



1506  
UNIVERSITÀ  
DEGLI STUDI  
DI URBINO  
CARLO BO

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI URBINO CARLO BO

DIPARTIMENTO DI SCIENZE BIOMOLECOLARI

Corso di Laurea magistrale in  
Biologia Molecolare, Sanitaria e della Nutrizione

*Valutazione del quadro ematologico in  
lavoratori esposti al benzene e supporto  
allo sviluppo della Web App TocTox*

Relatore: Chiar.mo Prof.  
STEFANO AMATORI

Laureanda:  
EUGENIA CIURLIA

Co-relatore: Chiar.mo Dott.  
MICHELE CALCINARI

ANNO ACCADEMICO 2021/2022

# INDICE

<b>1. Introduzione</b> .....	<b>2</b>
<b>2. Tossicologia occupazionale</b> .....	<b>3</b>
<b>2.1 Monitoraggio ambientale (MA)</b> .....	<b>4</b>
<b>2.2 Monitoraggio Biologico (MB)</b> .....	<b>6</b>
<b>2.2.1 Indici biologici e valori di riferimento</b> .....	<b>9</b>
<b>2.3 Monitoraggio degli effetti reversibili (MER)</b> .....	<b>11</b>
<b>2.4 Sostanze cancerogene e mutagene</b> .....	<b>12</b>
<b>2.4.1 Classificazione</b> .....	<b>12</b>
<b>2.4.2 Meccanismi d'azione</b> .....	<b>14</b>
<b>3. Benzene</b> .....	<b>16</b>
<b>3.1 Caratteristiche chimico-fisiche</b> .....	<b>16</b>
<b>3.2 Utilizzo e produzione</b> .....	<b>17</b>
<b>3.3 Limiti di benzene imposti dalla legge e valutazione dell'esposizione</b> .....	<b>18</b>
<b>3.4 Cinetica e metabolismo</b> .....	<b>19</b>
<b>3.5 Effetti sulla salute e cancerogenicità</b> .....	<b>20</b>
<b>3.6 Polimorfismi metabolici</b> .....	<b>23</b>
<b>4. Scopo della tesi</b> .....	<b>25</b>
<b>Fase 1: Effetti a breve termine del benzene sul quadro del sangue</b> .....	<b>26</b>
<b>4.1 Materiali e metodi</b> .....	<b>26</b>
<b>4.1.1 Quantificazione dell'acido trans,trans-muconico nelle urine</b> .....	<b>26</b>
<b>4.1.2 Analisi dell'emocromo</b> .....	<b>29</b>
<b>4.2. Risultati e discussione</b> .....	<b>29</b>
<b>4.2.1 Monitoraggio della quantità di acido trans,trans-muconico presente nelle urine di lavoratori esposti al benzene</b> .....	<b>29</b>
<b>4.2.2 Valutazione degli effetti del benzene sul quadro del sangue</b> .....	<b>33</b>
<b>Fase 2 - TocTox</b> .....	<b>35</b>
<b>5. Conclusioni</b> .....	<b>38</b>
<b>6. Bibliografia</b> .....	<b>39</b>

## **1. Introduzione**

In ambito occupazionale, numerosi lavoratori appartenenti a diverse categorie sono esposti a sostanze potenzialmente dannose che possono alterare la salute dell'individuo. Tali sostanze vengono metabolizzate con meccanismi di detossificazione e il monitoraggio di specifici biomarcatori consente di quantificare l'esposizione a questi agenti tossici in termini di dose assorbita e modulata dal metabolismo individuale. Questi biomarcatori sono molto utili per la prevenzione di diverse patologie dei lavoratori e importanti nella valutazione del rischio da esposizione a sostanze dannose. Una di queste sostanze è il benzene, in grado di causare malattie tumorali e una serie di altri effetti avversi all'organismo; in particolare, è ben noto che l'esposizione ad alti livelli di benzene è associata ad effetti sulla conta delle cellule del sangue. Fulcro dello studio è stato il monitoraggio di lavoratori esposti a livelli più bassi di benzene per valutare la presenza o meno di effetti sulle cellule del sangue e, inoltre, l'attenzione è stata rivolta ad unire la ricerca con il supporto informatico avvalendosi di una WebApp "TocTox" progettata con l'intento di poter reperire tutte le informazioni circa le sostanze tossiche presenti negli ambienti lavorativi, fornendo un importante ausilio per il medico del lavoro.

## 2. Tossicologia occupazionale

L'OMS (Organizzazione Mondiale della Sanità) ha definito la salute come *“uno stato di completo benessere fisico, sociale e mentale, e non soltanto l'assenza di malattia o di infermità”* (Ottawa Charter for Health Promotion. WHO, Geneva, 1986); nel mondo del lavoro, affinché possa essere affermato il diritto alla sicurezza e alla salute di tutti i lavoratori, gli Stati concorrono alla realizzazione di programmi di intervento finalizzati a prevenire e/o migliorare le condizioni di salute e sicurezza dei lavoratori. In Europa, in quasi tutti gli ambienti di lavoro, i lavoratori entrano a contatto con agenti biologici o chimici che possono rivelarsi dannosi, ovvero qualsiasi liquido, gas o solido che mette a repentaglio la salute o la sicurezza dei lavoratori [1]. La tossicologia occupazionale è la disciplina che applica i principi e i metodi della tossicologia (scienza multidisciplinare che studia l'interazione tra gli agenti chimici ed i sistemi biologici al fine di determinare i possibili effetti negativi sugli organismi viventi) con lo scopo di prevenire i danni alla salute dei lavoratori derivanti dall'esposizione a sostanze chimiche pericolose nei luoghi di lavoro [2].

Questo concetto implica la definizione di “rischio”: *“probabilità di raggiungimento del livello potenziale di danno nelle condizioni di impiego o di esposizione ad un determinato fattore o agente oppure alla loro combinazione”* (D.Lgs 81/08, art. 2, lettera s).

Rischio = danno x probabilità x suscettibilità

Dove per danno si intende la comparsa dell'effetto avverso nell'organismo, per probabilità la possibilità che il danno si verifichi, mentre la suscettibilità esprime le differenze individuali, di origine genetica o acquisita [3].

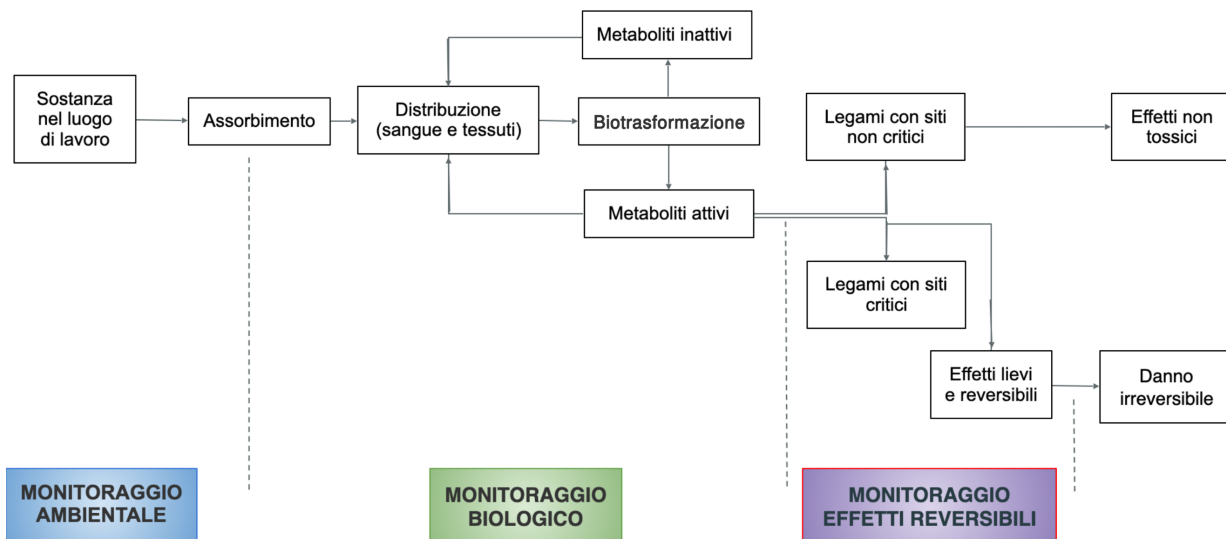


Figura 1– Schema rappresentativo di quanto accade nell’organismo in seguito ad esposizione ad una sostanza chimica pericolosa e i relativi monitoraggi. La sostanza aereodispersa nei luoghi di lavoro (monitoraggio ambientale), può entrare a contatto con l’organismo ed essere assorbita, distribuita nei tessuti e organi, avviene un processo di biotrasformazione che può produrre metaboliti inattivi o attivi (monitoraggio biologico): gli attivi possono effettuare legami con siti non critici e quindi avere effetti non tossici, oppure possono legarsi a siti critici e avere effetti all’inizio lievi e reversibili (monitoraggio degli effetti reversibili) e poi un danno anche irreversibile.

Come riportato in Figura 1, dal momento in cui la sostanza pericolosa è presente nel luogo di lavoro ed entra a contatto con l’organismo, si possono effettuare tre tipi diversi di monitoraggio, ossia attività connesse con lo stato di salute dell’uomo finalizzate all’adozione di idonee misure di riduzione correttive:

- Monitoraggio ambientale (MA)
- Monitoraggio biologico (MB)
- Monitoraggio degli effetti reversibili (MER)

## 2.1 Monitoraggio ambientale (MA)

Con il monitoraggio ambientale (MA) si valuta l’esposizione esterna ad un agente chimico. Il MA può essere fatto determinando il contatto cutaneo, la concentrazione nei cibi o nell’acqua ma prevalentemente si effettua misurando la concentrazione in aria negli ambienti di lavoro, ricordando che ogni metodo analitico presenta un valore Loq (*limit of quantification*) al di sotto del quale non è possibile affermare con sicurezza la presenza e la concentrazione della sostanza [4].

Nel caso di esposizione inalatoria la norma UNI EN 689:2018 (Atmosfera nell’ambiente di lavoro. Guida alla valutazione dell’esposizione per inalazione a composti chimici ai fini del confronto con i valori limite e strategia di misurazione), definisce i criteri di campionamento,

le modalità di misurazione di agenti chimici aereodispersi al fine di ottemperare una corretta valutazione del rischio.

<b>Nome</b>	<b>Associazione</b>	<b>Provenienza</b>	<b>Base</b>
TLV® ( <i>Threshold Limit Values</i> )	ACGIH	USA	Health-based
PELs ( <i>Permissible Exposure Limits</i> )	OSHA	USA	Not only health-based (1)
RELs ( <i>Recommended Exposure Limits</i> )	NIOSH	USA	Not only health-based (1)
WEELs ( <i>Workplace Environmental Exposure Limits</i> )	AHIA	USA	
MAKs ( <i>Maximale Arbeitsplatzkonzentration</i> )	DFG	Germania	Health-based
OELs ( <i>Occupational Exposure Limits</i> )	JSOH	Giappone	
IOELVs ( <i>Indicative Occupational Exposure Limits Values</i> )	SCOEL	UE	Health-based
BOELVs ( <i>Binding Occupational Exposure Limit Values</i> )	SCOEL	UE	Not only health-based (1)

Tabella 1- Denominazione dei valori limite ambientali per sostanze pericolose, relativi alle varie nazioni ed organismi internazionali, basati sulla salute (health-based) o anche su altri aspetti (not only health-based) (1): valori limite che tengono conto anche di aspetti di fattibilità tecnica, economico-produttivi e sociali. Abv. ACGIH: American Conference of Governmental Industrial Hygienists; OSHA: Occupational Safety and Health Administration; NIOSH: National Institute for Occupational Safety and Health; AIAH: American Industrial Hygiene Association; DFG: Deutsche Forschungsgemeinschaft; JSOH: Japan Society for Occupational Health; SCOEL: Scientific Committee on Occupational Exposure Limits.

Attualmente ci sono varie Associazioni che hanno definito valori limite ambientali per sostanze pericolose (Tabella 1). Nella Comunità Europea, il Comitato Scientifico per i limiti dell'esposizione professionale agli agenti chimici (SCOEL) definisce gli *Occupational Exposure Limits Value* (OELV) dividendoli in IOELV, ovvero valore limite di esposizione solo a carattere indicativo per gli agenti chimici pericolosi e BOELV, cioè valori limite di esposizione a carattere vincolante per gli agenti cancerogeni e/o mutageni; vale a dire che gli Stati Membri possono abbassare o innalzare uno IOELV, ma un BOELV può essere recepito tal quale o solo abbassato [5]. UE rimanda ai limiti internazionali e alla letteratura per quelle sostanze dove non ha adottato limiti.

I limiti di esposizione in Italia si chiamano VLEP (Valore Limite di Esposizione Professionale) e sono contenuti nel D.Lgs. 81/08 e aggiornamenti.

In generale, i valori limite ambientali (TLV, *Threshold Limit Values*) si distinguono in [4]:

- Valore limite mediato nel tempo rispetto ad una giornata lavorativa (TLV-TWA): definito come la concentrazione media ponderata nel tempo misurata o calcolata rispetto ad una giornata lavorativa (in genere 8 ore);
- Valore limite mediato nel tempo rispetto a un breve periodo di esposizione (TLV-STEL): definito come la concentrazione media ponderata nel tempo misurata o calcolata rispetto a un breve periodo di tempo (in genere 15 minuti);
- Valore limite di soglia (TLV-C): definito come la concentrazione che non deve essere superata durante qualsiasi momento dell'esposizione lavorativa.
- i valori di riferimento (VR) rappresentano i valori relativi a soggetti non professionalmente esposti ed elaborati statisticamente. Il confronto con tali valori è particolarmente importante per gli inquinanti a larga diffusione e per sostanze che causano effetti tossici per i quali a volte i valori-limite non siano definibili o appaiano di dubbio o scarso significato preventivo (per esempio cancerogeni, mutageni, teratogeni) (Riportati in *Air Quality in Europe – 2020*; WHO global Air quality guidelines).

## **2.2 Monitoraggio Biologico (MB)**

Il Monitoraggio biologico (MB) è la misura periodica di un composto tossico o di suoi metaboliti in matrici biologiche accessibili, allo scopo di confrontare i livelli misurati con appropriati standard di riferimento. Il MB è considerato un'integrazione al MA, ma non lo

sostituisce completamente perché il MA è fondamentale per identificare le sorgenti di emissione e definirne l'entità della stessa [6].

Il MB fornisce informazioni aggiuntive rispetto al MA:

- dose interna (assorbita, al bersaglio, efficace, ecc.),
- esposizione cutanea e/o per ingestione,
- esposizione pregressa,
- effetti biologici,
- suscettibilità individuale,
- efficacia dei mezzi di protezione.

I dati ottenibili dal MB permettono di individuare le condizioni lavorative potenzialmente a rischio ed ottenere importanti informazioni quali, ad esempio, le esposizioni relative ad un periodo di tempo prolungato, la quantità di sostanza tossica presente nell'ambiente di lavoro al momento dell'analisi in base alla mansione ricoperta dal lavoratore ma intesa anche come esposizione individuale globale derivante da differenti sorgenti di inquinamento, professionali ed extraprofessionali; informazioni sulla tossicità della sostanza in studio, sull'entità dell'assorbimento in base all'esposizione e al tipo di sostanza (in forma gassosa, liquida o solida) [6].

Le principali vie di esposizione con cui, generalmente, una sostanza pericolosa può entrare a contatto con l'organismo sono: orale, polmonare e cutanea; più raramente attraverso la via nasale e quella oculare. La tossicità è dovuta all'effetto dannoso che queste sostanze possono recare all'organismo e lo possono fare con due tipi di interazione: tramite azione diretta della sostanza sul suo bersaglio o azione indiretta di un intermedio, derivato della sostanza chimica pericolosa originale da processi di biotrasformazione (metabolizzazione enzimatica). Ci possono essere tre forme di intossicazione: i) intossicazione acuta data da una esposizione di breve durata a forti concentrazioni con assorbimento rapido della sostanza tossica (gli effetti sono immediati entro le 24 ore con morte o guarigione rapida), ii) intossicazione sub-acuta tramite esposizioni per un periodo di più giorni o settimane prima che appaiano i primi effetti e iii) intossicazione cronica derivante da esposizione frequente e prolungata nel tempo (a lungo termine) con effetti tardivi (fino anche a diverse decine di anni). L'azione degli agenti chimici può essere locale se agisce unicamente intorno al punto di contatto (pelle, occhi, vie respiratorie, ecc.) o generale/sistematico se l'azione si manifesta in punti lontani dal contatto [4].



La misura della concentrazione di una sostanza nell'ambiente e la contemporanea misura degli effetti sull'organismo consentono di studiare le cosiddette relazioni dose-risposta riconoscendo le diverse sensibilità dei soggetti all'agente tossico (in funzione di fattori individuali che influenzano la farmacocinetica dell'agente tossico nell'organismo; fattori che dipendono, ad esempio, dall'età, sesso, da caratteristiche genetiche, dalle condizioni di funzionalità degli organi deputati alla biotrasformazione ed alla eliminazione del tossico) [7]. La relazione dose-risposta risulta influenzata dal tempo, dalla modalità di esposizione e dalla complessità dei sistemi biologici caratterizzati da meccanismi non sempre noti. Generalmente tali esperimenti vengono condotti su animali, sottoposti alla stessa modalità di esposizione alla quale potrebbe sottostare un essere umano, per poi effettuare adattamenti sui risultati ottenuti relativi alla tossicità delle sostanze chimiche al fine di renderli adatti per l'uomo. Queste sperimentazioni consentono, tra l'altro, di determinare alcuni parametri fondamentali utili per stabilire gli effetti biologici di tali agenti tra cui:

- NOAEL (*No Observed Adverse Effect Level*) che corrisponde alla dose massima di sostanza somministrabile giornalmente senza la comparsa di effetti avversi, statisticamente o biologicamente significativi, rispetto ad un gruppo di controllo;
- LOAEL (*Lowest Observed Adverse Effect Level*) che corrisponde alla dose minima di sostanza somministrabile giornalmente con la comparsa di effetti avversi statisticamente o biologicamente significativi rispetto ad un gruppo di controllo.

In questo modo potrà essere determinata la Dose di Riferimento (RfD) (Figura 2) a cui un essere umano può essere esposto giornalmente senza che insorgano effetti dannosi per la salute [8].

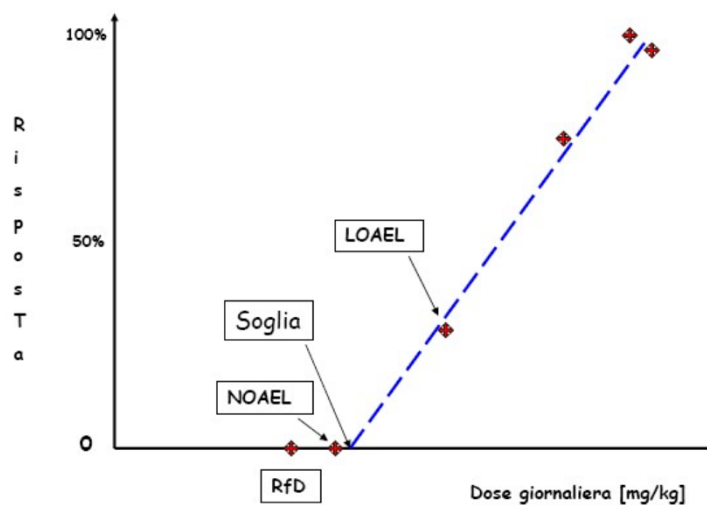


Figura 2 – Rappresentazione dei parametri NOAEL, LOAEL e Dose di Riferimento (RfD)

### 2.2.1 Indici biologici e valori di riferimento

I risultati ottenuti dal monitoraggio biologico tramite determinazione di uno xenobiotico o suoi metaboliti in matrici biologiche, permette la distinzione di tre tipi di indicatori biologici (IBE):

- indicatori biologici di esposizione,
- indicatori biologici di effetto,
- indicatori biologici di suscettibilità.

Gli Indicatori biologici di esposizione indicano la dose di sostanza effettivamente assorbita dall'individuo dello xenobiotico o di un suo metabolita nel corso dell'esposizione mediante la misura della concentrazione in campioni biologici (urine, sangue, saliva, capelli, aria espirata, ecc.) [6]. La principale applicazione di tali indicatori riscontrati nei lavoratori consiste nel confrontarli con i valori limite di esposizione disponibili come ad esempio i BEI (*Biological Exposure Indices*) dell'ACGIH (*American Conference of Governmental Industrial Hygienists*) (Tabella 2). Ad esempio: l'acido trans,trans-muconico (t,t-MA) urinario, metabolita minore del benzene, è un biomarker di esposizione professionale al benzene [9].

Gli Indicatori biologici di effetto permettono di identificare un'alterazione precoce e reversibile secondaria all'esposizione ad uno xenobiotico che si sviluppa nell'organo critico. L'uso più appropriato è la stima del rischio degli effetti a lungo termine, allo scopo di individuare eventuali interventi di prevenzione primaria se gli effetti considerati sono reversibili o come strumenti diagnostici per l'identificazione precoce se, gli effetti a carico dell'organo bersaglio, fossero irreversibili [10,11]. Ad esempio: l'acido-aminolevulinico (ALA) è un composto intermedio della biosintesi dell'eme ed è trasformato in porfobilinogeno per azione dell'enzima ALA deidratasi. Questo enzima è fortemente inibito dalla presenza di piombo nel sangue, per cui i soggetti esposti al piombo hanno di conseguenza un accumulo di ALA nell'organismo che viene successivamente escreto nelle urine (ALA-U) [12].

Gli Indicatori biologici di suscettibilità derivano da differenze individuali, di origine genetica (sesso, etnia, modificazione in geni che controllano la attivazione metabolica, etc...) o acquisita (dieta, stato di salute, stato socioeconomico, età). Tali differenze non si evidenziano in assenza di opportune sollecitazioni. Il risultato può essere una limitata capacità dell'organismo di rispondere all'esposizione ad un determinato xenobiotico e di conseguenza

una ipersensibilità o un aumento della dose interna. Per valutare correttamente il rischio soggettivo associato allo sviluppo di una determinata malattia, è fondamentale la conoscenza di tali fattori genetici predisponenti [13]. Ad esempio: Il fenotipo “acetilatore lento” dovuto a polimorfismo del gene N-acetiltransferasi 2 (NAT-2) è risultato associato al cancro della vescica in soggetti esposti ad ammine aromatiche [14].

<b>NOME</b>	<b>ASSOCIAZIONE</b>	<b>PROVENIENZA</b>
BEI ( <i>Biological Exposure Indices</i> )	ACGIH	USA
BAT ( <i>Biologischer Arbeitsstoff Toleranz- Wert</i> ”: <i>Biological tolerance values for occupational exposures</i> ”)	DFG	Germania
EKA ( <i>Expositions äquivalente für krebserzeugende Arbeitsstoffe</i> )	DFG	Germania
BLV ( <i>Biological Limit Values</i> )	SCOEL	UE
BGV ( <i>Biological Guide Values</i> )		

Tabella 2- Denominazione dei valori limite per il monitoraggio biologico per USA, Germania e UE.

I risultati ottenuti dal monitoraggio biologico sono valutati attraverso la loro comparazione rispetto ad importanti valori di riferimento definiti come accettabili, ricordando che tale operazione non distingue con certezza un’esposizione pericolosa da una non pericolosa e che il superamento dei valori limite, a causa della variabilità biologica, non implica necessariamente un aumento del rischio per la salute. Le liste più importanti di valori di riferimento (Tabella 2) sono rappresentate dai BEI dell’ACGIH e dai BAT (*Biological tolerance values for occupational exposures*) per i chimici in generale e gli EKA valori biologici equivalenti per esposizioni a chimici classificati come cancerogeni della DFG [4,7]. Questi valori sono molto difficili da ottenere e sono proposti solo per un numero limitato di sostanze; inoltre, possono derivare direttamente attraverso l’analisi dei rapporti dose-risposta o indirettamente dalla comparazione rispetto ai valori ambientali ritrovati negli ambienti di lavoro (Tabella 1).

I valori limite BEI per le sostanze chimiche rilevate nelle matrici biologiche sono proposti dall’ACGIH come valori di riferimento utili per la valutazione dei rischi per la salute dell’uomo. Gli IBE rappresentano i valori del livello dell’indicatore che è possibile riscontrare

in campioni prelevati su lavoratori esposti a livelli di concentrazione nell'aria dell'ordine di grandezza del TLV- TWA.

Anche la DFG (Commissione per la valutazione dei rischi per la salute dovuti a prodotti chimici industriali) propone valori di riferimento utili per una migliore stima del rischio. La definizione dei MAK (Tabella 1) e quella dei BAT (Tabella 2) sono collegate in modo biunivoco esprimendo le prime le concentrazioni ambientali e le seconde le corrispondenti concentrazioni rilevate in matrici biologiche della sostanza o di un suo metabolita che generalmente non si associano ad effetti negativi sulla salute degli operatori esposti.

Il Comitato Scientifico per i limiti dell'esposizione professionale (SCOEL) istituito dall'UE, raccomanda i BLV (valori limite biologici) che rappresentano le dosi assorbite più probabili in campioni raccolti da lavoratori esposti alla sostanza in questione, esclusivamente per inalazione, ad una concentrazione pari ai valori limite ambientali (Tabella 1); laddove i dati tossicologici non possono supportare un BLV basato sulla salute, la SCOEL ha stabilito dei valori orientativi BGV (valori guida biologici) che rappresentano la concentrazione della sostanza o di un suo metabolita in qualsiasi mezzo biologico appropriato corrispondente ad un certo percentile (generalmente 90 o 95) in una popolazione di riferimento definita [15].

Le normative italiane prevedono limiti solo per gli indicatori biologici di esposizione: VLB. Il D.Lgs. 81/2008, allegato XXXIX, ad oggi fa riferimento solo alla concentrazione di piombo nel sangue. Altri valori di riferimento vengono pubblicati periodicamente anche dalla SIVR (Società Italiana Valori di Riferimento).

### **2.3 Monitoraggio degli effetti reversibili (MER)**

Il monitoraggio degli effetti reversibili mira a identificare gli individui con segni precoci di effetti nocivi per la salute, cioè effetti che possono essere reversibili o che non progrediscono quando le condizioni di esposizione vengono migliorate. Lo scopo non è quello di diagnosticare le malattie professionali, che sono la conseguenza di inadeguati sistemi di prevenzione.

Viene effettuato dal medico del lavoro che si avvale dell'esame di parametri preclinici per tenere sotto controllo organi specifici e per attuare correttamente il programma di sorveglianza sanitaria (S.S), l'attività medica finalizzata a identificare, quanto più precocemente possibile, alterazioni dello stato di salute che possano essere la conseguenza dell'esposizione a xenobiotico [16].

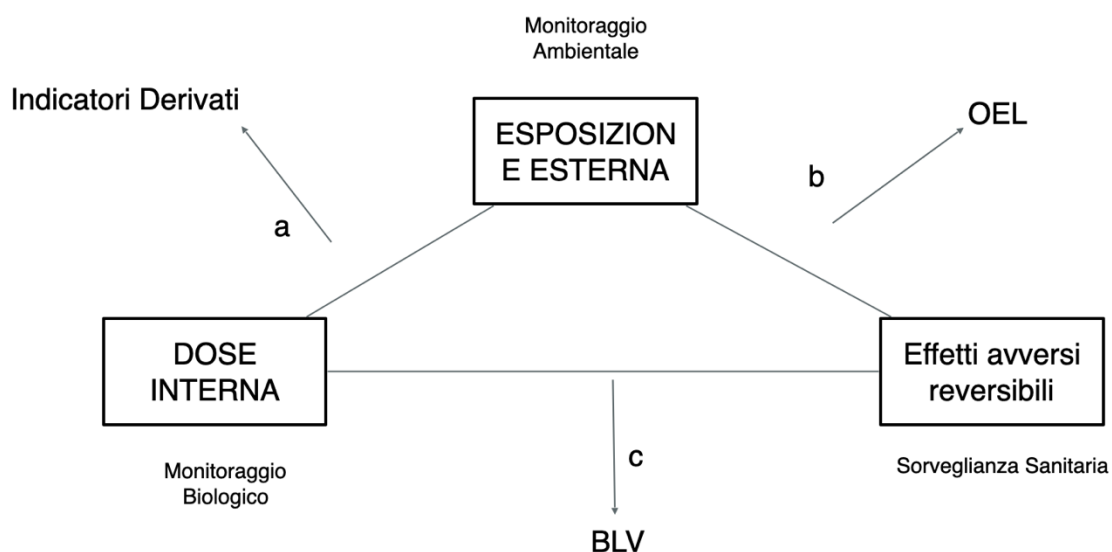


Figura 3– Schema riassuntivo dei rapporti tra monitoraggio ambientale (MA), monitoraggio biologico (MB) e Sorveglianza Sanitaria (MER) e relativi indici di riferimento.

I tre tipi di monitoraggio sono schematizzati in Figura 3. Se è nota la relazione tra l’esposizione esterna ed effetti avversi, cioè se ci sono degli studi che dimostrano che a determinate concentrazioni si iniziano ad avere effetti avversi, allora è possibile stabilire dei limiti di esposizione ambientale. Se invece è nota la relazione fra la dose interna (monitoraggio biologico) e danni agli organi (effetti avversi reversibili), è possibile definire dei limiti di esposizione biologica. Se è nota una di queste due relazioni ed è noto il rapporto tra esposizione esterna e dose interna, allora si possono avere degli indicatori derivati.

## 2.4 Sostanze cancerogene e mutagene

### 2.4.1 Classificazione

Il regolamento UE n.1272/2008, denominato CLP (*Classification, Labelling and Packaging of Chemicals*), in vigore dal 20/1/2009, classifica le sostanze cancerogene e mutagene come indicato in Tabella 3.

Cancerogene		Mutagene	
<b>Categoria 1A</b>	Sostanze di cui sono noti effetti cancerogeni per l'uomo	<b>Categoria 1A</b>	Sostanze di cui è accertata la capacità di causare mutazioni ereditarie nelle cellule germinali umane

<b>Categoria 1B</b>	Sostanze di cui si presumono effetti cancerogeni per l'uomo	<b>Categoria 1 B</b>	Sostanze da considerare capaci di causare mutazioni ereditarie nelle cellule germinali umane
<b>Categoria 2</b>	Sostanze di cui si sospettano effetti cancerogeni per l'uomo	<b>Categoria 2</b>	Sostanze che destano preoccupazione per il fatto che potrebbero causare mutazioni ereditarie nelle cellule germinali umane

Tabella 3- Classificazione CLP- UE sostanze cancerogene e mutagene

Oltre all'Unione Europea, altri Enti nazionali e internazionali effettuano la classificazione di cancerogenicità di agenti chimici. La IARC (*International Agency for Research on Cancer – Francia*) individua 4 gruppi di cancerogenicità, come riportato in Tabella 4.

<b>Gruppo 1</b>	Cancerogeni umani	
<b>Gruppo 2</b>	<b>Sottogruppo 2a</b>	Probabili cancerogeni umani
	<b>Sottogruppo 2b</b>	Possibili cancerogeni umani
<b>Gruppo 3</b>	Non classificabili come cancerogeni	
<b>Gruppo 4</b>	Non cancerogeni per l'uomo	

Tabella 4 – Classificazione IARC sostanze cancerogene

La classificazione EPA (*Environmental Protection Agency – USA*) è invece indicata in Tabella 5.

<b>Gruppo A</b>	Cancerogeni umani	
<b>Gruppo B</b>	<b>Sottogruppo B1</b>	Probabili cancerogeni umani con evidenza limitata di cancerogenicità in studi epidemiologici ma con evidenza sufficiente in studi sugli animali
	<b>Sottogruppo B2</b>	Probabili cancerogeni umani con evidenza sufficiente in studi sugli animali ma con evidenza inadeguata, o assenza di dati in studi sull'uomo
<b>Gruppo C</b>	Sospetti cancerogeni umani	
<b>Gruppo D</b>	Non classificabili come cancerogeni	
<b>Gruppo E</b>	Non cancerogeni	

Tabella 5 – Classificazione EPA sostanze cancerogene

La classificazione ACGIH (*American Conference of Governmental Industrial Hygienists – USA*) è infine descritta in Tabella 6.

<b>Gruppo 1A</b>	Cancerogeni riconosciuti per l'uomo
<b>Gruppo 1B</b>	Cancerogeni sospetti per l'uomo
<b>Gruppo 1C</b>	Cancerogeni riconosciuti per gli animali
<b>Gruppo 1D</b>	Non classificabili come cancerogeni per l'uomo
<b>Gruppo 1D</b>	Non sospetti come cancerogeni per l'uomo

Tabella 6- Classificazione ACGIH sostanze cancerogene

È utile sottolineare che non sempre le classificazioni sono concordi per uno stesso agente [17].

#### 2.4.2 Meccanismi d'azione

L'aumento del numero di tumori nella popolazione generale porta ad un interesse sempre maggiore per gli agenti cancerogeni e mutageni. Il cancro è la principale causa di morte correlata al lavoro nei paesi sviluppati [18]; i tumori che si sviluppano in un soggetto in sede lavorativa sono detti tumori professionali. È piuttosto difficile determinare un cancerogeno come causa eziologica, soprattutto nel luogo di lavoro in quanto possono trascorrere molti anni dalla prima esposizione al cancerogeno alla comparsa del tumore; quindi, è complicato ricostruire la relazione causa-effetto; inoltre, si deve considerare la possibilità di altre esposizioni a sostanze pericolose durante la vita professionale e non, che possono influenzare l'insorgenza del tumore.

Il bersaglio cellulare principale delle sostanze cancerogene è rappresentato dalle macromolecole ed in particolare dal DNA e quasi tutti gli agenti cancerogeni agiscono provocando modificazioni stabili del DNA, essendo dunque potenziali agenti mutageni. In particolare, il termine mutagenesi si riferisce a dei processi chimico-fisici che apportano modifiche nella sequenza nucleotidica (mutazione) del materiale genetico e possono avvenire a livello genico (mutazioni geniche), cromosomico (mutazioni o aberrazioni cromosomiche strutturali) o genomico (mutazioni o aberrazioni cromosomiche numeriche, quali ad esempio aneuploidie e poliploidia). Questi cambiamenti possono colpire cellule somatiche, con un possibile inizio della trasformazione neoplastica o cellule germinali, causando difetti ereditabili. Oltre che genotossici, i cancerogeni possono essere anche epigenetici. I cancerogeni genotossici sono capaci di interagire con il genoma cellulare, sia della linea germinale che somatica; le attività di tipo genotossico comprendono, oltre alle mutazioni,

diversi effetti avversi ai danni del materiale genetico, quali ad esempio: danni al DNA come rotture a singola o doppia elica, addotti al DNA, sintesi non programmata del DNA, scambi tra cromatidi fratelli, ricombinazione mitotica. I cancerogeni epigenetici sono sostanze che non modificano la sequenza nucleotidica del DNA, ma il modo in cui le informazioni in essa contenute vengono utilizzate, modificando l'espressione dei geni; tali alterazioni si possono concretizzare ad esempio in: inibizione degli enzimi che catalizzano la corretta duplicazione del DNA, blocco della capacità di riparare un danno al DNA, meccanismi citotossici, squilibri ormonali, immunosoppressione [19].

Quando un cancerogeno chimico viene a contatto con l'individuo ed è assorbito può accadere che raggiunga le cellule dell'organismo. La cellula colpita può quindi andare incontro a fenomeni di alterazione genetica (iniziazione), che possono indurre la trasformazione di una cellula da normale a tumorale. La cellula "iniziata" proliferando dà origine ad una lesione preneoplastica (promozione), che a sua volta può evolvere in un tumore maligno (conversione). A distanza di tempo dal primo contatto, attraverso la fase di progressione, il tumore si sviluppa ulteriormente diventando clinicamente evidente [20].

In un'ottica di prevenzione primaria del rischio cancerogeno è importante considerare che la relazione tra i livelli di esposizione e la probabilità di sviluppo di tumori sia di tipo lineare e che il rischio zero vi sia solo in assenza di esposizione. Ricordando che il comportamento di molte sostanze cancerogene è difficilmente classificabile in modelli comportamentali netti, risulta complessa la valutazione della potenza mutagena, del meccanismo di azione e della suscettibilità individuale.



### 3. Benzene

#### 3.1 Caratteristiche chimico-fisiche

Formula molecolare:  $C_6H_6$

Peso molecolare: 78.11 g/mol

Numero di Registro CAS: 71-43-2

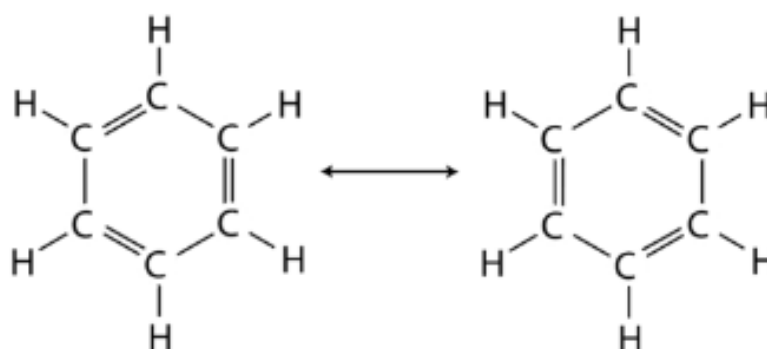


Figura 4 – Rappresentazione della struttura benzene che si pone a metà tra due “cicloesatrieni” equivalenti

La struttura del benzene (Figura 4) fu determinata nel 1865 dal chimico inglese Kekulé, il quale pose le basi della teoria dell’aromaticità. Il benzene ha una struttura planare, è formato da 6 atomi di C, ibridizzati  $sp^2$ , ognuno dei quali è legato ad un atomo di H. Ogni angolo di legame misura  $120^\circ$  e i legami hanno uguale lunghezza, posta a metà tra un legame singolo e un legame doppio. Ogni atomo di C condivide con gli altri il proprio elettrone spaiato, quindi, nella nuvola elettronica sono presenti 6 elettroni delocalizzati: l’anello benzenico è, pertanto, un anello aromatico. L’aromaticità è la proprietà fondamentale che distingue i composti aromatici dai non-aromatici sia in termini di stabilità che in termini di reattività chimica.

Il benzene è un liquido da incolore a giallo chiaro a temperatura ambiente che ha un punto di fusione di  $5,5^\circ C$  e un punto di ebollizione a  $80,1^\circ C$ ; la rapida evaporazione a temperatura ambiente è dovuta al punto di tensione di vapore di 9,95 kPa a  $20^\circ C$ . Altamente infiammabile con un flash point molto basso e ha un odore simile a benzina [21,22].

Il benzene si dissolve leggermente in acqua ed è miscibile alla maggior parte dei solventi organici. In base alla sua concentrazione in aria, al clima e alla presenza di altre sostanze, il benzene presenta un tempo di permanenza che varia da poche ore a pochi giorni.

## 3.2 Utilizzo e produzione

Nell'industria il benzene viene utilizzato come solvente ma, nelle applicazioni che comportano una esposizione diretta, viene sostituito da altri solventi per via della sua pericolosità; come intermedio chimico e nella sintesi di numerosi prodotti chimici che vengono utilizzati per produrre plastica, resine, nylon e fibre sintetiche; per produrre alcuni tipi di gomme, lubrificanti, coloranti, detersivi, farmaci e pesticidi [23].

Il benzene è anche un costituente in tracce impiegato come antidetonante nella “benzina verde” (la sua concentrazione non può essere superiore all’1% (Direttiva Europea 98/70/EC)). Infatti, il traffico veicolare è la principale causa dell’inquinamento ambientale da benzene: prevalentemente gli autoveicoli rilasciano benzene attraverso i gas di scarico e più limitatamente tramite l’evaporazione della benzina durante trasporti, stoccaggio, rifornimenti, nonché nei momenti di marcia e arresto, compresa la sosta prolungata in un parcheggio.

Il benzene può essere presente in acqua e cibo per contaminazione attraverso gli scarichi industriali e l’inquinamento atmosferico oppure per migrazione dal materiale metallico delle confezioni [24]. Negli ambienti indoor, il fumo di sigaretta è una delle cause di inquinamento da benzene, insieme alla presenza di prodotti eventualmente contaminanti (es: vernici, colle, solventi ecc.); il benzene può penetrare anche da aree con elevato inquinamento (es vie ad alto traffico, parcheggi sotterranei, autofficine) tramite prese d'aria collocate erroneamente.

Il benzene è formato sia da processi naturali (emissioni vulcaniche e incendi boschivi) che da attività umane: fino alla Seconda Guerra Mondiale il benzene proveniva principalmente dalla distillazione del carbone per la produzione del coke destinato alle acciaierie. Negli anni successivi, la crescita dell’industria e il conseguente aumento della richiesta di benzene hanno portato alla sua produzione a partire dal petrolio, di cui il benzene ne rappresenta una parte naturale, e che oggi costituisce il metodo principale di produzione, solo una piccola parte deriva dal carbone [23].

Le principali attività lavorative a rischio di esposizione al benzene sono [25,26,27]: distillazione del petrolio, produzione e distribuzione di carburanti, intermedio e/o solvente per la produzione di farmaci, cosmetici, coloranti, etc, lavorazioni che implicano combustioni in generale. Gli studi sull'esposizione professionale per i lavoratori esposti al benzene in Italia sono inclusi nella Tabella 7.

<b>Work area/occupation</b>	<b>n</b>	<b>Mean (<math>\mu\text{g}/\text{m}^3</math>)</b>	<b>Median (<math>\mu\text{g}/\text{m}^3</math>)</b>	<b>Range (<math>\mu\text{g}/\text{m}^3</math>)</b>
Oil refinery workers [28]	32	25		
Fuel tank drivers [29]	18	307	247	7-1017
Fuel tank drivers [29]	17	280	246	7-1020
Gasoline station workers [30]	89	59		5-284 (5-95 percentile)
Filling station attendants [29]	24	23	20	4-66
Filling station attendants [29]	13	20	14	5-53
Service station attendants	28		40	8-260
Gasoline pump maintenance workers [31]	21		24	5-515
Petrolchemical industry: Operators	145	45	10	<3-90
Outdoor operators [32]	173	35	9	2-895
Petrolchemical industry workers [31]	33		28	2-594
Forest workers using chainsaw [33]	80	71	45	

*Tabella 7- Alcuni studi in cui si riportano le principali attività lavorative a rischio di esposizione al benzene in Italia. Le concentrazioni di benzene sono riportate in  $\mu\text{g}/\text{m}^3$ .*

### **3.3 Limiti di benzene imposti dalla legge e valutazione dell'esposizione**

L'allegato III della direttiva 2004/37/CE (direttiva del Parlamento e del Consiglio dell'UE del 2004) specifica un valore limite per l'esposizione professionale al benzene di 1 ppm (3,25  $\text{mg}/\text{m}^3$ ) e una "nota cutanea" che indica che vi è un contributo sostanziale al carico corporeo totale possibile attraverso l'esposizione cutanea.

Il monitoraggio biologico rappresenta uno strumento indispensabile per la valutazione dell'effettiva esposizione individuale e di gruppo a benzene, complementare ma non alternativo al monitoraggio ambientale. Il monitoraggio biologico di lavoratori esposti a basse concentrazioni di benzene richiede l'uso tecniche altamente sensibili e selettive [34] per determinare il benzene o i suoi metaboliti nel corpo. Sono disponibili diversi indicatori biologici per misurare il benzene o suoi metaboliti nel corpo [21]:

- il benzene nel sangue (di solito non viene utilizzato come parametro di biomonitoraggio),

- il benzene nelle urine, un parametro di biomonitoraggio adatto per il quale sono disponibili metodi analitici sensibili,
- l'acido S-fenilmercapturico (SPMA) nelle urine, un parametro di biomonitoraggio adatto per il quale sono disponibili metodi analitici sensibili.
- l'acido trans, trans-muconico (t,t-MA) nelle urine, un parametro di biomonitoraggio per il quale sono disponibili metodi sensibili.

### 3.4 Cinetica e metabolismo

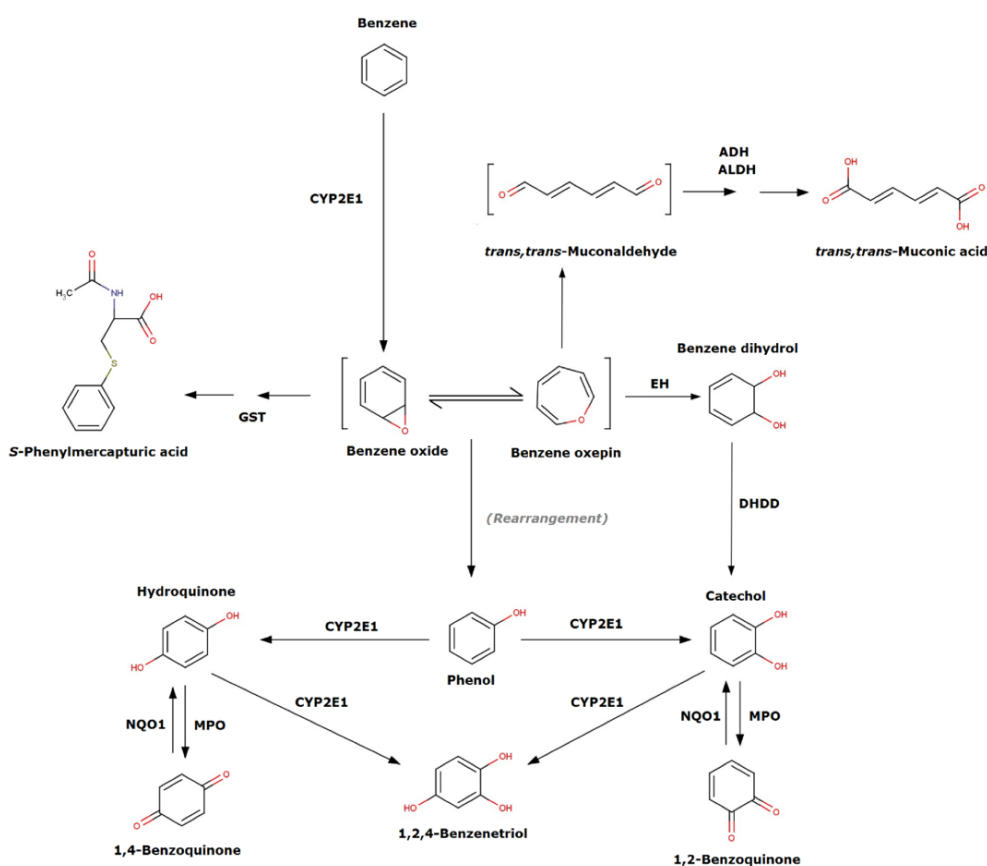


Figura 5 – Metabolismo del benzene. ADH: alcol deidrogenasi; ALDH: aldeide deidrogenasi; CYP2E1: citocromo P450 2E1; DHDD: didrodio deidrogenasi; EH: epossido idrolasi; GST: glutatione-S-transferasi; MPO: mieloperossidasi; NQO1: NAD(P)H:chinone ossidoreduttasi

Il benzene viene assorbito principalmente tramite inalazione, mentre l'esposizione orale o cutanea è minore [35]. Dopo l'esposizione, il benzene si distribuisce in tutti i tessuti, nei fluidi biologici e nella placenta, indipendentemente dalla via di assunzione. La distribuzione del benzene dipende dal grado di perfusione dei tessuti, con maggiori quantità in organi come il polmone, il cervello, il rene e la milza. Le concentrazioni decadono rapidamente cessata l'esposizione. Il metabolismo ossidativo (figura 5) avviene primariamente nel fegato

attraverso il sistema del citocromo p-450 (isoenzima 2E1) che determina l'ossidazione del benzene a benzene ossido (epossido), il quale viene rapidamente trasformato in fenolo che rappresenta il prodotto metabolico quantitativamente più importante nell'uomo.

Il fenolo può essere ossidato, sempre ad opera del Cyt P450, a idrochinone e catecolo, la cui ulteriore ossidazione determina la formazione di para e orto benzochinone, reazione che può essere reversibile ricostituendo nuovamente catecolo e idrochinone [36].

I metaboliti del benzene sono metabolizzati in glucurono-coniugati e solfo-coniugati ed escreti nelle urine. Altrimenti, il benzene ossido può essere idrolizzato, tramite idrolasi, a benzene diidrodiole, che può essere ulteriormente ossidato a trans-trans muconaldeide, una specie chimica reattiva ad anello aperto, che porta alla produzione della forma completamente ossidata di acido trans,trans muconico (t,t-MA), escreto direttamente nelle urine [21,24,36].

Tramite un pathway minore, il benzene ossido può reagire con il glutatione (GSH), catalizzato dalla glutatione-S-transferasi (GST), formando l'acido pre-fenilmercapturico che può aromatizzare attraverso disidratazione in condizioni acide ad acido S fenil-mercapturico (S-PMA), il quale viene eliminato attraverso le urine.

Una quota di benzene non metabolizzato può essere escreta direttamente nelle urine per diffusione passiva dal sangue durante il processo di filtrazione glomerulare renale. Una percentuale variabile della dose di benzene assorbito è eliminata anche attraverso la respirazione [37,38]. I metaboliti del benzene possono essere attivati dalle perossidasi nel midollo osseo (MPO) in radicali semichinonici che generano specie reattive dell'ossigeno, causando ulteriori danni alle cellule del midollo osseo, che potrebbero essere essenziali per il determinismo delle malattie ematologiche [39].

Inoltre, è stato dimostrato che la complessità del metabolismo del benzene è aumentata da polimorfismi genetici che sono stati descritti per gli enzimi implicati nel metabolismo del benzene come CYP2E1, glutatione-S-transferasi (GST) GSTM1, GSTT1, GSTP1 e NAD(P)H:chinone oxidoreduct [21].

### **3.5 Effetti sulla salute e cancerogenicità**

L'intossicazione acuta da benzene è associata per lo più all'inalazione a livelli elevati di benzene (molto più alti di quelli presenti normalmente nel nostro ambiente).

Respirare alti livelli di benzene, mangiare cibi o bere bevande contenenti alti livelli di benzene può provocare effetti acuti quali: sonnolenza, vertigini, battito cardiaco rapido o irregolare, mal di testa, nausea, tremori, convulsioni, confusione, irritazione oculare, perdita

di coscienza, morte acuta nei casi più gravi dovuta alla fibrillazione ventricolare causata dallo sforzo e dal rilascio di adrenalina. I bersagli principali dell'esposizione acuta al benzene sono, quindi, il sistema nervoso ed il cuore. Invece, esposizioni a lungo termine (croniche), di maggiore durata e a più basse dosi di benzene, possono provocare effetti sul sangue (sistema emopoietico): in particolare, una riduzione dei globuli rossi e bianchi causata da tossicità al midollo osseo (produttore delle cellule del sangue), che può portare ad una conseguente anemia. Può anche determinare sanguinamenti ed effetti sul sistema immunitario aumentando, così, il rischio di contrarre un'infezione [23,40]. Può determinare alterazione della spermato/spermiogenesi nell'uomo; prematurità e ipopeso nelle donne [41].

Il regolamento UE n.1272/2008, denominato CLP (*Classification, Labelling and Packaging of Chemicals*), in vigore dal 20/1/2009, classifica il benzene nel gruppo 1A delle sostanze cancerogene (Carc 1A; H350), cioè tra le sostanze di cui sono noti gli effetti cancerogeni nell'uomo e nel gruppo 1B delle sostanze mutagene (Muta 1B; H340), ossia sostanze da considerare capaci di causare mutazioni ereditarie nelle cellule germinali umane (Tabella 3). Altre classificazioni di cancerogenicità non-UE per il benzene sono:

- IARC: gruppo 1 (Tabella 4),
- EPA: gruppo A (Tabella 5),
- ACGIH: gruppo A1 (Tabella 6).

Diversi studi hanno dimostrato che l'esposizione professionale al benzene è in grado di causare l'insorgenza di neoplasie solide come il cancro al seno [42,43], tra cui [44] uno studio epidemiologico di coorte su lavoratrici che impiegano colle a base di benzene in un'industria calzaturiera in Italia. È, invece, ben noto che l'esposizione cronica al benzene è associata a un rischio di leucemia mieloide acuta (LMA) [45,46] e di altre forme di malignità come le neoplasie linfoproliferative. Le LMA sono un insieme di tumori ematologici caratterizzati da una crescita clonale di cellule progenitrici mieloidi immature nel midollo osseo e nel sangue periferico, che genera una massa di cellule non funzionali, inducendo neutropenia, anemia e trombocitopenia. I linfomi sono un gruppo composito di neoplasie del sistema ematopoietico che si distinguono, in base alla crescita anormale delle cellule linfoidee o dei loro precursori, in: linfoma non-Hodgkin (NHL, 90%) e linfoma di Hodgkin (HL, 10%). Ci sono anche correlazioni tra esposizione al benzene e mieloma multiplo (MM), una neoplasia plasmatica caratterizzata da una proliferazione aberrante di linfociti B clonali e differenziati terminali [47], e leucemia linfoblastica acuta (ALL) che è il tipo più frequente di tumore infantile e che

probabilmente può iniziare da una esposizione della madre al benzene, rilevante anche nel suo esordio e progressione [48].

Tutti i tumori ematopoietici derivano da cellule staminali alterate [49]; il benzene e i suoi metaboliti causano tossicità alle cellule staminali emopoietiche (HSC) e determinano effetti negativi sull'ambiente ematopoietico (BM): la nicchia MB è un ambiente specifico contenente diverse cellule staminali ematopoietiche, cellule stromali, cellule immunitarie, matrice e citochine. Il contatto con il benzene diminuisce non solo il tasso e la quantità di BM HSC negli animali, ma riduce anche la generazione di colonie, che è stata riportata anche nelle analisi in vivo [50,51]. In particolare, i meccanismi ritenuti responsabili della tossicità del benzene sono la formazione di chinoni reattivi e l'aumento delle specie reattive dell'ossigeno (ROS): studi su sistemi modello hanno mostrato che gli effetti delle ROS bersagliano principalmente i mitocondri [52] e studi sull'uomo hanno dimostrato che l'esposizione professionale è associata ad un aumento del numero di copie del DNA mitocondriale [53]. Il benzene, infatti, può provocare alterazioni dell'ossidazione degli acidi grassi e del relativo metabolismo energetico. Considerando che gli acidi grassi sono necessari per il controllo delle HSC e del loro auto-rinnovamento [54], quanto detto suggerisce che l'esposizione al benzene potrebbe causare ematotossicità attraverso la compromissione del metabolismo degli acidi grassi mitocondriali e la relativa bioenergetica. Inoltre, i metaboliti attivi (idrochinone e catecolo) possono inibire la topoisomerasi II, enzima coinvolto nei processi di riparazione e replicazione cellulare [55] e il conseguente danno ossidativo al DNA può aumentare l'espressione degli inibitori del ciclo cellulare causando una senescenza prematura delle HSC e una alterazione funzionale delle stesse [56].

Il benzene può inoltre causare instabilità genica associata a difetti nella ricombinazione, rotture a doppio filamento e anomalie a carico del fuso mitotico, che causano aberrazioni cromosomiche e numeriche [57]. Le azioni genotossiche del benzene successive allo stress ossidativo e all'inibizione della topoisomerasi II sono state verificate da studi di trascrittomici in animali p53-knockout e wild-type [58]. L'effetto genotossico del benzene è stato identificato come possibile meccanismo alla base della trasformazione neoplastica in tumori ematologici, insieme all'aumento dello stress ossidativo e dell'infiammazione e l'induzione di immunosoppressione.

Tuttavia, le alterazioni genetiche e le altre cause sono insufficienti per giustificare pienamente i diversi fenomeni che influenzano l'insorgenza di neoplasie ematologiche, occorre considerare anche la disregolazione epigenetica. Infatti, l'esposizione a lungo termine al benzene può anche indurre modifiche nell'espressione di geni coinvolti nella riparazione del

DNA, nell'inibizione della proliferazione, nell'apoptosi, di recettori nucleari, modificando la funzione di proteine regolatrici, tra cui le oncoproteine e le proteine soppressore del tumore, influenzando lo sviluppo cancerogeno [59,60,66]. L'integrazione di questi percorsi evidenzia la complessità dei potenziali processi correlati alla tossicità del benzene alla base del rischio di malattia.

### **3.6 Polimorfismi metabolici**

Si definiscono "alleli" le variazioni di sequenza in corrispondenza di specifiche localizzazioni del genoma umano (locus genico). Si utilizza il termine "normale" o "wild-type" per indicare la variante più comune in una data popolazione; se la frequenza dell'allele meno rappresentato è  $> 1\%$ , la variazione prende il nome di "polimorfismo" genetico, variazioni coinvolte nella definizione delle differenze inter-individuali. Il termine "mutazione" viene invece generalmente riservato a variazioni nella sequenza del DNA note per essere patologiche e che si distribuiscono con prevalenze non superiori all'1%. I polimorfismi metabolici sono, dunque, i polimorfismi genetici che possono influenzare l'attività di enzimi e recettori, fattori trascrizionali coinvolti nelle reazioni di attivazione o detossificazione degli xenobiotici. Per questo, i polimorfismi metabolici possono modificare le relazioni tra esposizione ed indicatori di dose interna e possono essere utilizzati come indicatori di suscettibilità in quanto possono influenzare le manifestazioni cliniche [61].

In particolare, per il benzene esistono polimorfismi dei geni coinvolti nel suo metabolismo che influenzano la suscettibilità individuale alla leucemia [63]. Il CYP2E1 è responsabile dell'ossidazione del benzene a intermedi reattivi (Figura 5), passaggio fondamentale coinvolto nella tossicità cellulare nonché limitante nell'escrezione dei metaboliti. In uno studio di esposizione al benzene, è stata trovata una correlazione tra conta dei globuli bianchi ridotta e genotipi con alleli varianti di CYP2E1 nella regione del promotore [63]; sono stati segnalati alcuni polimorfismi del CYP2E1 come associati al rischio di cancro [21] ma i risultati sono contrastanti, probabilmente perché le frequenze degli alleli e dei genotipi dei polimorfismi CYP2E1 hanno differenze significative tra i diversi gruppi etnici. Il glutatione-S-transferasi (GST) è una famiglia di geni costituita da diverse sottofamiglie, tra cui GSTM1, GSTT1 e GSTP1 coinvolti nella detossificazione dell'ossido di benzene a SPMA (Figura 5) e importanti mediatori nelle risposte allo stress ossidativo [62]. Le varianti genetiche di GSTM1 e GSTT1 consistono nella completa delezione dei geni e nella perdita della corrispondente attività



enzimatica [63]. In uno studio su lavoratori esposti al benzene [64] è stata trovata una correlazione tra conta dei globuli bianchi ridotta e genotipi nulli GSTM1 e GSTT1. Nello stesso studio è stata anche valutata l'attività dell'epossido idrolasi microsomiale (mEH) confrontando un gruppo con mEH lento (polimorfismo del gene EPHX1 che determina un'a riduzione dell'attività dell'idrolasi) con un gruppo con attività mEH veloce (polimorfismo che determina un aumento dell'attività dell'idrolasi): il gruppo con mEH veloce aveva una conta dei globuli bianchi inferiore. A livello del midollo osseo, la mieloperossidasi (MPO) metabolizza i metaboliti del benzene idrochinone e catecolo in chinoni tossici e radicali liberi (Figura 5) che generano specie reattive dell'ossigeno, portando alla tossicità specifica del benzene nei globuli bianchi. MPO è espresso abbondantemente nei granulociti neutrofili, un sottotipo di globuli bianchi, per produrre acidi ipoalosi utili per l'attività antimicrobica. Il particolare, per il polimorfismo G463A (MPO) è stato osservato che la riduzione dei globuli bianchi era meno grave nei soggetti con genotipi AG o AA che nei soggetti omozigoti GG [65]. NAD(P)H:chinone ossidoreduttasi 1 (N001) catalizza la riduzione e la detossificazione dei chinoni, evitando la formazione di radicali liberi e ROS, proteggendo quindi le cellule dai loro effetti avversi. NQ01\*2 (C609T) è il polimorfismo più importante, sia in termini di frequenza che di conseguenze fenotipiche [63]. Un altro studio su lavoratori esposti al benzene ha esaminato la correlazione tra aneuploidia indotta dal benzene e l'influenza dei polimorfismi genetici (GSTM1, GSTT1, GSTP1, NAT2, NQO1 e CYP2E1) sulle aberrazioni cromosomiche. È stato riscontrato che la presenza dei genotipi GSTM1-null e GSTT1-null, acetilatore lento di NAT2, una variante del genotipo NQO1 e due varianti di CYP2E1, erano associati con un aumento di frequenze di aneuploidia tra gli individui dopo aggiustamenti per fattori di rischio (età, consumo di alcol, fumo), in particolare aumenti sia della monosomia che della trisomia dei cromosomi 8 e 21 [67].

È utile considerare che la presenza di fattori di rischio e coesposizioni ad altre sostanze pericolose può condurre a stime di rischio che risentono delle prevalenze di questi e quindi soggette ad ampia variabilità.

#### **4. Scopo della tesi**

Fase 1. Indagare l'effetto dell'esposizione alla molecola cancerogena benzene sul quadro del sangue, monitorando la presenza di acido trans,trans-muconico (t,t-MA), biomarcatore dell'esposizione al benzene, nelle urine ed eventuali alterazioni dell'emocromo in circa 150 lavoratori esposti.

Fase 2. Effettuare un lavoro di ricerca bibliografica e di revisione con lo scopo di racchiudere tutte le informazioni contenute nelle varie banche dati relative alle sostanze tossiche attualmente note e inserirle in un'unica WebApp, "TocTox", creata dal laboratorio di analisi cliniche Biolab con l'intento di supportare il medico del lavoro nella gestione dei lavoratori esposti a sostanze tossiche.

## Fase 1: Effetti a breve termine del benzene sul quadro del sangue

La prima parte del lavoro di tesi è consistita nell'analisi di circa 150 campioni di urine di lavoratori esposti a benzene presso il centro analisi Biolab S.r.l. I lavoratori reclutati per lo studio sono prevalentemente impiegati come operatori in distributori di carburanti. L'obiettivo del monitoraggio biologico, in campo della tossicologia professionale, è la stima del carico di sostanze nocive, o dei loro metaboliti, e dei conseguenti rischi per la salute.

Nel caso del benzene, è stato determinato l'acido trans,trans-muconico nelle urine grazie a un metodo analitico mediante HPLC con rilevatore UV. Il prelievo delle urine è stato effettuato al termine di un turno lavorativo, considerato in letteratura il momento migliore per effettuare il campionamento [68]; le urine sono state immediatamente congelate a -25 °C e conservate fino al momento dell'analisi. Successivamente sono stati analizzati i parametri dell'emocromo: il prelievo del sangue è stato effettuato lo stesso giorno del prelievo delle urine e l'attenzione è stata focalizzata sulla conta di globuli bianchi e rossi.

### 4.1 Materiali e metodi

#### 4.1.1 Quantificazione dell'acido trans,trans-muconico nelle urine

##### Materiali

- Urine di fine turno
- 47000 Kit HPLC t,t-Muconic Acid in urine (Chromsystems)
- Vials di reazione (con protezione dalla luce) 1.5 ml
- Colonne Sample Clean Up
- Provette 5 ml
- Fiale sterili 1 ml per HPLC
- Micropipetta 1000 µl
- Vortex
- Centrifuga (Beckman coulter allegra x-30R)
- YL9100 HPLC
- Colonna HPLC Column t,t-Muconic Acid in Urine (Chromsystems)



Figura 6 - 47000 kit HPLC t,t-Muconic Acid in urine (Chromsystems)

- Mobile Phase t,t-muconic acid in urine (Chromsystems)

## Metodi

Partendo da 5 ml di urina, conservata a -25°C dal momento del prelievo, si effettua la purificazione del campione con la seguente procedura: si aggiungono, in un vial di reazione, 250 µl di urina e 270 µl di "Internal standard" e si miscelano brevemente (tramite vortex). Si carica nella colonnina, presente in un tubo da 5 ml (etichettato), il campione mescolato con lo standard interno utilizzato per compensare eventuali perdite subite dal campione durante la preparazione, e si centrifuga per circa 1 min a circa 2000 g, controllando che l'eluizione sia completa in ogni colonnina. Si elimina l'eluato e si ripone la colonna nel tubo. Nella colonna viene quindi caricato 1 ml di "Wash Buffer 1", si centrifuga a 2000 g per 1 min, si elimina l'eluato e si ripone la colonna. Si ripete quest'ultimo passaggio prima con "Wash Buffer 2" e successivamente con "Wash Buffer 3". A questo punto si cambia il tubo di raccolta, si carica nella colonna 1 ml di "Elution Buffer" e si centrifuga a 2000 g per 1 min.

Si mescola brevemente l'eluato e si caricano 20 µl del campione ottenuto in una fiala sterile da 1 ml per inserirlo nel sistema HPLC.

Il campione viene quindi analizzato mediante un YL9100 HPLC System, accoppiato ad un rivelatore UV/VIS YL9120 (260 nm). L'analisi mediante HPLC si effettua utilizzando una HPLC Column t,t-Muconic Acid in Urine (Chromsystems). Viene prima effettuato un lavaggio con fase mobile, quindi si colloca la colonna nell'apposita sede e si equilibra il sistema fino alla stabilizzazione della linea di base. Viene quindi iniettata la fase mobile con un flusso di 1.2 ml/min, temperatura 35°C e pressione 120 bar. Per garantire l'affidabilità dei risultati di separazione, prima dell'analisi dei campioni si calibra il sistema, iniettando lo standard di calibrazione fino a ottenere due cromatogrammi identici per tempi di ritenzione e aree/altezze dei picchi. La precisione e l'accuratezza delle analisi vengono verificate facendo passare un controllo in ogni serie di campioni.

I tempi di ritenzione sono circa 4,7 min per l'acido trans,trans-muconico e circa 7,4 min per lo standard interno. La separazione cromatografica richiede circa 17 min. (eventuali variazioni dei tempi di ritenzione possono essere causate, ad esempio, da variazione della temperatura).

## **Intervalli di riferimento**

- Il valore limite del benzene nell'aria in Italia ai sensi del D.Lgs. 81/08 è di 1 ppm (3,25 mg/m<sup>3</sup>).
- I valori di riferimento (VR) per il t,t-MA per soggetti non esposti professionalmente secondo la società Italiana Valori di Riferimento (S.I.V.R.) sono 15-165 µg/g creatinina. I VR sono definiti come “valori di un determinato indicatore ottenuto dall'elaborazione statistica dei risultati del suo dosaggio in campioni biologici provenienti da una popolazione di riferimento, selezionata secondo criteri predefiniti”. A tali valori ci si riferisce per interpretare i risultati di determinazioni dello stesso indicatore effettuati in individui o gruppi ad esposizione nota o sospetta. Il superamento di questi valori di riferimento non può essere in nessun modo interpretato come segnale d'insorgenza di una patologia o un evidente rischio per la salute, ma solo come indice di una variazione delle fonti di esposizione.
- L'indice Biologico di Esposizione (IBE) per il t,t-MA secondo l'American Conference of Governmental Industrial Hygienists (ACGIH) è di 500 µg/g creatinina (corrispondenti al valore medio di esposizione di 4 ppm di benzene nell'aria). L'IBE rappresenta il valore di concentrazione di un indicatore biologico corrispondente al livello di esposizione ambientale all'agente chimico di riferimento in concentrazione equivalente ai TLV (Threshold Limit Values); esso riguarda quindi le esposizioni in ambiente di lavoro. In altre parole, i TLV indicano, per ogni sostanza chimica, le concentrazioni atmosferiche alle quali si ritiene che la quasi totalità di un gruppo di lavoratori possa rimanere esposta, ripetutamente, giorno dopo giorno, senza subire effetti dannosi alla salute. La valutazione del loro significato, quindi, non avviene a livello individuale ma di gruppi omogenei di lavoratori. Per i motivi suddetti il BEI, a differenza dei VR, rappresenta un indice di esposizione cui è possibile attribuire un significato di rischio sanitario.

Il valore di t,t-MA viene normalmente espresso in µg normalizzato su g di creatinina per eliminare eventuali errori derivanti dalla possibile diluizione del campione (urina) a seguito di eccessiva idratazione.

## **Limiti inferiore e superiore di quantificazione del metabolita in urina**

Di seguito vengono riportati in Tabella 9 il limite inferiore e superiore di quantificazione dell'analisi strumentale.

Analyte	Lower limit of quantification (mg/l)	Upper limit of quantification (mg/l)
t,t-muconic acid	0,02	0,02 up to 10

Tabella 9- Limiti di quantificazione strumentale: limiti di concentrazione (mg/l) fino a cui è possibile ottenere strumentalmente una misura di tipo quantitativo dell'analita t,t-MA.

## 4.1.2 Analisi dell'emocromo

### Materiali

- XN Automated Haematology Analysers (Sysmex)
- Reagenti Dasit

### Metodi

Sono stati analizzati circa 150 campioni di sangue periferico raccolti in provette K<sub>3</sub>EDTA. I campioni sono stati analizzati sull'analizzatore ematologico (Sysmex) che ha eseguito in automatico il conteggio. L'analizzatore si basa su citometria a flusso in fluorescenza: il campione viene automaticamente miscelato con i reagenti Dasit, la miscela è immessa nella cella di flusso dove le cellule attraversano una dopo l'altra, mediante meccanismo di focalizzazione idrodinamica, il raggio di luce monocromatica di lunghezza d'onda  $\lambda=633$  nm. Opportuni sistemi ottici (fotodiodi, fotomoltiplicatori) rilevano la luce diffusa a diverse angolazioni da ciascuna cellula. L'analizzatore in automatico caratterizza e classifica le particelle contenute nel campione grazie alle informazioni provenienti da scatter frontale (dimensioni cellulari), scatter laterale (complessità interna della cellula) e intensità di fluorescenza (contenuto di DNA/RNA) di: formula leucocitaria, eritroblasti, reticolociti, piastrine.

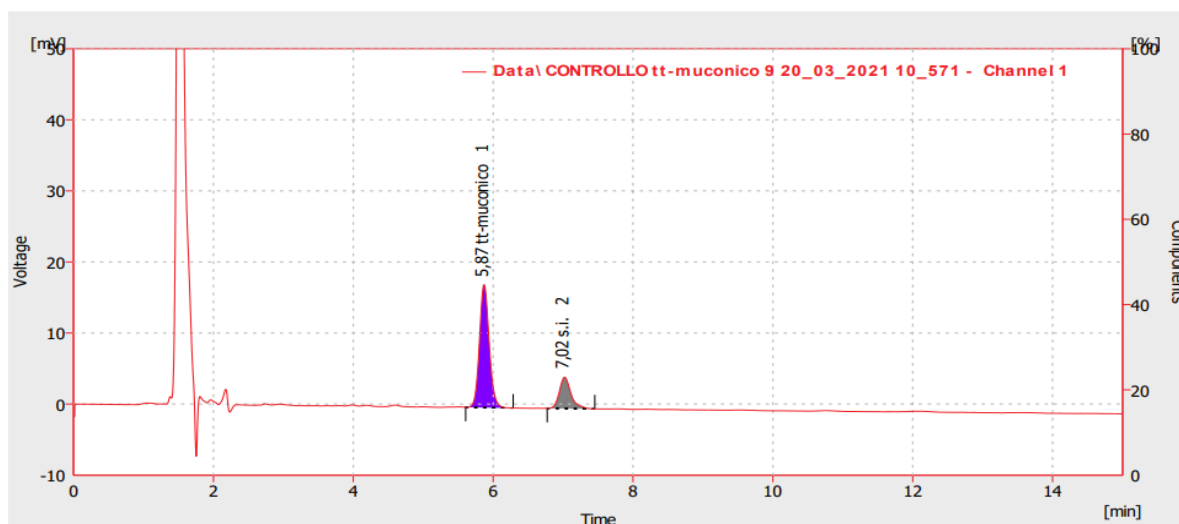
## 4.2. Risultati e discussione

### 4.2.1 Monitoraggio della quantità di acido trans,trans-muconico presente nelle urine di lavoratori esposti al benzene

Inizialmente, allo scopo di valutare il carico di benzene in lavoratori esposti, è stato determinato l'acido trans,trans-muconico nelle urine grazie a un metodo analitico mediante

HPLC con rivelatore UV. I prelievi sono stati effettuati al termine del turno lavorativo, considerato il momento ottimale per il prelievo [68].

Vengono di seguito riportati degli esempi di cromatogramma ottenuti dall'analisi. Nei grafici si ha in ascissa il tempo di ritenzione dell'analita, in ordinata il segnale elettrico (MeV) generato dal rivelatore UV. Il tempo di ritenzione è il tempo che impiega l'analita ad attraversare la colonna cromatografica ed è caratteristico per ciascuna sostanza. Quindi, la posizione dei picchi sull'ascissa (tempo di ritenzione) serve per identificare la sostanza ricercata; l'area sottesa ai picchi è proporzionale alla quantità di ogni sostanza e viene utilizzata per quantificare la concentrazione della sostanza ricercata. Per stabilire la correlazione tra il segnale elettrico e la concentrazione dell'analita si utilizzano calibratori. Nel caso specifico si è utilizzato un metodo che prevede anche uno standard interno così da eliminare i possibili errori di iniezione.

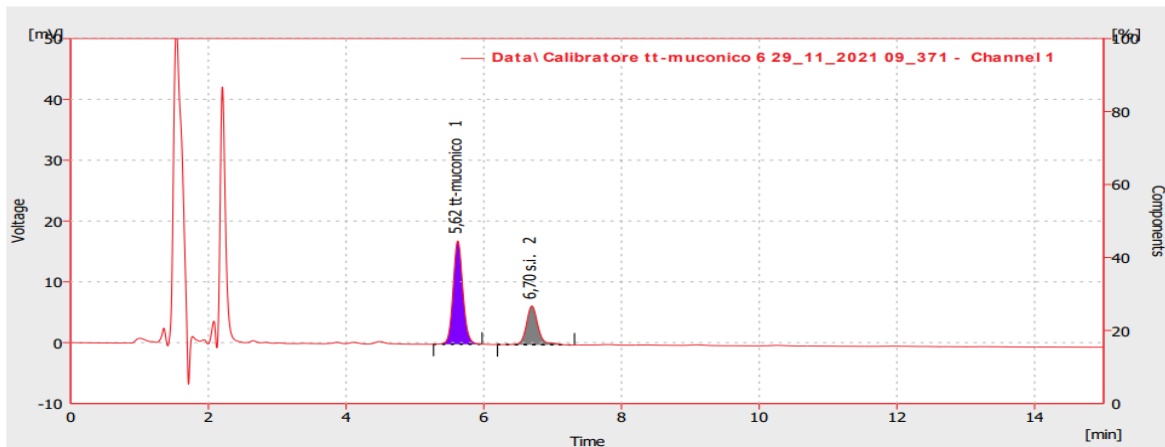


Result Table (ISTD - Data\CONTROLLO tt-muconico 9 20\_03\_2021 10\_571 - Channel 1)

	Reten. Time [min]	Response	Amount [mg]	Amount% [%]	Peak Type	Compound Name
1	5,870	165,907	2539,829	253982,9	Ordnr (by ISTD1)	tt-muconico
2	7,022	50,699	ISTD	ISTD	ISTD1	s.i.
	Total		1,000	253982,9		

Figura 7 - cromatogramma di un controllo per l'acido t,t-muconico

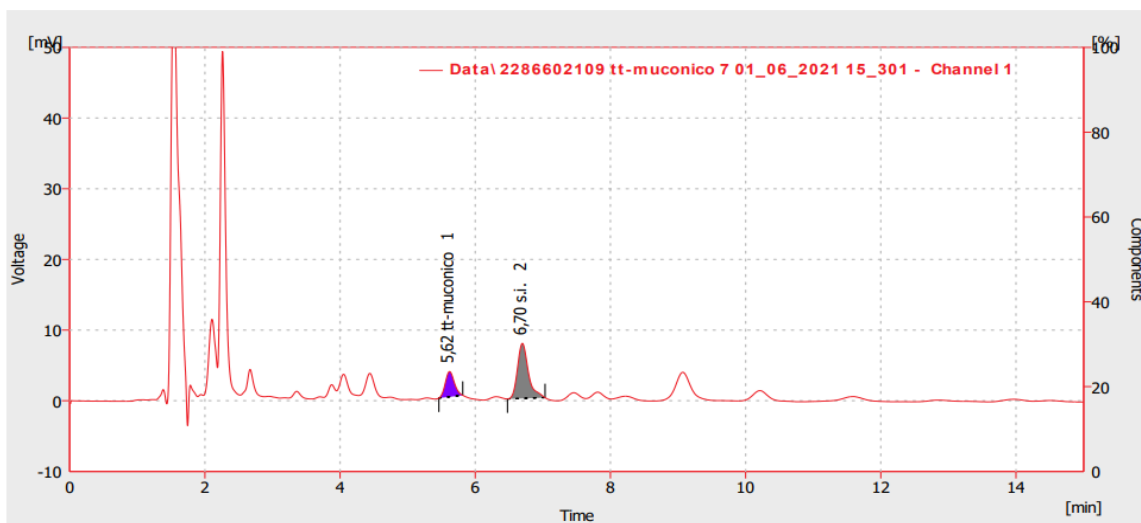
**BIOLAB Srl**  
CONTROLLO STRUMENTALE ANNUALE



Result Table (ISTD - Data\Calibratore tt-muconico 6 29\_11\_2021 09\_371 - Channel 1)

	Reten. Time [min]	Response	Amount [mg]	Amount% [%]	Peak Type	Compound Name
1	5,622	166,723	1560,000	156000,0	Ordnr (by ISTD1)	tt-muconico
2	6,698	75,173	ISTD	ISTD	ISTD1	s.i.
Total			1,000	156000,0		

Figura 8 - cromatogramma di uno standard di calibrazione per l'acido t,t-muconico



Result Table (ISTD - Data\2286602109 tt-muconico 7 01\_06\_2021 15\_301 - Channel 1)

	Reten. Time [min]	Response	Amount [mg]	Amount% [%]	Peak Type	Compound Name
1	5,620	33,000	293,490	29349,0	Ordnr (by ISTD1) (Forced)	tt-muconico
2	6,697	87,271	ISTD	ISTD	ISTD1 (Forced)	s.i.
Total			1,000	29349,0		

Figura 9 - cromatogramma di un paziente con normali valori di benzene

Si può notare in questi cromatogrammi come i picchi di eluizione risultino ben risolti e, nel campione preso come esempio, separati dai pochi interferenti ancora presenti nel campione purificato.



<b>Lavora tori</b>	<b>µg/g crea</b>	<b>Lavora tori</b>	<b>µg/g crea</b>	<b>Lavora tori</b>	<b>µg/g crea</b>	<b>Lavora tori</b>	<b>µg/g crea</b>	<b>Lavora tori</b>	<b>µg/g crea</b>
<b>1</b>	69,316	<b>32</b>	82,959	<b>63</b>	133,632	<b>94</b>	57,89	<b>125</b>	81,479
<b>2</b>	18,823	<b>33</b>	83,426	<b>64</b>	225,004	<b>95</b>	219,034	<b>126</b>	35,108
<b>3</b>	100,637	<b>34</b>	21,335	<b>65</b>	48,8	<b>96</b>	204,768	<b>127</b>	67,983
<b>4</b>	42,578	<b>35</b>	26,418	<b>66</b>	169,51	<b>97</b>	84,642	<b>128</b>	33,411
<b>5</b>	289,655	<b>36</b>	284,004	<b>67</b>	117,062	<b>98</b>	200,374	<b>129</b>	127,373
<b>6</b>	22,937	<b>37</b>	51,081	<b>68</b>	28,15	<b>99</b>	204,073	<b>130</b>	124,609
<b>7</b>	205,55	<b>38</b>	30,909	<b>69</b>	59,918	<b>100</b>	88,133	<b>131</b>	142,45
<b>8</b>	117,676	<b>39</b>	40,114	<b>70</b>	61,315	<b>101</b>	186,855	<b>132</b>	78,728
<b>9</b>	34,379	<b>40</b>	41,175	<b>71</b>	97,711	<b>102</b>	79,545	<b>133</b>	103,413
<b>10</b>	49,86	<b>41</b>	25,187	<b>72</b>	21,502	<b>103</b>	215,06	<b>134</b>	184,419
<b>11</b>	33,44	<b>42</b>	35,66	<b>73</b>	33,063	<b>104</b>	121,44	<b>135</b>	124,433
<b>12</b>	95,044	<b>43</b>	134,33	<b>74</b>	71,827	<b>105</b>	269,319	<b>136</b>	157,248
<b>13</b>	25,974	<b>44</b>	147,197	<b>75</b>	20,256	<b>106</b>	262,606	<b>137</b>	121,74
<b>14</b>	49,383	<b>45</b>	67,296	<b>76</b>	120,854	<b>107</b>	100,613	<b>138</b>	29,622
<b>15</b>	105,282	<b>46</b>	81,071	<b>77</b>	31,539	<b>108</b>	403,006	<b>139</b>	40,965
<b>16</b>	36,724	<b>47</b>	116,443	<b>78</b>	49,922	<b>109</b>	109,082	<b>140</b>	58,225
<b>17</b>	70,334	<b>48</b>	158,811	<b>79</b>	106,254	<b>110</b>	150,143	<b>141</b>	57,501
<b>18</b>	32,646	<b>49</b>	100,655	<b>80</b>	48,748	<b>111</b>	63,918	<b>142</b>	60,791
<b>19</b>	188,944	<b>50</b>	163,762	<b>81</b>	55,797	<b>112</b>	110,796	<b>143</b>	225,427
<b>20</b>	118,159	<b>51</b>	141,319	<b>82</b>	105,96	<b>113</b>	82,728	<b>144</b>	388,803
<b>21</b>	126,256	<b>52</b>	62,814	<b>83</b>	330,349	<b>114</b>	122,296	<b>145</b>	64,441
<b>22</b>	37,785	<b>53</b>	246,712	<b>84</b>	33,936	<b>115</b>	212,831	<b>146</b>	44,169
<b>23</b>	49,525	<b>54</b>	95,329	<b>85</b>	63,211	<b>116</b>	49,528		
<b>24</b>	32,19	<b>55</b>	176,871	<b>86</b>	15,551	<b>117</b>	93,13		
<b>25</b>	64,694	<b>56</b>	60,508	<b>87</b>	228,816	<b>118</b>	59,584		
<b>26</b>	29,92	<b>57</b>	114,364	<b>88</b>	201,33	<b>119</b>	112,508		
<b>27</b>	98,651	<b>58</b>	141,218	<b>89</b>	181,663	<b>120</b>	42,82		
<b>28</b>	219,169	<b>59</b>	131,898	<b>90</b>	156,841	<b>121</b>	78,775		
<b>29</b>	68,641	<b>60</b>	168,583	<b>91</b>	117,316	<b>122</b>	87,912		
<b>30</b>	25,314	<b>61</b>	212,369	<b>92</b>	70,636	<b>123</b>	98,837		
<b>31</b>	151,733	<b>62</b>	110,1	<b>93</b>	62,635	<b>124</b>	73,315		

Tabella 10- Risultati del monitoraggio della quantità di acido trans,trans-muconico urinario ( $\mu\text{g/g}$  crea) nei 146 lavoratori esposti a benzene.

In Tabella 10 sono riportati i risultati del monitoraggio quantitativo di t,t-MA urinario dei lavoratori esposti al benzene. Si può notare come nessuno dei lavoratori coinvolti nello studio superi la soglia dell'IBE (500  $\mu\text{g/g}$  crea) ma, considerando che il range di esposizione della popolazione normale va dai 15 ai 165  $\mu\text{g/g}$  crea, possiamo notare come molti mostrino valori tendenzialmente alti di metabolita. In particolare, 29 soggetti hanno mostrato valori maggiori di 165  $\mu\text{g/g}$  crea. Nel complesso, i valori di metabolita trovati suggeriscono come i lavoratori coinvolti nello studio siano soggetti a poca o moderata esposizione.

#### 4.2.2 Valutazione degli effetti del benzene sul quadro del sangue

Successivamente, è stata analizzata l'associazione tra acido trans,trans-muconico e conta dei globuli bianchi e globuli rossi dei lavoratori esposti a benzene, allo scopo di indagare l'effetto dell'esposizione al benzene sul sangue, come riportato in Figure 10 e 11. In particolare, sono stati presi in esame i dati fino ad una concentrazione minima di t,t-MA pari a 100  $\mu\text{g/g}$  crea per limitare la normale dispersione dovuta ai valori di persone non effettivamente esposte ma che comunque sono sotto controllo sanitario; i dati sono ordinati per concentrazione crescente e sono state calcolate le linee di tendenza.

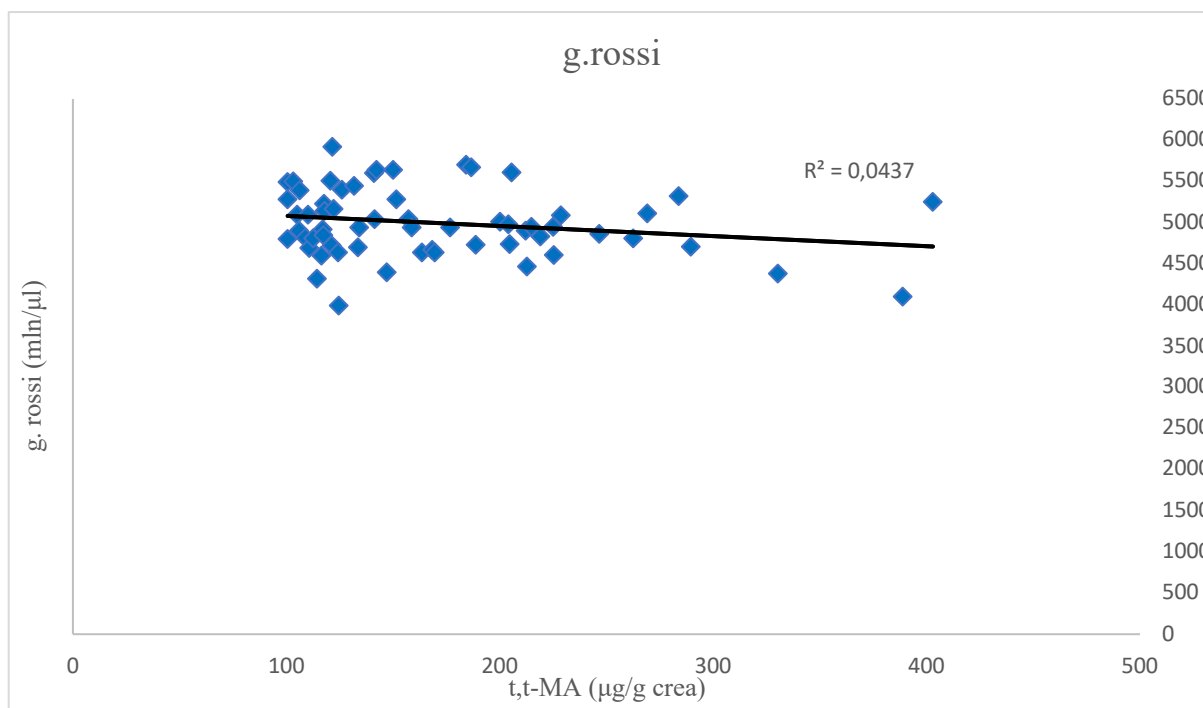


Figura 10- Grafico rappresentativo della correlazione tra t,t-MA e globuli rossi con linea di tendenza e  $R^2$

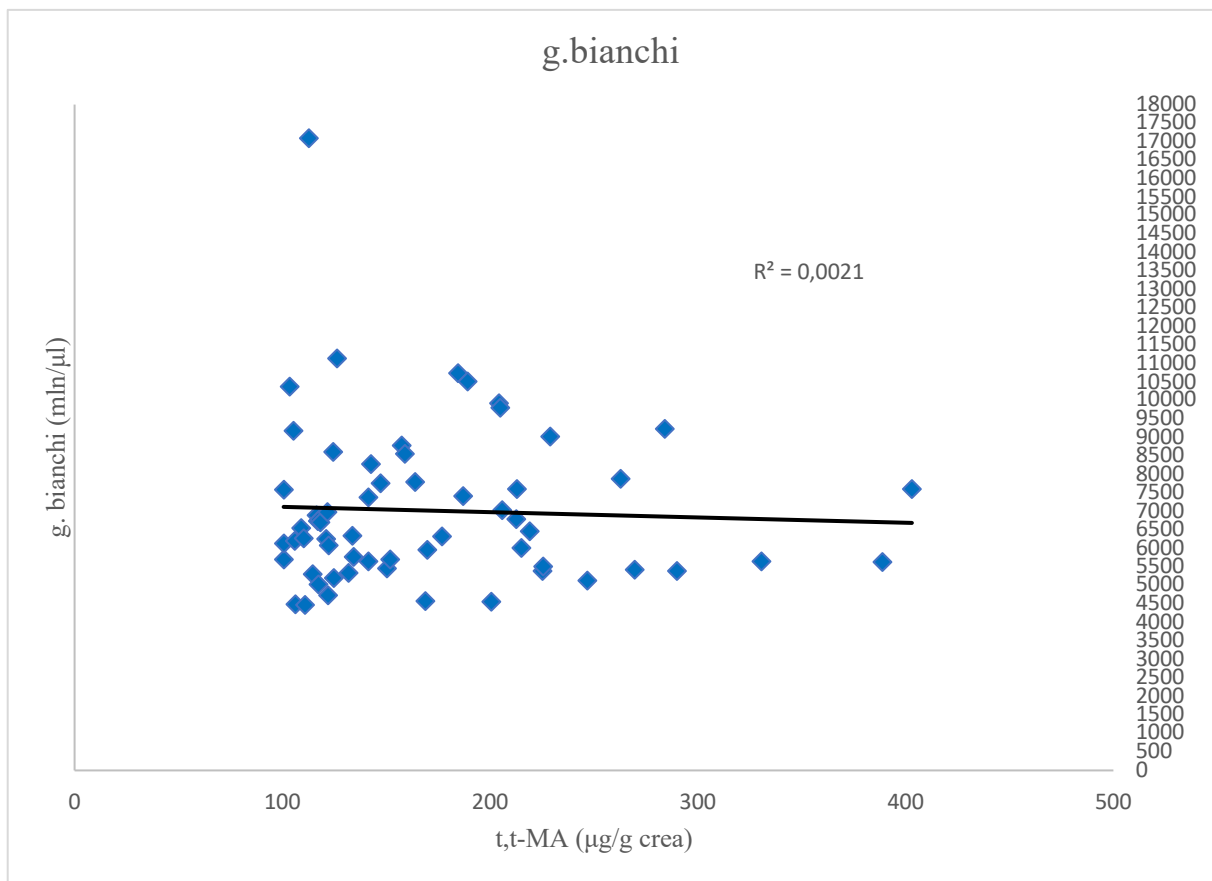
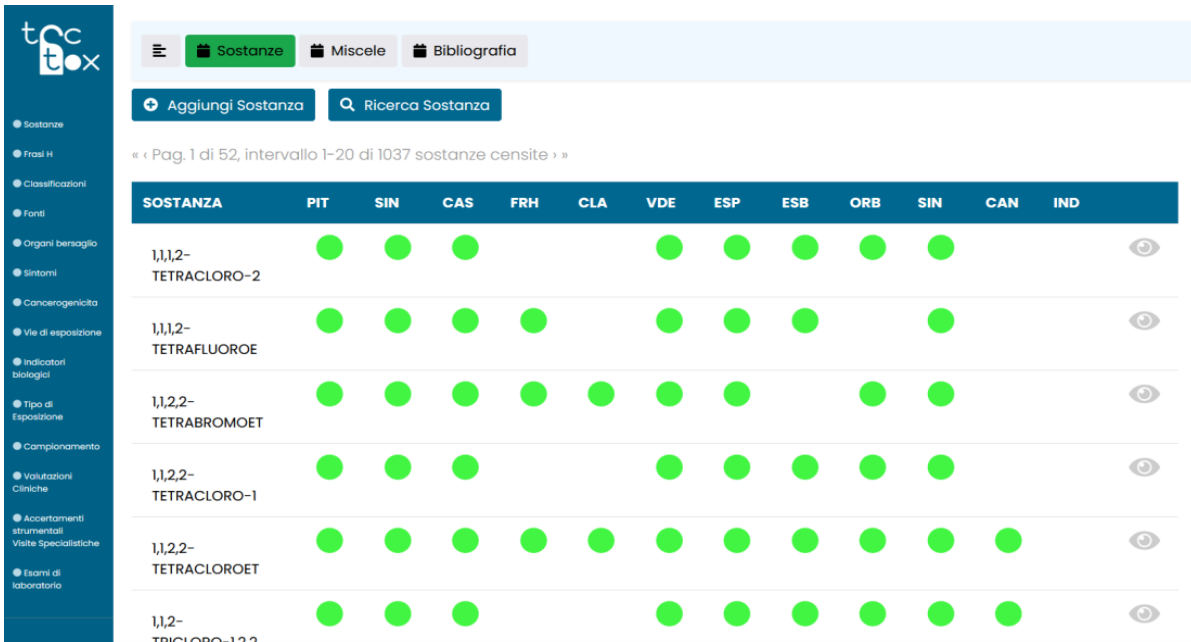


Figura 11- Grafico rappresentativo della correlazione tra t,t-MA e globuli bianchi con linea di tendenza e  $R^2$

I livelli di globuli bianchi e rossi non sembrano alterati in questi lavoratori e, come mostrato nelle Figure 10 e 11, non c'è correlazione tra livelli di t,t-MA urinario e numero di cellule del sangue, come suggerito dai bassi valori di  $R^2$ . L'analisi di correlazione è stata effettuata con tecniche di regressione lineare e non lineare (regressione parabolica ed esponenziale negativa) fornendo, in ogni caso, un valore di  $R^2 < 0,05$ , indicando una condizione di indipendenza tra le variabili.

## Fase 2 - TocTox



The screenshot shows the TocTox web application interface. At the top, there are navigation tabs for 'Sostanze', 'Miscele', and 'Bibliografia'. Below these are buttons for 'Aggiungi Sostanza' and 'Ricerca Sostanza'. A pagination indicator shows 'Pag. 1 di 52, intervallo 1-20 di 1037 sostanze censite'. The main content is a table with columns for 'SOSTANZA', 'PIT', 'SIN', 'CAS', 'FRH', 'CLA', 'VDE', 'ESP', 'ESB', 'ORB', 'SIN', 'CAN', and 'IND'. Each row represents a substance, with green circles indicating the presence of specific indicators. The substances listed are 1,1,2-TETRACLORO-2, 1,1,2-TETRAFLUORO, 1,1,2,2-TETRABROMOET, 1,1,2,2-TETRACLORO-1, 1,1,2,2-TETRACLOROET, and 1,1,2-TRICLORO-1,2,2.

SOSTANZA	PIT	SIN	CAS	FRH	CLA	VDE	ESP	ESB	ORB	SIN	CAN	IND
1,1,2-TETRACLORO-2	●	●	●			●	●	●	●	●		👁
1,1,2-TETRAFLUORO	●	●	●	●		●	●	●		●		👁
1,1,2,2-TETRABROMOET	●	●	●	●	●	●	●		●	●		👁
1,1,2,2-TETRACLORO-1	●	●	●			●	●	●	●	●		👁
1,1,2,2-TETRACLOROET	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	👁
1,1,2-TRICLORO-1,2,2	●	●	●			●	●	●	●	●	●	👁

Figura 12- Pagina iniziale presa dalla WebApp "TocTox"

TocTox è una WebApp progettata da Biolab, ideata con lo scopo di essere un ausilio per il medico del lavoro nella gestione dei lavoratori esposti a sostanze tossiche. L'intento è quello di prevenire le malattie professionali: infatti, è stato effettuato un lavoro di revisione e di ricerca nelle varie banche dati per racchiudere in questa piattaforma tutte le informazioni relative alle sostanze tossiche attualmente note (più di mille).

Per ogni sostanza viene riportato:

- nome, numero CAS, sinonimi
- pittogrammi, frasi H, classificazione
- vie di esposizione
- valori di esposizione occupazionale e per soggetti professionalmente non esposti
- organi bersaglio
- sintomi ed effetti critici
- cancerogenicità
- indicatori biologici di esposizione per soggetti professionalmente esposti e non
- indicatori biologici di effetto
- indicatori biologici di suscettibilità

A tal proposito, è stato effettuato un lavoro di revisione e, per le sostanze di cui non erano riportate informazioni, un lavoro di ricerca bibliografica in particolare per i campi “vie di esposizione”, “organi bersaglio”, “sintomi ed effetti critici” consultato le banche dati e fonti quali: ITA, EU, SCOEL, DNEL, SIVR, WHO, ACIGH, NIOSH, PUBCHEM, DFG, EPA, FRA, GERMAN AIR INDOOR (HAZARD), GERMAN AIR INDOOR (PRECAUTIONARY), Guida alla sorveglianza sanitaria R. Roi M. Boni, HSE (UK), PUBMED, ECHA, IARC, ILO-ICSC, INCHEM, Ist. Maugeri, Letteratura, NZL, OHSAS, SHWW, SIBIOC, WorkSafe (NZL); riportando nella WebApp la fonte da cui sono state prese le informazioni.

Organi Bersaglio			
FONTE	DESCRIZIONE	MONITORAGGIO	NOTE
NIOSH	Occhi	Valutazione clinica occhi. Eventuale visita Oculistica	-
NIOSH	Pelle	Valutazione clinica pelle. Eventuali visita dermatologica. Eventuale visita allergologica. Eventuali esami ematochimici: IgE.	-
NIOSH	Apparato respiratorio	Esame obiettivo apparato respiratorio. Spirometria. Eventuale RX torace. Eventuali esami ematochimici per evidenziare lo stato infiammatorio: VES, PCR.	-
NIOSH	Sangue	Esami ematochimici: emocromo, Pt, aPTT.	-
NIOSH	Midollo osseo	Esami ematochimici: emocromo	-

**RIEPILOGO VALUTAZIONI CLINICHE**

- Esame obiettivo neurologico (EON)
- Valutazione clinica occhio. ★★
- Valutazione clinica pelle ★★
- Esame obiettivo apparato respiratorio ★★

**RIEPILOGO ACCERTAMENTI STRUMENTALI - VISITE SPECIALISTICHE**

- Spirometria ★★

**RIEPILOGO INDICATORI BIOLOGICI**

- Acido S-fenilmercapturico urinario ★★★★★★
- Acido t,t-muconico urinario ★★
- Benzene Urinario ★★
- Benzene ematico ★★

**RIEPILOGO ALTRI ESAMI DI LABORATORIO**

- Emocromo ★★
- Tempo di protrombina (PT)
- aPTT

**Note Sezione Organi Bersaglio:**

Informazioni tratte da: Haschek, Wanda M. - Fundamentals of Toxicologic Pathology (2010).

Figura 13- Pagina riguardante i campi “organi bersaglio” e “riepilogo valutazioni critiche” presa dalla WebApp “TocTox”

È interessante notare, come riportato in Figura 13, che per ogni organo bersaglio vengono riportate tutte le valutazioni cliniche, accertamenti, visite specialistiche ed esami di laboratorio che il medico dovrà effettuare e, alla fine della pagina dedicata alla sostanza in questione, si vedrà un riepilogo di queste. La presenza di stelle accanto ad alcune voci indica che quell'analita è coinvolto in più organi bersaglio e che quel tipo di esame è prioritario rispetto agli altri che non ne hanno (o ne hanno ma in numero inferiore).

La particolarità di questa applicazione è, inoltre, che permette al medico di elaborare direttamente le miscele delle sostanze a cui i lavoratori sono esposti e riporta in un'unica pagina le voci relative al monitoraggio ambientale, monitoraggio biologico e monitoraggio degli effetti reversibili con un riepilogo di tutti gli esami da effettuare.

## 5. Conclusioni

I risultati di questo studio su lavoratori esposti al benzene, prevalentemente operatori di distributori di carburanti, evidenziano che bassi livelli di esposizione non sembrano avere effetti sulla conta totale di globuli rossi e globuli bianchi, coerentemente con diversi studi in letteratura [71,72,73] su soggetti a pari livello di esposizione (nonostante i risultati siano contrastanti). Va considerato che tale studio non ha la certezza circa la durata dell'esposizione: mediamente, infatti, i lavoratori sono esposti per 8 ore al giorno ma, in base alla mansione che ricoprono (ad esempio mansioni di ufficio), il tempo di esposizione può essere inferiore e può comunque variare di giorno in giorno anche in funzione delle condizioni climatiche (vento, umidità etc..). Mancano inoltre dati circa l'abitudine al fumo dei lavoratori coinvolti nello studio, considerato un interferente nella valutazione dell'esposizione al benzene mediante rilevazione dei livelli di t,t-MA urinario. Questi risultati andrebbero approfonditi con ulteriori studi per ottenere maggiori informazioni al fine di tutelare la salute dei lavoratori e limitare i costi sociali ed economici derivanti dall'esposizione al benzene. Il monitoraggio continuo del quadro completo del sangue e la ricerca dell'acido tran,trans-muconico urinario sono comunque importanti strumenti per rilevare i primi effetti dell'esposizione al benzene, come ampiamente suggerito in letteratura [69,70]. In quest'ottica di prevenzione del rischio cancerogeno e, in generale, del danno sui lavoratori, l'applicazione "TocTox" potrebbe essere uno strumento utile al medico del lavoro per attuare il programma di sorveglianza sanitaria.

## 6. Bibliografia

1. <https://osha.europa.eu/it/themes/dangerous-substances>
2. [https://www.inail.it/cs/internet/docs/tossicita\\_agenti\\_chimici\\_pdf\\_2443085453976.pdf?section=attivita](https://www.inail.it/cs/internet/docs/tossicita_agenti_chimici_pdf_2443085453976.pdf?section=attivita)
3. Christiani DC, Mehta AJ, Yu CL. (2008). *Genetic susceptibility to occupational exposures*. Occup Environ Med.
4. SNPA. (2017). *Manuale per la valutazione del rischio da esposizione ad Agenti Chimici Pericolosi e ad Agenti Cancerogeni e Mutageni* (terza revisione)
5. Incocciati E. (2021). *I valori limite di esposizione professionale, la misurazione, la valutazione dell'esposizione: strategie e metodi*. Inail
6. Indiveri P. (2009). *Sviluppo di tecniche di analisi ifenate per la quantificazione di biomarcatori di esposizione a tossici ambientali: gli acidi mercapturici*. Università di Bologna
7. Foà V, Alessio L. (1998). *Biological monitoring. General Principles*. In: JM Stellmann L ed. *Encyclopaedia of occupational health and safety*. (4th ed, vol I. Geneva, ILO.
8. ECHA. (2012). *Guidance on information and chemical safety assessment – chapter R.8: Characterisation of dose [concentration]-response for human health*
9. G Scherer, T Renner, M Meger (1998), *Analysis and valuation of trans,trans-muconic acid as a biomarker of benzene exposure*. J Chromatogr B Biome Sci Appl.
10. De Palma G et al. (2004). *Nuovi indicatori di effetto*. G. Ital. Med. Lav. Erg.
11. Mutti A. (1995). *Use of intermediate end-points to prevent long-term outcomes*. Toxicol. Lett.
12. T Sakai. (2000). *Biomarker of lead exposure*. Ind Health
13. Watson WP, Mutti A. (2004). *Review: Role of biomarkers in monitoring exposures to chemicals: present position, future prospects*. Biomarkers.
14. Zongheng Z et al. (2015). *Review: Risk on N-acetyltransferase 2 and bladder cancer: a meta-analysis*. Onco Targets Ther.
15. SCOEL. (2013). *Methodology for the Derivation of Occupational Exposure Limits*
16. Consonni D, Bertazzi PA. (2004). *Monitoraggio biologico nella sorveglianza sanitaria ed epidemiologica: l'approccio epidemiologico*. G. Ital. Med. Lav. Erg.
17. Barra MI, Mignacca FR, Ricciardini P. (2015). *Agenti Cancerogeni e Mutageni Lavorare Sicuri*. Inail



18. Takal J et al. (2015). *Eliminating occupational cancer in Europe and Globally*. European Trade Union Institute (ETUI)
19. Barra MI, Mignacca FR, Ricciardini P. (2017). *Correlazione tra mutagenesi e cancerogenesi*. Inail
20. Bajaj J, Diaz E, Reya T. (2020). *Stem cells in cancer initiation and progression*. J Cell Biol
21. ECHA (European Chemicals Agency) *Annex 1. Background Document in support of the Committee for Risk Assessment (RAC) Evaluation of Limit Values for Benzene in the Workplace*. European Chemicals Agency; Helsinki, Finland: 2018. [(accessed on 12 May 2021)].  
[https://echa.europa.eu/documents/10162/13641/benzene\\_bg\\_annex1\\_en.pdf/37b38de4-0e36-6058-eea4-1ffc56938831](https://echa.europa.eu/documents/10162/13641/benzene_bg_annex1_en.pdf/37b38de4-0e36-6058-eea4-1ffc56938831)
22. Weininger SJ. (2015). *Benzene and Beyond: Pursuing the Core of Aromaticity*. Ann Sci
23. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/241>
24. (<https://www.salute.gov.it/portale/temi/documenti/acquepotabili/parametri/BENZENE.pdf>).
25. <https://www.inail.it/cs/internet/docs/agenti-cancerogeni-e-mutageni.pdf?section=attivita>
26. Legge 5/3/1963, n. 245 “Limitazione dell'impiego del benzolo e suoi omologhi nelle attività lavorative”
27. Decreto ministeriale n. 707 del 10/12/1996 “Regolamento concernente l'impiego del benzene e suoi omologhi nelle attività lavorative”
28. Campagna M et al. (2012). *Biological monitoring of low-level exposure to benzene*. Med Lav
29. Lovreglio P et al. (2014) *Evaluation of chromosome aberration and micronucleus frequencies in blood lymphocytes of workers exposed to low concentrations of benzene*. Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen - Lovreglio P et al. (2016) *DNA damage and repair capacity in workers exposed to low concentrations of benzene*. Environ Mol Mutagen
30. Campo L et al. (2016). *Exposure to BTEX and Ethers in Petrol Station Attendants and Proposal of Biological Exposure Equivalents for Urinary Benzene and MTBE*. Ann Occup Hyg
31. Fracasso ME et al. (2010). *Low air levels of benzene: correlation between biomarkers of exposure and genotoxic effects*. Toxicol Lett

32. Carrieri M et al. (2012). *Influence of glutathione S-transferases polymorphisms on biological monitoring of exposure to low doses of benzene*. Toxicol Lett - Carrieri M et al. (2010). *Correlation between environmental and biological monitoring of exposure to benzene in petrochemical industry operators*. Toxicol Lett.
33. Neri F et al. (2016). *Determining exhaust fumes exposure in chainsaw operations*. Environmental Pollution
34. Mutti A (coordinatore), De Palma G et al. (2006). *Linee guida per il monitoraggio biologico*. PI-ME Editrice, Pavia.
35. Rauma M, Boman A, Johanson G. (2013). *Predicting the absorption of chemical vapours*. Adv Drug Deliv Rev. doi: 10.1016/j.addr.2012.03.012. Epub 2012 Mar 21. PMID: 22465561.
36. Meek ME, Klaunig JE. (2010) *Proposed mode of action of benzene-induced leukemia: Interpreting available data and identifying critical data gaps for risk assessment*. Chem Biol Interact. doi: 10.1016/j.cbi.2010.02.006. Epub 2010 Feb 11. PMID: 20153303.
37. Fustinoni S et al. (2005). *Monitoring Low Benzene Exposure: Comparative Evaluation of Urinary Biomarkers, Influence of Cigarette Smoking, and Genetic Polymorphisms*. Cancer. Epidemiol. Biomarkers Prev.
38. Briff RS, Lynch J, Bernath T, Scala RA, (1980). *Benzene in the workplace*. Am. Ind. Hyg. Assoc
39. McHale CM, Zhang L, Smith MT. (2012). *Current understanding of the mechanism of benzene-induced leukemia in humans: implications for risk assessment*. Carcinogenesis. doi: 10.1093/carcin/bgr297. Epub 2011 Dec 12. PMID: 22166497; PMCID: PMC3271273.
40. (<https://www.issalute.it/index.php/la-salute-dalla-a-alla-z-menu/b/benzene#effetti-sulla-salute>)
41. Anzidei P, Giovinazzo R, Venanzetti F. (2000). *esposizione lavorativa: effetti sulla biologia riproduttiva*. Riviste degli infortuni e delle malattie professionali
42. Petralia SA et al. (1999). *Risk of premenopausal breast cancer in association with occupational exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons and benzene*. Scand J Work Environ Health. doi: 10.5271/sjweh.426. PMID: 10450771.
43. Wolff MS, Collman GW, Barrett JC, Huff J. (1996). *Breast cancer and environmental risk factors: epidemiological and experimental findings*. Annu Rev Pharmacol Toxicol. doi: 10.1146/annurev.pa.36.040196.003041. PMID: 8725402.

44. Costantini AS et al. (2009). *Exposure to benzene and risk of breast cancer among shoe factory workers in Italy*. Tumori. 2009 doi: 10.1177/030089160909500102. PMID: 19366049.
45. Infante PF et al. (1997). *Leukaemia in benzene workers*. Lancet. doi: 10.1016/s0140-6736(77)90074-5. PMID: 69157.
46. Hayes RB et al. (1997). *Benzene and the dose-related incidence of hematologic neoplasms in China*. Chinese Academy of Preventive Medicine--National Cancer Institute Benzene Study Group. J Natl Cancer Inst. doi: 10.1093/jnci/89.14.1065. PMID: 9230889.
47. Infante PF. (2006). *Benzene exposure and multiple myeloma: a detailed meta-analysis of benzene cohort studies*. Ann N Y Acad Sci. doi: 10.1196/annals.1371.081. PMID: 17119195.
48. Badham HJ, Winn LM. (2010). *In utero and in vitro effects of benzene and its metabolites on erythroid differentiation and the role of reactive oxygen species*. Toxicol Appl Pharmacol. doi: 10.1016/j.taap.2010.01.002. Epub 2010 Jan 18. PMID: 20083130.
49. Beelte S et al. (2009). *Paradigmenwechsel in der Beurteilung myeloischer und lymphatischer Neoplasien bei beruflicher Benzolexposition (BK-Ziffer 1303) [Paradigm change in the assessment of myeloid and lymphoid neoplasms associated with occupational benzene exposure]*. Med Klin (Munich). German. doi: 10.1007/s00063-009-1032-8. Epub 2009 Apr 1. PMID: 19337709.
50. Zhou H et al (2009). *Benzene metabolite hydroquinone up-regulates chondromodulin-1 and inhibits tube formation in human bone marrow endothelial cells*. Mol Pharmacol. doi: 10.1124/mol.109.057323. Epub 2009 Jun 12. PMID: 19525446; PMCID: PMC2730389.
51. Sun R et al. (2015). *Altered Expression of Genes in Signaling Pathways Regulating Proliferation of Hematopoietic Stem and Progenitor Cells in Mice with Subchronic Benzene Exposure*. Int J Environ Res Public Health. doi: 10.3390/ijerph120809298. PMID: 26262635; PMCID: PMC4555281.
52. Kim S et al. (2006). *Using urinary biomarkers to elucidate dose-related patterns of human benzene metabolism*. Carcinogenesis. doi: 10.1093/carcin/bgi297. Epub 2005 Dec 8. PMID: 16339183.

53. Rothman N et al. (2021). *Metabolome-wide association study of occupational exposure to benzene*. *Carcinogenesis*. doi: 10.1093/carcin/bgab089. PMID: 34606590; PMCID: PMC8598381.
54. Grigoryan H et al. (2018). *Adductomic signatures of benzene exposure provide insights into cancer induction*. *Carcinogenesis*. doi: 10.1093/carcin/bgy042. PMID: 29538615; PMCID: PMC5932554.
55. Sun S et al. (2018). *Benzoquinone induces ROS-dependent mitochondria-mediated apoptosis in HL-60 cells*. *Toxicol Ind Health*. doi: 10.1177/0748233717750983. Epub 2018 Mar 5. PMID: 29506454.
56. IARC (2018) Benzene. In *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans*. Vol. 120. International Agency for Research on Cancer, Lyon
57. Zhang L, Eastmond DA, Smith MT. (2002). *The nature of Chromosomal aberrations detected in humans exposed to benzene*. *Critic Rev Toxicol*
58. Faiola B et al. (2004). *Gene expression profile in bone marrow and hematopoietic stem cells in mice exposed to inhaled benzene*. *Mutat Res*. doi: 10.1016/j.mrfmmm.2003.12.022. PMID: 15120971.
59. Herceg Z et al. (2013). *Towards incorporating epigenetic mechanisms into carcinogen identification and evaluation*. *Carcinogenesis*. doi: 10.1093/carcin/bgt212. Epub 2013 Jun 7. PMID: 23749751; PMCID: PMC3765050.
60. Fukushima S et al. (2005). *Hormesis and dose-response-mediated mechanisms in carcinogenesis: evidence for a threshold in carcinogenicity of non-genotoxic carcinogens*. *Carcinogenesis*. doi: 10.1093/carcin/bgi160. Epub 2005 Jun 23. PMID: 15975961.
61. De Palma G. (2009). *Polimorfismi metabolici: applicazioni nello studio della patologia multifattoriale e nel monitoraggio biologico dell'esposizione a xenobiotici*. Università degli Studi di Parma
62. Carrieri M et al (2018) *Biological monitoring of low level exposure to benzene in an oil refinery: Effect of modulating factors*. *Toxicol Lett*. doi: 10.1016/j.toxlet.2018.08.001. Epub 2018 Aug 4. PMID: 30086327.
63. Carbonari D et al (2016). *Biomarkers of susceptibility following benzene exposure: influence of genetic polymorphisms on benzene metabolism and health effects*. *Biomark Med*.

64. Ye LL et al. (2015). *Are polymorphisms in metabolism protective or a risk for reduced white blood cell counts in a Chinese population with low occupational benzene exposures?* Int J Occup Environ Health.
65. Lan Q et al. (2004). *Haematotoxicity in workers exposed to low levels of benzene.* Science.
66. Spatari G et al. (2021). *Epigenetic Effects of Benzene in Hematologic Neoplasms: The Altered Gene Expression.* Cancers (Basel). doi: 10.3390/cancers13102392. PMID: 34069279; PMCID: PMC8156840.
67. Kim SY et al. (2004). *Chromosomal aberrations in workers exposed to low levels of benzene: association with genetic polymorphisms.* Pharmacogenetics. doi: 10.1097/01.fpc.0000114751.08559.7b. PMID: 15226677.
68. <https://chromsystems.com/en/trans-trans-muconic-acid-in-urine-hplc-47000.html>
69. Scherer G, Renner T, Meger M. (1998). *Analysis and evaluation of trans,trans-muconic acid as a biomarker for benzene exposure.* J Chromatogr B Biomed Sci Appl. doi: 10.1016/s0378-4347(98)00065-6. PMID: 9832246.
70. Ibrahim KS et al. (2014). *Hematological effect of benzene exposure with emphasis of muconic acid as a biomarker.* Toxicol Ind Health. doi: 10.1177/0748233712458141. Epub 2012 Aug 29. PMID: 22933555.
71. Swaen GM et al. (2010). *Low level occupational benzene exposure and hematological parameters.* Chem Biol Interact. doi: 10.1016/j.cbi.2010.01.007. Epub 2010 Jan 13. PMID: 20074561.
72. Pesatori AC et al. (2009). *Early effects of low benzene exposure on blood cell counts in Bulgarian petrochemical workers.* Med Lav. PMID: 19382518.
73. Tunsaringkarn T, Soogarun S, Palasuwan A. (2013). *Occupational exposure to benzene and changes in hematological parameters and urinary trans, trans-muconic acid.* Int J Occup Environ Med. PMID: 23279797.

## **Ringraziamenti**

Un ringraziamento speciale al mio relatore, Prof. Stefano Amatori, per il grande supporto e per aver guidato con attenzione la stesura di questa tesi.

Ringrazio il mio co-relatore, Dott. Michele Calcinari, per avermi dato la possibilità di lavorare sul progetto “TocTox”, per le preziose indicazioni e il sostegno che mi ha dimostrato in questi mesi.

Ringrazio il Prof. Davide Sisti per gli impagabili consigli di analisi statistica.