; 45: 629-656.
- Forastiere F, Perucci CA, Di Pietro A, Miceli M, Rapiti E, Bargagli A, Borgia P. Mortality among urban policemen in Rome. *Am J Ind Med* 1994; 26: 785-798.
- Fustinoni S, Buratti M, Campo L, Colombi A, Consonni D, Pesatori AC, Bonzini M, Farmer P, Garte S, Valerio F, Merlo DF, Bertazzi PA. Urinary t,t-muconic acid, S-phenylmercapturic acid and benzene as biomarkers of low benzene exposure. *Chem Biol Interact* 2005; 153-154: 253-256.
- Fustinoni S, Rossella F, Polledri E, Bollati V, Campo L, Byun H-M, Agnello L, Consonni D, Pesatori AC, Baccarelli A, Bertazzi PA. Global DNA methylation and low-level exposure to benzene. *Med Lav* 2012; 103: 84-95.
- Han D, Williams E, Cadenas E. Mitochondrial respiratory chain-dependent generation of superoxide anion and its release into the intermembrane space. *Biochem J* 2001; 353: 411-416.
- Hou L, Wang H, Sartori S, Gawron A, Lissowska J, Bollati V, Tarantini L, Zhang FF, Zatonski W, Chow WH, Baccarelli A. Blood leukocyte DNA hypomethylation and gastric cancer risk in a high-risk Polish population. *International Journal of Cancer* 2010; 127: 1866-1874.
- Hoxha M, Dioni L, Bonzini M, Pesatori AC, Fustinoni S, Cavallo D, Carugno M, Albetti B, Marinelli B, Schwartz J, Bertazzi PA, Baccarelli A. Association between leukocyte telomere shortening and exposure to traffic pollution: a cross-sectional study on traffic officers and indoor office workers. *Environmental Health* 2009; 8: 41.
- Lan Q, Zhang L, Li G, Vermeulen R, Weinberg RS, Dosemeci M, Rappaport SM, Shen M, Alter BP, Wu Y, Kopp W, Waidyanatha S, Rabkin C, Guo W, Chanock S, Hayes RB, Linet M, Kim S, Yin S, Rothman N, Smith MT. Hematotoxicity in workers exposed to low levels of benzene. *Science* 2004; 306: 1774-1776.
- Laskin DL, Heck DE, Punjabi CJ, Laskin JD. Role of nitric oxide in hematosuppression and benzene-induced toxicity. *Environ Health Perspect* 1996; 104 Suppl 6: 1283-1287.

- Lee HC, Wei YH. Mitochondrial role in life and death of the cell. *J Biomed Sci* 2000; 7: 2-15.
- Melki JR, Clark SJ. DNA methylation changes in leukaemia. *Cancer biology* 2002; 12: 347-357.
- Paulsen M, Ferguson-Smith AC. DNA methylation in genomic imprinting, development, and disease. *J Pathol* 2001; 195: 97-110.
- Richter T, von Zglinicki T. A continuous correlation between oxidative stress and telomere shortening in fibroblasts. *Exp Gerontol* 2007; 42: 1039-1042.
- Rossella F, Polledri E, Bollati V, Baccarellix A, Fustinoni S. Development and validation of a gas chromatography/mass spectrometry method for the assessment of genomic DNA methylation. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 2009; 23: 2637-2646.
- Vigliani EC, Saita G. Benzene and Leukemia. *N Engl J Med* 1964; 271: 872-876.
- Wu X, Amos CI, Zhu Y, Zhao H, Grossman BH, Shay JW, Luo S, Hong WK, Spitz MR. Telomere dysfunction: a potential cancer predisposition factor. *J Natl Cancer Inst* 2003; 95: 1211-1218.

Corrispondenza: *Silvia Fustinoni, Via S. Barnaba 8, 20122 Milano, Italy, Tel. +39 02 503 20158, Fax + 39 02 503 20111, E-mail: silvia.fustinoni@unimi.it*

Maria Luisa Scapellato¹, Maria Cristina Aprea², Angelo Moretto³, Giovanni Battista Bartolucci⁴,
Maurizio Manno⁵

Considerazioni sui valori limite per il benzene

¹ U.O.C. di Medicina del Lavoro, Azienda Ospedaliera di Padova, Università di Padova, Padova

² Laboratorio di Sanità Pubblica, Azienda USL 7 di Siena, Siena

³ Dipartimento di Scienze Biomediche e Cliniche, Università degli Studi di Milano e International Centre For Pesticides and Health Protection (ICPS), Azienda Ospedaliera Luigi Sacco, Milano

⁴ Dipartimento di Medicina Molecolare, Università degli Studi di Padova, Padova

⁵ Dipartimento di Sanità Pubblica, Università degli Studi di Napoli Federico II, Napoli

RIASSUNTO. I valori-limite occupazionali e i valori-guida per la popolazione generale proposti per il benzene da alcuni Organismi Internazionali sono qui discussi, in rapporto ai criteri per la loro derivazione e al valore-limite italiano ed europeo. Il benzene è anche un inquinante ambientale e sulla base della stima del rischio cancerogeno per la popolazione generale l'UE ha stabilito un valore-guida di 5 µg/m³. Le esposizioni professionali si sono ridotte moltissimo e in molti casi si avvicinano a quelle della popolazione generale. Appare quindi non congruo avere oggi in Italia, e in Europa, un limite di legge di 1 ppm (3.2 mg/m³), in contrasto con il principio ALARA e non giustificato da esigenze tecnologiche. È opportuno che gli operatori della prevenzione intervengano, al di là del rispetto del valore-limite di legge, attraverso procedure operative che minimizzino le esposizioni e con l'effettuazione di un biomonitoraggio per valutare l'efficacia delle misure di prevenzione messe in atto.

Parole chiave: Limiti di esposizione occupazionale, valori limite biologici, valori guida.

ABSTRACT. CONSIDERATIONS ON THE LIMIT VALUES FOR BENZENE. Occupational exposure limits and guideline values for the general population proposed for benzene by several international bodies are discussed and compared with the Italian and EU occupational limit values, taking also into account the criteria used for their derivation. Benzene is an environmental pollutant, and the EU guideline value for ambient air is 5 µg/m³, based on carcinogenic risk. Presently, occupational exposures are greatly reduced, and in many instances close to those of the general population. Consequently, it does not seem to be appropriate to maintain the Italian and the EU occupational exposure limits of 1 ppm (3.2 mg/m³), which are inconsistent with the ALARA principle and not justified by technological constraints. It should be pointed out that, in any case, preventive interventions should be carried out, beyond the compliance with the established limit values, in order to ensure the lowest exposure and by carrying out biological monitoring as a tool to verify the appropriateness of risk management measures.

Key words: occupational exposure limits, biological limit values, guideline values.

Introduzione

I valori-limite proposti dai diversi Organismi internazionali possono riferirsi a due tipi principali di approccio: valori-limite basati prevalentemente su valutazioni tossicologiche e sanitarie (health-based), e valori-limite che tengano conto anche di aspetti di fattibilità tecnica, economico-produttivi e sociali.

I valori-limite health-based sono di regola di due tipi in base al tipo di effetto: cancerogeno e non cancerogeno. Questi ultimi sono basati sul concetto di dose-soglia e quindi calcolati attraverso il NOAEL/LOAEL (No/Lowest Observed Adverse Effect Level) o, più recentemente e in alcuni casi, con l'approccio Benchmark Dose (BMD) che individua la dose corrispondente ad un effetto predefinito (in generale, 1-10%), a cui vengono applicati dei fattori di sicurezza opportunamente scelti in base al tipo e qualità dello studio e del valore di partenza (1). In presenza invece di effetti per i quali non si ritiene opportuno o possibile definire una soglia, come nel caso di cancerogeni genotossici, i valori-limite health-based si basano sul concetto del massimo rischio accettabile e derivato dalla curva dose-risposta biologicamente più plausibile e/o quantitativamente più cautelativa (2, 3).

Scopo di questo lavoro è discutere i valori-limite per l'esposizione professionale e i valori guida per la popolazione generale proposti per il benzene da alcuni Organismi Internazionali, in rapporto ai criteri per la loro derivazione e al valore-limite esistente in Italia.

I valori-limite occupazionali per il benzene

L'OSHA (Occupational Safety & Health Administration) nel 1987 fissava (4) negli Stati Uniti un Permissible Exposure Limit (PEL) per il benzene di 1 ppm (TWA), con uno STEL di 5 ppm, sulla base di studi epidemiologici di coorte (5, 6) che evidenziavano un eccesso di rischio di leucemia mieloide acuta in lavoratori esposti a livelli di benzene nel range 1-10 ppm (3.2 - 32 mg/m³) (RR = 4.4; 95% CI: 1.2 - 11).

Nel 1991 lo SCOEL (Scientific Committee on Occupational Exposure Limits) raccomandava (7), fra le diverse valutazioni effettuate, l'analisi basata sulla coorte di lavoratori Pliofilm (produzione di gomma) (8) e concludeva che un range di 0.5-6.6 casi aggiuntivi di leucemia per 1000 lavoratori esposti ad 1 ppm di benzene per una vita lavorativa di 40 anni (40 ppm-anni) rappresentava la migliore stima possibile. Tenendo in considerazione il range dei LOAEL emersi dagli studi sugli animali e dagli studi epidemiologici sia per quanto riguarda gli effetti non genotossici a carico del sistema ematopoietico che genotossici sul midollo osseo, lo SCOEL raccomandava un valore-limite per il benzene <1.0 ppm (<3.25 mg/m³).

Nel 1997, l'ACGIH (American Conference of Governmental Industrial Hygienists) adottava nuovi TLV (Threshold Limit Values) - TWA e - STEL per il benzene (9), basati su tre nuovi studi sulla coorte Pliofilm (10-12) che consideravano diverse matrici di esposizione e modelli statistici, e utilizzavano come unità di misura ppm-anno. L'applicazione del modello "Lifetable Analysis" e di altre analisi più complesse (Proportional Hazards Regression, and Maximum Likelihood Method) portavano l'ACGIH a concludere che l'esposizione a benzene ≥1 ppm per una intera vita lavorativa (45 ppm-anni), determinava un eccesso di rischio di mortalità per leucemia, mentre per un TLV-TWA di 0.5 ppm, gli odds di mortalità per leucemia erano indistinguibili da quelli per i lavoratori non esposti. Inoltre, Schnatter *et al.* (1996), analizzando gli stessi dati e usando l'intensità di dose invece della dose cumulativa, trovavano che il rischio di indurre leucemia (tutte le leucemie e leucemia mieloide acuta) aumentava solo per esposizioni di picco a partire da 20-25 ppm di benzene (12). Su queste basi l'ACGIH fissava un TLV-TWA di 0.5 ppm e un TLV-STEL di 2.5 ppm.

JSOH (Japan Society for Occupational Health), quando siano disponibili informazioni scientificamente rilevanti, stima un valore corrispondente ad un eccesso di rischio di cancro dovuto all'esposizione ad un cancerogeno del Gruppo I. Per il benzene, dal 1997 riporta i seguenti eccessi di rischio: 10⁻³ e 10⁻⁴ per esposizioni rispettivamente pari a 1 e 0.1 ppm (13).

Nel 2011, il NIOSH (National Institute for Occupational Safety and Health) fissava per i cancerogeni occupazionali nuovi criteri (14) per la definizione dei RELs (Recommended Exposure Limits) basati sui dati tossicologici nell'animale e nell'uomo, su considerazioni ingegneristiche e sulle tecniche analitiche disponibili. Per il benzene il NIOSH propone attualmente un REL-TWA di 0.1 ppm e uno STEL di 1 ppm, in sostituzione del REL-TWA di 1 ppm stabilito nel 1976.

In Italia, il D.Lgs 66/2000, ora D.Lgs 81/08, fissava un valore-limite di esposizione professionale di 3 ppm (9.75 mg/m³), ridotto a 1 ppm (3.25 mg/m³) dal 1/1/2002, in recepimento delle direttive comunitarie 90/394/CEE e 97/42/CEE.

Valori guida per la popolazione generale

L'EPA (Environmental Protection Agency) ha determinato per l'esposizione inalatoria a benzene, una Unit Risk

(ovvero l'eccesso di rischio per una esposizione a 1 µg/m³ per tutta la vita) compresa fra 2.2 e 7.8 x 10⁻⁶, per estrapolazione lineare con il metodo delle "maximum likelihood estimates" dei dati della coorte Pliofilm. Peraltro, l'utilizzazione di altri metodi di estrapolazione dava, nella maggior parte dei casi, stime dello stesso ordine di grandezza. Sulla base di questa Unit Risk, EPA indica un rischio di 10⁻⁶ per esposizione per tutta la vita (popolazione generale) ad una concentrazione di 0.13-0.45 µg/m³ (15).

L'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS), nelle linee guida per la qualità dell'aria, utilizzando gli stessi studi valutati da EPA e lo stesso tipo di estrapolazioni, ha indicato una media geometrica di tutte le stime di Unit Risk di 6 x 10⁻⁶, e quindi un rischio di 10⁻⁶ per esposizione a 0.17 µg/m³ (16).

L'Unione Europea (17) ha stabilito un limite di qualità dell'aria per la popolazione generale di 5 µg/m³, sulla base degli stessi studi valutati da OMS e EPA. La scelta di questo valore, suggerito all'interno di un range (0.2-20 µg/m³) da un gruppo di lavoro convocato ad hoc (18), è stata dettata da considerazioni socio-economiche e di costo-beneficio. Tale valore è stato recepito dal D.Lgs 155/2010.

Per quanto riguarda gli effetti non cancerogeni, il limite (Reference Concentration) identificato da EPA (19) per effetti ematotossici (riduzione dei linfociti B circolanti) è di 30 µg/m³. EPA ha derivato questo valore utilizzando il Benchmark Dose Modeling per la riduzione dei linfociti circolanti in lavoratori esposti, e al BMDL trovato ha applicato un fattore di sicurezza di 300 (10 per intraspecie, e il resto per le caratteristiche del database).

Sugli effetti ematologici è basata anche la definizione del Minimal Risk Level di 0.003 ppm (9.57 µg/m³) proposto da ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry) (20), sulla base di uno studio del 2004 su lavoratori cinesi cui ha applicato il Benchmark Dose Modeling per la riduzione dei linfociti B circolanti, e un fattore di sicurezza di 10 (intraspecie).

Valori guida biologici

La via principale di esposizione a benzene è quella inalatoria ma in certe condizioni lavorative anche l'assorbimento cutaneo contribuisce all'esposizione, soprattutto quando il benzene è in forma liquida. Per questo, i valori-limite per il benzene riportano la notazione "skin" ed è utile affiancare al monitoraggio ambientale il monitoraggio biologico, che fornisce informazioni sull'assorbimento totale per tutte le vie.

Per il Benzene, in assenza di informazioni conclusive in merito a quali siano i metaboliti rilevanti per gli effetti ematotossici e/o genotossici, vengono attualmente proposti solo dei biomarcatori di esposizione derivati dalla correlazione tra la concentrazione aerodispersa di benzene e quella del composto stesso o di un suo metabolita in una matrice biologica. L'ACGIH propone al momento valori biologici di esposizione (Biological Exposure Indices - BEI) per l'acido S-fenilmercapturico (S-PMA) e l'acido

trans,trans-muconico (t,t-MA) urinari. Questi rappresentano il livello dell'indicatore che mediamente corrisponde ad una esposizione a benzene pari al TLV-TWA (21).

Il DFG (Deutsche Forschungsgemeinschaft), in base al principio che nessuna esposizione ad un cancerogeno può essere "accettabile" o "tollerata", non definisce per il benzene un MAK (Maximum concentration at the workplace), e quindi un BAT (Biological Tolerance Value), ma stabilisce solo dei valori EKA (exposure equivalents for carcinogenic substances) per t,t-MA, S-PMA e benzene ematico corrispondenti a diversi livelli ambientali (22).

Detti indicatori peraltro possono essere rilevati in campioni biologici raccolti da soggetti non professionalmente esposti. Ad esempio, la Società Italiana Valori di Riferimento (SIVR), ha aggiornato nel 2011 (www.valoridiriferimento.it) la lista dei Valori di Riferimento per la popolazione generale (VR) dove sono presenti i VR per il benzene e i suoi metaboliti (23).

Considerazioni conclusive

C'è sufficiente evidenza che il benzene è un cancerogeno genotossico per l'uomo. La stima del rischio cancerogeno alle concentrazioni estremamente ridotte che si trovano oggi negli ambienti di vita e di lavoro e quale rischio sia accettabile nei lavoratori esposti e nella popolazione generale, rappresentano gli elementi rilevanti ai fini della definizione dei valori-limite.

I valori-limite occupazionali e i valori guida per la popolazione generale proposti per il benzene dai diversi Organismi internazionali derivano principalmente da valutazioni di un'unica coorte di lavoratori (Pliofilm) dove non sembra evidente alcuna significativa esposizione ad altri composti. Tutte le analisi eseguite, diverse fra loro per matrici di esposizione e modelli statistici, assumono una estrapolazione lineare dalle alte alle basse dosi, e modificate nel tempo in seguito ad aggiornamenti e ri-analisi. Questo spiega, almeno in parte, le differenze emerse tra i valori-limite occupazionali proposti da alcuni Organismi, come emerge dall'analisi delle documentazioni allegate alle proposte OSHA, SCOEL e ACGIH. Al momento dell'uscita delle prime due (rispettivamente nel 1987 e 1991) non erano infatti ancora disponibili gli ultimi aggiornamenti della coorte Pliofilm, né erano disponibili alcuni studi sugli effetti ematossici, che hanno indotto l'ACGIH a proporre nel 1997 un TLV-TWA di 0.5 ppm (1.6 mg/m³) e un TLV-STEL di 2.5 ppm. Da segnalare tuttavia come né l'OSHA né lo SCOEL abbiano ritenuto opportuno rivedere negli anni successivi il limite proposto (1 ppm, 3.2 mg/m³), e come anche l'Italia non abbia modificato il valore-limite di legge adottato nel 2002 (1 ppm, 3.2 mg/m³), quando invece gli aggiornamenti di cui sopra erano già stati pubblicati.

Ciò detto, è importante riflettere su altri due aspetti. Innanzitutto, il benzene è anche un inquinante ambientale con un rischio cancerogeno per la popolazione generale valutato da EPA e OMS a 10⁻⁶ per esposizioni in

un range di concentrazioni 0.15-0.45 µg/m³. L'Unione Europea ha stabilito invece un limite di qualità dell'aria di ben 5 µg/m³, accettando di fatto un rischio di 10⁻⁵, se si considera il valore più basso derivato dalle varie estrapolazioni. In secondo luogo le esposizioni professionali correnti si sono ridotte moltissimo, come conseguenza degli interventi normativi e dei miglioramenti tecnologici, e in molti casi si avvicinano a quelle della popolazione generale. Anche in considerazione di questa situazione, alcuni Organismi propongono valori-limite basati anche su aspetti di fattibilità tecnica come, ad esempio, il NIOSH che adotta un valore di 0.1 ppm (320 µg/m³).

Da quanto sopra esposto, appare non motivato avere oggi in Italia, e in Europa, un limite di legge di 1 ppm (3.2 mg/m³), in palese contrasto con il principio ALARA (As Low As Reasonable Achieve), ovvero di minimizzare le esposizioni a cancerogeni per quanto tecnologicamente possibile. Il valore-limite adottato dal NIOSH, allo stato attuale delle conoscenze e delle condizioni degli ambienti di lavoro, sembra una proposta ragionevole anche per il nostro Paese.

È importante sottolineare come i datori di lavoro e gli operatori che si occupano di prevenzione nei luoghi di lavoro debbano intervenire, aldilà del rispetto del valore-limite di legge, attraverso procedure operative che minimizzino le esposizioni (anche con l'uso di DPI), e con l'effettuazione di un biomonitoraggio mirato per valutare l'efficacia delle misure di prevenzione e tenendo conto dei VR per la popolazione generale.

Bibliografia

- 1) EFSA. Use of the benchmark dose approach in risk assessment. Guidance of the Scientific Committee. The EFSA Journal 2009; 1150: 1-72.
- 2) EFSA. Opinion of the Scientific Committee on a request from EFSA related to A Harmonised Approach for Risk Assessment of Substances which are both Genotoxic and Carcinogenic. The EFSA Journal 2005; 282: 1-31.
- 3) WHO. Harmonization Project Document No. 4. Part 1: IPCS Framework for analysing the relevance of a cancer mode of action for humans and case-studies. Part 2: IPCS framework for analysing the relevance of a non-cancer mode of action for humans. WHO, Geneva, 2007.
- 4) US Department of Labor, Occupational Safety and Health Administration: Title 29, CFR, Part 1910.1028. Occupational Exposure to benzene; Final rule. Part II. Fed Reg 52 (176): 34460-34578 (1987).
- 5) Ott GM, Townsend JC, Fishbeck WA, Langner RA. Mortality among individuals occupationally exposed to benzene. Arch Environ Health 1978; 33: 3-10.
- 6) Bond GG, McLaren EA, Baldwin CL, Cook RR. An update of mortality among workers exposed to benzene. Br J Ind Med 1986; 43: 685-691.
- 7) Recommendation from the Scientific Committee on Occupational Exposure Limits for benzene. SCOEL/SUM/140, December 1991.
- 8) Rinsky RA, Smith AB, Hornung R, Fillaon TG, Young RJ, Okun AH, Landrigan PJ. Benzene and leukemia. An epidemiologic risk assessment. N Engl J Med 1987; 316: 1044-1050.
- 9) ACGIH. Documentation of the Threshold Limit Values (TLVs) and Biological Exposure Indices (BEIs) - Benzene; 2001.
- 10) Paxton MB, Chinchilli VM, Brett SM et al. Leukemia risk

- associated with benzene exposure in the Pliofilm cohort. II. Risk Estimates. *Risk Anal* 1994; 14: 155-161.
- 11) Crump K. Risk of benzene-induced leukaemia: a sensitivity analysis of the Pliofilm cohort with additional follow-up and new exposure estimates. *J Toxicol Environ Health* 1994; 42: 219-242.
 - 12) Schnatter AR, Nicholich MJ, Bird MG. Determination of leukemogenic benzene exposure concentrations: refined analyses of the Pliofilm cohort. *Risk Anal* 1996; 16: 833-840.
 - 13) JSOH Recommendation of Occupational Exposure Limits 2012-2013. *J Occup Health*, 2012; 54: 387-404.
 - 14) NIOSH Pocket Guide to Chemical Hazard - Benzene. Appendix A: NIOSH Potential Occupational Carcinogens, 2011.
 - 15) USEPA/IRIS (2003). Benzene (CASRN 71-43-2); (<http://www.epa.gov/iris/subst/0276.htm#carc>)
 - 16) WHO. Air Quality Guidelines for Europe. Second Edition. WHO regional publications. European series 2000; 9: 62-66.
 - 17) Direttiva 2008/50/CE del Parlamento Europeo e del Consiglio del 21 maggio 2008 relativa alla qualità dell'aria ambiente e per un'aria più pulita in Europa. GUCE, 11.6.2008.
 - 18) Istituto Inquinamento Atmosferico. Council directive on ambient air quality assessment and management working group on benzene. Position paper. September 1998.
 - 19) USEPA/IRIS (2003). Benzene (CASRN 71-43-2); (<http://www.epa.gov/iris/subst/0276.htm#refinhal>).
 - 20) ATSDR. Toxicological profile for benzene (Update). Atlanta (GA): Agency for Toxic Substances and Disease Registry, US Department of Health & Human Services, Public Health Service, 2007.
 - 21) ACGIH. Threshold Limit Values and Biological Exposure Indices. Cincinnati: American Conference of Governmental Industrial Hygienists, 2013.
 - 22) DFG. List of MAK and BAT Values 2011. Report N. 47.
 - 23) Aprea MC, Scapellato ML, Bartolucci GB, Apostoli P. I valori limite ambientali e biologici e i valori di riferimento. *G Ital Med Lav Erg* 2011; 33: 3, Suppl, 430-433.

Corrispondenza: *Maria Luisa Scapellato, U.O.C. Medicina del Lavoro, Azienda Ospedaliera di Padova, Università di Padova, Via Giustiniani 2, 35128 Padova, Italy, Tel. 049-8211369, E-mail: marialuisa.scapellato@unipd.it*

