

BENZENE : Consolidato Scientifico

(tratto da una pubblicazione su “ESPOSIZIONE AMBIENTALE ED OCCUPAZIONALE A BENZENE” -Università degli Studi di Bologna)

Il benzene è un inquinante ambientale ubiquitario le cui principali sorgenti sono i processi industriali, quali combustione di olio e carbone, produzione e stoccaggio di rifiuti, gas di scarico degli autoveicoli, evaporazione dalle stazioni di benzina. Inoltre il fumo di sigaretta rappresenta un'altra fonte di introduzione dell'inquinante nell'ambiente.

Il principale effetto tossico del benzene riguarda l'ematopoiesi, un effetto esclusivo, che lo contraddistingue da tutti gli altri idrocarburi aromatici (1, 2). I dati riguardanti gli effetti a seguito di esposizione acuta per via inalatoria (60 ppm per due ore) indicano chiaramente l'insorgenza di **leucopenia**, **anemia** e **trombocitopenia** sebbene alterazioni ematologiche possono evidenziarsi anche in individui professionalmente esposti a vari livelli di benzene e per periodi di tempo intermedi o prolungati. Il potenziale meccanismo responsabile dell'insorgenza di pancitopenia nell'uomo è la **distruzione delle cellule staminali del midollo osseo**, il **disturbo della**

lifferenziazione di queste cellule e/o la **distruzione di precursori delle cellule del sistema ematopoietico** e delle cellule circolanti. La pancitopenia, quando è seriamente compromessa la funzionalità del midollo osseo può evolvere in anemia aplastica. La **pancitopenia** può essere accompagnata da **iperplasia del midollo osseo**, una condizione considerata **pre-luecemica** (1-3).

Studi epidemiologici hanno dimostrato che l'esposizione industriale a benzene è associata ad un aumentato rischio di leucemia mieloide acuta (3-5). Questo effetto sembra essere mediato dalle proprietà clastogene ed aneuploidogene del benzene stesso (6). Studi su individui professionalmente esposti hanno evidenziato anomalie cromosomiche al seguito di esposizioni sufficienti a produrre discrasie ematiche (1, 6). L'esposizione professionale, cronica a benzene sembra causare **danni cromosomici in linfociti e cellule del sistema ematopoietico**. Numerosi sono gli studi effettuati su individui esposti ad un ampio intervallo di livelli di benzene -da 1 ppm a 100 ppm- per periodi variabili (1, 6), che hanno evidenziato un incremento della frequenza di aberrazioni cromosomiche sia strutturali che numeriche. Più di recente, incrementi della frequenza di micronuclei sono stati dimostrati in linfociti di lavoratori esposti, anche con risultati dose-dipendenti (7). I dati ottenuti da studi condotti sul roditore hanno confermato la potente genotossicità del benzene, con risultati chiaramente positivi per quanto riguarda incidenza di aberrazioni cromosomiche, sister chromatid exchanges (SCE) e micronuclei in cellule di midollo osseo ed in linfociti (1, 2). La tossicità del benzene è riconducibile al suo complesso metabolismo. Il benzene viene convertito ad ossido dalle ossidasi microsomiali epatiche a funzione mista. L'ossido può riarrangiarsi non enzimaticamente a formare fenolo; reagire con il glutatione a formare acido premercapturico, che a sua volta viene convertito ad acido l-fenil-mercapturico; o, ancora, reagire con l'epossido idrolasi microsomiale che lo converte in benzene 1,2-diidrodiolo o 1,4-diidrodiolo. La deidrodiolo deidrogenasi citosolica è responsabile della riaromatizzazione dell'anello, con formazione di catecolo ed idrochinone. Un altro metabolita potenzialmente tossico del benzene, la muconaldeide, derivante dall'apertura dell'anello epossidico, va incontro ad una serie di reazioni che portano alla produzione di uno dei metaboliti urinari, l'acido t,t-muconico (2).

La tossicità ematopoietica del benzene è direttamente correlata al metabolismo nel midollo osseo degli idrossiderivati formati nel fegato (2, 3). I metaboliti chinonici, tra cui il p-benzochinone, sembrano essere i principali responsabili della tossicità del benzene, grazie alla capacità di legare covalentemente le proteine (2). Il catecolo e l'idrochinone sono ulteriormente metabolizzati nel midollo osseo da parte dell'enzima mieloperossidasi (MPO), rispettivamente in 1,2- e 1,4-semichinoni che, a loro volta possono disproporzionare portando a catecolo, 1,2- o 1,4-

benzochinone (8). Il legame covalente del benzene e suoi metaboliti al DNA avviene a livelli di esposizione molto più bassi, suggerendo che altri tipi di eventi molecolari siano i responsabili del danno cromosomico indotto dal benzene (3). **In particolare, è stato dimostrato che: 1) l'induzione del danno nel midollo osseo è dovuto alla formazione di specie reattive all'ossigeno nei processi di ossido-riduzione** dei metaboliti del benzene; 2) i metaboliti attivi (idrochinone e catecolo) possono **inibire la topoisomerasi II**, enzima critico nei processi di riparazione e replicazione cellulare; 3) il benzene può causare instabilità genetica tramite ricombinazione, rotture a doppio filamento e anomalie a carico del fuso mitotico, che causano aberrazioni cromosomiche strutturali e numeriche (3,6,9).

Attualmente il benzene non è più impiegato come solvente negli ambienti di lavoro, sebbene l'esposizione professionale sia ancora possibile in alcune realtà lavorative, quali la raffinazione e la distribuzione dei prodotti petroliferi, alcuni settori dell'industria chimica ed i laboratori di chimica. Di recente, l'attenzione si è rivolta al potenziale rischio associato alla presenza di **benzene ambientale, prodotto dai gas di scarico degli autoveicoli**, ed ai suoi possibili effetti sulla salute delle popolazioni che vivono o lavorano in prossimità di aree urbane altamente inquinate. **Alcuni studi hanno evidenziato che l'inquinamento derivante dal traffico automobilistico può causare leucemia, con un rischio di circa 4 casi per milione di persone esposte per l'intera vita a concentrazioni di benzene di: 1 ug/m³ d'aria (10, 11).**

L'American Conference of Governmental Industrial Hygienists (ACGIH) (12) ha fissato i limiti per l'esposizione professionale a benzene in 0.5ppm, (pari a 1.6mg/m³), mentre la legge Italiana 66/2000 ha fissato un limite di 1ppm. Per limitare i rischi per la salute umana, una Direttiva Europea del 2000 (13) ha stabilito che l'esposizione a benzene ambientale sia ridotta a **5 ug/m³** per l'anno 2010. Tuttavia, i livelli di esposizione, e quindi la valutazione del rischio, non possono essere semplicemente estrapolati dai valori di concentrazione ambientale del benzene (14). Utilizzando un campionatore in grado di monitorare sia l'esposizione personale che la concentrazione ambientale, è stato evidenziato che in varie città europee alcuni individui sono esposti a concentrazioni di benzene sino a due volte superiore la media (14). Ciò pone grosse implicazioni per l'analisi del rischio di particolari categorie occupazionali e sottogruppi della popolazione generale. E' quindi di critica importanza definire gli effetti biologici derivanti dalla reale esposizione individuale al benzene presente in aree urbane a diverso livello di inquinamento ambientale.

L'epidemiologia molecolare rappresenta un valido approccio di studio alla valutazione del rischio, in quanto analizza la relazione esistente tra esposizione ad agenti tossici e la quantificazione di biomarcatori legati alle prime fasi della cancerogenesi. I biomarcatori possono essere distinti in biomarcatori di esposizione, che considerano sia la dose interna che la dose biologicamente efficace dell'agente tossico; biomarcatori di effetto, che riflettono il danno biologico causato dall'esposizione all'agente tossico; e biomarcatori di suscettibilità che valutano le differenze inter-individuali nelle risposte al composto tossico (15, 16).

I biomarcatori di esposizione, che valutano la presenza di metaboliti nelle urine (o altri fluidi biologici) forniscono un'indicazione della complessiva esposizione del soggetto all'agente tossico. Esiste però il problema di identificare quale dei metaboliti che si formano dalla biotrasformazione del benzene possa essere utilizzato come biomarcatore di esposizione, in particolare per concentrazioni di benzene inferiori a 1ppm. Il fenolo urinario, in passato usato come biomarcatore di dose interna, si è rivelato essere un parametro di valutazione poco credibile, in quanto i bassi livelli di fenolo attesi, derivanti dai bassi livelli di benzene attualmente presente negli ambienti di lavoro, sostanzialmente non andrebbero a modificare i livelli di fondo di fenolo urinario originati da altre sorgenti espositive. Anche la determinazione degli acidi t,t-muconico e S-fenilmercapturico, i biomarcatori attualmente impiegati per il monitoraggio dell'esposizione presentano alcune limitazioni. Infatti, le concentrazioni di acido t,t-muconico sono influenzate dall'assunzione di acido sorbico con la dieta, mentre la determinazione dell'acido s-fenilmercapturico è possibile solo attraverso una complessa metodologia analitica, che di fatto ne rende pressoché impossibile l'utilizzo su larga scala come biomarcatore di esposizione a benzene. Altri prodotti di

biotrasformazione del benzene, quali l'idrochinone o il catecolo, vengono impiegati come biomarcatori di dose interna. L'utilità di questi biomarcatori di monitoraggio biologico è stata dimostrata anche per livelli di esposizioni a benzene inferiori a 0.5 ppm. In alcuni casi, inoltre è stato dimostrato che la determinazione delle concentrazioni urinarie di idrochinone permette di distinguere tra soggetti fumatori e non fumatori, utilizzando, tra l'altro, un approccio analitico molto più semplice di quello necessario per determinare l'acido S-fenilmercapturico. Anche la valutazione del benzene urinario è stata proposta come valido biomarcatore a breve termine di dose interna, per esposizione a livelli molto bassi di benzene (0.01 ppm) (17, 18).

La determinazione di biomarcatori citogenetici, come aberrazioni cromosomiche, SCE e micronuclei, sono comunemente impiegati per valutare l'esposizione occupazionale ad agenti mutageni o cancerogeni. Gli studi di coorte nordico ed italiano hanno dimostrato che la frequenza di aberrazioni cromosomiche può essere un indice prognostico di incidenza di tumore (19-21). Studi analoghi sono attualmente impegnati nella validazione di altri marcatori genetici, come i micronuclei, più facilmente applicabili allo studio di grandi popolazioni. I micronuclei derivano da cromosomi interi a frammenti acentrici che non migrano ai poli durante l'anafase e non vengono incorporati in uno dei nuclei principali, dando origine a nuclei accessori più piccoli. Con il test del micronucleo è quindi possibile rilevare sia effetti clastogeni che aneuploidogeni, due fenomeni di danno genetico legati agli stadi iniziali della cancerogenesi (22, 23). Negli ultimi anni un crescente interesse è stato rivolto al comet assay, una nuova tecnica che permette di evidenziare, in singole cellule, specifici danni al DNA, quali rotture a singolo e doppio filamento, siti alcali-labili e processi di riparazione (24, 25).

L'epidemiologia molecolare ha di recente introdotto l'impiego di biomarcatori di suscettibilità. Negli ultimi anni è infatti emerso che differenze inter-individuali nei processi di attivazione e detossificazione metabolica, nonché nei processi di riparazione del DNA, possono modulare le risposte all'esposizione a xenobiotici, giocando quindi un ruolo di peculiare importanza nello sviluppo di patologie cronico-degenerative. Una significativa proporzione dei geni che codificano per enzimi appartenenti al sistema di attivazione e detossificazione metabolica e di riparazione al DNA esistono in forma polimorfa. L'esistenza di alleli multipli ai loci di questi geni offre la possibilità di espressione di fenotipi suscettibili ed altri resistenti che, a loro volta, possono spiegare la differente suscettibilità individuale agli effetti mutageni e cancerogeni di tossici presenti nell'ambiente. Il numero di geni polimorfi che si pensa in grado di modificare gli effetti di noti o sospetti cancerogeni è in rapida crescita e benché lo studio di polimorfismi nell'eziologia del cancro sia ancora agli inizi, stanno emergendo dati promettenti. Lo studio dei polimorfismi come biomarcatori di suscettibilità potrebbe portare all'identificazione di sottogruppi di individui ad alto rischio di sviluppo di certi tipi di cancro. Tutti i polimorfismi relativi a geni coinvolti nel metabolismo del benzene potrebbero essere rilevanti per la valutazione delle possibili associazioni tra esposizione a benzene ambientale e rischio individuale di leucemia (8, 26, 27). Studi di epidemiologia molecolare, nei quali vengono valutate le relazioni tra esposizione a benzene ambientale e vari biomarcatori di esposizione, di effetto e di suscettibilità, sono particolarmente rilevanti per la valutazione degli effetti sulla salute legati all'inquinamento urbano. Studi di biomonitoraggio condotti su popolazioni esposte occupazionalmente a benzene ambientale (non industriale) sono piuttosto rari, e solitamente riguardano solo l'impiego di marcatori genetici. Ad esempio, un significativo aumento della frequenza di micronuclei è stato osservato nei linfociti dei vigili urbani della città di Lanzhou (Cina) (28), aumenti della frequenza di aberrazioni cromosomiche e SCE sono stati riscontrati nei vigili urbani del Cairo (Egitto) (29) ed un aumento di SCE è stato evidenziato nei poliziotti di Madras (India) (30). Al contrario, non è stato osservato alcun incremento del danno cromosomico in vigili urbani in alcune città italiane, come Genova e Roma (31-33). La concordanza o meno dei risultati ottenuti nei diversi studi di biomonitoraggio può essere riconducibile a diversi fattori. Studi di biomonitoraggio su popolazioni esposte a basse ad alte concentrazioni di benzene ambientale non hanno dimostrato una chiara relazione dose-effetto, probabilmente a causa dell'esistenza di più sorgenti e più vie di esposizione a benzene, oltre a quella

dell'aria, a diversa composizione, dei centri urbani, che rendono difficile dare una valutazione adeguata e specifica dell'esposizione correlata all'ambiente. Altri fattori che potrebbero aver influito sono le specifiche mansioni professionali e l'organizzazione dei turni di lavoro. Non da ultimo, gli studi pubblicati impiegano marcatori genetici con diversa sensibilità e specificità. Inoltre, solo gli studi sui vigili urbani di Roma hanno fornito informazioni sull'esposizione media di benzene presente nell'atmosfera, misurato con campionario personale -radiello- indossato durante i turni di lavoro. Nessun dato relativo all'esposizione personale al benzene o ad altri inquinanti è stato riportato in alcuno degli studi menzionati. La mancanza di questa fondamentale informazione impedisce di paragonare ed interpretare i risultati ottenuti nei diversi studi. Queste omissioni sottolineano l'importanza di una accurata determinazione della reale intensità della esposizione, come prerequisito per la stima del rischio derivante da inquinanti ambientali. Vi è quindi la necessità di un approccio sistematico che correli l'esposizione allo specifico agente tossico all'insorgenza di appropriati biomarcatori.

Infine, lo studio di polimorfismi in geni del metabolismo, come CYP2E1, NQO1, MPO e della famiglia delle GST, potrebbero portare all'identificazione di individui particolarmente suscettibili agli effetti dell'esposizione a benzene ambientale.

Bibliografia

- 1) ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry): Toxicological Profile for Benzene (1997). Atlanta, GA: Public Health Service.
- 2) Bruckner, J.V. and Warren, D.A. (2001) Toxic effects of solvents and vapors. In Klaassen, C.D. (ed.) Casarett & Doull's Toxicology the basic science of poisons. McGraw-Hill, USA, pp. 869-916.
- 3) Snyder, R. (2002) Benzene and leukaemia. *Crit. Rev. Toxicol.*, 32; 155-210.
- 4) IARC. Monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals in humans (1987). Overall evaluations of carcinogenicity: an updating of IARC monographs volumes 1 to 42. Lyon 1987.
- 5) Hayes, R.B., Songnian, Y., Dosemeci, M. and Linet, M. (2001) Benzene and lymphohematopoietic malignancies in human. *Am. J. Ind. Med.*, 40, 117-126.
- 6) Zhang, L., Eastmond, D.A. and Smith, M.T. (2002) The nature of chromosomal aberrations detected in humans exposed to benzene. *Critic. Rev. Toxicol.*, 32, 1-42.
- 7) Liu, L., Zhang, Q., Feng, J., Deng, L., Zeng, N., Yang, A., Zhang, W. (1996). The study of DNA oxidative damage in benzene-exposed workers. *Mutat. Res.*, 370, 145-150.
- 8) Rothman, N., Smith, M.T., Hayes, R.B., Traver, R.D., Hoener, B., Campleman, S., Li, G., Dosemeci, M., Linet, M., Zhang, L., Xi, L., Wacholder, S., Lu, W., Meyer, K.B., Titenko-Holland, N., Stewart, J.T., Yin, S., Ross, D. (1997). Benzene poisoning, a risk factor for haematological malignancy, is associated with the NQO1 609 C T mutation and rapid fractional excretion of chlorozzone. *Cancer Res.*, 57, 2839-2842.
- 9) Eastmond, D.A., Shuler, M., Frantz, C., Chen, H.W., Parks, R., Wang, L., Hasegawa, L. (2001) Characterization and mechanisms of chromosomal alterations induced by benzene in mice and humans. Health Effects Institute, research Report 103.
- 10) Snyder, R., Witz, G., Goldestein, B.D. (1993). The toxicology of benzene. *Environ. Health Perspect.*, 100, 293-306.
- 11) World Health Organization, 1996. Updating and revision of the Air Quality Guidelines for Europe. Report no. EUR/ICP/EHAZ9405/MT12. ACGIH. Threshold limit values and biological exposure indices (2000). American Conference of Governmental Industrial Hygienists. Cincinnati, Ohio, USA,.
- 12) Ghittori, S., Maestri, L., Fiorentino, M.L., Imbriani, M. (1995). Evaluation of occupational exposure to benzene by urinalysis. *Int Arch Occup Environ Health*, 67, 195-200.

- 13) European Union Parliament and Council (2000). Directive 2000/69/CE of the European Parliament and Council of the 16 November 2000 concerning the limit values for benzene and carbon monoxide in environmental air. Official Journal of the European Communities, 13.12.2000: L313/12-21.
- 14) Cocheo,V., Sacco,P., Boaretto,C., De Saeger,E., Ballesta,P.P., Skov,H., Goelen,E., Gonzalez,N., Caracena,A.B. (2000). Urban benzene and pollution exposure. *Nature*, 404, 141-142.
- 15) Groopman,J.D., Kensler,T.W. (1993). Molecular Biomarkers for human chemical carcinogen exposures. *Chem. Res. Toxicol.*, 6, 764-770.
- 16) Perera,F.P., Whyatt,R.M. (1994). Biomarkers and molecular epidemiology in mutation/cancer research. *Mutat. Res.*, 313, 117-129.
- 17) Grittore, S., Maestri,L., Fiorentino, M.L., Imbriani,M. (1995) Evaluation of occupational exposure to benzene by urinalysis. *Int. Arch. Occup. Environ. Health*, 67, 195-200.
- 18) Waidyanatha,S., Rothman,N., Fustinoni,S., Smith,M.T., Hayes,R.B., Bechtold,W., Dosemeci,M., Guilan,L., Yin,S., Rappaport,S.M. (2001). Urinary benzene as a biomarker of exposure among occupationally exposed and unexposed subjects. *Carcinogenesis*, 22, 279-286.
- 19) Hagmar,L., Brogger,A., Hansteen,I.L., Heim,S., Hogstedt,B., Knudsen,L., Lambert,B., Linnainmaa,K., Mitelman,F., Nordenson,I., Reuterwall,C., Salomaa,S., Skerfving,S., Sorsa, M. (1994). Cancer risk in humans predicted by increased levels of chromosomal aberrations in lymphocytes: Nordic study group on the health risk of chromosome damage. *Cancer Res.*, 54, 2919-22.
- 20) Hagmar,L., Bonassi,S., Stromberg,U., Brogger,A., Knudsen,L.E., Norppa,H., Reuterwall,C. (1998). Chromosomal aberrations in lymphocytes predict human cancer: a report from the European Study Group on Cytogenetic Biomarkers and Health (ESCH). *Cancer Res.* 1998, 58, 4117-4121.
- 21) Bonassi,S., Hagmar,L., Stromberg,U., Montagud,A.H., Tinnerberg,H., Forni,A., Heikkila,P., Wanders,S., Wilhardt,P., Hansteen,I.L., Knudsen,L.E., Norppa,H. (2000). Chromosomal aberrations in lymphocytes predict human cancer independently of exposure to carcinogens. European Study Group on Cytogenetic Biomarkers and Health. *Cancer Res.*, 60, 1619-1625.
- 22) Fenech,M., Holland,N., Chang,W.P., Zeiger,E., Bonassi,S. (1999). The Human MicroNucleus Project—an international collaborative study on the use of the micronucleus technique for measuring DNA damage in humans. *Mutat. Res.*, 428, 271-283.
- 23) Fenech,M. (2002). Biomarkers of genetic damage for cancer epidemiology. *Toxicology*, 181-182, 411-416.
- 24) Kassie,F, Parzefall,W, Knasmuller,S. (2000). Single cell gel electrophoresis assay: a new technique for human biomonitoring studies. *Mutation Res*, 463, 13-31.
- 25) Schmezer,P., Rajae-Bebahani,N., Risch,A., Thiel,S. (2001). Rapid screening assay for mutagen sensitivity and DNA repair capacity in human peripheral blood lymphocytes. *Mutagenesis*,16, 25-30.
- 26) Rossi,A.M., Guarnirei,C., Rovesti,S., Gobba,F., Ghittori,S., Vivoli,G., Barale,R. (1999). Genetic polymorphisms influence variability in benzene metabolism in humans. *Pharmacogenetics*, 9, 445-451.
- 27) Rothman,N., Wacholder,S. Caporaso,N.E., Garcia-Closas,M. Buetow,K., Fraumeni,J.F. (2001). The use of common genetic polymorphisms to enhance the epidemiologic study of environmental carcinogens. *Biochem. Biophysica acta*, 1471, C1-10.
- 28) Zhao,X., Niu,J., Wang,Y., Yan,C., Wang,X. and Wang,J. (1998) Genotoxicity and chronic health effects of automobile exhaust: a study on the traffic policemen in the city of Lanzhou. *Mutat. Res.*, 415, 185-190.
- 29) Anwar,W.A. and Kamal,A.A.M. (1988) Cytogenetic effects in a group of traffic policemen in Cairo. *Mutat. Res.*, 208, 225-231.

- 30) Chardrasekaran,R., Samy,P.L.P. and Murthy,P.B.K. (1996) Increased sister chromatid exchange (SCE) frequencies in lymphocytes from traffic policemen exposed to automobile exhaust pollution. *Hum. Exp. Toxicol.*, 15, 301-304.
- 31) Bolognesi,C., Merlo,F., Rabboni,R., Valerio,F. and Abbondandolo,A. (1997) Cytogenetic biomonitoring in traffic police workers: micronucleus test in peripheral blood lymphocytes. *Environ. Mol. Mutagen.*, 30, 396-402.
- 32) Carere,A., Andreoli,C., Galati,R., Leopardi,P., Marcon,F., Rosati,M.V., Rossi,S., Tomei,F., Verdina,A., Zijno,A. and Crebelli,R. (2002) Biomonitoring of exposure to urban air pollutants: analysis of sister chromatid exchanges and DNA lesions in peripheral lymphocytes of traffic policemen. *Mutat. Res.*, 518, 215-224.
- 33) Leopardi,P., Zijino,A., Marcon,F., Conti,L., Carere,A., Verdina,A., Galati,R., Tomei,F. and Crebelli,R. (2003) Analysis of Micronuclei in peripheral blood lymphocytes of traffic wardens: effects of exposure, metabolic genotypes, and inhibition of excision repair in vitro by ARA-C. *Environ. Mol. Mutagen.*, 41, 126-130.