

## Correlazione tra benzene e testosterone nei lavoratori esposti a inquinamento urbano

M. V. Rosati<sup>1</sup>, A. Sancini<sup>2</sup>, F. Tomei<sup>2</sup>, C. Sacco<sup>1</sup>, V. Traversini<sup>1</sup>, A. De Vita<sup>1</sup>, D. P. De Cesare<sup>1</sup>, G. Giammichele<sup>1</sup>, F. De Marco<sup>1</sup>, F. Pagliara<sup>1</sup>, F. Massoni<sup>3</sup>, L. Ricci<sup>3</sup>, G. Tomei<sup>4</sup>, S. Ricci<sup>1-3</sup>

<sup>1</sup>Department of Anatomy, Histology, Medical-Legal and the Orthopedics, Specialty School of Occupational Medicine, Unit of Occupational Medicine, University of Rome "Sapienza", Rome; <sup>2</sup>Spin off of University of Rome "Sapienza" "Sipro", Rome; <sup>3</sup>Department of Anatomy, Histology, Legal Medicine and Orthopaedics, Sapienza University of Rome, Rome; <sup>4</sup>Department of Psychiatric and Psychological Science, University of Rome "Sapienza", Rome, Italy

### Riassunto

**Scopo.** Pochi studi hanno esaminato gli effetti del benzene sul testosterone. Lo scopo di questo studio era di valutare la possibile correlazione tra i livelli di benzene nel sangue e i livelli testosterone.

**Materiali e metodi.** Lo studio ha riguardato un gruppo di 148 soggetti. Per ogni lavoratore sono stati effettuati un prelievo di sangue per la valutazione dei livelli di benzene ematico e del testosterone e l'analisi delle urine per la determinazione dei livelli di acido trans, trans-muconico e acido S-fenilmercapturico. Abbiamo stimato la correlazione di Pearson tra le variabili nel campione totale e metaboliti urinari, età, anzianità lavorativa, sesso, BMI. Per la valutazione dei principali fattori confondimento è stata eseguita la regressione lineare multipla.

**Risultati.** La correlazione di Pearson ha evidenziato: 1. una correlazione inversa significativa è stata trovata tra l'acido S-fenilmercapturico e il testosterone libero; 2. una correlazione diretta significativa tra acido trans-trans muconico e BMI. Dopo aver suddiviso il campione in base alla mediana del benzene ematico (161,0 ng/L), la correlazione di Pearson ha mostrato una significativa correlazione inversa tra l'acido S-fenilmercapturico e il testosterone libero nel gruppo con valori inferiori a tale mediana.

**Conclusioni.** I nostri risultati, da considerare preliminari, suggeriscono che l'esposizione occupazionale a bassi livelli di benzene, presenti nell'inquinamento urbano, influenza i livelli di testosterone ematico. Tali risultati dovranno essere confermati in successive ricerche, con l'eventuale possibilità di includere anche ulteriori specifici test sulla fertilità. *Clin Ter 2017; 168(6):e380-387. doi: 10.7417/CT.2017.2038*

**Parole chiave:** Benzene, testosterone, BMI, Inquinamento, acido trans-trans-muconico, acido S-fenilmercapturico, fertilità

### Introduzione

Tra gli inquinanti organici riveste notevole importanza il benzene a causa della sua elevata tossicità e della sua attività oncogena. Il benzene è un idrocarburo aromatico monocicli-

### Abstract

#### Correlation between benzene and testosterone in workers exposed to urban pollution

**Aim.** Many studies have examined the effects of benzene on testosterone.

The purpose of this study was to evaluate the possible correlation between the blood levels of benzene and the levels of testosterone.

**Materials and methods.** The study involved a group of 148 subjects. For every worker have been made out a blood sample for the evaluation of benzene and testosterone levels and an urine analysis for the evaluation of the levels of trans, trans-muconic acid and S-phenylmercapturic acid. We estimated the Pearson correlation coefficient between the variables in the sample and the urinary metabolites, age, length of service, gender, BMI. For the analysis of the major confounding factors it was performed a multiple linear regression.

**Results.** The Pearson correlation coefficient showed: 1. a significant inverse correlation between the S-phenylmercapturic acid and free testosterone; 2. a significant direct correlation between trans-trans muconic acid and BMI.

After dividing the sample according to the median of blood benzene (161.0 ng / L), Pearson correlation coefficient showed a significant inverse correlation between the S-phenylmercapturic acid and free testosterone in the group with values below this median.

**Conclusions.** Our results, to be considered preliminary, suggest that occupational exposure to low levels of benzene, present in urban pollution, affect the blood levels of testosterone. These results need to be confirmed in future studies, with the eventual possibility of including more specific fertility tests. *Clin Ter 2017; 168(6):e380-387. doi: 10.7417/CT.2017.2038*

**Key words:** Benzene, testosterone, BMI, Pollution, T-T muconic acid, S-phenylmercapturic acid, Fertility

co, costituente naturale del petrolio, onnipresente nell'ambiente, principalmente a causa delle emissioni di benzina, della combustione di idrocarburi e del fumo di tabacco. Il benzene penetra nell'organismo per via inalatoria e cutanea, viene metabolizzato a livello epatico trasformandosi in ben-

zene epossido e derivati idrossilati quali il fenolo, il catecolo, il chinolo ed infine escreto tramite le urine come metaboliti (acido trans, trans-muconico e derivati fenolici).

L'esposizione ad inquinanti tossici organici ed inorganici può provocare effetti negativi sulla salute della popolazione urbana, con effetti anche cardiovascolari, respiratori, ematologici ed endocrino-riproduttivi (1-5). Il sistema endocrino riproduttivo umano si basa su un delicato equilibrio che può essere sconvolto facilmente da numerosi fattori, pregiudicando così la capacità procreativa (2-7).

Molti agenti chimici, ad esempio prodotti dalle attività umane, possono compromettere la fertilità maschile e femminile (8-10), provocando infertilità, incremento di aborti, malformazioni congenite ed alterazioni dei livelli plasmatici di testosterone, FSH e LH (11-18).

Il testosterone è un ormone steroideo prodotto nelle cellule interstiziali del testicolo (cellule di Leydig) per azione dell'ormone ipofisario luteinizzante (LH), ed in parte anche a livello surrenale (per conversione dell'androstenediolo) ed ovarico, sebbene in quantità più limitate.

Soltanto una piccola parte di testosterone circola liberamente nel sangue ed è in grado di penetrare nelle cellule (cosiddetto *testosterone libero*); la maggior parte (98% negli uomini e 99% nelle donne) invece è legata a proteine: il 50% circa è legato all'albumina con un legame debole, il 44% alla SHBG (globulina legante gli ormoni sessuali) e il 4% alla CBG (globulina legante il cortisolo). Numerose sono le funzioni che il testosterone svolge nel nostro organismo e diverse in relazione agli stadi della vita umana. Nel periodo prenatale il testosterone regola lo sviluppo della prostata, delle vescichette seminali e lo sviluppo degli organi genitali esterni; durante la pubertà i livelli di testosterone libero raggiungono il loro picco e si assiste a un accrescimento significativo delle ghiandole sebacee, del pene e del clitoride, si riducono i livelli di grasso ipodermico, il timbro vocale si abbassa, si registra un'importante crescita muscolare e anche un notevole accrescimento osseo. Nel corso dell'età adulta il testosterone è coinvolto, oltre che nel mantenimento del tono muscolare, anche nella regolazione del desiderio sessuale, nel mantenimento dell'erezione e nella produzione adeguata di sperma.

Livelli di testosterone inferiori alla norma si possono riscontrare in caso di cirrosi epatica, insufficienza renale, terapia estrogenica, squilibri alimentari (malnutrizione e obesità), patologie ipotalamo-ipofisarie, sindromi genetiche (per es. Klinefelter, Kallmann, Prader-Willi), esiti di malattie virali (parotiti e morbillo). Al contrario, un aumento è riscontrabile in caso di patologie tumorali (soprattutto testicolari e surrenali), abuso di anabolizzanti, ipertiroidismo, iperplasia surrenale, allenamenti eccessivi, uso di farmaci anticonvulsivanti, barbiturici e clomifene.

Il deficit di testosterone comporta alterazioni fisiche e psichiche nell'organismo umano. Gli effetti più comuni sono: disfunzione erettile, bassa produzione di sperma e deficit di fertilità.

In precedenti ricerche del nostro gruppo (19-22), i lavoratori esposti agli agenti inquinanti hanno mostrato alterazioni dei livelli plasmatici di testosterone (10) e cambiamenti dei valori plasmatici di FSH (23).

Scopo di questo studio è valutare se l'esposizione pressoché quotidiana dei lavoratori outdoor ad un inquinante

quale il benzene possa correlarsi ad alterazione nei livelli di testosterone libero plasmatico.

## Materiali e Metodi

### Popolazione studiata

Lo studio è stato condotto su un campione iniziale di circa 1594 lavoratori outdoor sottoposti a visite di sorveglianza sanitaria in accordo con la normativa vigente e che avevano aderito a programmi di promozione della salute nei luoghi di lavoro su base volontaria. Tali programmi sono condotti in conformità con le indicazioni della normativa vigente e si propongono di indagare le condizioni di salute degli individui professionalmente esposti ad inquinanti urbani.

I lavoratori studiati sono viabilisti, autisti o soggetti impiegati in altre mansioni outdoor, esposti all'ambiente urbano per almeno l'80% del tempo di lavoro (7 ore al giorno per 5 giorni/settimana) di una grande città italiana con densità di traffico medio-alta.

Sono state individuate 8 aree nella città in cui lavorano i soggetti del campione, considerate rappresentative della qualità dell'aria e da ciascuna di queste aree è stato preso in maniera randomizzata un campione di numerosità analoga di lavoratori.

I lavoratori con mansione di viabilista sono assegnati al controllo del traffico veicolare nelle strade e nelle vie con alta e media densità di traffico, monitoraggio e controllo del traffico negli incroci, parcheggi e zone a traffico limitato.

I lavoratori con mansione di autista o di motociclista sono assegnati al controllo del traffico, ad intervenire in casi specifici come incidenti stradali e ad altre attività comprendenti la guida dell'autovettura, come conducente o "secondo in pattuglia".

I lavoratori con altre mansioni outdoor erano assegnati a vari ruoli tra i quali addetti al nucleo assistenza emarginati, addetti ad attività esterne di edilizia, attività esterne in campo di Polizia Giudiziaria, Polizia Ambientale, etc.

Nessuno di questi lavoratori era provvisto di dispositivi per la protezione delle vie respiratorie contro polveri, gas o vapori.

Per l'inclusione nello studio è stato raccolto, in presenza di un medico, un questionario clinico-anamnestico con anamnesi fisiologica, patologica remota e prossima, anamnesi farmacologica, zona di residenza degli ultimi 5 anni, anamnesi lavorativa attuale e pregressa, con particolare attenzione ai disordini della fertilità e patologie della sfera sessuale consumo di farmaci o patologie che possono influire sui parametri indagati nello studio.

Nel campione iniziale non erano presenti soggetti con patologie testicolari, ipofisarie, surrenaliche diagnosticate o con insufficienza epatica e renale.

I fattori di esclusione considerati per questo studio sono stati: esposizione extralavorativa a solventi, pesticidi e vernici, anzianità lavorativa inferiore a 1 anno, pratica agonistica di sport, turni di lavoro notturno.

Relativamente all'abitudine tabagica, sono stati considerati fumatori tutti i soggetti che avevano dichiarato in anamnesi di aver fumato nella loro vita almeno 100 sigarette e di essere attualmente fumatori, o di aver smesso di fumare

da almeno 6 mesi. Tali soggetti sono stati inclusi nello studio, perché gli interessati si sono astenuti dal fumo, secondo le nostre indicazioni, per tutta la settimana precedente all'esecuzione del campionamento personale. Sono stati esclusi inoltre coloro che hanno dichiarato un consumo medio dannoso di alcolici per la salute fisica e psichica (consumo di alcol superiore a 6 Unità Alcoliche per gli uomini e 4 Unità per le donne, dove 1 Unità corrisponde a circa 10-12 grammi di etanolo) (24).

In base a questi fattori sono stati esclusi 51 lavoratori.

Il campione finale oggetto dello studio è pertanto risultato essere costituito da 148 lavoratori outdoor (53 donne e 95 uomini), assegnati alle mansioni di viabilista, autista e/o 2° in pattuglia ed altre mansioni outdoor.

Su tutti i 148 soggetti esaminati è stato effettuato il monitoraggio biologico (valutazione del benzene ematico e dei suoi metaboliti urinari: acido trans-trans muconico e acido S- fenil mercapturico) e il dosaggio del testosterone ematico.

Sono state effettuate 8 dosimetrie personali sui viabilisti (air benzene), una per ciascuna area della città, considerate rappresentative dell'esposizione personale al benzene dei lavoratori provenienti dall'area stessa. Sono state inoltre effettuate 4 dosimetrie personali sugli autisti, considerate rappresentative dell'esposizione personale degli autisti e del secondo in pattuglia.

Ai fini della valutazione statistica, sono stati considerati i seguenti fattori: sesso, età, anzianità lavorativa, abitudine tabagica e BMI.

Tutti i soggetti hanno reso disponibili le informazioni personali dopo essere stati a conoscenza che tali dati sarebbero stati classificati come "dati sensibili". Essi hanno acconsentito al trattamento dei dati in forma anonima e collettiva, alla loro valutazione tramite metodi scientifici ed all'analisi per fini scientifici in accordo con i principi della Dichiarazione di Helsinki.

Benzene ematico, metaboliti urinari (t,t MA e S- Pma) e testosterone libero

Il dosaggio del benzene ematico e dei suoi metaboliti è stato effettuato su 148 lavoratori.

Per ogni lavoratore, il prelievo ematico per la determinazione dei valori di benzene ed il campionamento delle urine per il dosaggio dei metaboliti (t,t MA e S- Pma) sono stati eseguiti dopo 5 giorni lavorativi continuativi a fine turno lavorativo. Ad ogni lavoratore è stato chiesto di astenersi nei 4 giorni antecedenti il prelievo dal consumo di alcuni cibi (frattaglie, pollame, pesce e arachidi) e di astenersi dal fumo nei 7 giorni precedenti al campionamento.

Il laboratorio ha eseguito il dosaggio del benzene ematico attraverso metodica di estrazione con tecnica SPME e analisi in gascromatografia con rivelatore a spettrometria di massa GC-MS con limite di rilevabilità (LOD) <150 ng/L.

Il campione di urina è stato immediatamente congelata e mantenuta a -20°C fino all'analisi. Il laboratorio ha eseguito la determinazione analitica di t,t MA e di S-Pma.

La determinazione dell'acido trans-trans muconico è stata eseguita utilizzando HPLC con rivelatore spettrofotometrico UV dopo estrazione in fase solida SPE (25). Il limite

di rilevazione (LOD) è 50,0 µg/L. I valori di normalità sono compresi tra 15-145 µg/g di creatinina per soggetti non fumatori e tra 20-240 µg/g creatinina per i fumatori (26).

L'analisi dell'acido S- fenil mercapturico è stata effettuata mediante estrazione con etilacetato, esterificazione e analisi mediante GC utilizzando un rivelatore spettrometria di massa (27). Il limite di rilevazione (LOD) è 5 µg/L. I valori sono considerati normali se compresi nel range < 0.05-35 µg/g di creatinina (26).

Il dosaggio del testosterone libero è stato eseguito tramite prelievo di un campione di sangue venoso di 10 ml da ogni lavoratore tra le ore 8-10 del mattino. I campioni sono stati conservati sul luogo di lavoro in frigorifero a +4°C fino al momento in cui sono stati trasferiti in un apposito contenitore ed alla stessa temperatura in laboratorio, dove sono stati centrifugati e successivamente conservati a -20°C fino al momento dell'analisi (entro 3 giorni). Il dosaggio è stato effettuato attraverso la metodica EIA (enzyme immunoassay) con valori di normalità compresi tra 8.7-55 pg/ml per il sesso maschile e 0.0-3.2 per i soggetti di sesso femminile.

#### Monitoraggio ambientale

Sono state eseguite n. 8 dosimetrie personali, su viabilisti selezionati da ciascuna delle 8 sedi di lavoro considerate rappresentative della distribuzione topografica dei lavoratori studiati, nonché n. 4 dosimetrie personali rappresentative per gli autisti nelle autovetture di servizio nelle quali erano presenti almeno n. 2 agenti per ogni turno di lavoro. Quindi, anche se un solo lavoratore indossava il dosimetro, i risultati sono stati considerati rappresentativi dell'esposizione del collega che era in macchina con lui. Il campionamento è durato per tutto il turno lavorativo.

I lavoratori sono stati dotati di dosimetri personali a diffusione passiva, attaccati come badge al collo del lavoratore all'inizio di ciascun giorno di campionamento al fine di misurare la concentrazione di benzene nell'area di respirazione.

Dopo il campionamento, i campionatori passivi sono stati preparati per il desorbimento aggiungendo CS<sub>2</sub> ai badge. Le analisi del benzene sono state eseguite mediante gascromatografia capillare (GC) con Dani gascromatografo 1000 dotato di un rivelatore a ionizzazione di fiamma (FID) per la quantificazione.

Il limite di rilevazione per il benzene (LOD) è stato 0,001 ppm (3,19 µg/m<sup>3</sup>).

L'American Conference of Governmental Industrial Hygienists (ACGIH) ha proposto un valore di soglia (TLV-TWA) di 0,5 ppm (1,6 mg/m<sup>3</sup>) per i soggetti professionalmente esposti a benzene (28) mentre il valore limite per la popolazione generale è di 5 µg/m<sup>3</sup>.

Le concentrazioni di benzene rilevate sono state espresse come valori medi ponderati nel tempo su un periodo di 8 ore.

I campioni di aria e sangue e urine sono stati raccolti in parallelo nei partecipanti allo studio, per evitare l'influenza delle condizioni meteorologiche e stagionali sull'esposizione personale al benzene presente in aria.

## Analisi Statistica

I risultati sono analizzati e confrontati, in accordo con la natura delle singole variabili.

I risultati del monitoraggio biologico (benzene ematico, t,t MA e S-Pma) e dei livelli di testosterone libero sono espressi in termini di media, deviazione standard (SD), mediana e range (min-max).

Quando il valore dei parametri misurati era inferiore al LOD della metodica è stato indicato un valore pari ad 1/2 del LOD stesso (28).

I parametri analizzati non sono risultati distribuiti in modo normale secondo il test di Kolmogorov-Smirnov e sono stati quindi convertiti in forma logaritmica per effettuare la correlazione Pearson e regressione lineare multipla.

La correlazione di Pearson è stata calcolata per verificare il livello di associazione tra i valori del benzene ematico e degli altri fattori che potevano essere influenti (metaboliti urinari, età, anzianità lavorativa, sesso, BMI), e il testosterone libero.

È stata effettuata la regressione lineare multipla, considerando come variabile dipendente il testosterone libero e come fattori indipendenti il benzene ematico, i metaboliti, il sesso, l'età, l'anzianità lavorativa e il BMI.

La regressione è stata poi ripetuta sul campione, utilizzando come variabile dipendente il benzene ematico e come indipendenti il sesso, l'età, l'anzianità lavorativa, il testosterone e il BMI.

Il campione totale dei lavoratori è stato successivamente suddiviso in 2 sotto-gruppi prendendo come parametro di riferimento la mediana del benzene ematico e le analisi di correlazione sono state eseguite anche sui due sottogruppi.

Come misura della bontà di adattamento di un modello di regressione multipla è stato utilizzato il cosiddetto coefficiente di determinazione, meglio noto come  $R^2$ .

I risultati sono stati considerati significativi quando i valori della  $p$  erano  $< 0.05$ .

L'analisi è stata condotta utilizzando il software SPSS Advanced Statistical 21,0.

## Risultati

## Popolazione studiata

Le caratteristiche descrittive del campione, costituito da 148 lavoratori, sono mostrate in Tab. 1.

Nessun lavoratore presenta valori di testosterone libero fuori dal range di normalità del laboratorio in relazione a sesso ed età.

Tre soggetti mostrano un valore di benzene ematico sopra il limite di 1700 ng/l proposti dalla Società Italiana Valori di Riferimento (26).

Otto soggetti superano il limite massimo di 240  $\mu\text{g/g}$  di creatinina per l'acido transmuconico proposto dalla S.I.V.R. (26), mentre per l'acido fenilmercapturico tutti i soggetti rientrano nel range di riferimento (0.05-35  $\mu\text{g/g}$  di creatinina).

Nessun campionamento supera il valore limite di 1.6  $\text{mg/m}^3$  proposto dall'ACGIH per i soggetti professionalmente esposti.

Tabella 1. Characteristics of the study population

Variables	Outdoor workers	
Number of subjects	(n.148)	
Gender		
Male n°( %)	95 (64,18%)	
Female n°( %)	53 (35,82%)	
Age (ys)		
Mean (SD)	44,9 (8,52)	
Geometric Mean	45	
Min-Max	28-64	
Median	45	
Working life (ys)		
Mean (SD)	15 (8,70)	
Geometric Mean	17	
Min-Max	1-37	
Median	16,5	
Benzene (ng/L)		
Mean (SD)	290,77 (366,16)	
Geometric Mean	75	
Min-Max	3,46-1926	
Median	161	
Transmuconic Acid( $\mu\text{g/L}$ )		
Mean (SD)	75,308 (87,28)	
Geometric Mean	25	
Min-Max	25-555	
Median	25	
Phenylmercapturic Acid( $\mu\text{g/L}$ )		
Mean (SD)	3,151 (2,4)	
Geometric Mean	2,5	
Min-Max	2,5-20	
Median	2,5	
Testosterone( $\text{pg/ml}$ )		
Mean (SD)	3,33 (2,71)	
Geometric Mean	0,18	
Min-Max	0,14-13,70	
Median	3,49	
BMI		
Mean (SD)	18,39 (21,99)	
Geometric Mean	19	
Min-Max	15,84-26,67	
Median	24,69	
<b>Air Benzene (<math>\mu\text{g/m}^3</math>)</b>		
Number of subjects	8 (TP)	4 (D)
Mean (SD)	17,28 (10,42)	10,81 (7,85)
Geometric Mean	13,88	6,63
Min-Max	5-36,6	1-24,8
Median	16,2	11,2

SD = Standard Deviation

ys = year

TP: traffic policemen

D: Drivers

## Benzene ematico metaboliti e testosterone libero

I valori delle concentrazioni di benzene ematico, dei suoi metaboliti e del testosterone nella popolazione studiata espressi in termini di media, moda, mediana, deviazione standard e range min-max, sono mostrati in Tab. 1.

Table 2. Pearson correlation coefficient (R) between log testosterone, log total blood benzene and log metabolites values in the total sample

Variables	Benzene	Transmuconic Acid	Phenylmercapturic Acid	Testosterone
Age	r: ,112 <sup>a</sup> p: 0,174 <sup>b</sup>	r: -,016 <sup>a</sup> p: 0,847 <sup>b</sup>	r: -,128 <sup>a</sup> p: 0,170 <sup>b</sup>	r: ,325 <sup>a</sup> p: 0,000 <sup>b</sup>
Working Life	r: ,099 <sup>a</sup> p: 0,233 <sup>b</sup>	r: -,045 <sup>a</sup> p: 0,594 <sup>b</sup>	r: -,134 <sup>a</sup> p: 0,151 <sup>b</sup>	r: ,219 <sup>a</sup> p: 0,007 <sup>b</sup>
Gender	r: -,118 <sup>a</sup> p: 0,152 <sup>b</sup>	r: -,042 <sup>a</sup> p: 0,620 <sup>b</sup>	r: ,311 <sup>a</sup> p: 0,001 <sup>b</sup>	r: -,886 <sup>a</sup> p: 0,000 <sup>b</sup>
BMI	r: -,108 <sup>a</sup> p: 0,193 <sup>b</sup>	r: ,190 <sup>a</sup> p: 0,024 <sup>b</sup>	r: -,063 <sup>a</sup> p: 0,504 <sup>b</sup>	r: ,116 <sup>a</sup> p: 0,161 <sup>b</sup>
Testosterone	r: ,149 <sup>a</sup> p: 0,70 <sup>b</sup>	r: ,067 <sup>a</sup> p: 0,425 <sup>b</sup>	r: -,297 <sup>a</sup> p: 0,001 <sup>b</sup>	

<sup>a</sup>= the correlation was made after transformation in logarithmic form

<sup>b</sup> = The correlation is statistically significant at p 0.05 level.

La correlazione di Pearson ha evidenziato:

- l'esistenza di una correlazione inversa statisticamente significativa tra l'acido S- fenil mercapturico e il testosterone libero (R: -0,297 p<0,05 Tab. 2).
- l'esistenza di una correlazione diretta statisticamente significativa tra acido trans-trans muconico e BMI (P<0.05) R:0,190 p<0,05 Tab. 2). La regressione lineare multipla effettuata utilizzando come variabile dipendente il testosterone libero e con variabili indipendenti le concentrazioni di benzene ematico, t,t MA e S-Pma urinari, il sesso l'età l'anzianità lavorativa e il BMI non confermano la correlazione evidenziata tra S-Pma e testosterone e le altre correlazioni evidenziate mediante la correlazione Pearson fatta eccezione per il sesso (Tab. 3).

Dopo aver suddiviso il campione in base alla mediana del benzene ematico (161,0 ng/L), sono stati esaminati i 2 gruppi sopra e sotto tale valore attraverso la correlazione di Pearson (testosterone libero vs benzene ematico, testosterone libero vs S-Pma, testosterone libero vs t,t MA) e si è riscontrata la presenza di una significativa correlazione inversa tra l'acido S-fenil mercapturico e il testosterone libero nel gruppo con valori inferiori a tale mediana (P< 0.05) (Tab. 4). Al contrario, non si sono ottenuti risultati significativi nel gruppo con valori superiori alla mediana.

## Discussione

L'esposizione ad inquinanti ambientali può alterare la secrezione e l'azione degli ormoni sessuali, sia maschili che femminili.

Alcuni studi mostrano come, ad esempio, l'esposizione a metalli pesanti, quali zinco, nickel e molibdeno possono far diminuire i livelli di testosterone (29). Il piombo e il cadmio, invece, possono influenzare i livelli di prolattina

Table 3. Multiple linear regression analysis, in the total group of subjects studied, between Log Testosterone values (dependent variable) and Log blood benzene with the main confounding factors (independent variables).

Independent variables	Dependent variable (LOG-Testosterone)	
	Total sample	
	t'	p
	(beta)	
Blood Benzene	1,186 (0,058)	,238
Gender	-15,56 (-0,851)	,000
Age (ys)	,441 (0,036)	,660
Working life (ys)	-,924 (-,073)	,358
Transmuconic acid	,731 (,037)	,466
Phenylmercapturic acid	-,610 (-,031)	,543
BMI	,546 (,028)	,586
	F	p
Modelo	(R <sup>2</sup> -Ad.)	
	41,90	0,000
	(0,742)	

ys = years

R<sup>2</sup>-Ad = R<sup>2</sup>-Adjusted

<sup>a</sup> = Statistically significant

Table 4. Pearson correlation coefficient (R) between log testosterone and log blood benzene values after subdivision on the basis of median (161 ng/L)

Variables <sup>a</sup>	Benzene <sup>a</sup>	Transmuconic <sup>a</sup> Acido <sup>a</sup>	Phenylmercapturic <sup>a</sup> Acido <sup>a</sup>
Testosterone <sup>a</sup>	r: ,095 <sup>a</sup> p: ,421 <sup>b</sup>	r: -,192 <sup>a</sup> p: ,106 <sup>b</sup>	r: -,290 <sup>a</sup> p: ,035 <sup>b</sup>

<sup>a</sup>=the correlation was made after transformation in logarithmic form

<sup>b</sup>=The correlation is statistically significant at p<0.05 level.

(30). Studi dimostrano l'influenza dei principali componenti dei gas di scarico veicolari, principalmente benzene, monossido di carbonio, idrocarburi policiclici aromatici e particolato, sulla secrezione di ormoni sessuali (5, 31-33). Le particelle emesse possono infatti danneggiare la salute umana, attraverso alterazioni dell'equilibrio dei livelli ormonali, dovuti in parte all'azione agonista sui recettori arilici per gli idrocarburi (AHR) ed in parte all'attività antagonista sui recettori per gli androgeni (34-35).

Riguardo ai numerosi inquinanti ambientali, numerosi studi hanno evidenziato la capacità lesiva di tali particelle sulla fertilità maschile, tramite la perdita di integrità della cromatina e del DNA degli spermatozoi, con incremento di aneuploidie, disomie, duplicazioni e delezioni sulle regioni cromosomiche delle cellule germinali (12, 36-40). A questo consegue un aumento di malformazioni fetali, aborti o una diminuzione della capacità procreativa.

Mandani et al. (41) hanno, per esempio, dimostrato come i metaboliti epatici del benzene, quali catecolo e fenol-idrochinone possono far diminuire la motilità e la viscosità degli spermatozoi e compromettere l'integrità della doppia elica di DNA. La tossicità di questi metaboliti può essere ricondotta all'interferenza nelle reazioni ossidative mitocondriali con produzione eccessiva di radicali liberi e compromissione delle membrane cellulari (42).

Katukam et al. (43) hanno evidenziato un decremento della conta e della motilità spermatica in operai delle industrie esposti a solventi organici come il benzene e un aumento delle anomalie nella loro morfologia.

Nostrì studi precedenti (44-45), hanno dimostrato alterazioni significative dei livelli del testosterone anche nel sesso femminile; questo significa che un'esposizione cronica ad inquinanti urbani potrebbe comportare nelle donne alterazioni del ciclo mestruale, ridotta fertilità, pre-eclampsia, aborti spontanei e parti prematuri.

Alcuni autori hanno tuttavia suggerito una possibile influenza della variante genetica di alcuni enzimi, tipo citocromi e glutatione-transferasi, sul metabolismo epatico degli inquinanti ambientali come il benzene e, di conseguenza, i sintomi e le patologie manifestate dagli individui dopo un'eventuale esposizione saranno molto variabili (37, 46).

Nella nostra ricerca si evidenzia una correlazione inversa significativa tra il metabolita urinario del benzene (acido S-

fenilmercapturico) e il testosterone libero. Tale risultato è rafforzato anche dai dati ottenuti nell'analisi del gruppo di soggetti con valori di benzene ematico inferiori alla mediana, in cui si conferma la correlazione inversa tra testosterone e acido fenilmercapturico.

Secondo alcuni autori (47-48), il fenilmercapturico urinario risulta più specifico dell'acido trans-transmuconico e del benzene urinario per valutare un'eventuale esposizione al benzene aerodisperso, soprattutto in caso di esposizioni basse o molto basse. L'esistenza di una correlazione inversa di questo parametro con i livelli di testosterone metterebbe in evidenza l'esistenza di un effetto del benzene anche alle bassissime dosi di esposizione del nostro campione sul testosterone libero. Tale parametro risulterebbe quindi più sensibile di altri indicatori di esposizione al benzene nello studio degli effetti di quest'ultimo sullo studio dell'assetto degli ormoni sessuali, per prevenire eventuali disordini della fertilità e alterazioni dell'assetto ormonale tra i lavoratori esposti e potrebbe, quindi, essere usato come marker biologico precoce in ambito occupazionale.

E' stata osservata una correlazione significativa tra acido transmuconico e i valori di BMI. Solo recentemente si è posta l'attenzione sui possibili effetti negativi degli inquinanti sul sistema metabolico, pertanto le diverse ipotesi devono essere ancora confermate. Tuttavia, molti studi convergono principalmente su una di esse (49-52): gli inquinanti ambientali (come ad esempio, il Pm 2.5) provocano attivazione dei monociti-macrofagi con infiltrazione dei tessuti. Tale meccanismo innesca la formazione di anioni superossidi, i quali a loro volta comportano un aumento dell'insulina-resistenza direttamente o tramite disfunzione endoteliale e proliferazione/ipertrofia delle cellule adipocitarie. Si tratta comunque di risultati preliminari da approfondire.

Non è stata osservata, invece, una correlazione significativa tra benzene, acido trans-transmuconico e i livelli di testosterone libero, probabilmente a causa di un campione non ampio.

Inoltre, il confronto tra individui di sesso maschile e quello femminile non ha evidenziato risultati significativi, molto probabilmente a causa dell'esiguità del campione.

Il punto di debolezza del nostro studio rappresenta il campione non molto ampio che ci si promette di implementare in futuro, mentre i punti di forza sono la significatività

statistica, nonostante la non alta numerosità del campione, è la plausibilità biologica documentata in letteratura.

## Conclusioni

I nostri risultati preliminari suggeriscono che una possibile esposizione occupazionale a basse dosi di inquinanti urbani potrebbe alterare i valori di testosterone ematico. Tuttavia, i risultati vanno interpretati con cautela, sottolineando che tali risultati dovranno essere confermati in successive ricerche, con l'eventuale possibilità di includere anche ulteriori specifici test sulla fertilità.

## Bibliografia

- Chen H, Goldberg MS, Villeneuve PJ. A systematic review of the relation between long-term exposure to ambient air pollution and chronic diseases. *Rev Environ Health* 2008; 23:243-97
- Landrigan PJ, Boffetta P, Apostoli P. The reproductive toxicity and carcinogenicity of lead: a critical review. *Am J Ind Med* 2000; 38:231-43
- Figà-Talamanca I, Traina ME, Urbani E. Occupational exposure to chemical: recent evidence on male reproductive effects and biological markers. *Occup Med (Lond)* 2001;51:174-88
- Bahadar H, Mostafalou S, Abdollahi M. Current understandings and perspectives on non-cancer health effects of benzene: A global concern. *Toxicol Appl Pharmacol* 2014; 276:83-94
- Ahmadi R, et al. Effect of diesel exhaust on serum levels T3/T4/Testosterone. *The Journal of Shahid Sadoughi university of medical sciences*. 2015; 23(4): 2061-9
- Jurewicz J, Radwan M, Sobala W, et al. The Relationship Between Exposure to Air Pollution and Sperm Disomy. *Environ Mol Mutagen*. 2015; 56:50-9
- Radwan M, Jurewicz J, Polańska K, et al. Exposure to ambient air- does it affect semen quality and the level of reproductive hormones? *Ann Hum Biol* 2016; 43:50-6
- De Rosa M, Zarrilli S, Paesano L, et al. Traffic pollutants affect fertility in men. *Hum Reprod*. 2003;18(5):1055-61
- Miranda-Figueroa G, Paz-Román Mdel P, Aguilar-Madrid G, et al. Male hormonal profile in workers exposed to toluene in an industrial packaging plant. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc* 2013; 51:270-5
- Sancini A, Tomei F, Tomei G, et al. Exposure to urban stressor and free testosterone plasma values. *Int Arch Occup Environ Health* 2011; 84:609-16
- Massoni F, Simeone C, Ricci P, et al. Papillary thyroid carcinoma and medicolegal considerations. *Minerva Med*. 2013; 104(4):493-4
- Marchetti F, Eskenazi B, Weldon RH, et al. Occupational Exposure to Benzene and Chromosomal Structural Aberrations in the Sperm of Chinese. *Environ Health Perspect* 2012;120:229-34
- Spaziani E, Silecchia G, Ricci S, et al. Minimally invasive approach for the treatment of idiopathic varicocele. *Surg Laparosc Endosc* 1997; 7(2):140-3
- Pantano F, Tittarelli R, Mannocchi G, et al. Hepatotoxicity induced by "the 3Ks": Kava, kratom and khat. *Int J Mol Sci*. 2016; 17(4):580
- Massoni F, Ricci P, Simeone C, et al. Cardiac death in aortic valve sclerosis and coronary artery disease. An autopsy report. *Acta Medica Mediterranea* 2014; 30:77-80
- Xing C, Marchetti F, Li G, et al. Benzene Exposure Near the U.S. Permissible Limit Is Associated with Sperm Aneuploidy. *Environ Health Perspect* 2010; 118:833-9
- Jurewicz J, Radwan M, Sobala W, et al. Lifestyle and semen quality: role of modifiable risk factors. *Syst Biol Reprod Med* 2014; 60:43-51
- Zhao T, Liu XX, He Y, et al. Detection of numerical aberrations of chromosomes 7 and 8 in sperms of workers exposed to benzene series by two-color fluorescence in situ hybridization. *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi* 2004; 21:360-4
- Tomei F, Ricci S, De Marco F, et al. Evaluation of liver function between indoor and outdoor workers: preliminary results. *Clin Ter* 2016; 167(2):e25-31
- Casale T, Rosati MV, Capozzella A, et al. Prolonged exposure to urban pollutants and arterial blood pressure: a whole evaluation of our researches. *Clin Ter* 2015; 166(1):e1-6
- Sancini A, Caciari T, Sinibaldi F, et al. Blood pressure changes and polycyclic aromatic hydrocarbons in outdoor workers. *Clin Ter* 2014; 165(4):e295-303
- Casale T, Sacco C, Ricci S, et al. Workers exposed to low levels of benzene present in urban air: Assessment of peripheral blood count variations. *Chemosphere* 2016; 152:392-8
- Ciarrocca M, Caciari T, Ponticciello BG, et al. Follicle-stimulating hormone levels in female workers exposed to urban pollutants. *Int J Environ Health Res* 2011; 21:391-401
- Rehm J, Room R, Monteiro M, et al. Alcohol use. In Ezzati M, Lopez AD, Rodgers A, Murray CJL, eds. *Comparative quantification of health risks: global and regional burden of disease attributable to selected major risk factors*. Geneva: World Health Organization 2004
- Ducos P, Gaudin R, Robert A, et al. Improvement in HPLC analysis of urinary trans,trans-muconic acid, a promising substitute for phenol in the assessment of benzene exposure. *Int Arch Occup Environ Health* 1990; 62:529-34
- SIVR. Lista dei valori di riferimento per elementi metallici, composti organici e loro metaboliti. Società italiana per i Valori di riferimento, Pavia, 2011
- Van Sittert NJ, Boogaard PJ, Beulink GD. Application of the urinary S-phenylmercapturic acid test as a biomarker for low levels of exposure to benzene in industry. *Br J Ind Med* 1993; 50:460-9
- ACGIH. American Conference of Governmental Industrial Hygienists, TLVs and BEIs for chemical substances and physical agents. Cincinnati OH, 2012
- Wang YX, Sun Y, Huang Z, et al. Association of urinary metal levels with serum hormones, spermatozoa apoptosis and sperm DNA damage in a Chinese population. *Environ Int* 2016; 94:177-88
- Dobrakowski M, Kasperczyk A, Czuba ZP, et al. The influence of chronic and subacute exposure to lead on the levels of prolactin, leptin, osteopontin, and follistatin in humans. *Hum Exp Toxicol (in press)*
- Rengaraj D, Kwon WS, Pang MG. Effects of motor vehicle exhaust on male reproductive function and associated proteins. *J Proteome Res* 2015; 14:22-37
- Eldesouky MA, Sharaf NE, Shakour AAA, et al. Study of the effect of occupational exposure to volatile organic compounds (VOC's) on male reproductive hormones. *World Journal of Medical Sciences* 2013; 8(1):06-12

33. Jeng HA, Pan CH, Lin WY, et al. Biomonitoring of polycyclic aromatic hydrocarbons from coke oven emissions and reproductive toxicity in nonsmoking workers. *J Hazard Mater* 2013; 244-245:436-43
34. Li C, Taneda S, Taya K, et al. Effects of inhaled nanoparticle-rich diesel exhaust on regulation of testicular function in adult male rats. *Inhal Toxicol* 2009; 21:803-11
35. Okamura K, Kizu R, Toriba A, et al. Antiandrogenic activity of extracts of diesel exhaust particles emitted from diesel engine truck under different engine loads and speeds. *Toxicology* 2004; 195:243-54
36. Hansen C, Luben TJ, Sacks JD, et al. The effects of ambient air pollution on semen quality. *Environ Health Perspect* 2010; 118:203-9
37. Rubes J, Selevan SG, Evenson DP, et al. Episodic air pollution is associated with increased DNA fragmentation in human sperm without other changes in semen quality. *Hum Reprod* 2005;20:2776-83
38. De Celis R, Feria-Velasco A, González-Unzaga M, et al. Semen quality of workers occupationally exposed to hydrocarbons. *Fertil Steril* 2000; 73:221-8
39. Joensen UN, Veyrand B, Antignac JP, et al. PFOS (perfluorooctanesulfonate) in serum is negatively associated with testosterone levels, but not with semen quality, in healthy men. *Hum Reprod* 2013; 28:599-608
40. Calogero AE, La Vignera S, Condorelli RA, et al. Environmental car exhaust pollution damages human sperm chromatin and DNA. *J Endocrinol Invest* 2011; 34:e139-43
41. Mandani P, Desai K, Highland H. Cytotoxic Effects of Benzene Metabolites on Human Sperm Function: An In Vitro Study. *ISRN Toxicol* 2013; 12:397524
42. Chapman DE, Namkung MJ, Juchau MR. Benzene and benzene metabolites as embryotoxic agents: effects on cultured rat embryos. *Toxicol Appl Pharmacol* 1994; 128:129-37
43. Katukam V, Kulakarni M, Syed R, et al. Effect of benzene exposure on fertility of male workers employed in bulk drug industries. *Genet Test Mol Biomarkers* 2012; 16:592-7
44. Tomei G, Ciarrocca M, Fiore P, et al. Exposure to urban stressor and effects on free testosterone in female workers. *Sci Total Environ* 2008; 392:198-202
45. De Sio S, Casale T, Rosati MV, et al. Correlation between urinary nickel and FSH plasma values in workers occupationally exposed to urban stressors. *Prevent Res* 2014; 2:131-140
46. Saadat M, Bahaoddini S, Saadat I. Alteration of serum sex hormonal profile in male gasoline filling station workers in respect to their polymorphism of glutathione S-transferase M1. *Environ Toxicol Pharmacol* 2013; 35:265-9
47. Lovreglio P, Barbieri A, Carrieri M, et al. Lesser validity of urinary benzene than S-phenylmercapturic acid for measuring occupational and environmental exposure to very low concentrations of benzene. *G Ital Med Lav Ergon* 2011; 33:117-24
48. Ciarrocca M, Tomei F, Caciari T, et al. Environmental and biological monitoring of benzene in traffic policemen, police drivers and rural outdoor male workers. *J Environ Monit* 2012; 14:1542-50
49. Xu J, Zou MH. Molecular insights and therapeutic targets for diabetic endothelial dysfunction. *Circulation* 2009; 120:1266-86
50. Zou MH. Is Nad(P)H oxidase a missing link for air pollution-enhanced obesity? *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2010; 30:2323-4
51. Xu X, Yavar Z, Verdin M, et al. Effect of early particulate air pollution exposure on obesity in mice role of p47phox. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2010; 30:2518-27
52. Massoni F, Salesi M, Sarra MV, et al. Absence from work and the medical sickness certificate. *Panminerva Med* 2013; 55(1):99-105