



# Webinar Magistrali 2024

Italian Society of Occupational Health

**HUMAN HEALTH RISKS FROM THE WORKPLACE TO THE  
GENERAL ENVIRONMENT OF LIFE: WHAT LESSONS FOR  
RESEARCHERS AND PROFESSIONALS INVOLVED IN THEIR  
IDENTIFICATION, QUANTIFICATION, AND PREVENTION?**



## **Benzene: from very high to very low exposure what (adverse) effects in exposed subjects?**

Angela Cecilia Pesatori

Università degli Studi di Milano



1897, Santesson  
1916, Selling

## ANEMIA APLASTICA

Numerose segnalazione di casi di leucemia in tutto il mondo a partire dagli anni '30 fino agli anni '70

1928, Delore e Bergomano

**1938, Penati e Vigliani**

1939, Bowditch and Elkins

Hunter

Mallory et al

**1945, Saita**

1962, Ludwig and Werthermann

1963, DeGowin

Tareeff et al

**1964, Vigliani e Saita, Benzene and leukemia New Eng J Med**

1967, Goguel et al

1971, Aksoy et al

> J Occup Med. 1969 Mar;11(3):148-9.

## **Benzene, chromosome changes and leukemia**

E C Vigliani, A Forni

### Chromosome Changes and Their Evolution in Subjects With Past Exposure to Benzene

*Alessandra M. Forni, MD; Anna Cappellini, MD;  
Emma Pacifico, ScD; and Enrico C. Vigliani, MD, Milan, Italy (Arch Environ Health, 1971)*

# **Benzene and leukemia: from scientific evidence to regulations. A historical example**

MICHAEL BELINGHERI<sup>1</sup>, SILVIA FUSTINONI<sup>2,3</sup>, GIOVANNI DE VITO<sup>1</sup>, ALESSANDRO PORRO<sup>2</sup>,  
MICHELE AUGUSTO RIVA<sup>1</sup>

<sup>1</sup> School of Medicine and Surgery, University of Milano-Bicocca, Monza, Italy

<sup>2</sup> Department of Clinical Sciences and Community Health, University of Milan, Milan, Italy

<sup>3</sup> Fondazione IRCCS Ca' Granda Ospedale Maggiore Policlinico, Milan, Italy

# CORRIERE D'INFORMAZIONE

PREZZI ALL'ESTERO \* SPEDIZIONE AEREA \* Roma ... 5L 1/6 \* 6540 Africa ... 5L 1/6 \* 6540 Roma ... 5L 1/6 \* Redazione, Amministrazione, Pubblicità e Tipografia - Milano - Via Solferino, 23 - Tel. 8780 6293 - Estero 865.941 \* PREZZI D'ASSONAMENTO \* Anno \* Semestre \* Trimestre \* Anno \* Semestre \* Trimestre

## LE SCARPE

### Allarme per i casi di morte a Vigevano

Vigevano, 13 giugno. Allarme in città per la colla che si dice s'è morta tre persone (due bambini e una bambina), dopo una lunga e straziante agonia, a seguito di intossicazione dovuta al benzolo, che si trova nella colla per fabbricare le scarpe.

Negli ospedali di Vigevano e Pavia trentatré persone lottano disperatamente fra la vita e la morte, sette calzaturifici sono stati chiusi d'ordine delle autorità sanitarie. Ma c'è di più. *Leggere il servizio del nostro inviato a pagina dodici.*

### Inchiesta aperta a Vigevano sui casi dei calzaturifici morti per il benzolo

Alcuni laboratori di scarpe chiusi per ordine dell'ufficiale sanitario

Vigevano, 13 giugno. Notevole scolorire sta succedendo a Vigevano l'inchiesta pneumologica per verificare il grande pericolo che grava sui lavoratori dell'industria calzaturifici.

In fatti in venti giorni tre persone hanno perduto la vita in seguito a intossicazione da benzolo, e altre sei sono ricoverate negli ospedali in gravi condizioni.

Il primo caso mortale risale al 23 maggio scorso, quando al Policlinico di Pavia morì la piccola Paola Piredda, di tre anni, residente a Vigevano in via Merlino 39. Sua sua cuginata, invece, Maria Luisa Piazza fu ricoverata in via di via.

Le due bambine da alcuni mesi vivevano con le loro famiglie in una casetta formata da due vani, nella quale la madre e la nonna di Maria Luisa, per arrotondare il mezzogiorno familiare, intrattavano aiuti di scarpe con

una soluzione a base di benzolo. Le esalazioni prodotte dal velenoso solvente finirono gradualmente per intossicare le due bimbe.

Dopo soli cinque giorni, perdette la vita anche il cinquequattrenne Giuseppe Cedrati, occupato come pianta-tacchi nel calzaturificio Pollini, in via Pietrasana 2. Immediatamente la fabbrica venne chiusa.

Fecero giorni fa si è registrata un altro decesso, sempre per intossicazione da benzolo. Si tratta questa volta dell'artigiano Paolo Sala, di 55 anni.

### UN ALTRO OPERAIO UCCISO DAL BENZOLO

## Un'ottava vittima a Vigevano del solvente per i calzaturifici

Aveva avvertito i primi sintomi del male nel giugno scorso, prima che intervenissero le misure di profilassi attualmente in corso

DEL NOSTRO CORRISPONDENTE

### E' SPIRATO DOPO LUNGA AGONIA

## Decima vittima del benzolo: muore un operaio a Vigevano

E' un calzaturiere di cinquantacinque anni - Inutili le cure tentate a Pavia per salvarlo

## Scioperano a Vigevano

### per la "peste bianca,"

## 800 fabbriche di scarpe

Motivo il benzolo nei calzaturifici - Le ragioni degli industriali e quelle dei sindacalisti

### NELLE FABBRICHE DI CALZATURE

## Il comune di Vigevano chiede che sia vietato l'uso del benzolo

Vigevano 17 ottobre, notte.

Il consiglio comunale di Vigevano, al termine di una seduta protrattasi per gran parte della notte, ha votato all'unanimità un ordine del giorno contro l'uso del benzolo nei calzaturifici.

« Il consiglio comunale di Vigevano — dice l'ordine del giorno — in ordine alle gravi preoccupazioni che mortali intossicazioni da benzolo hanno sollevato in città, rendendosi interprete delle legittime istanze della popolazione ed in particolare di quella lavoratrice, invita le autorità ministeriali competenti a predisporre con tutta urgenza un decreto legge che vieti l'uso del benzolo nella fabbricazione delle calzature ed in attesa dà mandato al sindaco ed alla giunta di emettere o di chiedere da parte delle autorità competenti l'emissione di una ordinanza che proibisca l'impiego di detta sostanza nei calzaturifici ».



LEGGE 5 marzo 1963, n. 245.

**Limitazione dell'impiego del benzolo e suoi omologhi nelle attività lavorative.**

La Camera dei deputati ed il Senato della Repubblica hanno approvato ;

## IL PRESIDENTE DELLA REPUBBLICA

PROMULGA

la seguente legge :

### Art. 1.

Le norme contenute nella presente legge si applicano a tutte le attività, anche se esercitate dallo Stato e dagli Enti pubblici, alle quali siano comunque addetti prestatori di lavoro, ivi compresi quelli che svolgono attività artigiane e quelli che lavorano a domicilio su commissione.

### Art. 2.

Nei lavori di lavaggio a secco, di sgrassaggio e di pulitura in genere, è vietato l'uso di solventi contenenti benzolo. E' pure vietato l'uso di toluolo o xilolo in percentuale superiore al 5 per cento in peso. Qualora il solvente contenga più di una delle dette sostanze la percentuale del 5 per cento si intende riferita al complesso di esse.

### Art. 3.

Nelle impermeabilizzazioni dei tessuti, nella fabbricazione e riparazione degli impermeabili, nella fabbricazione e riparazione delle calzature, è vietato l'uso di prodotti, quali colle, mastici, cementi, sciolti in solventi contenenti benzolo. E' pure vietato l'uso di toluolo o xilolo in percentuale superiore al 5 per cento in peso del solvente.

Nelle lavorazioni diverse da quelle indicate al primo comma è consentito l'uso di prodotti, quali colle, mastici, cementi, i cui solventi contengano toluolo o xilolo in misura non eccedente il 30 per cento, complessivamente considerati, fermo restando il divieto per l'uso del benzolo.

### Art. 4.

Nei lavori di pittura, di decorazione, di verniciatura e di rivestimento in genere, nonchè nei lavori di sverniciatura e di decapaggio, è vietato l'uso del benzolo. E' consentito l'uso di prodotti i cui solventi o diluenti contengano toluolo o xilolo in percentuale non superiore al 45 per cento in peso, complessivamente considerati.

### Art. 5.

E' vietato l'uso di inchiostri, nei quali le sostanze diluenti o disperdenti contengano benzolo. E' pure vietato l'uso di toluolo o xilolo in percentuale superiore al 5 per cento, complessivamente considerati.

Nei lavori di rotocalcografia è consentito l'impiego di inchiostri con solventi costituiti in tutto o in parte da toluolo o xilolo, fermo restando il divieto di uso del benzolo.

Rimane in vigore per quanto riguarda le operazioni di ripulitura dei rulli inchiostriatori, dei cilindri, dei calamai, di parti di macchine, di attrezzi in genere, il disposto dell'articolo 2 della presente legge relativo ai lavori di pulitura.

**1974,** Animal data: The data reported ***do not permit the conclusion*** that carcinogenicity has been demonstrated

Human data: It is established that exposure to commercial benzene or benzene-containing mixture may result in ***damage to the hematopoietic system.***

A relationship between such exposure and the development of leukemia is suggested by many case reports, and this suggestion is strengthened by a case-control study from Japan

**1979,** Animal data: *Inadequate evidence*

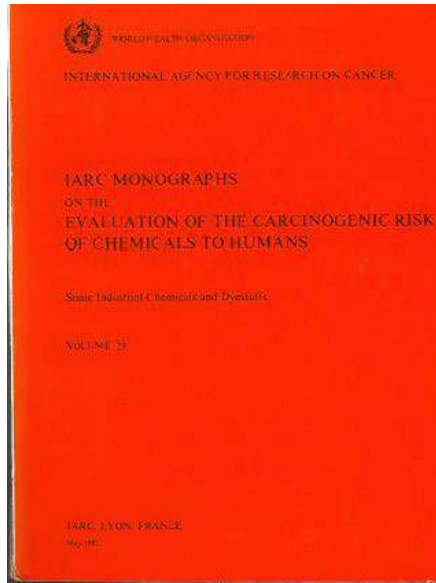
Human data: *Sufficient evidence (case-reports, case-control, cohort studies in workers)*

## **GROUP 1**

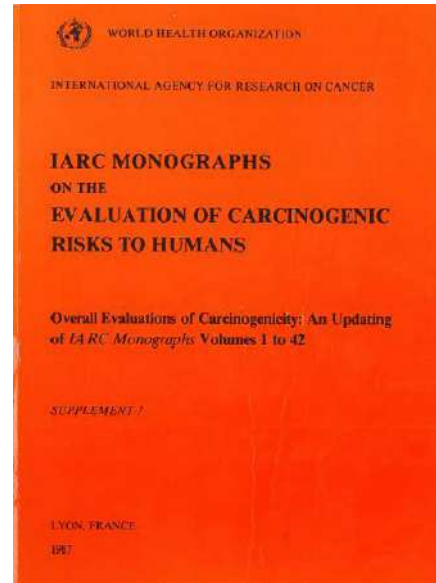
# International Agency for Research on Cancer



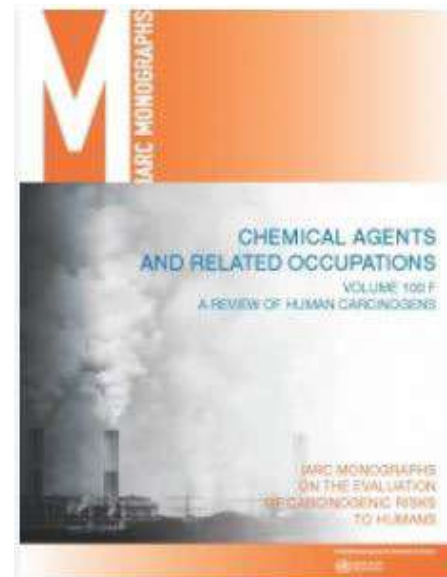
## IARC MONOGRAPHS ON THE IDENTIFICATION OF CARCINOGENIC HAZARDS TO HUMANS



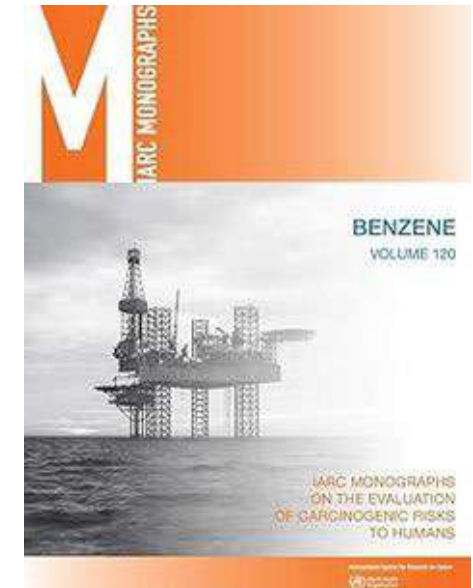
1982, Vol 29



1987, Supl.7



2012, Vol 100F



2018, Vol 120

1982,     Animal data: *Limited evidence*  
          Human data: *Sufficient evidence*

It is established that exposure to commercial benzene or benzene-containing mixture may result in damage to the hematopoietic system, ***including pancytopenia.***

A relationship between such exposure and the development of ***acute myelogenous leukemia*** has been established in epidemiological studies

Reports linking exposure to benzene with ***other malignancies were considered to be inadequate*** for evaluation

1987,     Animal data: Sufficient evidence  
          Human data: sufficient evidence

Other relevant data: Chromosomal aberration in human peripheral lymphocytes, in bone marrow cells of rats and mice; MN and SCE in rats and mice, benzene induced mutation and DNA damage in rodents cells in vitro



**BENZENE**  
VOLUME 120

IARC MONOGRAPHS  
ON THE EVALUATION  
OF CARCINOGENIC RISKS  
TO HUMANS

**Animal data:** Sufficient evidence

**Humans:**

Sufficient evidence for Acute Myeloid Leukemia

Limited evidence: non-Hodgkin lymphoma, CLL, MM, CML, AML in children, and lung cancer

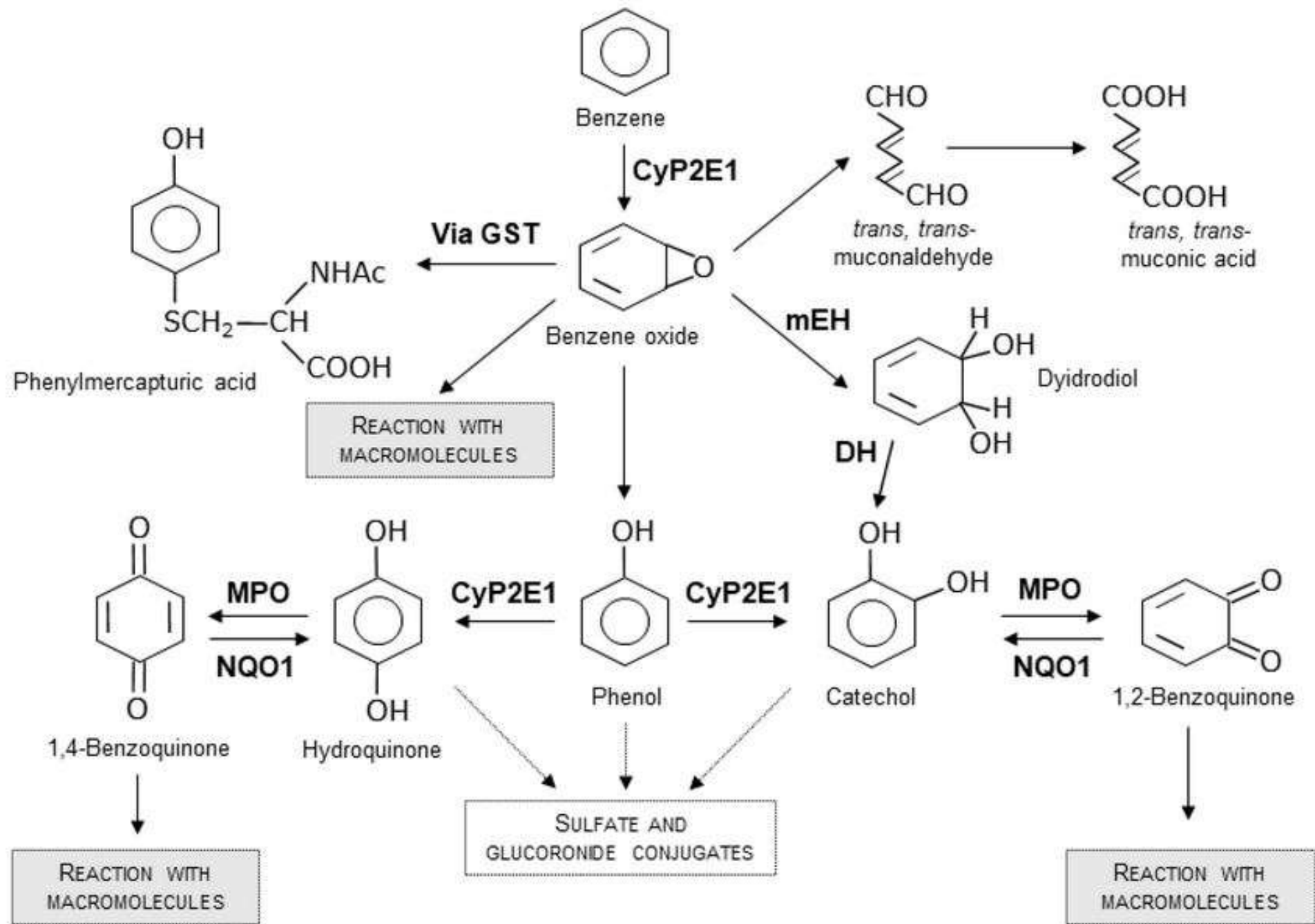
**Mechanistic data:**

**Strong evidence**, including in exposed human that benzene :

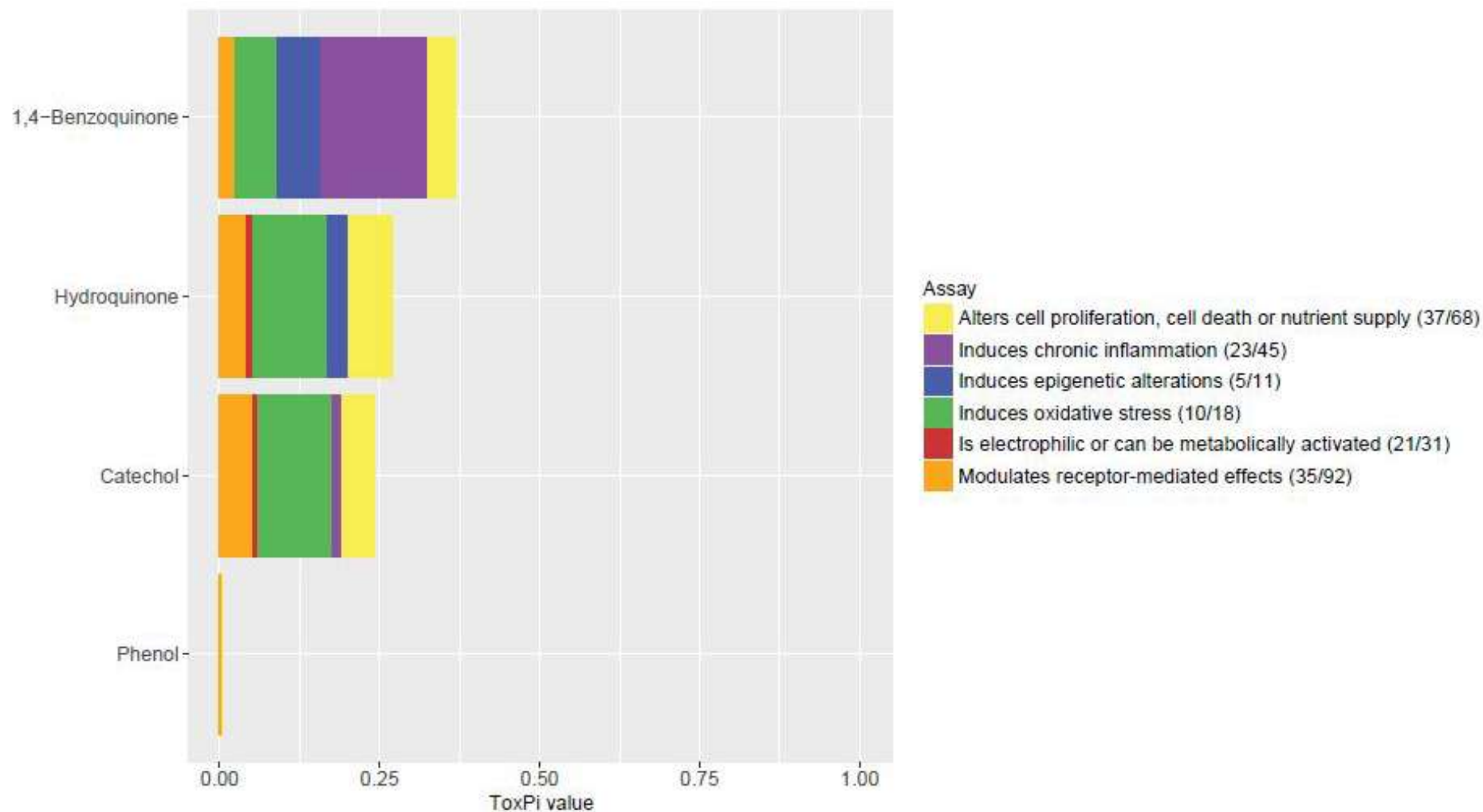
- is metabolically activated to electrophilic metabolites,
- induce oxidative stress and oxidative DNA damage
- is genotoxic ( DNA damage and chromosomal changes)
- Immunosuppressive and causes hematotoxicity

Key characteristic of carcinogenesis (Smith 2006)

1. Is electrophilic or can be metabolically activated to electrophiles
2. Is genotoxic
3. Alters DNA repair or causes genomic instability
4. Induces epigenetic alterations
5. Induces oxidative stress
6. Induces chronic inflammation
7. Is immunosuppressive
8. Modulates receptor-mediated effects
9. Causes immortalization
10. Alters cell proliferation, cell death, or nutrient supply



**Fig. 4.3 Stacked bar plots of ToxPi values by assay category for benzene metabolites phenol, catechol, hydroquinone, and 1,4-benzoquinone using ToxCast and Tox21 assay end-points mapped to six key characteristics of carcinogens**



The numbers in the parentheses next to each category represent the ratio of the maximum number of hits to assays assigned to category over 189 IARC agents to the total number of assays assigned to the category

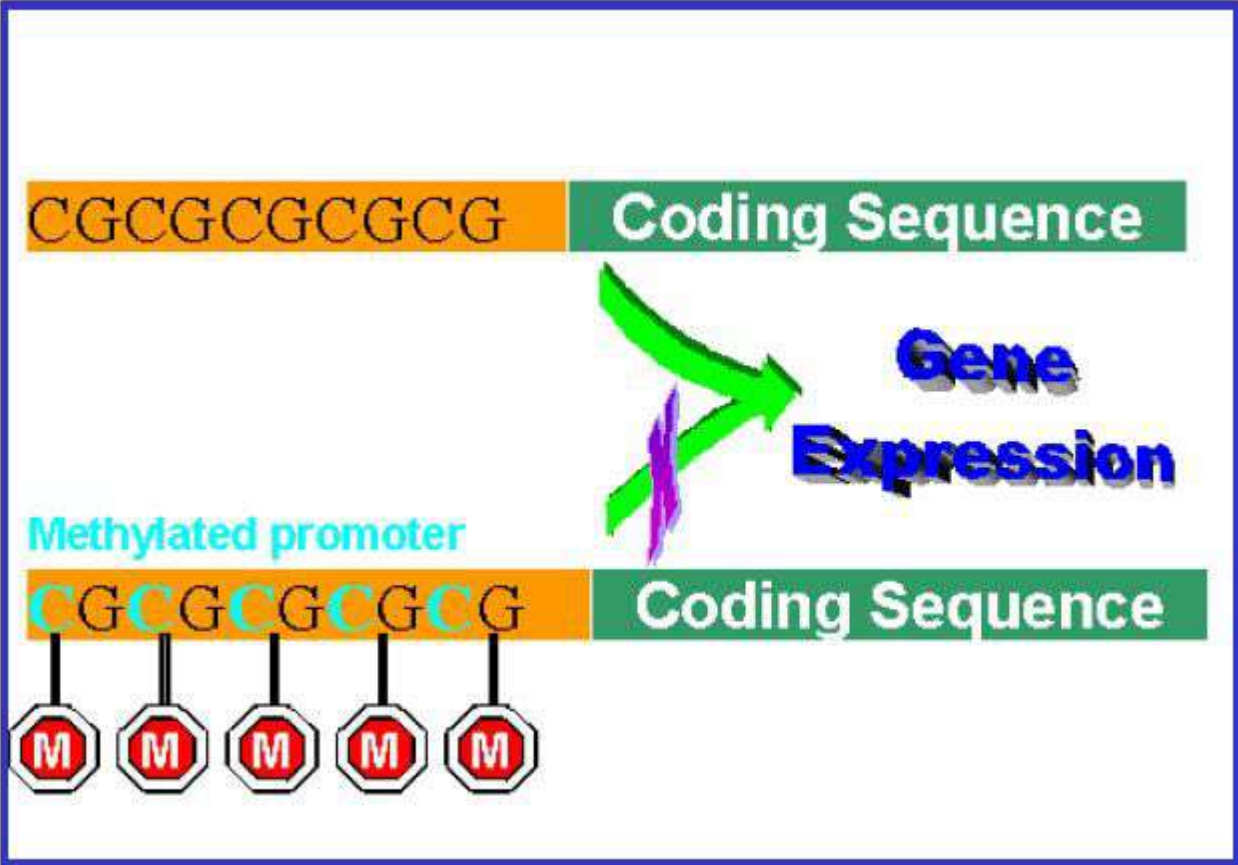
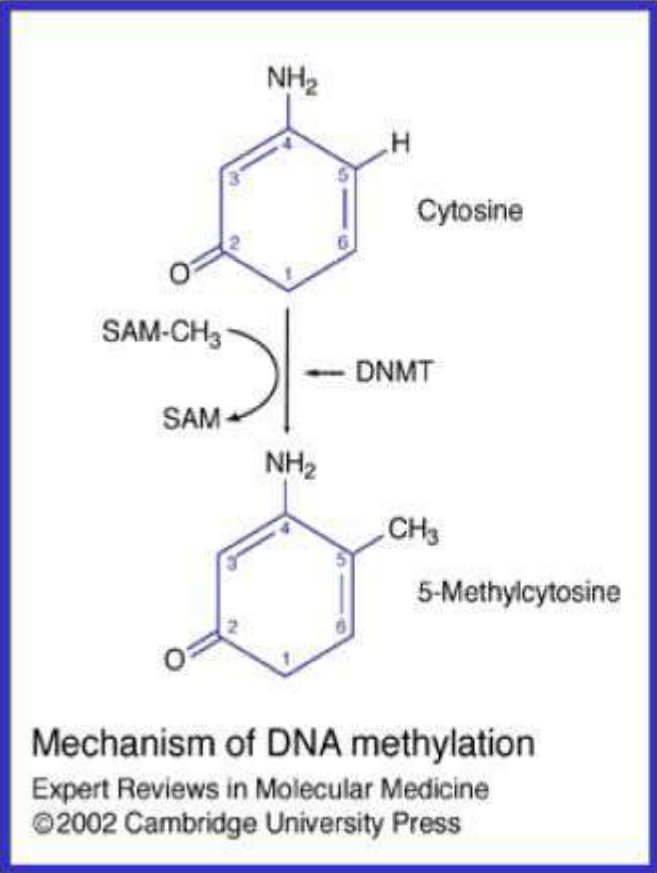
# Benzene oggi



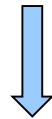
*Valori Limite di esposizione (OEL), Direttiva UE 2022/431*

Fino al 5 aprile 2024	1 ppm (3,25 mg/m <sup>3</sup> )
5 aprile 2024-5 aprile 2026	0,5 ppm
Poi	0,2 ppm

# METILAZIONE DEL DNA

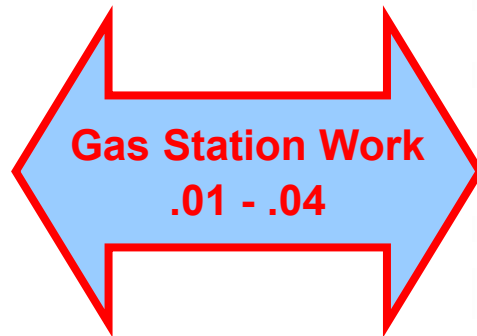


# Ipotesi 1

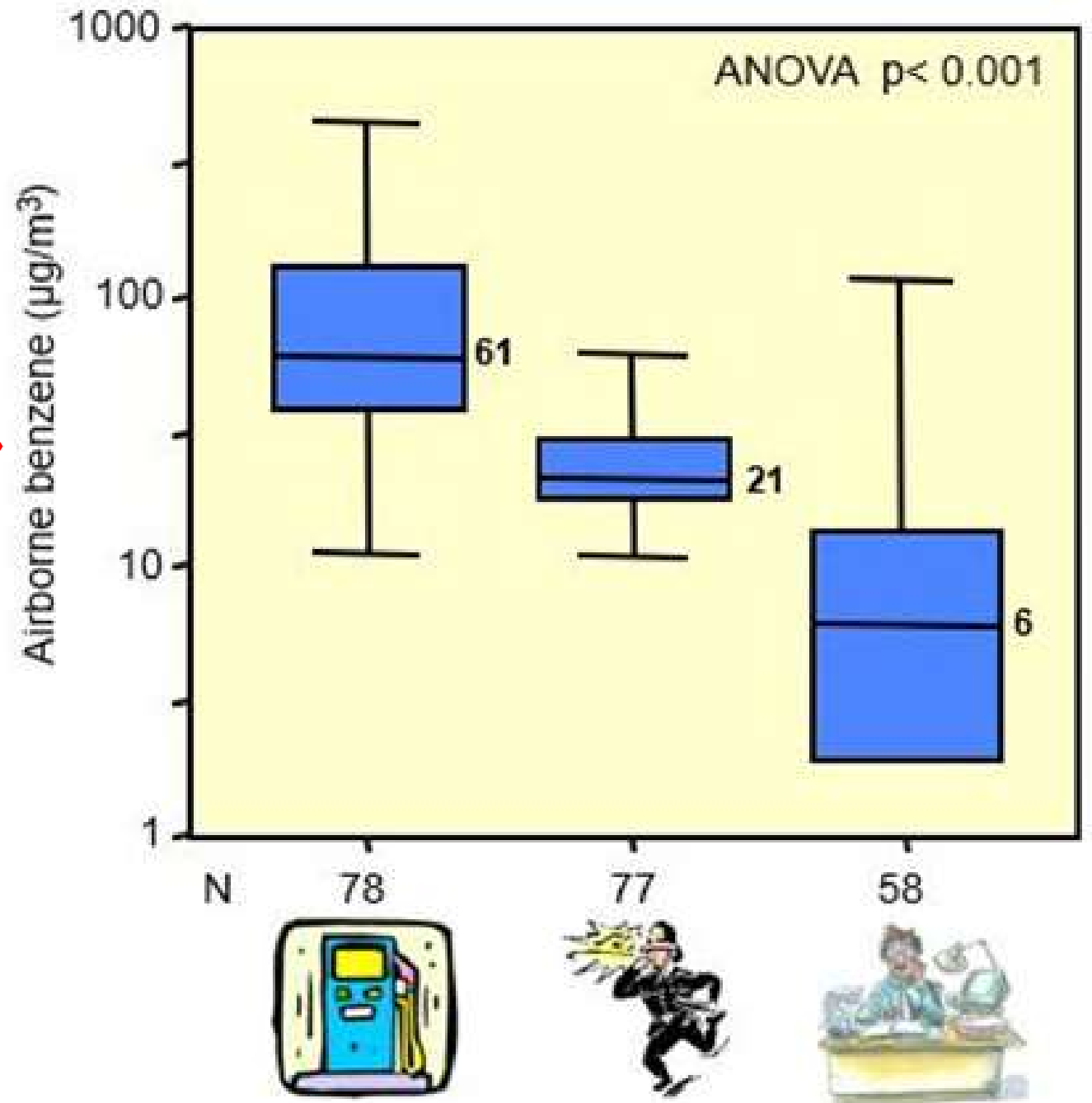


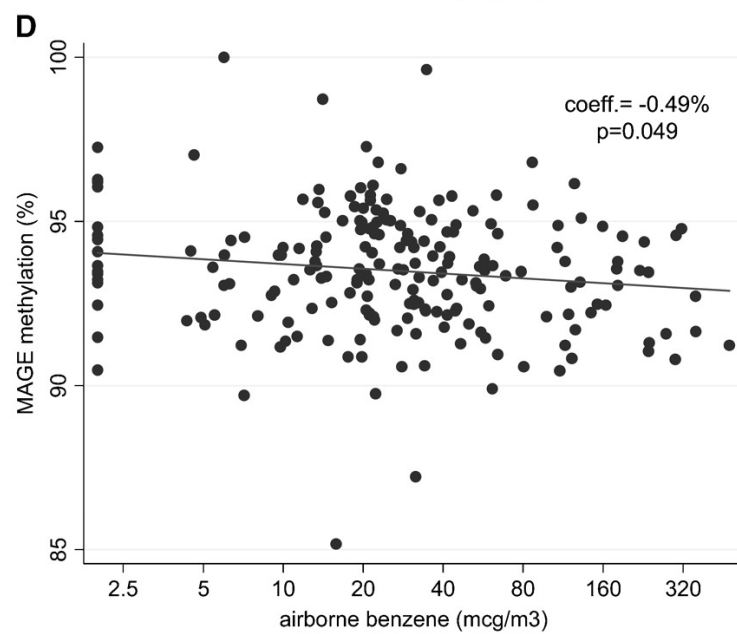
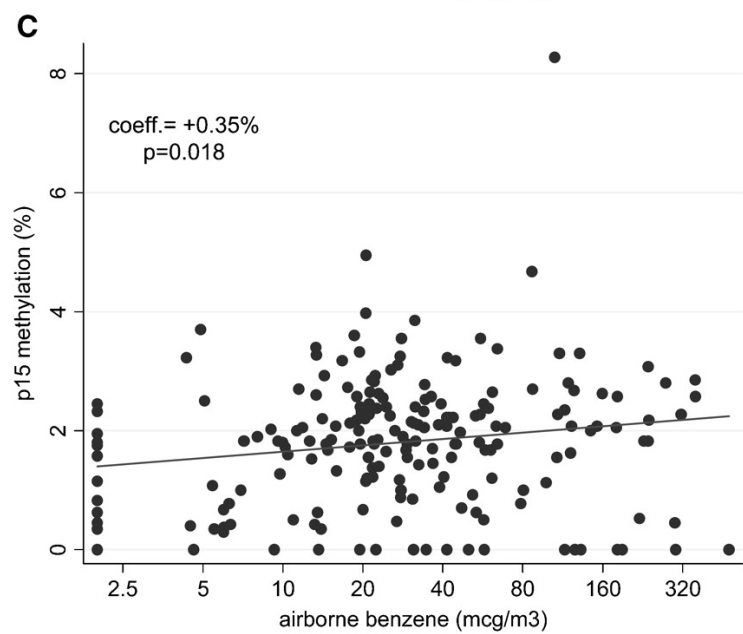
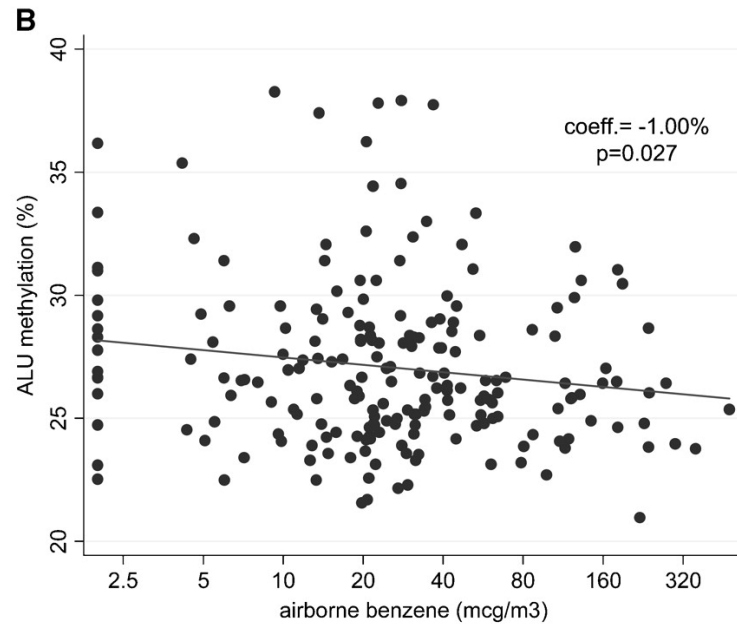
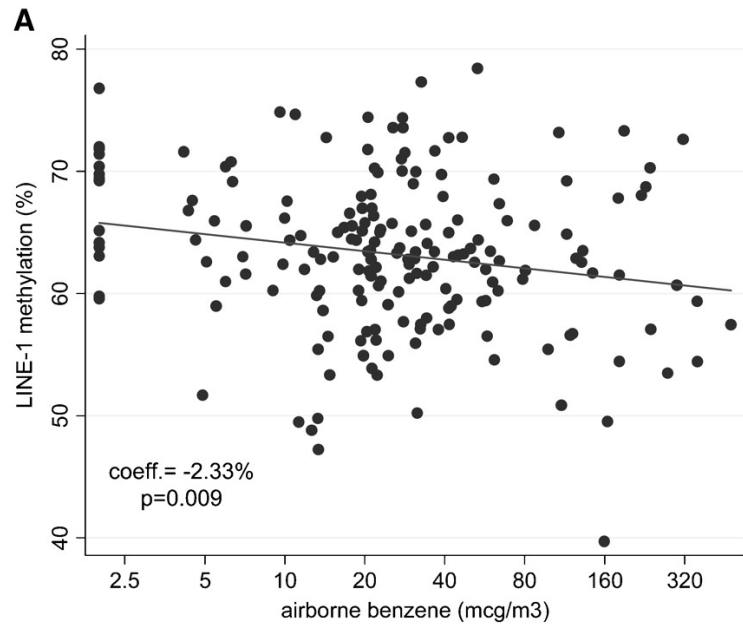
- Globale (sequenze ripetute di Alu e LINE-1)
- Gene oncosoppressore p-15
- Gene MAGE-1

# Popolazione allo studio



< 0.1 ppm





- Ipometilazione di LINE-1
- Ipometilazione di Alu
- Ipermetilazione di p15
- Ipometilazione di MAGE1

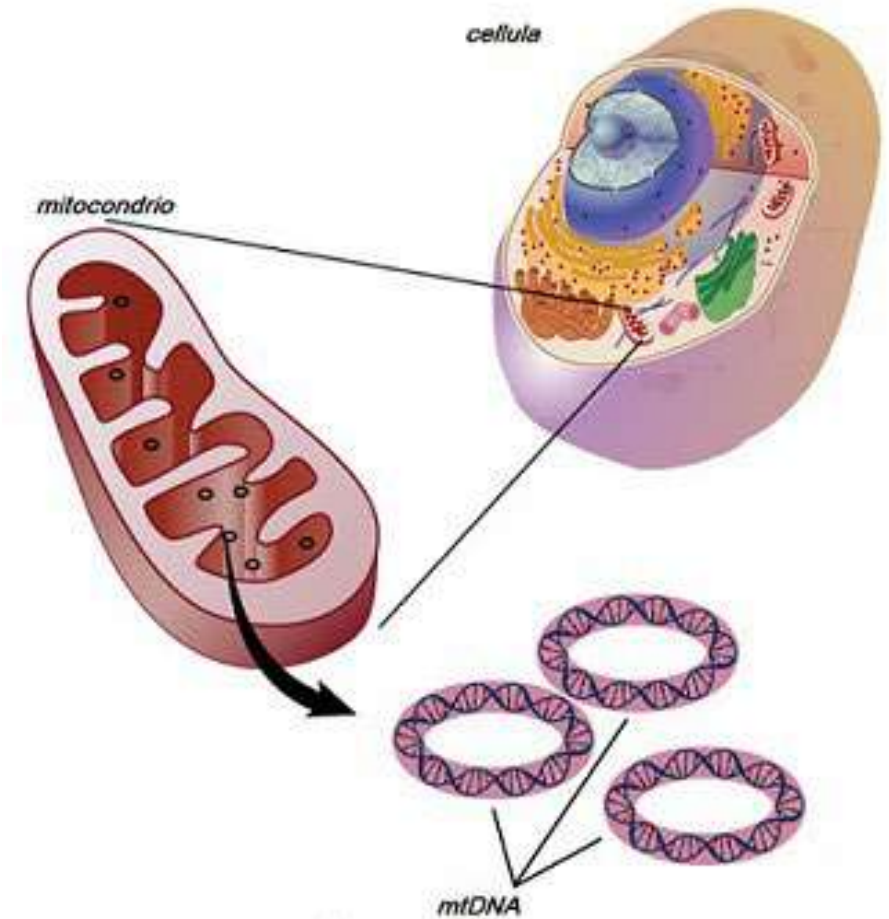
# Effetti sulla Metilazione:

## Confronto malattia e nostri risultati

<b>Metilazione</b>	<b>Leucemia</b>	<b>nostri Risultati</b>
Globale	↓	↓
p15	↑	↑
MAGE-1	↓	↓

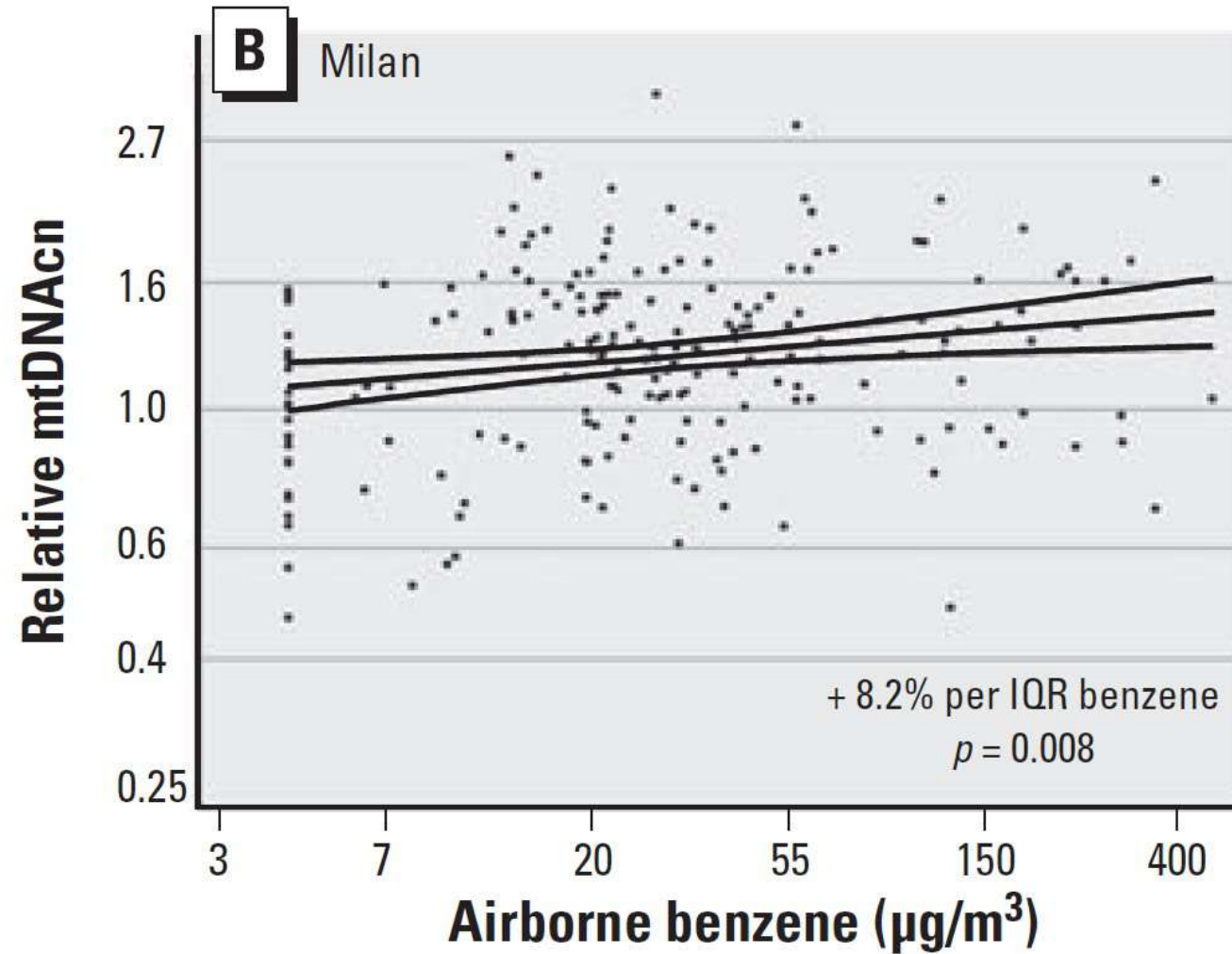
# Ipotesi 2

- Gli effetti del benzene sulla metilazione potrebbero essere il risultato di danni a DNA causati da un aumento stress ossidativo?
- C'è associazione coi pattern alterati di metilazione osservati?

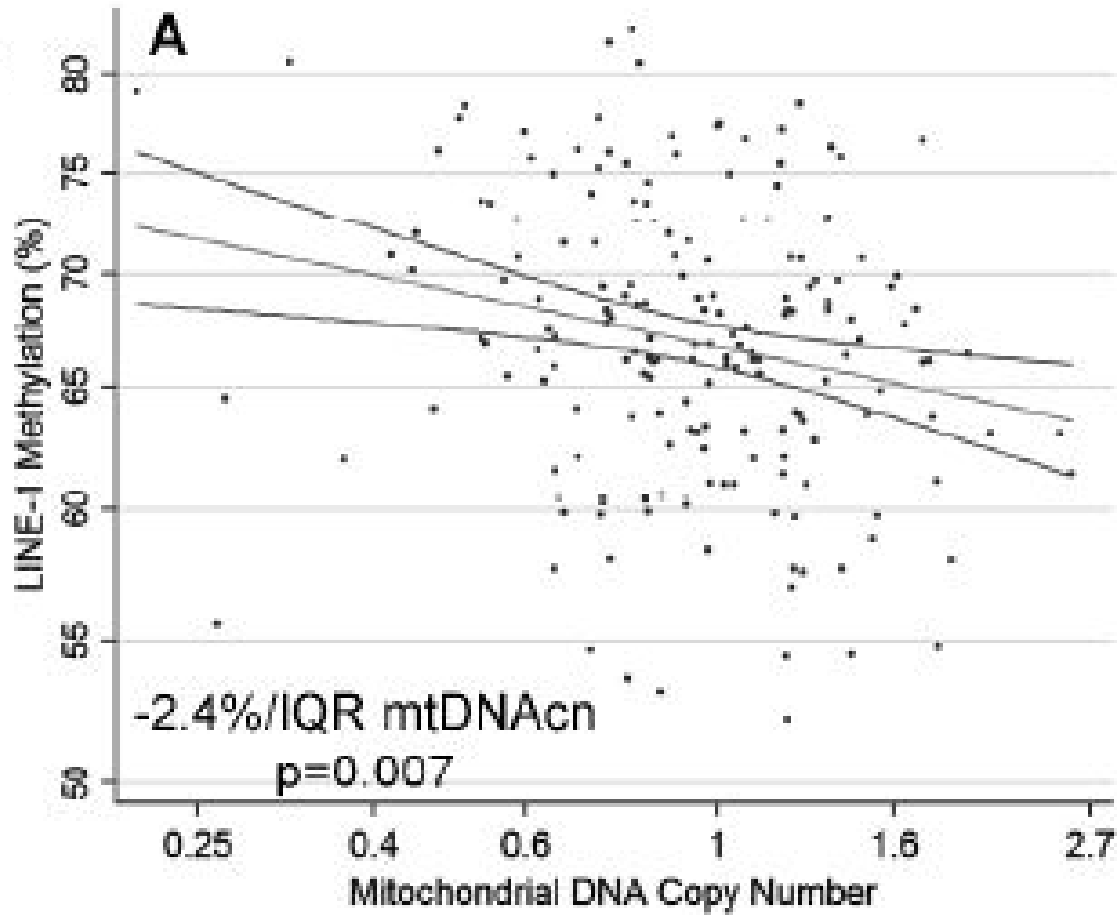


Copie di DNA  
mitocondriale

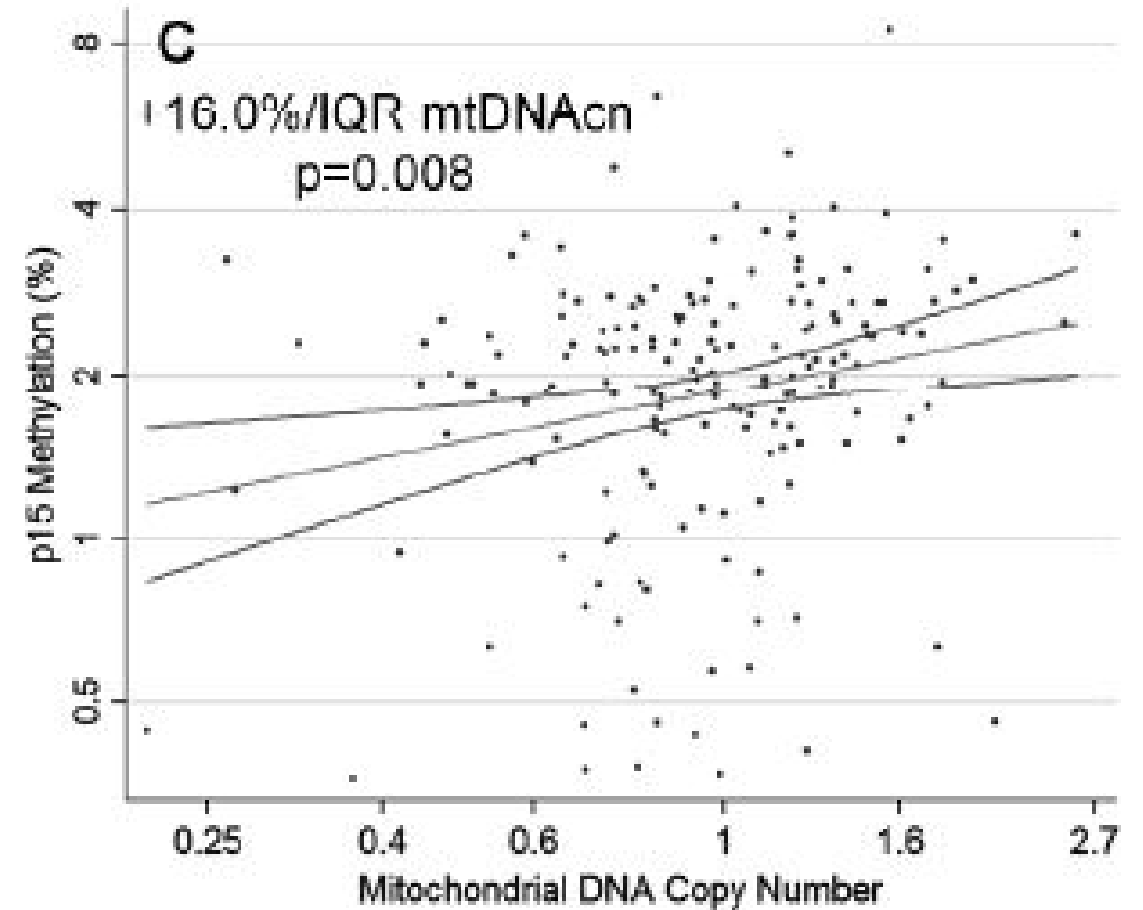
# Benzene exposure & mitochondrial DNA copy number alterations



## LINE-1 methylation and DNA mt copy number



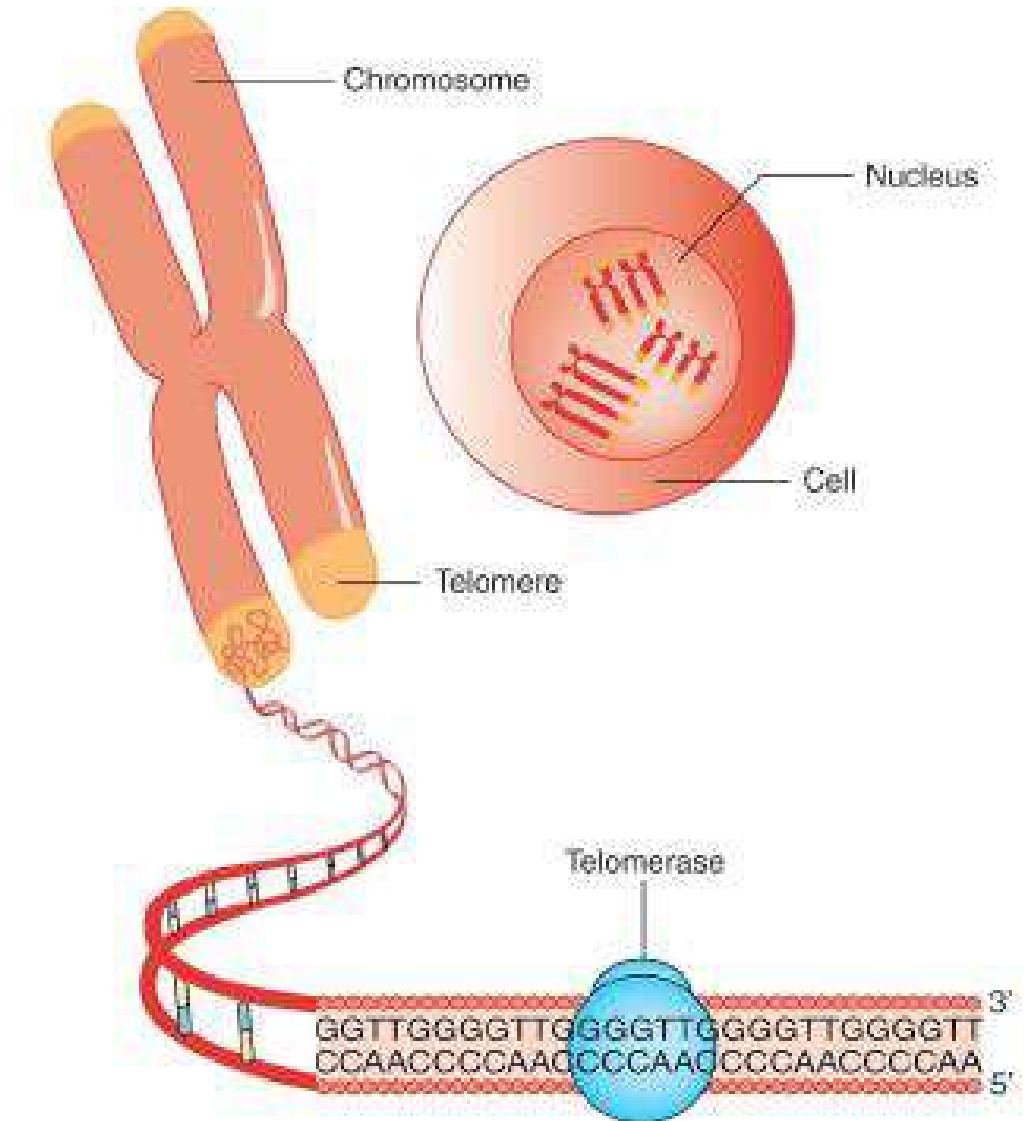
## p15 methylation and DNA mt copy number



Authors	Subjects	Benzene Exposure	MtDNAcp	p
		ppm (previous year)		
Shen (2008) China	40 unexposed	< 0.04	ref	
	20 low exposed	1-10	↑ 4%	0.7
	20 high exposed	≥ 10	↑ 15%	0.02 <i>(P-trend 0.02)</i>
		Median CE (ppm-yr)		
Li A (2020) China	58 unexposed	NA	ref	
	87 low exposed	0.9 ± 0.4	↑ 4%	0.004
	87 high exposed	3.6 ± 1.4	↔	
Ji B (2021) China	102 unexposed	NA	ref	
	294 exposed	9.8	↑ 38%	0.001

# 3 ipotesi

Lo stress ossidativo causato dal benzene può portare ad un accorciamento dei telomeri?



# Benzene e telomeri

- 48 lavoratori dell'industria calzaturiera cinese esposti a benzene e 50 soggetti non esposti
- Categorie di esposizione:
  - referenti (<0.035 ppm)
  - basse esposizioni (media = 1.35 ppm)
  - alte esposizioni (media = 27.3 ppm)
- Riduzione della lunghezza telomerica e accelerazione dell'età biologica al crescere dell'esposizione

Environment International 158 (2022) 106871



Contents lists available at [ScienceDirect](#)

Environment International

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/envint](http://www.elsevier.com/locate/envint)

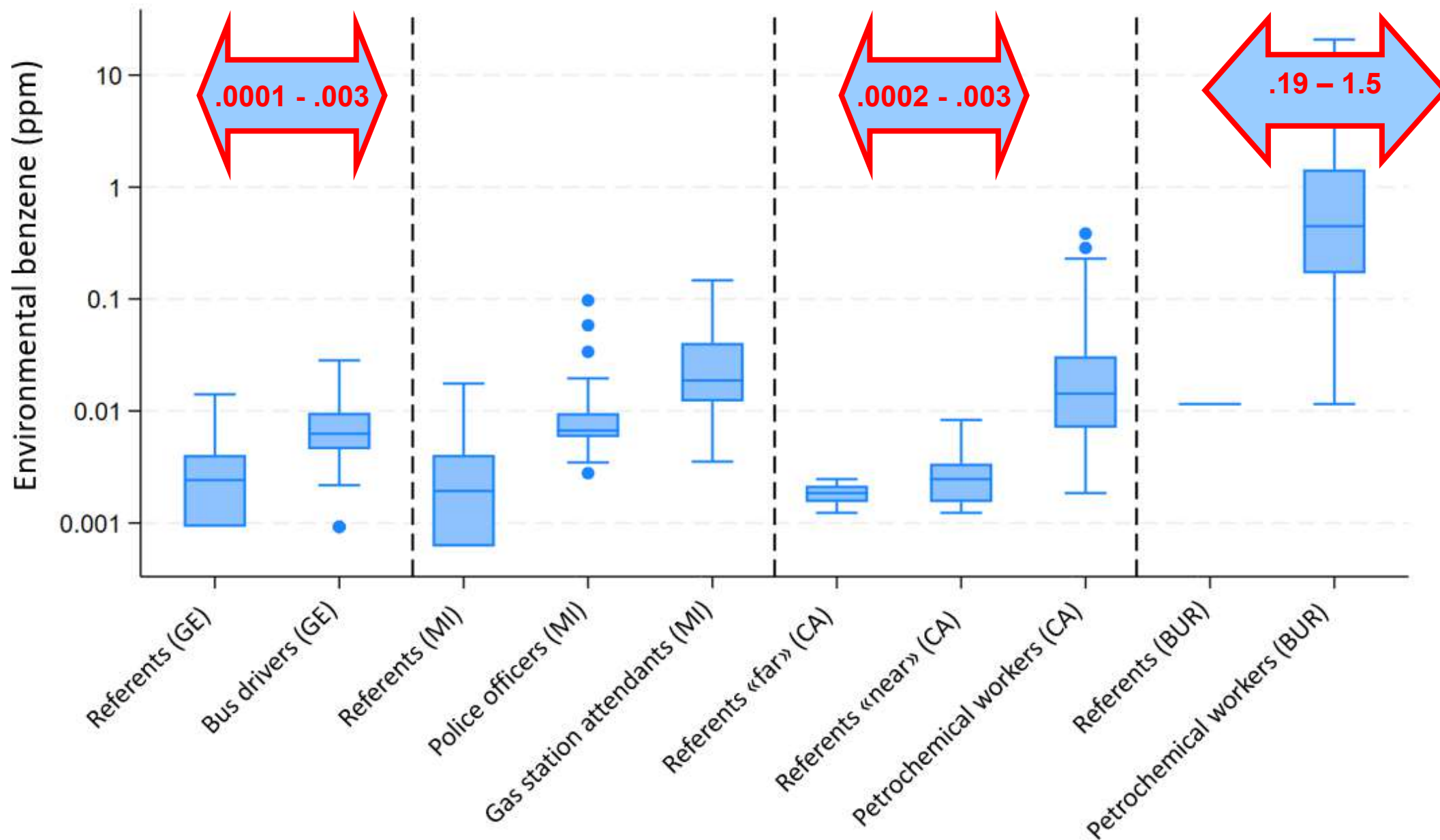


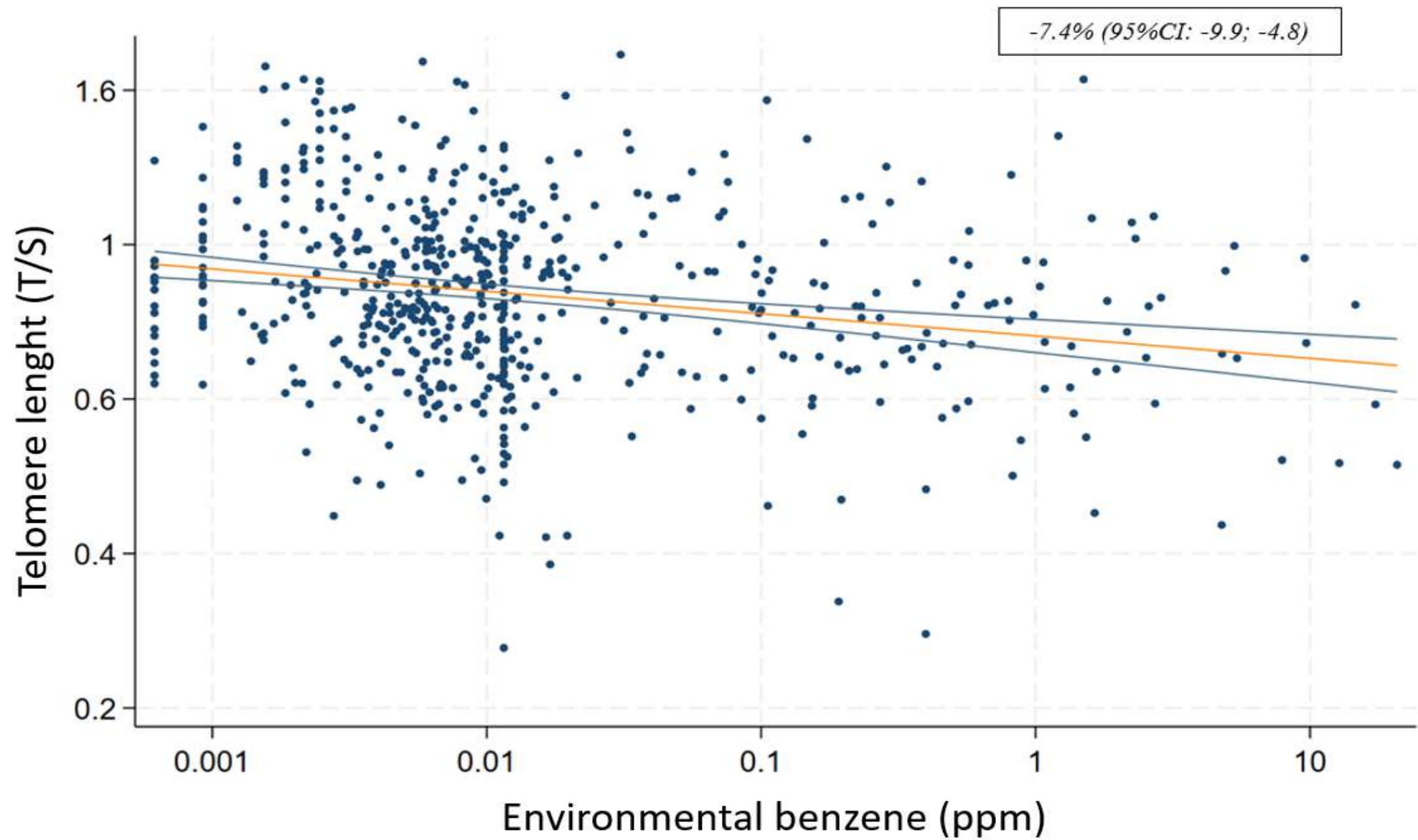
Epigenetic aging biomarkers and occupational exposure to benzene, trichloroethylene and formaldehyde

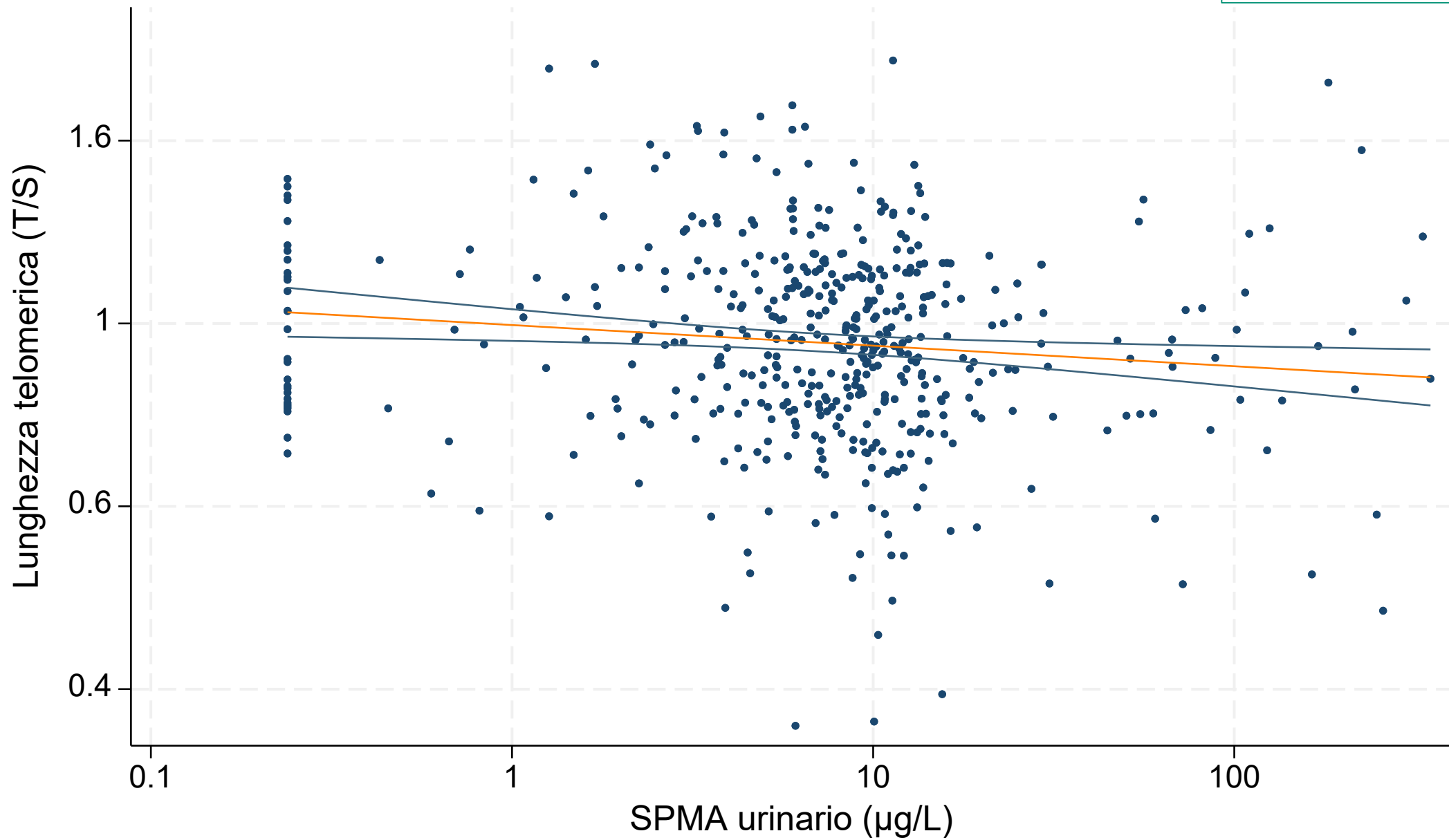
Lars van der Laan<sup>a,\*,1</sup>, Andres Cardenas<sup>a,b,\*,1</sup>, Roel Vermeulen<sup>c</sup>, Raj P. Fadadu<sup>a</sup>, Alan E. Hubbard<sup>a,b</sup>, Rachael V. Phillips<sup>a,b</sup>, Luoping Zhang<sup>a</sup>, Charles Breeze<sup>d</sup>, Wei Hu<sup>d</sup>, Cuiju Wen<sup>e</sup>, Yongshun Huang<sup>e</sup>, Xiaojiang Tang<sup>f</sup>, Martyn T. Smith<sup>a,1</sup>, Nathaniel Rothman<sup>d,1</sup>, Qing Lan<sup>d,1</sup>



# Study population: 423 exposed and 190 non exposed subjects







Benzene (ppm)	GM (95%CI)	p-trend
$\leq 0.005$	0.94 (0.90 - 0.98)	
$> 0.005 - \leq 0.001$	0.86 (0.82 - 0.90)	
$> 0.001 - \leq 0.05$	0.83 (0.79 - 0.87)	
$> 0.05$	0.79 (0.75 - 0.83)	$< 0.001$

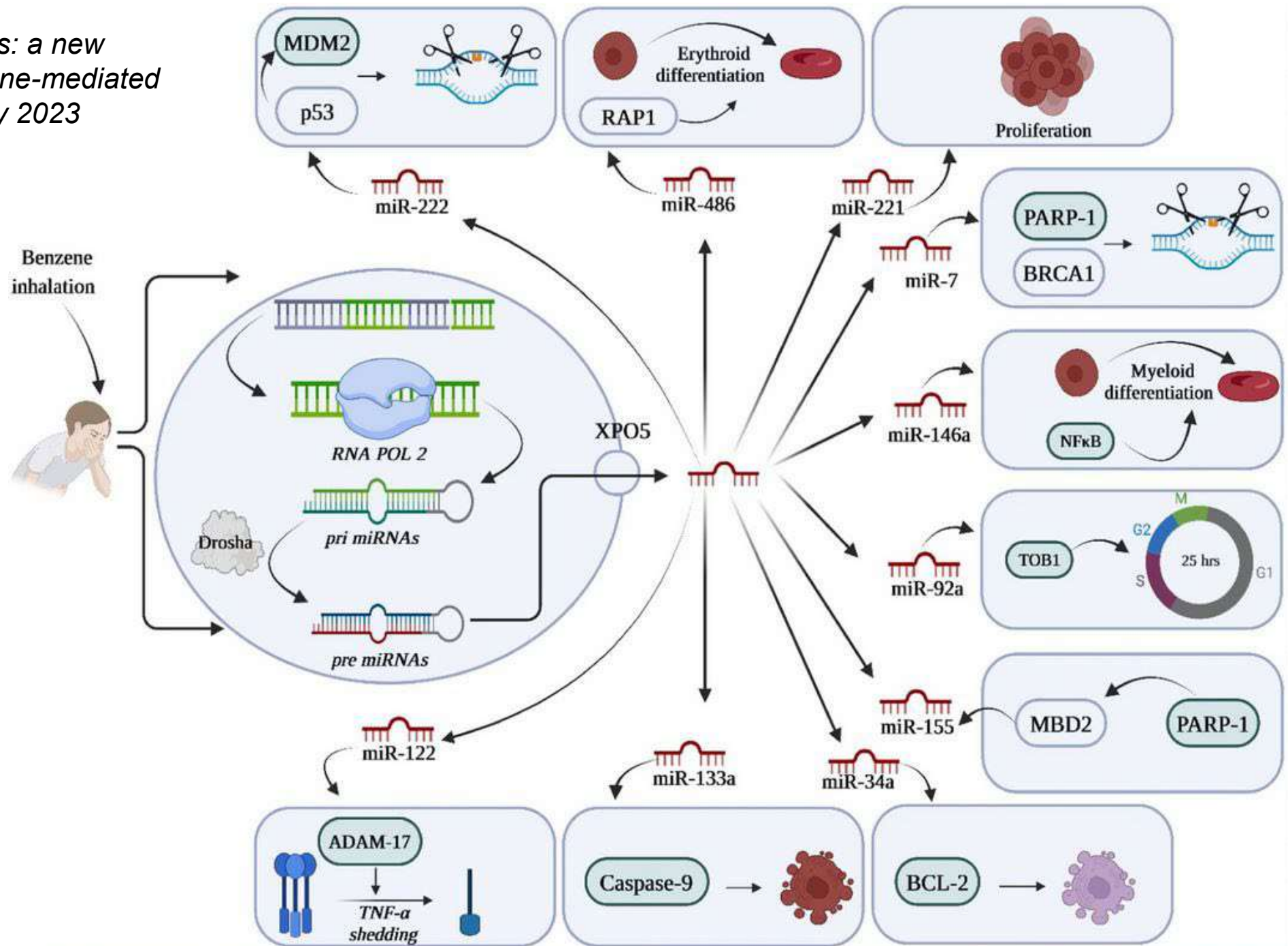
Authors	Subjects	Exposure (ppm)	TL	Notes
Bassig (2014)	40 unexposed		ref	
	21 low exposed	≤ 31	↔	
	22 high exposed	>31	↑ 9%	<i>P=0.03</i>
		Median CE(ppm-yr)		
Ren (2020)	102 unexposed	NA	ref	
	151 low exposed	< 9.9	↔	
	143 high exposed	≥ 9.9	↑ 55%	<i>P&lt;0.001</i>
Van der Laan (2022)	48 unexposed	< 0.035	ref	
	50 exposed	6 (mean ±13 DS)	↓ 0.09 kb	<i>P=0.02</i>
Everson (2020), SA	61 women	0.0031 (median 6 days)	↓ 6.8 %	<i>P&lt;0.001</i>
Wang (2024)	50 chronic benzene poisoning	NA	↓ 17%	<i>P&lt;0.05</i>
	60 healthy s.			

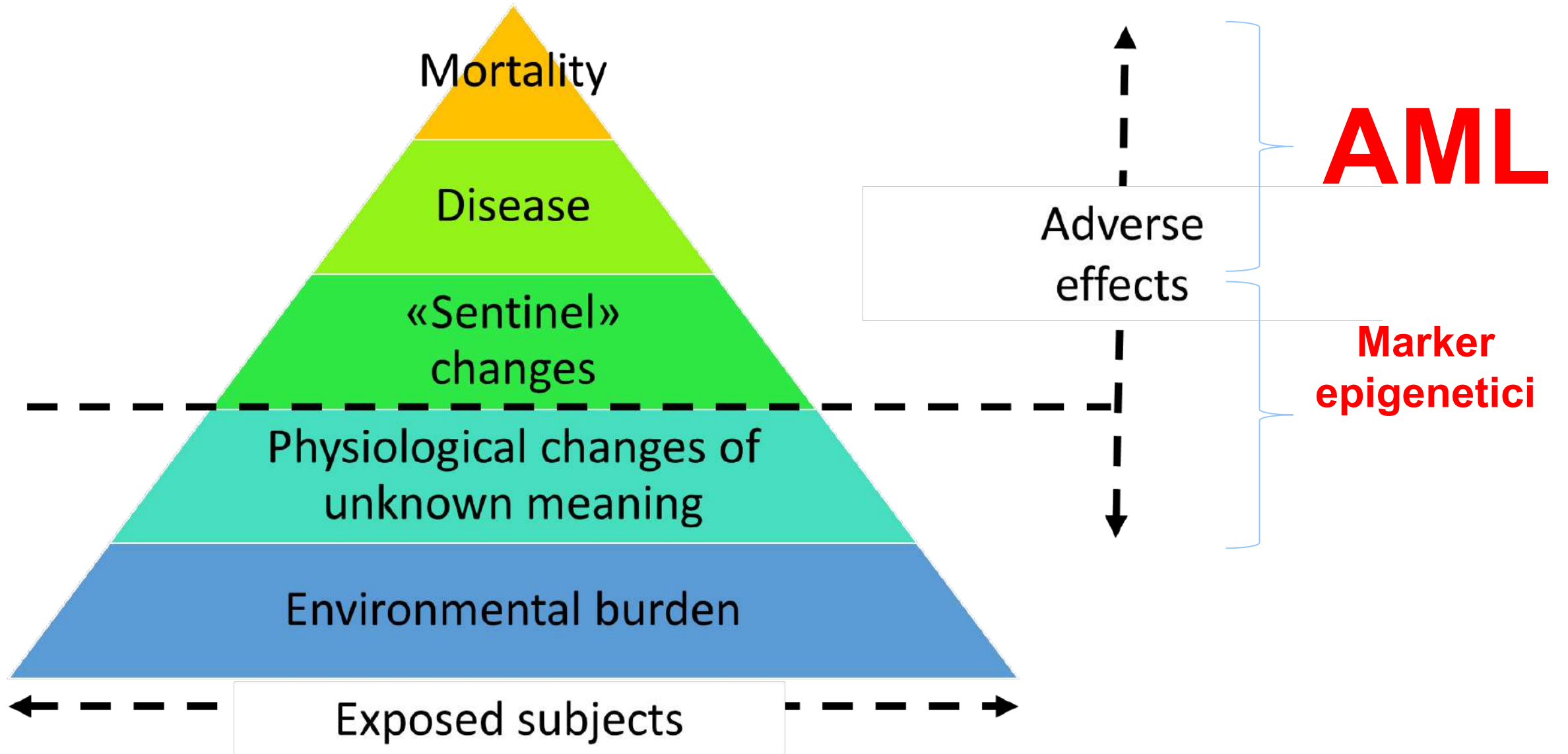
# Benzene Exposure and MicroRNAs Expression: In Vitro, In Vivo and Human Findings

*Mozzoni P et al, Int J Environ Res & Public Health 2023*

Author	Subjects	ppm	mi_RNA
Bai (2014)	4 CBP 3 controls	2.1	↑ <b>miR-34a</b> , miR-205, miR10b, let-7d, miR185, miR423-5p-2 ↓ <b>miR-133a</b> , miR-543, miR-130a, miR-27b, miR-223, miR142-5p, miR-320b
Liu Y (2016)	27 CBP with low blood count 54 BEW and 54 controls	4.4	↑ miR-24-3p, <b>miR-221-3p</b> ↓ miR 122-5p, miR638 (vs pool ex e none)
Chen Y (2016)	50 BEW vs 50 controls	1.1	↓ <b>miR-133a</b>
Hu D (2016)	97 petrol station attendants	0.02	↑ <b>miR-221</b>
	103 controls		
Chen Y (2017)	314 BEW vs 288 controls	0.8	↑ <b>miR-34a</b>
Wang Ts (2021)	73 BEW vs 8 controls	0.1	↑ <b>miR-222</b>

Nia SAH, *MiRNAs: a new frontiers in benzene-mediated toxicity, Toxicology 2023*





Modified from WHO (1972)

# MA

- Sono aspecifici
- Variabilità (tempo, individuo)
- Valore predittivo?

# Dalla Letteratura


## INTRODUCTION

Benzene is a well known carcinogen... but the mechanisms underlying... *are still unclear*

## CONCLUSIONS

Our study showed that..... However *additional studies* are required to better define the mechanisms

## Review on novel toxicological effects and personalized health hazard in workers exposed to low doses of benzene

Tongshuai Wang<sup>1</sup> · Yiyi Cao<sup>2</sup> · Zhaolin Xia<sup>3,4</sup> · David C. Christiani<sup>5</sup> · William W. Au<sup>6,7</sup> 

Specific CpG sites methylation is associated with hematotoxicity in low-dose benzene-exposed workers

Feier Wang<sup>a,1</sup>, Lizhu Ye<sup>a,b,1</sup>, Xinhang Jiang<sup>a,1</sup>, Rui Zhang<sup>a</sup>, Shen Chen<sup>a</sup>, Liping Chen<sup>a</sup>, Hongyao Yu<sup>a</sup>, Xiaowen Zeng<sup>a</sup>, Daochuan Li<sup>a</sup>, Xiumei Xing<sup>a</sup>, Yongmei Xiao<sup>a,\*</sup>, Wen Chen<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Department of Toxicology, Guangdong Provincial Key Laboratory of Food, Nutrition and Health, School of Public Health, Sun Yat-sen University, Guangzhou, China

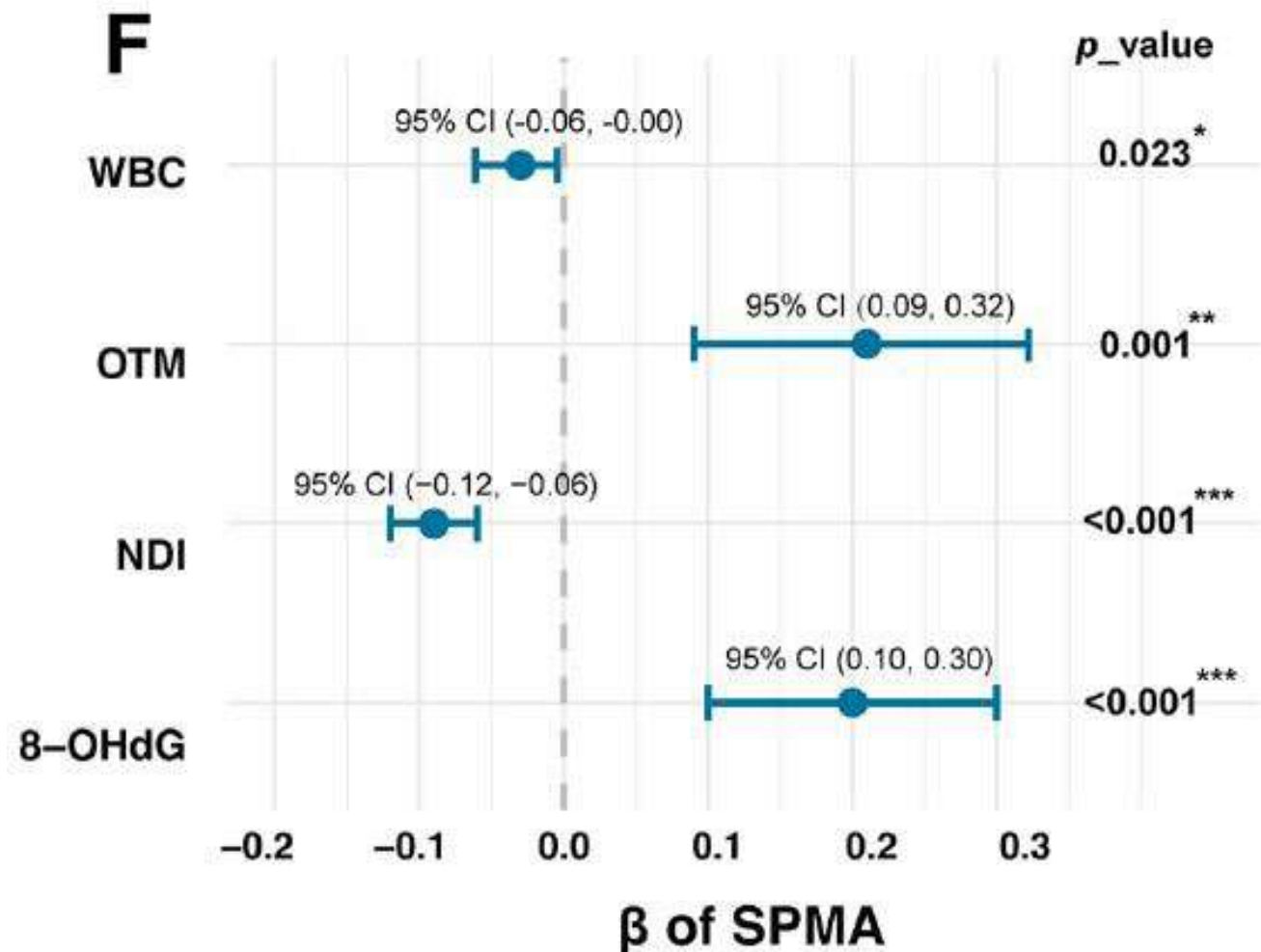
<sup>b</sup> Boji Drug Evaluation Center, Boji Medical Technology Co., Ltd, Guangzhou, China

(*Environ Intern*, 2024)

# Specific CpG sites methylation is associated with hematotoxicity in low-dose benzene-exposed workers (Wang F et al. Environ Intern, 2024)



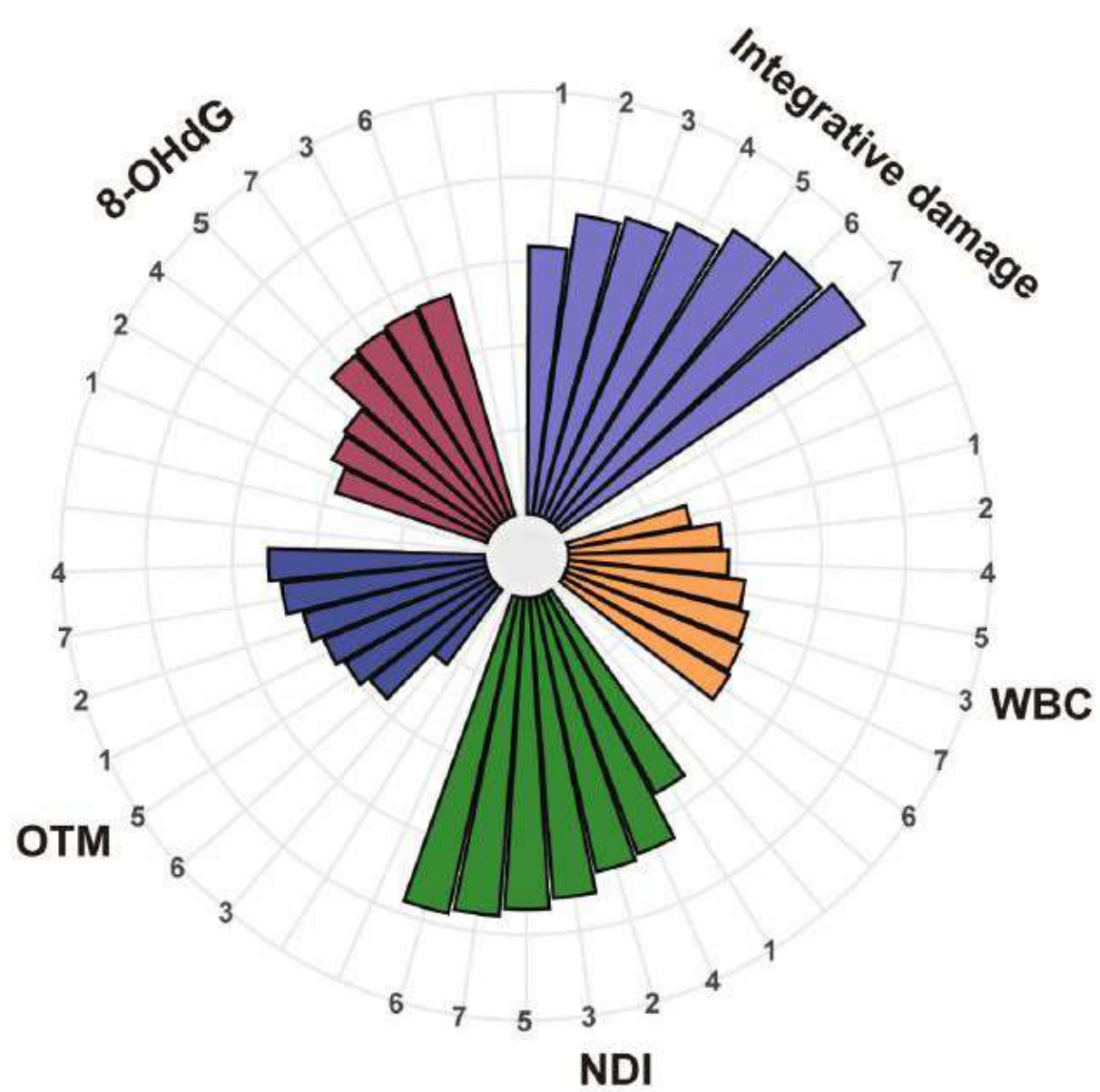
Non fumatori  
< 1 ppm  
Urinary S-PMA



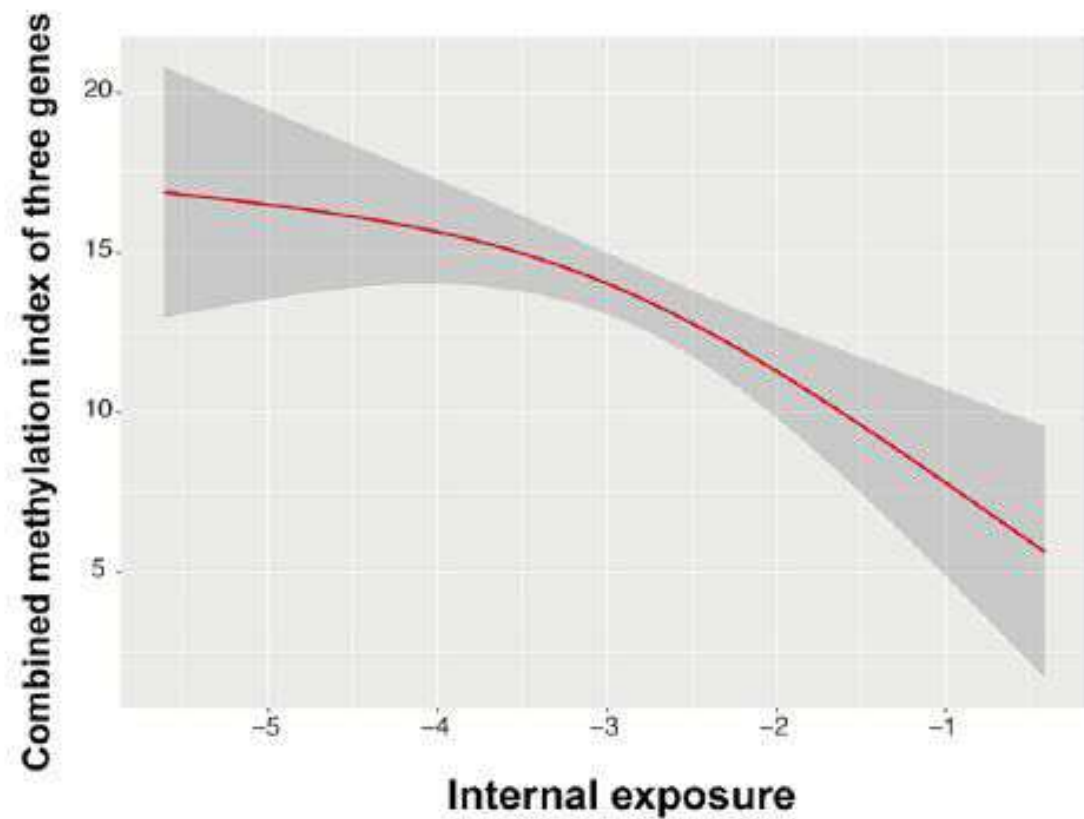
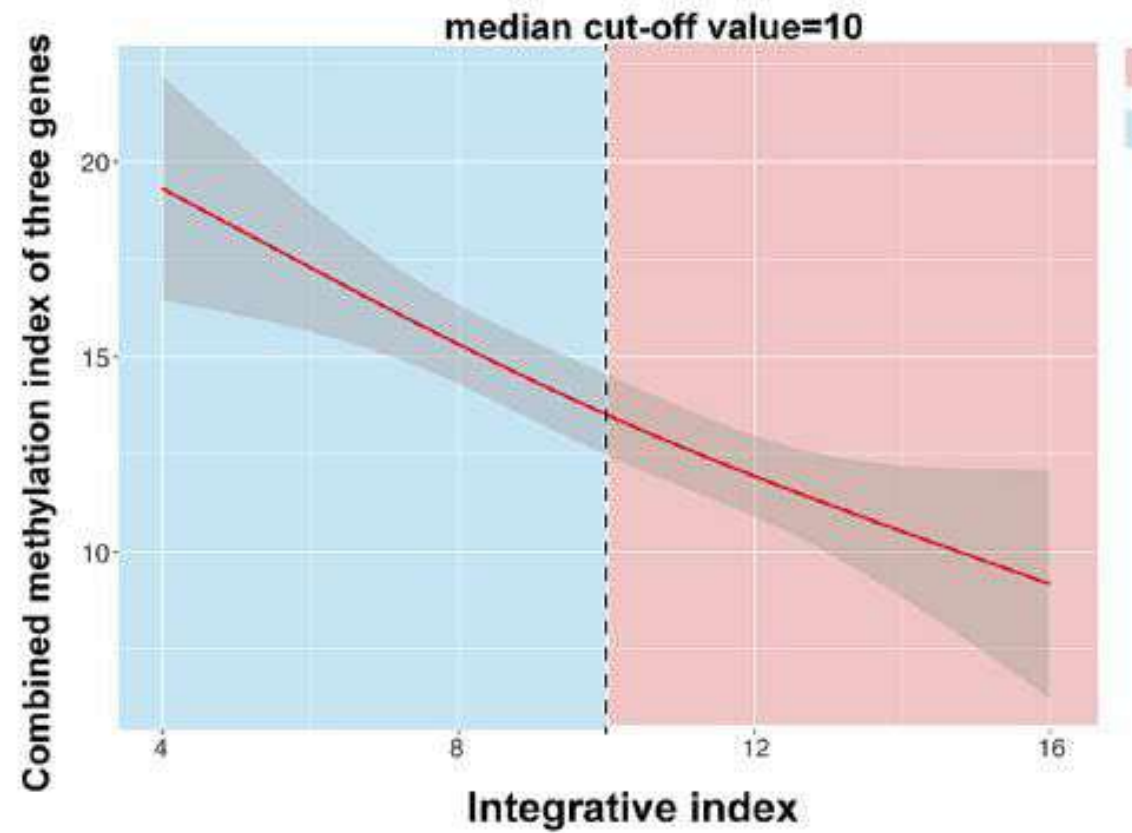
*«Specific CpG sites ... might be the potential key sites that exhibited **significant association with both internal exposure and various adverse effects**»*

**HOT CpG Sites  
(overlapped sites)**

**TRIM36: Site 6  
RASSF1a: site 2, 4, 6  
MGMT: site 1, 3**

**C**

- |                  |                                    |                   |
|------------------|------------------------------------|-------------------|
| 1 <i>TRIM36</i>  | 4 <i>TRIM36</i> and <i>RASSF1a</i> | 7 All three genes |
| 2 <i>RASSF1a</i> | 5 <i>TRIM36</i> and <i>MGMT</i>    |                   |
| 3 <i>MGMT</i>    | 6 <i>RASSF1a</i> and <i>MGMT</i>   |                   |

**A****B**

high-risk group  
low-risk group


# Further Steps?

- Identificare un panel di marcatori che esplorino diversi meccanismi tra i più rilevanti
- Misure ripetute sia della esposizione che degli outcomes

Archives of Toxicology (2024) 98:365–374  
<https://doi.org/10.1007/s00204-023-03650-w>

REVIEW ARTICLE

**Review on novel toxicological effects and personalized health hazard in workers exposed to low doses of benzene**

Tongshuai Wang<sup>1</sup> · Yiyi Cao<sup>2</sup> · Zhaolin Xia<sup>3,4</sup> · David C. Christiani<sup>5</sup> · William W. Au<sup>6,7</sup> 

*Grazie!*