DEISE NASCIMENTO CRISPIM DOS SANTOS

**Avaliação citogenética e molecular de
trabalhadores intoxicados pelo benzeno**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo
para obtenção do título de Mestre em Ciências

Programa de Fisiopatologia Experimental
Orientadora: Prof.^a Dra. Gilka Jorge Fígaro Gattás

São Paulo

2012

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Santos, Deise Nascimento Crispim dos

Avaliação citogenética e molecular de trabalhadores intoxicados pelo benzeno
/ Deise Nascimento Crispim dos Santos. -- São Paulo, 2012.

Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São
Paulo.

Programa de Fisiopatologia Experimental.

Orientadora: Gilka Jorge Fígaro Gattás.

Descritores: 1.Benzeno 2.Marcadores biológicos 3.Hibridização *in situ* por
fluorescência 4.Polimorfismo genético 5.Translocação PML/RAR α
6.Exposição ocupacional

USP/FM/DBD-266/12

Este trabalho foi desenvolvido no laboratório de Imuno-Hematologia e
Hematologia Forense LIM-40
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Dedico este trabalho a todas as pessoas que estiveram ao meu lado, me acompanhando, apoiando e principalmente acreditando em meus sonhos:

Meus pais Zoroastro e Eliane e meu marido Pedro.

Aos pacientes, maior fonte de dedicação e motivação para a realização
deste estudo.

Esta dissertação está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors (Vancouver)*.

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias/ elaborado por Annelise Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria Fazanelli Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a Ed. – São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação – DBD/FMUSP; 2011.

Abreviatura dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

Agradecimentos

À Prof.^a Dr.^a Gilka Gattás, Livre Docente do Departamento de Medicina Legal, Ética Médica, Medicina Social e do Trabalho da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, pela orientação, estímulo, paciência e confiança.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela concessão da bolsa de mestrado, que me permitiu a realização deste trabalho.

Ao Dr. Danilo Fernandes Costa, médico do trabalho do Ministério do Trabalho e emprego, delegacia regional do trabalho (DRT), pelos conhecimentos compartilhados, pela amizade, pela dedicação e por acreditar nesse trabalho.

Aos indivíduos que acreditaram em nosso trabalho e participaram compondo o grupo controle.

Ao Dr. Sergio Paulo Bydlowski e à Dra. Luciana Morganti do Departamento de Genética e Hematologia Molecular, Divisão de Pesquisa e Biologia Molecular, pela colaboração para que esta pesquisa pudesse ser realizada.

À Dra. Kátia Leite e a Dra. Ísida de Campos Souza, pelos ensinamentos e oportunidades que me concederam para realizar esta pesquisa.

Aos Técnicos de Laboratório Marcelo, Thiago e Priscilla pela ajuda nas entrevistas, coleta de material e principalmente pela amizade.

À Dra Fernanda de Toledo Gonçalves, Pesquisadora Científica do LIM 40, por toda a ajuda no laboratório, pelas discussões referentes ao trabalho e pela amizade.

Às amigas de laboratório, Silvia, Mari, Marcela, Renata, Simone, por todo o incentivo, apoio e pela amizade que construímos.

À amiga Fernanda Shimabukuro, companheira de citogenética, pela ajuda nos experimentos e pelos ensinamentos.

Ao LIM 40 do Departamento de Medicina Legal, Ética Médica, Medicina Social e do Trabalho pelo apoio financeiro concedido para a realização da parte experimental da pesquisa.

À Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo e ao Programa de Fisiopatologia experimental.

A todas as pessoas que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.

A Deus, sempre.

OBRIGADA!

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS

LISTA DE SÍMBOLOS

LISTA DE SIGLAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE FIGURAS

RESUMO

SUMMARY

1. INTRODUÇÃO	2
1.1 AVALIAÇÃO DE POPULAÇÕES EXPOSTAS.....	3
1.1.1 BIOMARCADORES DE EXPOSIÇÃO	6
1.1.2 BIOMARCADORES DE EFEITO	7
1.1.3 BIOMARCADORES DE SUSCETIBILIDADE	11
1.2 BENZENO	14
1.2.1 EXPOSIÇÃO AMBIENTAL E OCUPACIONAL AO BENZENO	16
1.3 AGRAVOS À SAÚDE PELA EXPOSIÇÃO AO BENZENO	19
1.3.1 BENZENO E CÂNCER.....	21
1.4 BIOMARCADORES NA AVALIAÇÃO DE TRABALHADORES EXPOSTOS AO BENZENO.....	24
2. OBJETIVOS.....	29
3. MATERIAL E MÉTODOS	31
3.1 CASUÍSTICA.....	31
3.1.1 PACIENTES	31
3.1.2 CONTROLES	32
3.2 COLETA DE AMOSTRAS BIOLÓGICAS.....	33
3.3 AVALIAÇÃO CLÍNICO-OCUPACIONAL	33
3.4 TESTES HEMATOLÓGICOS.....	33
3.5 TESTES MOLECULARES.....	34
3.6 TESTES CITOGENÉTICOS	37
3.6.1 TESTE DO MICRONÚCLEO COM BLOQUEIO DA CITOCINESE (CBMN)	37
3.6.2 TESTE DE FISH PARA TRANSLOCAÇÃO	39
3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA	44
4. RESULTADOS	47
4.1 PERFIL DAS POPULAÇÕES ESTUDADAS	47
4.2 ATIVIDADE OCUPACIONAL DAS POPULAÇÕES ESTUDADAS.....	51
4.3 AVALIAÇÃO CLÍNICA DOS TRABALHADORES EXPOSTOS AO BENZENO	54
4.4 EXAMES LABORATORIAIS: HEMOGRAMA	56
4.5 TESTES MOLECULARES.....	60
4.6 TESTES CITOGENÉTICOS	62
4.6.1 TESTE DO MICRONÚCLEO COM BLOQUEIO DA CITOCINESE (CBMN)	62
4.6.2 TESTE DE FISH	67
5. DISCUSSÃO	81
5.1 AVALIAÇÃO CITOGENÉTICA	91
6. CONCLUSÕES.....	105
7. ANEXOS	107
8. REFERÊNCIAS	126

LISTA DE ABREVIATURAS

1 F.	Uma fusão
1 VD.	Um sinal verde
1 VM.	Um sinal vermelho
2 F.	Duas fusões
2 VD.	Dois sinais verdes
2 VM.	Dois sinais vermelhos
3 VM.	Três sinais vermelhos
AC.	Aberração Cromossômica
CHCM.	Concentração de hemoglobina corpuscular média
COV.	Composto orgânico volátil
CYP.	Citocromo P450
DAPI.	4',6'-diamidina-2-fenilindol
DNA.	Ácido desoxirribonucleico
EDTA.	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EPI.	Equipamento de proteção individual
FISH.	<i>Fluorescence in situ hybridization</i>
GST.	Glutathione S- transferase
HCL.	Ácido Clorídrico
HPA.	Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos
IC 95%.	Intervalo de confiança de 95%
KCL.	Cloreto de potássio
LMA.	Leucemia mielóide aguda
LMA1.	<i>Acute myeloid leukemia 1 gene</i>
LPA.	Leucemia promielocítica aguda
Meh.	Epóxido hidrolase microssomal
MN.	Micronúcleo
MNCtB.	Teste do Micronúcleo com bloqueio da citocalasina
MPO.	Mieloperoxidase
NACL.	Cloreto de sódio
NAT.	N- acetiltransferase
NPM.	<i>Nucleophosmin</i>
NQO1.	NAD(P)H quinona oxidoreductase 1
NuMA.	<i>Nuclear Matrix-Mitotic Apparatus</i>
OR.	<i>Odds Ratio</i>
p21.	proteína p21
p53.	<i>p53 gene</i>
PCR.	Reação em cadeia pela polimerase
PLZF.	<i>Promyelocitic Leukemia zinc finger</i>
PML.	<i>Promyelocitic Leukemia</i>
PNP.	Ponte nucleoplasmática
Ppb.	partes por bilhão
Ppm.	partes por milhão

PST.	Phenol sulfotransferase
<i>RAR</i> α .	Receptor alfa do ácido retinóico
RDW-CV.	Amplitude de distribuição dos eritrócitos medido como coeficiente de variação
RDW-SD.	Amplitude de distribuição dos eritrócitos medido como desvio padrão
RFLP.	<i>Restriction fragment length polymorphism</i>
RNA.	Ácido ribonucleico
Rpm.	Rotações por minuto
RPMI.	Roswell Park Memorial Institute
S- PMA.	Ácido S-fenilmercaptúrico
SCGE.	<i>Single cell gel eletrophoresis assay</i>
SFB.	Soro fetal bovino
SMD.	Síndrome mielodisplásica
t- SMD.	Síndrome Mielodisplásica relacionada à terapia
TCI.	Troca de cromátides irmãs
t-LMA.	Leucemia mielóide aguda relacionada à terapia
t-t- mucônico.	Ácido trans-trans mucônico
UDPGT.	Uridina difosfato glucoronil transferase
VCM.	Volume corpuscular médio
VPM.	Volume plaquetário médio

LISTA DE SÍMBOLOS

°C	graus Celsius
μg	micrograma
μl	microlitro
GI	graus de Liberdade
MI	mililitros
mM	milimolar

LISTA DE SIGLAS

ACGIH	<i>American Conference of Governmental Industrial Hygienists</i>
ANP	Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis
CETESB	Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental
COSIPA	Companhia Siderúrgica Paulista
FUNDACENTRO	Fundação Jorge Duprat Figueiredo de Segurança e Medicina do Trabalho
HC-FMUSP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
IARC	Agência Internacional de Pesquisa em Câncer
INCA	Instituto Nacional do Câncer
LIM	Laboratório de Investigação Médica
MPT	Ministério Público do Trabalho
Petrobrás	Petróleo Brasileiro S/A
RECAP	Refinaria de Capuava
RPBC	Refinaria Presidente Bernardes
SSO	Serviço de Saúde Ocupacional
SSST	Secretaria de Segurança e Saúde no Trabalho
WHO	<i>World Health Organization</i>

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Distribuição de fatores sócio-demográficos nos grupos de trabalhadores expostos ao benzeno e de controles	49
Tabela 2: Comparação da frequência de consumo de bebidas, cigarros, drogas, medicamentos, problemas de saúde e número de abortos nos grupos de trabalhadores expostos ao benzeno e de controles	50
Tabela 3: Perfil ocupacional dos trabalhadores expostos ao benzeno nas Refinarias Presidente Bernardes de Cubatão (RPBC) e de Capuava (RECAP) e na Companhia Siderúrgica Paulista (COSIPA)	53
Tabela 4: Perfil ocupacional dos trabalhadores expostos ao benzeno (E) nas refinarias de petróleo (RPBC/RECAP) ou na siderúrgica (COSIPA) relacionando local de trabalho, função, tempo de trabalho, afastamento, grau de exposição e acidente de trabalho	54
Tabela 5: Comparação da média de células vermelhas (eritrograma) avaliadas no hemograma dos 20 indivíduos expostos e 20 indivíduos controles.....	58
Tabela 6: Comparação da média de células brancas (leucograma) avaliadas no hemograma dos 20 indivíduos expostos e 20 controles.....	59
Tabela 7: Frequências alélicas dos genes <i>CYP1A1/MspI</i> , <i>CYP2E1/PstI</i> , <i>GSTM1</i> , <i>GSTT1</i> , <i>NQO1/HinfI</i> e <i>MPO/AclI</i> nos grupos de trabalhadores expostos e controles	60
Tabela 8: Frequência de células com MN, pontes nucleoplasmáticas (PNP), e índice de divisão nuclear (IDN) observadas nos linfócitos do sangue periférico dos trabalhadores expostos ao benzeno (E) e controles (C)	64
Tabela 9: Distribuição da frequência de MN e PNPs em relação ao tabaco, drogas, bebidas, medicamentos, saúde do trabalhador, saúde dos filhos e número de abortos nos indivíduos expostos	65
Tabela 10: Distribuição da frequência de MN e PNPs em relação ao tabaco, drogas, bebidas, medicamentos, saúde do trabalhador, saúde dos filhos e número de abortos no grupo controle	66
Tabela 11: Frequência de células normais, células com pelo menos uma fusão e de células com alterações no número de sinais que foram observadas nos trabalhadores expostos ao benzeno pela técnica de FISH	70

Tabela 12: Frequência de células normais, células com pelo menos uma fusão e de células com alterações no número de sinais que foram observadas no grupo controle pela técnica de FISH	71
Tabela 13: Comparação, pelo teste t-Student, das frequências de células normais, de células com pelo menos uma fusão, e de células com alterações no número esperado de sinais verdes e vermelhos observada na análise citogenética por FISH de células dos trabalhadores expostos ao benzeno e dos controles.....	72
Tabela 14: Correlação da idade com a frequência de células normais, células com pelo menos uma fusão, e de células com alterações no número de sinais verdes e/ou vermelhos, identificados pela técnica de FISH, observadas no grupo de expostos ao benzeno e nos controles	75
Tabela 15: Correlação do tempo de trabalho e afastamento com a frequência de células normais, células com pelo menos uma fusão, e de células com alterações no número de sinais verdes e/ou vermelhos, identificados pela técnica de FISH, observadas no grupo de expostos ao benzeno e nos controles	75
Tabela 16: Distribuição do número de células normais, células com pelo menos uma fusão e células com alteração de sinal no grupo de trabalhadores expostos segundo problemas de saúde dos filhos.....	76
Tabela 17: Descrição das medidas segundo o genótipo de <i>CYP1A1</i> e resultado dos testes comparativos.....	77
Tabela 18: Descrição das medidas segundo o genótipo de <i>GSTT1</i> e resultado dos testes comparativos.....	78
Tabela 19: Distribuição das idades, dados clínicos (leucócitos) com os testes citogenéticos (CBMN e FISH) nos trabalhadores expostos ao benzeno	79

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Diagrama sugerindo a utilização de biomarcadores na avaliação do risco de desenvolver doenças em decorrência da ocupação.	5
Figura 2: Representação esquemática do metabolismo do benzeno demonstrando as principais vias e metabolização das enzimas levando a toxicidade..	16
Figura 3: Representação esquemática da sonda para o gene <i>PML</i> e da sonda para o gene <i>RARα</i>	43
Figura 4: Produtos das reações de PCR para os genes: <i>CYP2E1</i> , <i>GSTT1</i> , <i>GSTM1</i> , <i>NQO1</i> , <i>CYP1A1</i> e <i>MPO</i>	61
Figura 5: Células coradas com Feulgen-Fast-Green.....	62
Figura 6: Núcleos interfásicos demonstrando os sinais típicos e atípicos observados nas células a partir da utilização de FISH para t(15;17)	68

RESUMO

Santos DNC. Avaliação citogenética e molecular de trabalhadores intoxicados pelo benzeno [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2012.

O benzeno é um hidrocarboneto aromático produzido pela combustão de produtos naturais. A exposição ocupacional ao benzeno é caracterizada por ambientes industriais que o empregam em seus processos produtivos. Nos laboratórios de indústria do petróleo ele é utilizado em forma pura para análise, e está presente como contaminante em derivados, como gasolina, hexano, querosene, tolueno, entre outros. No Brasil o valor recomendado pela legislação como limite de exposição ambiental ao benzeno é de 1ppm. O câncer hematológico é considerado um dos principais fatores de risco para a saúde dos trabalhadores expostos ao benzeno e a utilização de biomarcadores no monitoramento destes profissionais tem sido sugerida em diferentes países. O presente trabalho teve como objetivo avaliar diferentes biomarcadores em sangue periférico de trabalhadores homens, cronicamente expostos ao benzeno em refinarias e siderurgia (18 deles com diagnóstico de intoxicação), que estavam afastados de suas funções por períodos que variaram de cinco meses a 27 anos, com idade média de $46,8 \pm 9,33$ anos comparado com um grupo controle composto também de 20 homens, selecionados em Bancos de Sangue (idade média de $45,7 \pm 8,00$ anos), com diferentes ocupações não correlacionadas ao agente em estudo. Em ambos os grupos foram realizados hemograma completo, teste do micronúcleo em linfócitos com bloqueio da citocinese (CBMN), teste de FISH em linfócitos para a translocação t(15;17), bem como testes moleculares para avaliação de polimorfismos em genes envolvidos na metabolização do benzeno (*MPO*, *NQO1*, *CYP1A1* e *CYP2E1*) e na eliminação de xenobióticos (*GSTM1/GSTT1*). Quanto ao hemograma à análise estatística realizada pelo teste t-Student revelou que os expostos ao benzeno apresentavam leucopenia com diferença altamente significativa na contagem de leucócitos ($p < 0,001$), neutrófilos ($p < 0,001$), segmentados ($p < 0,001$), linfócitos ($p = 0,013$) e monócitos ($p = 0,010$). A avaliação da série eritrocitária também revelou diferenças estatísticas entre os grupos para os

índices de RDW-CV ($p=0,031$) e RDW-SD ($p=0,008$), assim como para o VPM ($p=0,001$). Não foi verificada diferença entre os grupos quanto à frequência de polimorfismos nos genes *CYP1A1*, *CYP2E1*, *MPO*, *NQO1*, *GSTM1*, *GSTT1*. No teste do CBMN a contagem de células com MN e pontes núcleoplasmáticas foi três vezes maior nos expostos ($1,95 \pm 2,37$) que nos controles ($0,65 \pm 0,75$), diferença essa considerada estatisticamente significativa ($t=2,33$; 38gl; $p=0,024$). Na análise de FISH para o rearranjo PML/RAR α os trabalhadores expostos também apresentaram frequência três vezes maior de células com pelo menos uma fusão gênica ($9,79 \pm 9,54$) em comparação aos controles ($3,95 \pm 3,17$), diferença essa considerada estatisticamente significativa pelo teste t-Student ($p=0,019$). Os resultados obtidos na presente investigação parecem estar de acordo com os dados da literatura que revelam alteração nas células primordiais da medula, decorrente da exposição ocupacional ao benzeno, bem como ação genotóxica, identificada pelos testes do CBMN e FISH em linfócitos de sangue periférico. Embora o número de trabalhadores estudados seja reduzido, e a exposição ocupacional possivelmente inclua outros agentes potencialmente genotóxicos que não só o benzeno é interessante ressaltar que os resultados positivos foram observados após em média nove anos de afastamento profissional. A utilização do teste do CBMN e o estudo de outras translocações, que não só a PML/RAR α , em linfócitos de trabalhadores expostos pode representar um biomonitoramento importante e menos invasivo no acompanhamento destes trabalhadores. A análise de um grupo maior de trabalhadores, inclusive expostos a baixas concentrações de benzeno pode ser fundamental na validação destes biomarcadores.

Descritores: Benzeno; Marcadores biológicos; Hibridização *in situ* por Fluorescência; Polimorfismo Genético; Translocação PML/RAR α ; Exposição ocupacional.

Summary

Santos DNC. Cytogenetic and molecular evaluation of workers poisoned by benzene [dissertation]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2012.

Benzene is an aromatic hydrocarbon produced by the burning of natural products. The occupational exposure to benzene is characterized by industrial environments that use in their production processes. In the laboratories of Petroleum industry it is used in the pure form for analysis, and it is present as a contaminant in other products like gasoline, hexane, kerosene, toluene, etc. In Brazil the threshold limit value recommended by law in environmental exposure to benzene is 1 ppm. The hematological cancer is considered one of the main risk factors for the health of workers occupationally exposed to benzene and the use of biomarkers in monitoring these professionals has been suggested in different countries. The aim of this study was to assess different biomarkers in peripheral blood lymphocytes from 20 men workers chronically exposed to benzene in Petroleum Refinery and Steel Industry (18 workers with poisoning diagnosis), who were removed from workplace for periods ranging from five months to 27 years, with average age 46.8 ± 9.33 years old compared to a control group consisting also of 20 men, selected in Blood Banks (average age 45.7 ± 8.00 years old), with different occupations unrelated to the agent under study. In both groups were performed blood cell counts, cytokinesis-block micronucleus assay (CBMN), FISH assay in peripheral blood lymphocytes for translocation $t(15;17)$, and molecular tests for evaluation of genetic polymorphisms in genes involved in benzene metabolism (*MPO*, *NQO1*, *CYP1A1* e *CYP2E1*) and detoxification (*GSTM1/GSTT1*). Despite blood cell counts the statistical analysis performed by t-Student test revealed that workers exposed to benzene had leukopenia with a highly significant difference in leukocyte count ($p < 0.001$), neutrophils ($p < 0.001$), segmented ($p < 0.001$), lymphocytes ($p = 0.013$) and monocytes ($p = 0.010$). The evaluation of red blood cells also revealed statistically significant differences between groups for RDW-CV (0.031), RDW-SD (0.008) and MPV (0.001). There were no differences between groups regarding the frequency of genetic polymorphisms in *CYP1A1*,

CYP2E1, MPO, NQO1, GSTM1, and GSTT1. In the CBMN test the cell counts with MN and nucleoplasmic bridges was three times higher in exposed (1.95 ± 2.37) than in controls (0.65 ± 0.75), and the difference was considered statistically significant ($t=2.33; 38\text{gl}; p=0.024$). In the FISH analysis for the PML/RAR α rearrangement the exposed workers also showed three times higher frequency of cells with at least one signal fusion (9.79 ± 9.54) in comparison to controls (3.95 ± 3.17), and the difference was statistically significant by the t-Student test ($p=0.019$). The results obtained in this study seem to agree with the literature data that show alterations in the stem cells of the bone marrow, resulting from occupational exposure to benzene, as well genotoxicity, identified by CBMN and FISH assay in peripheral blood lymphocytes. Although the number of subjects evaluated is reduced, and the occupational exposure includes other potentially genotoxic agents not only benzene, it is interesting to note that positive results were observed after an average of nine years of removal professional. The use of the CBMN test and the study of other translocations, not only PML/ RAR α , in lymphocytes of workers exposed may represent an important biomonitoring and less invasive monitoring of workers. The analysis of a major number of individuals, including those exposed to low concentrations of benzene, may be essential in validation of these biomarkers.

Descriptors: Benzene; Biological Markers; Fluorescence *in situ* Hybridization; Polymorphism, Genetic; PML/RAR α Translocation; Occupational Exposure.

1.INTRODUÇÃO

AVALIAÇÃO CITOGÉNÉTICA E MOLECULAR DE TRABALHADORES INTOXICADOS PELO BENZENO

1. INTRODUÇÃO

A avaliação e o possível controle de fatores ambientais que podem potencialmente afetar a saúde humana, tanto nas gerações presentes quanto nas futuras, tem sido foco de atenção de profissionais de diferentes áreas do conhecimento. Em especial, a saúde ambiental é definida como uma área que procura relacionar características físicas, químicas, biológicas, além de fatores sociais e psicológicos (externos à pessoa), que podem estar relacionados com o ambiente e modificar as condições de saúde das populações. Neste contexto, dois pontos principais podem ser focados: os perigos ou riscos ambientais e a promoção da saúde. Os perigos se referem à capacidade potencial de fatores ambientais estarem associados a um efeito adverso à saúde, enquanto risco é a probabilidade de ocorrência destes efeitos, decorrentes da exposição humana, aos fatores adversos do ambiente. Por outro lado, a promoção da saúde abrange também a preocupação com a qualidade de vida das pessoas (Loewenson, 2001; WHO, 2010; McHale et al., 2010).

As doenças profissionais, resultantes de processos obsoletos e não controlados, são geralmente pouco visíveis nos países menos industrializados e, também não são devidamente reconhecidas como um problema em países de baixa renda. Não só a saúde do trabalhador pode ser afetada, mas também a de pessoas fora do ambiente de trabalho, por meio da poluição ambiental, qualidade de vida precária ou também por residirem próximas a fontes de contaminação, como as próprias indústrias (Loewenson, 2001).

No processo de globalização, as substâncias químicas desempenham um importante papel. Elas fazem parte da natureza, sendo extraídas e utilizadas desde os primórdios da civilização para os mais diversos fins.

Dados da literatura revelam que a produção global de substâncias químicas, que era de um milhão de toneladas em 1930, se tornou superior a 400 milhões de toneladas em 2006, período em que a indústria química já era o terceiro maior setor industrial no mundo e empregava cerca de 10 milhões de pessoas (Costa, 2009). A convivência com as substâncias químicas é, portanto, inevitável e permanente, sendo seu efeito mais grave para os trabalhadores envolvidos, direta ou indiretamente em processos produtivos. Os principais danos à saúde incluem doenças respiratórias, dermatites, sonolência, cansaço e injúrias musculares, e em alguns casos inclusive o câncer, dependendo do tempo de exposição e do tipo de substância química em questão (Franco et al., 2008; McHale et al., 2010).

Dentre as doenças de difícil conexão com o trabalho inclui-se o câncer, uma vez que sua manifestação pode ocorrer muitos anos após a exposição do trabalhador, além de estar associado a fatores individuais como genótipo, ou mesmo hábitos como alimentação, consumo de tabaco, álcool, drogas lícitas e/ou ilícitas, entre outros. O câncer ocupacional representa de 2% a 4% dos casos de câncer no mundo. De fato, os fatores de risco externos (ambientais e/ou de exposição ocupacional) ou endógenos (hereditários), podem interagir de várias formas para dar início às alterações celulares, presentes na etiologia do câncer (WHO, 2010).

1.1 Avaliação de populações expostas

A detecção de populações expostas envolve tecnologias que permitem avaliar ou estimar a magnitude, o tempo e a duração da exposição. Nesta etapa é importante definir quais são os diferentes aspectos que estão contribuindo para que uma determinada população se encontre exposta a substâncias que são potencialmente prejudiciais a saúde.

Uma população definida como exposta pode ser muito heterogênea, possuindo indivíduos ou grupos de indivíduos diferentes entre si. Os membros podem variar demograficamente (idade, origem étnica, condição nutricional, hábitos de consumo, etc.) e em termos de fatores mais

específicos (geográficos) como, por exemplo, a contaminação de rios e solos, fatores esses que são determinantes e influenciam na probabilidade do aumento da exposição em uma dada situação de contaminação. Por outro lado, além das condições ambientais, as características físico-químicas das substâncias em questão, são fundamentais para a definição do nível de exposição ambiental/ocupacional (Freitas, 1997).

Em seres humanos, a avaliação direta da exposição pode ser realizada por meio de técnicas que identificam os níveis do agente em questão no meio ambiente, assim como da utilização de testes que sejam capazes de realizar monitoramento individual (Manno et al., 2010). O principal objetivo da avaliação de populações expostas é fornecer subsídios para a proteção e a promoção da saúde (Costa, 2009).

As interações gene-ambiente podem favorecer o desenvolvimento e a progressão de doenças, especialmente para aqueles indivíduos que são mais suscetíveis aos efeitos da exposição ou metabolização do agente em questão (MacHale et al., 2010).

Historicamente, a primeira observação entre câncer e ocupação foi relatada por Pott em 1775, que descreveu incidência de câncer da bolsa escrotal em limpadores de chaminés da cidade de Londres (Pearce et al., 1996). Entretanto, somente após a Segunda Guerra Mundial, a avaliação epidemiológica sobre a ocorrência de cânceres e outras doenças foi relacionada à exposição ocupacional. Um número significativo de agentes químicos, físicos e processos industriais têm sido identificados como causadores potenciais de câncer em humanos (Monson, 1996; IARC, 1999a).

O estabelecimento de medidas preventivas, principalmente no ambiente ocupacional, poderá ocorrer a partir da identificação de marcadores capazes de revelar eventos biológicos que se estabelecem precocemente ou em estágios iniciais da doença. Os biomarcadores moleculares podem ser classificados em três categorias: biomarcadores de exposição, biomarcadores de suscetibilidade e biomarcadores de efeito. Os biomarcadores de exposição correspondem à expressão de um agente

ambiental ou de seus metabólitos no meio interno dos indivíduos, os de suscetibilidade indicam indivíduos mais ou menos propensos a desenvolver câncer quando expostos a substâncias cancerígenas e os biomarcadores de efeito ou de resposta indicam alterações presentes em tumores; são tardios e permitem avaliar o prognóstico da doença (Wünsch Filho e Gattás, 2001).

Qualquer tentativa de sistematizar uma classificação dos biomarcadores existentes para avaliar o risco de câncer, em uma população ocupacionalmente exposta, seria simplista e provavelmente insuficiente. Entretanto, uma divisão entre biomarcadores de exposição, biomarcadores de efeito e biomarcadores de suscetibilidade tem sido utilizada na literatura com o intuito de gerar dados que permitam avaliar o risco da exposição, conforme sugerido na Figura 1, e proposto por McHale e colaboradores (2010).

Figura 1: Diagrama sugerindo a utilização de biomarcadores na avaliação do risco de desenvolver doenças em decorrência da ocupação (Adaptado de McHale et al., 2010).

1.1.1 Biomarcadores de exposição

A utilização de biomarcadores de exposição tem como foco central a identificação e quantificação de metabólitos específicos derivados de uma substância química de origem ambiental no fluido corporal, sugerindo assim a contribuição de determinados agentes na exposição.

O indicador biológico de exposição estima a dose interna, por meio da identificação da substância química ou de seu produto de biotransformação, permitindo quantificar a substância no organismo. Por outro lado, a dose externa se refere à concentração do agente químico presente no ambiente em contato com o organismo (Amorim, 2003).

Os biomarcadores de exposição podem ser medidos em diferentes tecidos, inclusive no sangue, e a partir dessa análise pode-se estimar a dose biológica efetiva em um organismo, pois somente uma parte da quantidade total da substância química absorvida atingirá o tecido-alvo (Jakubowski et al., 2005; Gyorffy et al., 2008).

Em trabalhadores, a avaliação dos metabólitos excretados na urina pode fornecer estimativas da exposição. Nessa comparação as dosagens ambientais servem de padrão somente no momento do exame, pois, as concentrações dessas substâncias no meio ambiente podem variar para cada situação e população estudada. A escolha do metabólito a ser avaliado deve ser criteriosa, pois alguns compostos contêm misturas complexas e pode ser necessária a utilização de mais de um biomarcador (Franco et al., 2008).

Um exemplo amplamente estudado de biomarcadores de exposição se refere à identificação de adutos de DNA ou proteínas. A formação de adutos, que são ligações covalentes entre metabólitos e DNA, não é região específica dentro da molécula de DNA podendo ocorrer ao longo de toda a estrutura atingindo inclusive genes envolvidos no processo de carcinogênese (Vineis e Perera, 2000). A identificação de adutos de DNA implica, portanto em risco de câncer, independente da localização específica do mesmo. Diferentes adutos que podem se ligar ao DNA ou proteínas têm

sido descritos na literatura como importantes marcadores de exposição na avaliação de populações expostas (Au et al., 2007).

1.1.2 Biomarcadores de efeito

Os biomarcadores de efeito identificam eventos biológicos que ocorrem continuamente entre a exposição e o desenvolvimento do câncer. Os testes utilizados incluem avaliações celulares ou de toxicidade tecidual, alterações cromossômicas, alterações no DNA, RNA, na expressão de proteínas, assim como alterações nas funções relevantes para a carcinogênese (reparo do DNA, resposta imunológica, entre outros). Esses marcadores podem ser avaliados em tecidos e componentes do sangue (Boffetta, 2010).

A vantagem de se estudar os linfócitos humanos do sangue periférico é justificada pelo fato de que eles circulam pelo corpo todo e são assim expostos ao agente genotóxico, independentemente da via de administração (oral, aérea, dérmica, intravenosa, etc), sendo também capazes de revelar danos que se mantiveram mesmo após a divisão celular (Garcia-Sagredo, 2008).

Diferentes testes citogenéticos têm sido empregados para monitorar e avaliar populações com exposição ocupacional a agentes possivelmente mutagênicos. Dentre os testes mais utilizados na avaliação citogenética estão os testes de aberrações cromossômicas (AC) em linfócitos do sangue periférico (Hoyos-Giraldo et al., 2009), troca de cromátides irmãs (TCI) - (Kopjar et al., 2009), teste do micronúcleo (MN) – (Fenech, 2000), FISH (Garcia-Sagredo, 2008) e o teste do cometa (Takahashi, 2003).

Dados epidemiológicos sugerem que as ocorrências de aberrações cromossômicas em linfócitos do sangue periférico representam eventos relevantes na carcinogênese e podem servir como um indicador para o risco de câncer (Holecková et al., 2004; Garcia-Sagredo, 2008; McHale et al., 2008).

As mutações ou aberrações cromossômicas envolvem modificações na estrutura e no número de cromossomos, identificadas ao microscópio ótico, sendo esse teste considerado um indicador extremamente sensível de genotoxicidade, capaz de avaliar de forma precoce o risco de câncer em populações expostas (Boffetta et al., 2007; Bonassi et al., 2008). A utilização do teste de aberração cromossômica como indicador de mutagênese baseia-se no fato de haver forte correlação entre as aberrações cromossômicas e as mutações pontuais (Garcia-Sagredo, 2008). No entanto, a capacidade de detecção dos testes citogenéticos pode ser limitada quando a concentração do agente mutagênico é baixa, tornando o resultado obtido negativo, o que não significa que o agente deixa de ser prejudicial em baixas concentrações. Geralmente, a maioria das aberrações cromossômicas observadas utilizando a coloração de Giemsa são quebras, fragmentos acêntricos, anéis e dicêntricos que são aberrações instáveis que irão levar à morte celular durante a proliferação. Além disso, o número de células com esses tipos de aberrações diminuem com o tempo decorrido após a exposição. As trocas cromossômicas estáveis – translocações - podem persistir por mais tempo e fornecem, portanto, uma estimativa das frequências de aberrações cromossômicas acumuladas (Mitelman et al., 2007; Garcia-Sagredo, 2008). Estas aberrações estáveis são muito importantes por estarem associadas a anomalias congênitas, bem como ao câncer (Garcia-Sagredo, 2008).

O teste do MN é considerado rápido e econômico e vem sendo aplicado como teste de *screening* de populações humanas expostas a agentes potencialmente mutagênicos e/ou carcinogênicos (Heddle et al., 1991; Fenech, 2006; Garcia-Sagredo, 2008). A ocorrência de MN representa uma resposta integrada a fenótipos de instabilidade cromossômica e a alterações na viabilidade celular em decorrência de defeitos genéticos e/ou exposições exógenas a agentes genotóxicos (Iamarcovai et al., 2008).

Os micronúcleos são pequenos corpúsculos citoplasmáticos correspondendo a aproximadamente 1/3 do diâmetro do núcleo principal. São delimitados por membrana e se encontram separados do núcleo principal. A origem do MN ocorre a partir de fragmentos cromossômicos ou

cromatídicos acêntricos ou de cromossomos inteiros que se atrasam na anáfase e deixam de ser incluídos no núcleo das células filhas, no final da telófase, durante a mitose. O dano no DNA que leva a formação do MN pode ocorrer por diversos motivos, dentre eles os relacionados à exposição a agentes capazes de danificar os cromossomos e a erros que ocorrem durante a mitose e/ou no processo de reparo do DNA (Fenech, 1997; Decordier e Kirsch-Volders, 2006; Fenech, 2006; Bonassi et al., 2007; Ceppi et al., 2010). O aumento na frequência de MN em linfócitos do sangue periférico, da mesma forma que as aberrações cromossômicas estruturais, parece ser um biomarcador preditivo de câncer em populações humanas (Bonassi et al., 2007; Iarmarcovai et al., 2008; Garcia-Sagredo, 2008).

O teste do MN com bloqueio da citocinese (CBMN) foi proposto por Fenech e Morley em 1985, como metodologia capaz de distinguir células que não sofreram divisão e células que completaram um ciclo de divisão nuclear durante a cultura *in vitro*. A técnica de bloqueio da citocinese com adição da citocalasina B interrompe a divisão do citoplasma ou a citocinese, sem inibir a divisão nuclear. A citocalasina B é um inibidor da polimerização da proteína actina requerida para a formação do anel de microfilamentos que induz a contração do citoplasma e clivagem da célula em duas células filhas. Portanto, a identificação dessas células durante a análise se dá por sua aparência binucleada (Fenech et al., 1999; Fenech, 2000; Decordier e Kirsch-Volders, 2006).

Como o citoplasma não sofre divisão, o MN encontrado na célula, é decorrente de um processo clastogênico (quebras cromossômicas ou cromatídicas que resultam em fragmentos de cromossomos acêntricos) ou aneugênico (alterações no fuso que impedem ou ativam a migração das cromátides na anáfase da divisão celular) - (Garcia-Sagredo, 2008).

O teste CBMN evoluiu para um método mais abrangente capaz de avaliar quebras cromossômicas, falha no reparo do DNA, perda cromossômica, não disjunção, necrose e apoptose. Este método também é utilizado para avaliar Pontes nucleoplasmáticas, um biomarcador de cromossomos dicêntricos que resultam de fusões terminais dos telômeros ou

de falhas no reparo do DNA, e avaliar Brotos nucleares, um biomarcador de amplificação gênica (Fenech, 2007). Por ser um método considerado como “cytome”, a sua utilização fornece a possibilidade de avaliar, de maneira mais precisa, cada célula estudada, ou seja, cada célula é citologicamente avaliada paraviabilidade (necrose, apoptose), estado mitótico (mononucleada, binucleada, multinucleada) e para dano cromossômico ou instabilidade (presença de MN, PNP, Broto nuclear) - (Mateuca et al., 2006; Fenech et al., 2011a).

A técnica de FISH (*Fluorescent In Situ Hybridization*) permite a detecção de sequências específicas de ácidos nucleicos nos cromossomos. A técnica consiste em hibridizar uma sonda de DNA à sua sequência complementar em amostras cromossômicas. As sondas podem ser marcadas diretamente através da incorporação de nucleotídeos fluorescentes ou indiretamente através da incorporação de moléculas que são detectadas por anticorpos fluorescentes (Guerra, 2004). Essa técnica permite identificar aneuploidias em células interfásicas, sem necessidade de cultura celular. Também por meio desta técnica é possível identificar células com translocações cromossômicas indicativas de danos cumulativos ao DNA em células interfásicas e em cromossomos metafásicos, além da identificação de alterações cromossômicas numéricas e estruturais (Garcia-Sagredo, 2008).

A utilização da técnica de FISH, com sondas centroméricas, em cromossomos específicos também permite uma avaliação da frequência de não-disjunção, para detecção de danos cromossômicos induzidos *in vivo* ou *in vitro* por agentes químicos e físicos (Hovhannisyan, 2010; Decordier et al., 2011). Outra forma de avaliação consiste na combinação do teste do MN com a técnica de FISH, o que possibilita distinguir os micronúcleos que contenham o cromossomo inteiro (induzidos por agentes aneugênicos) daqueles que possuem fragmentos acêntricos (dano clastogênico), resultantes de perda ou quebra cromossômica (Norppa e Falck, 2003; Hovhannisyan, 2010).

O teste do cometa, também conhecido como SCG ou SCGE (*single cell gel electrophoresis assay*) é outro teste de mutagenicidade utilizado, que permite mensurar danos no DNA em células eucarióticas isoladas (Speit e Hartmann, 2006). Em condições alcalinas ($\text{pH} > 13$) o ensaio pode detectar quebras em fita simples e duplas, sítios de reparo incompleto e também identificar *crosslinks* DNA-proteínas e DNA-DNA e apoptose (Burlinson et al., 2007).

1.1.3 Biomarcadores de suscetibilidade

A predisposição genética, ao lado da influência de fatores externos como idade, dieta, estilo de vida, hábitos de fumo e bebida, pode contribuir na suscetibilidade de indivíduos em desenvolver diferentes doenças, inclusive câncer, quando expostos a agentes potencialmente mutagênicos.

Após a exposição, diferentes vias metabólicas são ativadas com intuito de eliminar os metabólitos gerados, bem como minimizar os possíveis efeitos adversos (Christiani et al., 2008).

Desta forma, a suscetibilidade individual ao câncer parece depender, em parte, da capacidade, determinada geneticamente, de metabolizar e eliminar essas substâncias do organismo de forma eficiente (Wünsch Filho e Gattás, 2001). Existe uma variabilidade individual em decorrência de polimorfismos em genes responsáveis pela produção de enzimas de fase I e fase II de metabolização, ou seja, enzimas que catalisam reações de oxidação e conjugação, respectivamente (Johansson e Ingelman-Sundberg, 2011). Muitos compostos são convertidos em metabólitos altamente reativos através das enzimas oxidativas de fase I, que são principalmente enzimas da superfamília do citocromo P450 (*CYP*). Essas enzimas catalisam uma variedade de reações oxidativas e algumas reações de redução (e Ingelman-Sundberg, 2001). Como resultado, por meio da adição de uma ou mais hidroxilas no substrato, um pró carcinógeno pode se tornar um carcinógeno (Hiyama et al., 2008). Dentre elas destacam-se as *CYP1A1* e *CYP2E1*.

As reações de fase II envolvem a conjugação com substratos endógenos (glutathiona, sulfato, acetato, glicose) mediados pela glutathiona S-transferase (*GSTs*), UDP-glucoronosiltransferase e N-acetiltransferase (*NATs*). Na fase II as enzimas inativadoras dos produtos de fase I, catalisam a conversão de reativos eletrofílicos em conjugados solúveis em água que podem ser facilmente removidos da circulação sanguínea (Androtsopoulos et al., 2009).

Polimorfismos nos genes que codificam para essas enzimas podem alterar sua expressão ou função, mudando assim a ativação ou detoxificação dos compostos carcinogênicos e o risco de desenvolvimento de câncer após exposição à carcinógenos (Harth et al., 2008; Cury et al., 2012; Waters et al., 2010).

As enzimas da superfamília do citocromo P450 (*CYP450*) são responsáveis pela ativação metabólica de diferentes substratos, inclusive os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos. Os polimorfismos genéticos identificados em diferentes *CYPs* podem estar associados com a atividade das enzimas (Norppa, 2004; Chetty e Murray, 2007).

Por outro lado, polimorfismos nos genes de fase II de metabolização parecem estar associados com uma função reduzida da enzima, diminuindo assim a velocidade de excreção dos metabólitos gerados (Roodi et al., 2004). O desequilíbrio na produção e/ou eliminação de metabólitos, pode propiciar a ligação de compostos com afinidade pelo DNA gerando adutos de DNA (Lang e Pelkonen, 1999). Exemplo destas enzimas são as *GSTs*.

NQO1: NAD(P)H quinona oxidoreductase 1 (*NQO1*) é uma enzima de segunda linha de defesa contra agentes químicos, que detoxifica hidrocarbonetos policíclicos aromáticos e reduz o estresse oxidativo nas células tronco hematopoiéticas. O gene está localizado no braço longo do cromossomo 16 (16q22.1) - (Yamaguti et al., 2010).

O polimorfismo na posição 609 no éxon seis (C/T) do gene *NQO1* resulta na substituição de prolina por serina na posição 187, podendo acarretar perda de atividade enzimática, e com isso ser um fator de risco na

etiologia de tipos específicos de doenças malignas hematopoiéticas (Siegel et al., 1999; Lozic et al., 2011). Entre os europeus e os norte-americanos brancos, a frequência do alelo selvagem é de 0,79 e 0,21 para o alelo mutado respectivamente (Traver et al., 1997; Larson et al., 1999). A frequência do alelo mutado em africanos é ligeiramente mais alta do que a encontrada na população de raça branca e consideravelmente alta entre hispânicos e os asiáticos (Rothman et al., 1997; Kelsey et al., 1997). A atividade da enzima *NQO1* é considerada normal nos indivíduos que possuem o alelo selvagem, já os indivíduos heterozigotos para o polimorfismo apresentam atividade enzimática reduzida (Ross et al., 1996). Tanto a atividade quanto a proteína *NQO1* estão ausentes nos indivíduos homozigotos para a mutação (Traver et al., 1997; Larson et al., 2011).

MPO: Mieloperoxidase (MPO) é uma enzima sintetizada no estágio de promielócitos do desenvolvimento do neutrófilo, durante a diferenciação mielóide (Winterbourn et al., 2000). O polimorfismo desta enzima com a substituição de uma única base (G para A), na posição 463, na repetição Alu localizada na região promotora do gene *MPO*, está associado à mutação somática em células de portadores de leucemia mielóide aguda (Austin et al. 1995; Piedrafita et al., 1996).

Indivíduos polimórficos apresentam redução na expressão do gene e também na sua atividade de transcrição da proteína MPO (Piedrafita et al., 1996). Os indivíduos homozigotos para o alelo G correspondem a 80% dos casos de leucemia promielocítica aguda, comparados a 61% na população, sugerindo que a transcrição do alelo comum de MPO (alelo G) está associada ao alto risco de leucemia promielocítica aguda, um subtipo de leucemia mielóide aguda (Reynolds et al., 1997).

O polimorfismo no gene *MPO* também pode atuar como um cofator na suscetibilidade para a leucemia etiológicamente associada à exposição ao benzeno, pelas alterações que este polimorfismo acarreta na atividade da enzima, afetando assim o metabolismo do benzeno no organismo, com a formação de adutos no DNA (Zhang et al., 2007).

1.2 Benzeno

O benzeno, cuja fórmula molecular é C_6H_6 , é um hidrocarboneto policíclico aromático (HPA) que, nas condições normais de temperatura e pressão, se apresenta sob a forma líquida e incolor, com aroma característico (Atkins, 2003). É um composto orgânico volátil (COV) do petróleo, altamente inflamável, não polar e hidrossolúvel, utilizado como solvente em laboratórios químicos (analíticos e de sínteses), como matéria prima nas indústrias químicas e encontrado nos parques petroquímicos, de refino de petróleo, nas companhias siderúrgicas, na gasolina e na fumaça do cigarro (Costa e Costa, 2002).

O benzeno pode ser encontrado no ar, água e solo e pelo seu alto poder de volatilização (95,2 mmHg a 25°C) em função da sua pressão de vapor e o seu ponto de fusão relativamente baixo (80,1 °C), é considerado um contaminante atmosférico. O benzeno é um componente natural do petróleo (menos de 1% em peso) sendo encontrado, nas proximidades de depósitos naturais de petróleo e gás natural, na concentração aproximada de 0,8 µg/L (IPCS, 1993; Freitas, 1997).

A toxicidade do benzeno independe da via de introdução, sendo as principais vias de absorção a respiratória e a cutânea. Parte do benzeno inalado, aproximadamente trinta por cento, é expirado e o restante se distribui pelo organismo (Pesquero, 2001; Machado, 2003).

Cinquenta por cento do benzeno absorvido é biotransformado predominantemente no fígado, com formação de derivados mais hidrossolúveis para facilitar sua excreção pelos rins. O processo de biotransformação também ocorre na medula óssea, podendo acarretar leucopenia, anemia, trombocitopenia e leucemia (Pesquero, 2001; Machado, 2003). A toxicidade medular do benzeno deve-se à capacidade de ligação de um ou mais de seus metabólitos, formados a partir da biotransformação, com macromoléculas como o DNA e proteínas (Barbosa, 1997).

Os mecanismos de ação tóxica do benzeno não estão totalmente esclarecidos, mas há indícios de que esses efeitos estejam relacionados ao

seu metabolismo, por meio do citocromo P4502E1 (*CYP2E1*), que leva a formação de um reativo intermediário, o benzeno óxido, que existe em equilíbrio com o seu tautômero “*oxepin*”. O metabolismo do “*oxepin*” é realizado com intuito de abrir o anel aromático, resultando em muconaldeídos e ácido E, denominado ácido E-mucônico (Atkinson, 2009).

O benzeno óxido poderá, dependendo da via ativada, originar o fenol. Parecem existir três vias diferentes de eliminação do benzeno pelo organismo, conforme representado na Figura 2, sendo a via predominante a que leva à formação do fenol por um rearranjo não enzimático. O fenol pode ser excretado na urina como derivado de sulfato ou glucoronato (80 a 90% da dose absorvida) ou pode ser oxidado, via *CYP2E1* para 1,4- e 1,2 – benzodiol. Estes metabólitos são ainda bioativados pela conversão a benzoquinona, o último metabólito tóxico, via *MPO* na medula óssea, que pode ser detoxificado por meio da enzima *NQO1* a metabólitos hidroxilados menos tóxicos (Kim et al., 2008; Atkinson, 2009; Smith, 2010).

A segunda via leva o benzeno a 1,2-diidrodiol via epóxido hidrolase, que poderá ser oxidado para ácido trans-trans-mucônico (AttM-U), e assim excretado na urina (3-18% da dose absorvida).

A terceira e menor via leva ao ácido pré-fenilmercaptúrico, após conjugação, pela glutathione S transferase, ao ácido S-fenilmercaptúrico (S-PMA), que é excretado na urina (< 1% da dose absorvida). O benzeno não metabolizado também poderá ser excretado na urina (U-benzeno) após difusão passiva nos glomérulos renais, conforme apresentado na Figura 2 (Atkinson, 2009; Smith, 2010).

Figura 2: Representação esquemática do metabolismo do benzeno demonstrando as principais vias e metabolização das enzimas levando a toxicidade. *CYP2E1*, citocromo P450 2E1; *GST*, glutationa S-transferase; *NQO1*, NAD(P)H quinona óxido redutase 1; *MPO*, mieloperoxidase; *UDPGT*, uridina difosfato glucoronil transferase; *PST*, fenol sulfotransferase, *mEH*, microsomal epóxido hidrolase (Modificado de Smith, 2010).

1.2.1 Exposição ambiental e ocupacional ao benzeno

A exposição ocupacional ao benzeno é caracterizada em ambientes industriais que o utilizam em seus processos produtivos, como por exemplo, o uso em detergentes, explosivos, inseticidas, produção de cola, borracha, couro, adesivos, siderurgia e metalurgia (INCA, 2006). Na indústria do petróleo, ele é utilizado em forma pura nos laboratórios, para análise, e está presente como contaminante em diversos derivados, como gasolina, hexano, querosene, tolueno, entre outros (Costa, 2009).

É interessante ressaltar que apenas uma pequena parcela da população está exposta ao benzeno no ambiente ocupacional, embora a população como um todo esteja diariamente exposta ao benzeno disperso na atmosfera. As principais fontes ambientais de benzeno incluem a

exaustão de veículos automotivos, as emissões industriais e as operações de abastecimento de veículos, sendo que os gases da exaustão de automóveis contribuem em cerca de 80 a 85% das emissões para a atmosfera (Smith, 2010). A exposição também ocorre por meio da fumaça do cigarro, da inalação de ar contaminado em áreas de intenso tráfego de veículos e ao redor de postos de combustíveis (Abrantes, 2009).

Em 2001, segundo a Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental (CETESB), os níveis de benzeno na atmosfera no Estado de São Paulo eram de $0,2\mu\text{g}/\text{m}^3$ em áreas rurais e $349\mu\text{g}/\text{m}^3$ em centros industriais (CETESB, 2001). Um estudo revelou que a concentração de benzopireno na cidade de São Paulo era em média 1,09 nanograma por metro cúbico de ar o que na época correspondia a quatro vezes o nível de referência do Reino Unido, que era de 0,25 nanograma por metro cúbico (Abrantes, 2009).

No Brasil, as principais fontes de produção do benzeno encontram-se concentradas nos parques de produção petroquímica e de refino de petróleo: Camaçari–BA, Capuava e Cubatão–SP e Triunfo–RS, responsáveis por aproximadamente 95% da produção nacional. O benzeno produzido no Brasil é utilizado como matéria-prima para a síntese de produtos petroquímicos básicos como o etilbenzeno, alquilbenzeno linear, anidro maleico, caprolactama, ciclohexano, clorobenzeno e cumeno. Estes produtos tornam-se intermediários (91,7%) de novas sínteses químicas que servirão para a produção de plásticos, resinas, tintas, pesticidas e muitas outras substâncias industrializadas, sendo que 8,3% são destinadas a produção de sabões e detergentes. O restante da produção nacional (5%) provem da destilação fracionada de óleos leves do alcatrão, mais conhecido como BTX siderúrgico, que é obtido a partir do carvão mineral, por meio dos processos de destilação nas principais companhias siderúrgicas nacionais: Companhia Siderúrgica Paulista (COSIPA), Companhia Siderúrgica Nacional (CSN), AÇOMINAS e USIMINAS (Barbosa, 1997).

Em relação à exposição dos trabalhadores ao benzeno, a legislação brasileira reconhece, desde 1932, qualitativamente a existência de riscos gerados pela utilização do benzeno em algumas atividades industriais, que

naquela época correspondiam à destilação do carvão mineral, utilização de solventes e produtos voláteis e inflamáveis. Neste período houve uma proibição da exposição de mulheres a estas atividades ocupacionais, sendo que apenas em 1943 foi proibido o trabalho de menores de idade com o benzeno e seus homólogos (INCA, 2006; Costa, 2009).

A indústria brasileira, em 1993, segundo dados oficiais da Fundação Jorge Duprat Figueiredo de Segurança e Medicina do Trabalho (FUNDACENTRO), do Ministério do Trabalho, empregava cerca de 116 mil trabalhadores na produção e consumo do benzeno, dos quais, aproximadamente, 38 mil encontravam-se potencialmente expostos a essa substância. Esse fato contribuiu para a regulamentação da Portaria nº. 14, de 20 de dezembro de 1995, da Secretaria de Segurança e Saúde no Trabalho (SSST), do Ministério do Trabalho, com a inclusão do Anexo 13-A e das Instruções Normativas nº 001 (Avaliação das Concentrações do Benzeno em Ambientes de Trabalho) e nº 002 (Vigilância da Saúde do Trabalhador na Prevenção da Exposição Ocupacional ao Benzeno) conforme mencionado por Barbosa (1997). A Portaria nº 14 regulamenta as ações, atribuições e procedimentos relativos à prevenção da exposição dos trabalhadores ao benzeno, e amplia a participação dos trabalhadores neste processo, por meio de compromisso firmado com empregadores no denominado Acordo do Benzeno (Fundacentro, 1995). Esse acordo representou um importante avanço em relação às condições de segurança e saúde dos trabalhadores uma vez que regulamentou procedimentos em todas as empresas e indústrias que produzem, transportam, armazenam, utilizam ou manipulam o benzeno ou suas misturas líquidas, contendo 1% ou mais em volume (Barbosa, 1997).

A partir de 1997 a utilização do benzeno foi proibida, exceto nas indústrias ou laboratórios que produzem, e/ou utilizam o benzeno em processos de síntese química, em combustíveis derivados de petróleo ou em trabalhos de análise ou investigação em laboratórios, quando não for possível a sua substituição. O emprego do benzeno como azeótropo, ou

seja, da obtenção de álcool anidro, passou a ser totalmente proibido no Brasil a partir de maio de 2000 (Anexo 13-A - Barbosa, 1997).

Em 1946, a *American Conference of Governmental Industrial Hygienists* (ACGIH) passou a recomendar um limite de exposição ocupacional ao benzeno de 100 ppm (partes por milhão), limite este que foi progressivamente reduzido para 50 ppm, e 35 ppm nos anos seguintes. Em 1957 este valor foi novamente reduzido para 25 ppm, em 1977 para 10 ppm e somente em 1991 passou para 5 ppm. Desde 1997 a ACGIH recomenda para a exposição ocupacional ao benzeno o valor limite de 0,5 ppm, enquanto que em Portugal e no Brasil o valor considerado como limite é de 1 ppm (ACGIH, 2005; Roma-Torres et al., 2006).

Trabalhos realizados na Comunidade Européia para avaliar a exposição de trabalhadores ao benzeno na indústria do petróleo, em períodos de 1977-1992, indicaram que aproximadamente 90% dos trabalhadores estariam expostos a concentrações inferiores a 1 ppm de benzeno nas áreas de refino, distribuição e comércio do petróleo (CONCAWE, 1994). No período que compreende os anos de 2003 a 2006, pesquisadores dos EUA avaliaram as concentrações de benzeno no ar em seis diferentes cidades do estado da Flórida (EUA). A concentração média de benzeno no ar para cada cidade variou de 0.18 a 3.58 ppb (partículas por bilhão). Baseados em evidências epidemiológicas os pesquisadores concluíram que a concentração de benzeno no ar, nestas cidades, extrapolava os limites aceitáveis para o risco de se desenvolver o câncer (Johnson et al., 2009).

1.3 Agravos à saúde pela exposição ao benzeno

O benzeno em altas concentrações é uma substância bastante irritante para as mucosas, e quando aspirado pode provocar edema pulmonar e hemorragia em áreas de contato. Os vapores são, também, irritantes para as mucosas ocular e respiratória (ATSDR, 1997). Uma dose oral de 50 a 500 mg/kg provavelmente seria letal ao ser humano sendo que

a inalação de aproximadamente 20.000 ppm (2% no ar) é fatal entre 5 a 10 minutos (Ahmad, 2007).

Quanto aos efeitos de exposição crônica, são documentados principalmente alterações na medula óssea, no sangue periférico, e nos sistemas imunológico e nervoso central. Os principais sintomas, de acordo com a quantidade absorvida, incluem períodos de sonolência e excitação, vertigem, cefaleia, náuseas, taquicardia, dificuldade respiratória, tremores, convulsões, perda de consciência e morte (Fundacentro, 1995; Infante, 2006).

Os sinais clínicos e sintomas mais frequentes (em aproximadamente 60% dos casos) de intoxicação por benzeno e seus derivados são: astenia, mialgia, sonolência, tontura, além de infecções repetidas (ATSDR, 1997).

Os efeitos do benzeno sobre os parâmetros sanguíneos têm sido amplamente estudados, estando bem documentados em eritrócitos, leucócitos e plaquetas (Aksoy et al., 1971; Khuder, 1999; Wiwanitkit et al., 2004). Os achados hematológicos mais relevantes são: neutropenia, leucopenia, eosinofilia, linfocitopenia, monocitopenia, macrocitose, pontilhado basófilo (estrutura anormal no citoplasma das hemácias), pseudo Pelger (neutrófilos hiposegmentados) e plaquetopenia. Quando essas alterações hematológicas são detectadas precocemente os efeitos parecem ser reversíveis. As exposições a altas doses por longos períodos podem levar à pancitopenia, resultante da aplasia da medula óssea, sendo considerado um estágio irreversível da doença (Khuder, 1999).

O diagnóstico de intoxicação por benzeno, de natureza ocupacional, é eminentemente clínico e epidemiológico, fundamentado na história de exposição ocupacional e na observação de sinais e sintomas clínicos e laboratoriais (Costa, 2009). As alterações sanguíneas observadas no diagnóstico podem ser isoladas ou associadas. Sendo mais frequente os achados de hipoplasia, displasia e aplasia da medula, sendo que o aparecimento de macrocitose, pontilhado basófilo, hiposegmentação dos neutrófilos, eosinofilia, linfocitopenia e macro plaquetas são alterações precocemente identificadas (Ministério da Saúde, 2006).

Na avaliação da exposição ao benzeno, os resultados dos exames hematológicos realizados no exame pré-admissional do trabalhador são comparados aos sequenciais (são realizados pelo menos 3 hemogramas com intervalos de 15 dias entre os mesmos). Quando ocorre queda em 20% do número de células avaliadas no leucograma, o exame indica suspeita de intoxicação pelo benzeno. Nesse caso são realizados outros exames clínico-laboratoriais, na busca de exclusão de enfermidades concomitantes, além da exposição ao benzeno, que possam acarretar tais alterações. Se isso não ocorrer fica estabelecido o diagnóstico de intoxicação por benzeno (Ministério da Saúde, 2006).

1.3.1 Benzeno e câncer

A carcinogênese é um processo multigenético e de multiestágios que envolve deleções e mutações gênicas, rearranjos cromossômicos e comprometimento da sinalização celular, resultando em transformação neoplásica de linhagens celulares normais (Atkinson, 2009).

A exposição ocupacional ao benzeno foi primeiramente associada à leucemia em 1928 (Costa, 2009). Cerca de 10 anos depois (1939) foi relatada na Inglaterra a morte de 10 trabalhadores expostos cronicamente ao benzeno (Aksoy et al., 1971).

Por volta de 1970, foram realizadas as primeiras tentativas de se quantificar o risco de leucemia pela exposição ao benzeno (Vigliani e Saita, 1964, Aksoy et al., 1974). Desde 1982, o benzeno é classificado como carcinogênico para humanos pela Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (IARC), sendo a associação com leucemia mais frequente em expostos no processo industrial (Freitas, 2000).

Os estudos epidemiológicos posteriores revelaram que trabalhadores expostos ao benzeno, em concentrações acima de 200 ppm ao ano, apresentavam risco adicional para o desenvolvimento de leucemia mieloide aguda (LMA), 20 vezes maior do que o esperado na população em geral (Wong, 1995).

Ainda não está claro o papel dos diferentes metabólitos do benzeno na carcinogênese, mas a formação da benzoquinona a partir da hidroquinona via mieloperoxidase na medula óssea parece ser a chave do processo (Iskander e Jaiswal, 2005; Fustioni et al., 2005; Smith, 2010).

O benzeno pode atuar causando danos cromossômicos (aneuploidias, deleções e translocações) por meio da inibição da topoisomerase II; pode romper os microtúbulos; gerar radicais de oxigênio que levam a mutações pontuais; quebrar as fitas de DNA; reduzir o tamanho das células tronco pela hematotoxicidade; e ainda pode alterar a metilação do DNA e possivelmente microRNAs específicos. Estes vários mecanismos de ação sugerem que o efeito do benzeno sobre o processo leucemogênico não é singular e pode ocorrer do começo ao fim do processo (Gowans et al., 2005; Rivedal e Witz, 2005; Ren et al., 2009; Smith, 2010).

Décadas de pesquisas sugerem que a exposição ao benzeno induz ao câncer hematopoiético, porém estudos sobre o papel da exposição ao benzeno no desenvolvimento de malignidades hematológicas têm causado um grande debate, particularmente para as leucemias mielóides, leucemias linfocíticas, linfoma Não-Hodgkin's e mieloma múltiplo (Pyatt, 2004; Atkinson, 2009; Smith, 2010).

A leucemia mielóide aguda e as síndromes mielodisplásicas (SMD) são doenças relacionadas à medula óssea que surgem *de novo*, na população em geral, ou aparecem após terapia com agentes alquilantes, inibidores da topoisomerase II, ou radiação ionizante (Pedersen-Bjergaard et al., 2008).

A exposição ocupacional ao benzeno parece estar associada à leucemias que são similares: terapia relacionada à LMA (t-LMA) e a SMD (t-SMD). Tanto a LMA quanto a SMD surgem a partir de células progenitoras ou de células tronco CD34+ geneticamente alteradas na medula óssea que são caracterizadas por diferentes tipos de aberrações cromossômicas associadas com as leucemias geradas (Pedersen-Bjergaard et al., 2006; Mrozek e Bloomfield, 2008).

A análise citogenética do número e da estrutura dos cromossomos é uma ferramenta importante no diagnóstico e no tratamento dessas doenças. Nestas análises são comumente observadas aberrações não equilibradas, que se apresentam com um cariótipo complexo e algumas mutações pontuais nos genes p53 ou LMA1 (Smith, 2010).

As alterações citogenéticas frequentemente associadas à exposição ao benzeno são as aneuploidias, ou seja, ganho ou perda de cromossomos específicos envolvidos na LMA e na SMD (trissomia do cromossomo 8, monossomia dos cromossomos 5 e 7), translocações cromossômicas, inversões e deleções [ex: t(8;21) e t(15;17) ou inversões [inv(16)] (Smith e Zhang, 1998a,b; Zhang et al., 2011b).

A leucemia promielocítica aguda (LPA ou LMA-M3), um subtipo de leucemia mielóide aguda, é caracterizada por um acúmulo de promielócitos anormais na medula óssea e/ou no sangue periférico, núcleo excêntrico, abundantes granulações no citoplasma e frequentemente esta associada a alterações cromossômicas estruturais (Sagrillo et al., 2007; Wang et al., 2008).

Translocações cromossômicas envolvendo o locus *RARα* também se associam a LPA: translocação recíproca e balanceada entre os cromossomos 15 e 17 [t(15; 17) (q22; q21)] com formação de genes quiméricos: *PML-RARα* formado no derivativo do cromossomo 15 [der(15)], enquanto a fusão recíproca *RARα-PML* esta localizada no derivativo do cromossomo 17 [der(17)], ambos envolvidos na hematopoese normal. A translocação é encontrada em 98% das leucemias promielocíticas agudas (LMA-M3) e 9% de todas as LMA. A proteína de fusão gerada, *PML-RARα* é um fator de transcrição quimérico que atua como uma forma dominante negativa de *RARα* (Sagrillo et al., 2007; Wang et al., 2008; Leal, 2008). A oncoproteína atua interrompendo o processo de diferenciação das células mielóides, bloqueando a maturação mielóide no estágio de promielócitos (Leal et al., 2009). O ponto de quebra do gene *PML* pode variar ocorrendo em três regiões cromossômicas diferentes: íntron 6 (*bcr1 – breakepoint cluster region 1* ou *long form*), éxon 6 (*bcr2* ou *variable form*) e íntron 3 (*bcr3*

ou *short form*) levando a formação de três subtipos de transcritos do gene híbrido *PML-RAR α* . No gene *RAR α* , o ponto de quebra ocorre no íntron 2 (Ruiz-Arguelles, 2004).

Em cerca de 2% dos casos, o gene *RAR α* está fusionado a outro gene que não o *PML*, levando à formação de proteínas de fusão conhecidas com X-*RAR α* , sendo que alguns dos genes relacionados a essa fusão já foram descritos: *PLZF* (*promyelocytic leukemia zinc finger*), *NPM* (*nucleophosmin*) e *NuMA* (*nuclear mitotic apparatus*) como resultado de translocações alternativas: t(11;17)(q23;q21), t(5;17)(q35;q21) e t(11;17)(q13;q21), respectivamente. Além desses genes o *STAT5b*, localizado no cromossomo 17q21, também foi identificado em casos de LPA com [der(17)] (Sagrillo et al., 2007; Leal et al., 2009).

Também são relatados casos com cariótipo normal, mas com frequentes mutações em *NPM1* (*nucleophosmin 1*), duplicações em tandem de *FLT3* (*FMS-like tyrosine kinase 3*), e/ou mutações pontuais ou metilação alterada de *C/EBP α* (*enhancer binding protein α*) (Pedersen-Bjergaard et al., 2006; Pedersen-Bjergaard et al., 2008).

Sendo assim, o mecanismo por meio do qual o benzeno induz a leucemia provavelmente começa como um evento mutagênico nas células progenitoras ou nas células-tronco, com subsequente instabilidade genômica, favorecendo o estabelecimento de mutações em um curto período de tempo (Goldstein, 2010).

1.4 Biomarcadores na avaliação de trabalhadores expostos ao benzeno

A avaliação de risco gerada pela exposição ao benzeno tem focado principalmente na concentração ambiental, e não na variação interindividual na suscetibilidade aos efeitos adversos induzidos pelo benzeno (Qu et al., 2005).

Os biomarcadores utilizados para estimar o risco e a exposição pelo benzeno incluem dosagem de benzeno no ar, sangue e urina; e de seus metabólitos urinários: fenol, catecol, ácido trans-trans mucônico e ácido S-fenilmercaptúrico, além de adutos de proteínas no sangue (Weisel, 2010).

O efeito genotóxico da exposição ao benzeno pode ser medido pela presença de adutos de DNA no sangue de indivíduos expostos. A detecção desses adutos tornam-se maiores em decorrência do tempo de exposição ocupacional ao benzeno, e também, por relatos de associação com a presença de micronúcleos em linfócitos binucleados de sangue periférico (Kim et al., 2008).

Em um estudo conduzido na Itália por Fracasso e colaboradores (2010) a exposição ao benzeno foi avaliada em 33 operadores da indústria petroquímica, 28 atendentes de postos de gasolina e 21 trabalhadores de manutenção de bombas de gasolina comparados a 51 controles, por meio de biomarcadores de exposição, que incluíram a dosagem do t,t-mucônico e do S- fenilmercapturico em amostras de urina. A excreção urinária do ácido t,t-mucônico e do S-fenilmercapturico foi significativamente maior no grupo de trabalhadores do que nos controles.

A presença do benzeno no ambiente ocupacional parece alterar a frequência de aberrações cromossômicas numéricas e/ou estruturais tanto em linfócitos do sangue periférico quanto em células da medula óssea (Holecková et al., 2004; Atkinson, 2009; Smith, 2010). Snyder et al. (1993) propuseram que o benzeno e seus metabólitos não atuam como mutagênicos, mas são altamente clastogênicos produzindo aberrações cromossômicas, trocas de cromátides irmãs e micronúcleos em linfócitos do sangue periférico. Um estudo avaliando 108 trabalhadores de uma refinaria de petróleo em Seul (Coréia) revelou que a frequência de AC e de MN foi significativamente maior quando comparados ao grupo de trabalhadores não expostos (Kim et al., 2008). Resultados semelhantes foram observados na Itália com 500 trabalhadores empregados em duas refinarias de petróleo, onde houve aumento significativo na frequência de MN em relação ao grupo controle (Basso et al., 2011). Outros autores verificaram aumento na frequência de quebras cromossômicas afetando ambos os cromossomos 1 e 9, na cultura de linfócitos de 12 atendentes de postos de gasolina expostos a compostos derivados do petróleo (com baixos níveis de benzeno) - (Marcon et. al., 2002). Em outro estudo, foi observado aumento na

frequência de cromossomos dicêntricos ($p < 0.05$) em 36 mulheres funcionárias de uma indústria de sapato expostas ao benzeno, comparadas ao grupo controle (Kasuba et al., 2000).

A utilização da técnica de FISH tem revelado que a exposição industrial ao benzeno pode induzir aneuploidias de cromossomos específicos (7,8,9) em células de indivíduos expostos (Hrelia et al., 2004). Esse efeito foi observado também em trabalhadores de uma refinaria de petróleo expostos a baixas concentrações de benzeno (0.5 ppm) com aumento na frequência de aneuploidias dos cromossomos 7 e 9 (Kim et al., 2010).

A exposição *in vitro* a concentrações de 50 e 100 $\mu\text{mol/l}$ de benzeno em linfócitos de sangue periférico de duas mulheres, não modificou de forma significativa a frequência de MN ($p > 0.05$), porém a monossomia e a tetraploidia do cromossomo 1 foram observadas, em ambas as concentrações, nas duas doadoras (Holecková et al., 2008).

A associação de polimorfismos em genes de metabolização de xenobióticos e o risco de câncer em expostos ao benzeno também tem sido avaliada na literatura. Um estudo realizado na China com 156 pacientes intoxicados por benzeno e 152 trabalhadores ocupacionalmente expostos ao benzeno indicou que indivíduos com polimorfismos nos genes *CYP2E1* (1293 C/C e 1293 G/C) e *NQO1* (609 T/T) além da ausência do gene *GSTM1* (*GSTM1-nulo*) tendem a ser mais suscetíveis à toxicidade do benzeno (Wan et al., 2002). Por outro lado, Garte (2008) não encontrou associações entre os polimorfismos em *GSTM1* e *MPO* e o número de células com aberrações cromossômicas estruturais quando avaliou 208 trabalhadores de uma petroquímica na Bulgária. Em um artigo de revisão, Dougherty et al. (2008) avaliaram a contribuição das enzimas de metabolização de xenobióticos para os danos decorrentes da exposição ao benzeno. Esse estudo demonstrou que os polimorfismos produzem um efeito modesto quando associados na análise aos biomarcadores de exposição, embora a ausência dos genes *GSTM1* e *GSTT1* tenham revelado associações consistentes. Sun et al. em 2009 estudaram polimorfismos em

p53 e *p21* numa população de 307 pacientes intoxicados por benzeno e 299 trabalhadores ocupacionalmente expostos ao benzeno no sul da China. Os resultados obtidos neste estudo revelaram que variações genéticas em *p21* podem estar associadas com a intoxicação crônica pelo benzeno na população chinesa.

O monitoramento ambiental e ocupacional de trabalhadores expostos, assim como a utilização de biomarcadores para estudar a exposição ao benzeno e o seu potencial tóxico podem ajudar a identificar grupos de risco com possibilidade de medidas de prevenção e controle. Aparentemente existem poucos dados de avaliação de mutagenicidade em trabalhadores expostos ao benzeno no Brasil que possam contribuir na busca de biomarcadores informativos na avaliação de trabalhadores expostos.

2. OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

1. Analisar os possíveis efeitos genotóxicos em linfócitos do sangue periférico de trabalhadores intoxicados pelo benzeno, por meio de testes citogenéticos, como o MN e FISH (biomarcadores de efeito).
2. Avaliar polimorfismos em genes de metabolização de xenobióticos da fase I (*CYP1A1*, *CYP2E1*) e da fase II (*GSTT1*, *GSTM1*), além de polimorfismos em genes de metabolização e de detoxificação de metabólitos do benzeno (*NQO1* e *MPO*) para comparação com os possíveis danos genotóxicos (biomarcadores de susceptibilidade).
3. Comparar os dados clínicos e ocupacionais com os biomarcadores identificados.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3. MATERIAL E MÉTODOS

A presente investigação teve como objetivo a avaliação de parâmetros hematológicos, citogenéticos e moleculares de pacientes com diagnóstico ou suspeita clínica de intoxicação por benzeno, atendidos no Serviço de Saúde Ocupacional do Departamento de Medicina Legal, Ética Médica e Medicina Social e do Trabalho do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (SSO-HC-FMUSP). Os pacientes foram previamente selecionados por meio da análise dos prontuários médicos, sendo todos provenientes dos sindicatos dos metalúrgicos e dos petroleiros, ambos da Baixada Santista.

Os testes citogenéticos e moleculares foram processados no Laboratório de Imuno-Hematologia e Hematologia Forense (LIM-40) do mesmo Departamento, e os exames hematológicos na Divisão de Laboratório Central HCFMUSP, sob supervisão do Prof. Dr. Sergio Paulo Bydlowski.

3.1 Casuística

3.1.1 Pacientes

A partir dos prontuários médicos de atendimento no SSO foram identificados 20 pacientes, todos do sexo masculino, que apresentavam diagnóstico clínico e/ou suspeita de intoxicação ao benzeno. Os trabalhadores foram convidados a participar da pesquisa no momento em que retornavam ao hospital para consultas médicas. Os pacientes eram informados sobre a pesquisa e aceitavam participar eram incluídos, após assinarem o termo de consentimento aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa do HC-FMUSP - Cappesq (Processo nº0536/09), Anexo A.

No mesmo dia era aplicado o questionário, adaptado de um estudo caso-controle conduzido na China (Rothman et. al., 1996), conforme apresentado no Anexo B. O questionário utilizado incluiu questões sobre a

condição socioeconômica (renda, grau de escolaridade) dos participantes, sexo, idade, além de hábitos individuais como o uso de medicamentos, exposição a radiações ionizantes e/ou quimioterapia, consumo de tabaco, drogas psicoativas, consumo de álcool, padrões de alimentação, entre outros. Uma parte deste questionário avaliou o histórico ocupacional (tempo de atividade em diferentes funções, tipo de exposição, uso de equipamentos de proteção individual (EPI)), além de associação com outras atividades profissionais que pudessem de alguma forma interferir no resultado dos testes utilizados.

Dados dos prontuários foram considerados para melhor identificação da exposição ocupacional e das condições clínicas dos pacientes selecionados para a pesquisa. Esses dados foram cedidos pelo médico responsável, colaborador na pesquisa.

Não foram elegíveis os indivíduos com histórico de câncer e idade superior a 62 ou inferior a 25 anos.

3.1.2 Controles

A seleção dos 20 indivíduos para o grupo controle foi primeiramente idealizada para ocorrer dentro do mesmo serviço, a partir de trabalhadores atendidos no SSO, por problemas de saúde, não decorrentes de exposição a produtos químicos. O SSO tem ambulatórios para avaliação auditiva em expostos a ruídos, ambulatórios que oferecem fisioterapia para casos de lesões articulares, entre outros. Entretanto, na aplicação dos questionários, verificamos que grande parte dos pacientes trabalhava em ambientes onde havia exposição ambiental a produtos químicos que poderiam interferir na avaliação proposta. Assim sendo, passamos a coletar as amostras controle no banco de sangue do mesmo complexo Hospitalar. A seleção dos controles também levou em conta os mesmos critérios propostos para os casos, incluindo homens, com idades entre 25 a 62 anos, sem histórico de câncer e que relataram desenvolver ocupações sem exposição crônica ao benzeno ou derivados.

Após esclarecimentos sobre o projeto os indivíduos que concordaram em participar da pesquisa também, primeiramente, assinaram o mesmo termo de consentimento. Os doadores de sangue responderam ao mesmo questionário formulado aos expostos, exceto as questões relativas ao benzeno.

3.2 Coleta de amostras biológicas

Foram coletados 10 ml de sangue por meio de punção venosa de cada um dos pacientes e dos controles, no Laboratório de Análises Clínicas do Hospital das Clínicas - FMUSP, ou diretamente da bolsa de coleta de sangue, no momento da doação.

As amostras de sangue foram divididas em dois frascos estéreis um deles contendo heparina (BD *Vacutainer Sodium Heparin* 143- USP units) para cultura de células e o outro EDTA (BD *Vacutainer K2 EDTA* 7.2 mg) para extração de DNA e realização dos hemogramas.

3.3 Avaliação clínico-ocupacional

A avaliação clínica e ocupacional destes trabalhadores foi realizada a partir da história ocupacional (antecedentes profissionais), levando-se em consideração as atividades laborais exercidas, as empresas, setores, funções, tarefas e o período em que foram exercidas. Foram consideradas as alterações na série histórica de hemogramas na caracterização do quadro como intoxicação ou suspeita de intoxicação pelo benzeno.

3.4 Testes hematológicos

As amostras de sangue foram coletadas em tubos contendo EDTA para que os hemogramas pudessem ser realizados. Essas amostras foram processadas por meio de método automatizado (Cell Dyn 3700 -

Abbot, North Chicago Illinois, USA) e a análise foi realizada no Hospital das Clínicas (HC-FMUSP).

3.5 Testes moleculares

A identificação de polimorfismos em genes das fases I e II de metabolização de xenobióticos foi realizada a partir das amostras de 5 ml de sangue periférico, coletadas em EDTA, dos pacientes e dos controles.

Após a lise dos glóbulos vermelhos com bicarbonato de amônia, o DNA foi extraído com solução salina saturada (*Salting out*), de acordo com o protocolo de Miller et al. (1998). Resumidamente, após a lise das hemácias (NH₄HCO₃ 1mM, NH₄Cl 114mM, água mili-Q), os tubos foram centrifugados e a eles foi adicionada uma solução de lise de leucócitos que inclui TEN (NaCl 4M; Tris-HCl 2M, EDTA 0,5M pH 8,0, água mili-Q), SDS 10% e proteinase K (100µg/ml de sangue). Os tubos foram mantidos então em banho-maria, 37°C *overnight*. A seguir, uma solução de NaCl saturado (6M) foi adicionada e os tubos foram centrifugados a 3000 rpm (15 minutos a 18°C). O sobrenadante foi transferido para outro tubo de 15 mL, adicionados 2 volumes de etanol gelado, para precipitação do DNA. O DNA foi desidratado em etanol absoluto e, após centrifugação e diluição em TE (Tris/EDTA 10: 0,1), as amostras foram quantificadas (Nanodrop 2000, Spectrophotometer – Thermo Scientific) e posteriormente estocadas a -80°C até a análise.

CYP1A1

A amplificação do éxon 7 do gene CYP1A1 na região de polimorfismo que inclui a mutação A/G (Ile462Val – rs: 1048943) reconhecida pela enzima MspI foi realizada de acordo com protocolo de Cartensen et al. (1993). Os *primers* utilizados para amplificação do fragmento de interesse por PCR-RFLP (*restriction fragment length polymorphism*) foram: 5' - TAG GAG TCT TGT CTC ATG CCT - 3' e 5' - CAG TGA AGA GGT GTA GCC GCT - 3'. O

ciclo de co-amplificação incluiu 94°C por 5 minutos seguidos por 30 ciclos de amplificação (denaturação a 94°C – 1 minuto; *annealing* a 57°C - 1 minuto e extensão da cadeia a 72°C por 1 minuto e 30 segundos, seguidos de 2 minutos a 72°C). O produto de PCR foi digerido com 5 unidades da enzima de restrição *MspI*, 37°C por 12 horas. O alelo selvagem gerou um fragmento de 340pb, enquanto que o alelo variante gerou fragmentos de 200 e 140pb. A identificação dos fragmentos polimórficos foi efetuada em gel de agarose a 2,0% corado com brometo de etídeo, visualizado em luz UV.

CYP2E1

O método descrito por Kato et al. (1992) foi utilizado na análise de PCR-RFLP do gene *CYP2E1* (*rs: 3813867*). A amplificação da região 5' de regulação de transcrição do *CYP2E1*, que possui um sítio de restrição para a enzima *PstI*, com a transição G→C (Hayashi et al., 1991), foi efetuada utilizando-se os seguintes primers : 5' - CCA GTC GAG TCT ACA TTG TCA - 3' e 5' - TTC ATT CTG TCT TCT AAC TGG - 3'. Após denaturação inicial a 95°C por 1 minuto, procedeu-se 25 ciclos de amplificação (denaturação a 95°C - 1 minuto; annealing a 55°C - 1 minuto e extensão da cadeia a 72°C por 1 minuto). O produto de PCR foi digerido com 10 unidades da enzima de restrição *PstI* por 12 horas a 37°C overnight. A presença do alelo variante foi identificada por fragmentos de 290 e 120pb e do alelo selvagem por 410pb.

GSTM1/GSTT1

Para avaliação da presença ou ausência dos genes *GSTM1/GSTT1* foi utilizada uma única reação de PCR (multiplex- PCR), conforme descrito por Abdel-Rahman et. al. (1996), e para amplificação dos fragmentos de interesse foram utilizados os seguintes primers para *GSTM1*: *GSTM1*-G1 (5'- GAA CTC GAA AAG CTA AAG C- 3') *GSTM1* -G2: (5'-GTT GGG CTC AAA TAT ACG GT -3') e para *GSTT1*: *GSTT1*-1 (5'- TTC CTT ACT GGT CCT

CAC ATC TC-3') e *GSTT1-2*: (5'- TCA CCG GAT CAT GGC CAG CA-3'). Como controle interno da reação foram utilizados primers específicos para amplificação do éxon 7 do gene *CYP1A1* (*CYP1A1-1*: 5' GAA CTG CCA CTT CAG CTG TCT-3' e *CYP1A1-2*: 5'- GAG CTG CAT TTG GAA GTG CTC-3'). O produto de PCR foi identificado em gel de agarose a 2% corado com brometo de etídeo e visualizado em luz UV. A presença do gene *GSTT1* foi identificada por um fragmento de 480pb e o gene *GSTM1* por um fragmento de 215pb. Um fragmento de 312pb, presente em todas as reações, corresponde ao gene *CYP1A1* que serviu como controle interno da reação.

NQO1

A transição de C/T na posição 609 do gene *NQO1* (rs: 1800566) foi identificada através do método de PCR-RFLP, como descrito por Larson et al. (1999). Os primers utilizados foram 5'-AAG CCC AGA CCA ACT TCT-3' e 5'-TCT CCT CAT CCT GTA CCT CT-3'. O ciclo de co-amplificação incluiu 94°C por 4 minutos seguidos por 30 ciclos de amplificação (denaturação a 94°C – 10 segundos; *annealing* a 57°C – 20 segundos e extensão da cadeia a 72°C por 10 minutos). O produto de PCR foi digerido com 5 unidades da enzima de restrição *HinfI*, 37°C por 2 horas. Os três genótipos foram definidos por três padrões de bandas distintos: um único fragmento de 195 pb para o genótipo C/C; fragmentos de 195- e 151-pb para o genótipo C/T; e 151 pb para o genótipo T/T. A identificação dos fragmentos polimórficos foi efetuada em gel de agarose a 2,0% corado com brometo de etídeo, visualizado em luz UV.

MPO

O sítio polimórfico na posição - 463 do gene *MPO* (rs: 2333227) foi amplificado utilizando os seguintes primers: 5'- CGG TAT AGG CAC ACA ATG GTG AG-3' e 5'- GCA ATG GTT CAA GCG ATT CTT C-3' de acordo

com o método descrito por London et al. (1997). As condições utilizadas para a PCR foram: 94°C – 3 minutos, seguido de 34 ciclos de amplificação a 95°C – 30 segundos, 61°C – 30 segundos e 72°C - 40 segundos, seguidos de extensão final a 72°C – 7 minutos. O produto amplificado consistiu em um fragmento de 350 pb. Uma alíquota de 5 µL foi digerida com 20 U de enzima de restrição *Acil* a 37°C por 5 minutos e separado no gel de agarose a 2% corado com brometo de etídeo e visualizado em luz UV. Um fragmento de 61pb, presente em todas as reações, corresponde ao sítio de restrição invariável de *ACil* e serviu como controle interno da digestão. Os genótipos foram definidos por três padrões distintos de bandas: A/A (fragmentos de 289 - e 61 – pb), A/G (fragmentos de 289-, 169-, 120-, e 61- pb), e G/G (fragmentos de 169-, 120-, e 61- pb).

3.6 Testes citogenéticos

3.6.1 Teste do micronúcleo com bloqueio da citocinese (CBMN)

O teste do CBMN em linfócitos binucleados foi realizado segundo a técnica de Fenech (2000), com pequenas adaptações. A partir da amostra de sangue heparinizada uma alíquota de 2,5ml foi primeiramente centrifugada por 15' (3000 rpm) para sedimentação das hemácias. O anel de leucócitos, juntamente com parte do sobrenadante foi transferido para outro tubo e após homogeneização, 300 µL deste volume foram inoculados em frascos estéreis contendo 5mL de meio de cultura.

O meio de cultura utilizado continha 80% de RPMI 1640 (GIBCO) suplementado com 20% de soro fetal bovino (GIBCO) filtrado e estéril (Seitz Milipore), e 100 µL de fitohemaglutinina-M (INVITROGEN). Tanto para os casos como para os controles foram preparadas culturas em duplicata (A e B). As culturas foram mantidas em estufa a 37°C, por um total de 72 horas. Após 44 horas de incubação, foram adicionados 75µL citocalasina B (Sigma), dissolvida em dimetilsulfóxido (DMSO - Merck), na concentração final de 6µg/mL de meio, para obtenção dos linfócitos binucleados.

A seguir, o conteúdo dos frascos de cultura foi transferido para tubos Falcon (15mL) e submetidos a centrifugação (1500 rpm por 10 minutos). Após desprezar o sobrenadante, foram acrescentados 5 mL de solução NaCl a 0,85% (soro fisiológico) e, vagarosamente, 5mL de solução fixadora, constituída de metanol e ácido acético (ambos da Merck), na proporção de 3:1. Após centrifugação a 1500 rpm, por 10 minutos, repetia-se o processo de troca do fixador por uma ou duas vezes, sempre desprezando o sobrenadante. Ao final, o sedimento foi diluído em 1 ml de fixador e 2 a 3 gotas dessa suspensão foram transferidas para lâminas de vidro úmidas, previamente limpas e conservadas em água destilada a 4°C. O restante da suspensão foi conservado no congelador, para posterior confecção de novas lâminas para análise.

Depois de secas as lâminas foram mantidas em geladeira até o processo de coloração com Feulgen-Fast-Green. As lâminas foram primeiramente tratadas com uma solução de HCl 5N por 5 minutos, lavadas em 3 banhos sucessivos de água destilada por 1 minuto cada e deixadas à temperatura ambiente para secar. A seguir, as lâminas foram coradas com o Reativo de Schiff (1g de Fucsina diamante, 30 mL de HCL 1N e 3g de metabissulfito de sódio diluídos em 200 mL de água) por 90 minutos e posteriormente lavadas em três banhos consecutivos de água destilada por 1 minuto cada. As lâminas foram então contra-coradas com Fast-Green Ácida (0,1 g do corante diluído em 100 ml de ácido acético a 1%) por 15 segundos, lavadas com água destilada (3 banhos) e deixadas a temperatura ambiente para secar. Após a coloração, a montagem das lâminas foi feita com lamínula e Evermount.

Crítérios de análise: A análise, em teste cego, da frequência de células com MN e de MN foi realizada em um microscópio da marca Opton, com iluminação simples e objetiva de 400X. A confirmação da presença ou não de MN foi realizada por meio de objetiva de imersão (100X). Foram selecionadas para análise, 1000 células íntegras e isoladas, com membranas nucleares e citoplasmáticas preservadas, segundo protocolo de avaliação, sugerido por Fenech (2000). As células binucleadas, trinucleadas

e tetranucleadas também foram contabilizadas uma vez que permitem avaliar o índice de divisão nuclear. Foram considerados MN os corpúsculos citoplasmáticos, com tamanho de no máximo 1/3 do núcleo principal, com forma arredondada, contorno regular e bem delimitado, com coloração e textura de cromatina em plano focal semelhante aos núcleos principais (Fenech, 2000).

Na análise também foram consideradas variações não tão frequentes como a presença de ponte nucleoplasmática (estrutura tênue de cromatina unindo os dois núcleos), brotos nucleares (pedúnculo de cromatina anexado a um dos núcleos) e necrose (fragmentação da cromatina em pequenos núcleos), segundo proposto por Fenech, 2006.

As pontes nucleoplasmáticas são biomarcadores de instabilidade genômica que se expressam como ligações contínuas entre os núcleos das células binucleadas e parecem ser resultantes de rearranjos cromossômicos envolvendo mais de um centrômero ou de cromátides que migram para os pólos opostos da célula durante a anáfase (Fenech, 2006).

O broto nuclear é uma estrutura semelhante ao MN, que permanece ligado ao núcleo principal. A presença de broto nuclear indica que essa estrutura é um DNA amplificado que foi eliminado do núcleo durante a fase S do ciclo celular (Fenech et al., 2011a).

As células representativas das alterações acima mencionadas foram fotografadas por um sistema de imagens, diretamente no microscópio, e arquivados no computador.

3.6.2 Teste de FISH para translocação

Para a técnica de FISH foi utilizado o mesmo meio de cultura anteriormente descrito. As culturas em duplicata foram mantidas em estufa a 37°C, onde permaneceram por um total de 72 horas (Moorhead et al., 1960), com modificações.

Nos 45 minutos finais da cultura, foi adicionado 50µL de Karyomax Colcemid Solution 10 µg/mL (GIBCO) e foram mantidos em estufa a 37°C até completarem 72 horas. Posteriormente, o conteúdo dos frascos de

cultura foi transferido para tubos falcon de 15 ml e levados para centrifugação a 1500 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi desprezado e foram acrescidos 5mL de solução hipotônica de KCl 0,075M, aquecida a 37°C. Os tubos foram levados novamente à estufa a 37°C por mais 30 minutos. A seguir foi adicionado 5mL de solução fixadora, constituída de metanol e ácido acético (ambos da Merck), na proporção de 3:1. Repetiu-se o processo de centrifugação e de troca do fixador por pelo menos duas vezes, sempre desprezando o sobrenadante. O material sedimentado foi ressuspenso em 1ml de fixador e 2 a 3 gotas dessa suspensão foram depositadas em lâminas de vidro úmidas, previamente limpas e conservadas em água destilada a 4°C. As lâminas com as células fixadas foram mantidas na geladeira até o momento da realização da técnica de FISH (Korenberg e col., 1992).

A presença da t(15;17)(q22;q21), com consequente rearranjo dos genes PML/RAR α foi avaliada com a sonda comercial *PML/RAR α - Translocation Dual Fusion* (Cytocell) e o protocolo utilizado foi o sugerido pelo fabricante. Resumidamente, as lâminas já fixadas foram mantidas em uma jarra de *coplin* com 2xSSC (NaCl 3M / Citrato Trissódico.2H₂O 0,3M, pH 7.0), à temperatura ambiente por 2 minutos. A seguir, o processo de desidratação das lâminas foi feito por meio de banhos sucessivos em etanol, 70%, 85% e 100% respectivamente, durante 2 minutos cada, à temperatura ambiente. As lâminas foram então mantidas em uma placa aquecedora, na temperatura de 75°C por 50 segundos e mantidas na estufa à 37°C, por 10 minutos. A seguir, 3 μ l da sonda foram acrescidos na lâmina, e sobre ela foi colocada uma lamínula circular, vedada com cola de borracha (*Elmer's Rubber Cement*), sendo a lâmina levada a uma placa aquecida (75°C por 5 minutos) para denaturação. A lâmina foi então depositada em uma câmara úmida, mantida na estufa, a 37°C, para que ocorresse processo de hibridação de um dia para o outro. Completado o processo, a lâmina foi lavada em uma solução de 4xSSC a 73°C em banho-maria, por 2 minutos, e de 2xSSC + 0,05% NP40, à temperatura ambiente, durante 1 minuto. A coloração com DAPI (*Propidium Iodide/Antifade*) foi

realizada a seguir, após a retirada do excesso da solução anterior, e as lâminas foram cobertas por uma lamínula. A análise foi realizada em um microscópio Nikon de epifluorescência, com objetiva de imersão (100x), equipado com filtros de banda simples de espectros: verde, vermelho e azul e filtro de banda tripla (filtro triplo, contendo os três espectros em um só), além do filtro de banda dupla (que contém os espectros verdes e vermelhos).

As metáfases e os núcleos interfásicos representativos das alterações acima mencionadas foram fotografados por um sistema *Applied Spectral Imaging Bringing the Details to ASI light (Applied Imaging)*.

Critérios de análise: A utilização desta sonda para diagnóstico de LMA normalmente é realizada em células da medula óssea e não em linfócitos de sangue periférico. Assim sendo, para estabelecer a frequência esperada deste tipo de alteração em linfócitos foram realizados testes de FISH em cinco indivíduos, sabidamente não portadores de doenças onco-hematológicas. Analisou-se 300 células de cada amostra. Para análise, em teste cego, da frequência de células com t(15;17)(q22;q21), foram avaliadas 300 células provenientes de linfócitos do sangue periférico de indivíduos intoxicados e grupo controle.

O gene *PML* foi identificado com uma sonda de 107kb que corresponde à região proximal a *PML* e uma segunda sonda na região distal ao *PML* de 169kb, ambas marcadas em vermelho (Figura 3 - A). Para identificação do *RAR α* , sondas de 194kb na região proximal a *RAR α* , incluindo *CABC3* e uma segunda sonda na extremidade distal de *RAR α* de 153kb, ambas marcadas em verde (Figura 3 - B) foram utilizadas. Na célula sem translocação, essas sondas são identificadas como dois sinais verdes e dois sinais vermelhos, um para cada homólogo, representando os genes *PML* e *RAR α* (Figura 3 - C). Em pacientes com a t(15;17) as células apresentam dois sinais amarelos, resultantes das fusões recíprocas, além de um sinal verde e um sinal vermelho que correspondem aos cromossomos 15 e 17 sem translocação (Figura 3 - D). Na análise dos linfócitos também foram consideradas variações nos sinais observados, tais

como células com uma única fusão, associadas ou não à presença de outros sinais.

Figura 3: A- Representação esquemática da sonda para o gene *PML*. B- Representação esquemática da sonda para o gene *RARα*. C- Esquema de visualização da célula normal pela técnica de FISH em cromossomo metafásico e núcleo interfásico. D- Esquema de visualização da célula com rearranjo *PML/RARα* pela técnica de FISH em cromossomo metafásico e núcleo interfásico.

3.7 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se os softwares SPSS 15.0 e Excell 2010.

Foram realizados testes de normalidade de distribuição dos dados Kolmogorov-Smirnov (Kirkwood e Sterne, 2006) para os testes do micronúcleo, FISH e Hemogramas separadamente por grupo. Para os testes cuja normalidade de distribuição não foi aceita foram realizados testes Mann-Whitney (Kirkwood e Sterne, 2006) para comparação entre casos e controles e para os testes cuja normalidade de distribuição foi aceita foram realizados testes t-Student (Kirkwood e Sterne, 2006) para comparação dos grupos.

Foram calculadas correlações de Spearman ou de Pearson (Kirkwood e Sterne, 2006) entre as idades e os resultados do teste do micronúcleo e FISH para verificar se existe variação dos resultados do teste segundo idade, tanto para todos os indivíduos como separadamente por grupo. As características pessoais e familiares de interesse foram descritas segundo grupos e verificada a existência de associação entre os grupos e as características com uso de testes qui-quadrado ou testes exatos de Fisher ou testes da razão de verossimilhanças (Kirkwood e Sterne, 2006).

A amostra foi separada segundo grupos e os testes de micronúcleo e de FISH foram comparados segundo as categorias das características de interesse com uso de testes t-Student ou testes Mann-Whitney, quando a característica apresenta apenas duas categorias possíveis e ANOVA ou testes Kruskal-Wallis (Neter, et. al., 1996) quando a característica de interesse apresenta mais de duas categorias. Estes testes foram aplicados para verificar se as características pessoais avaliadas podem modificar o resultado nos testes do micronúcleo e de FISH.

Modelos lineares gerais (Neter, et. al., 1996) foram aplicados aos testes em que se observaram influências das características pessoais para verificar se, na presença destas características, o resultado obtido na comparação dos grupos se altera (Neter, et. al., 1996).

Foram calculados os valores de corte (cutoff), por meio do teste estatístico de função β inversa, utilizando o programa da Microsoft Excell (Wolf et al., 2007), na análise da translocação em linfócitos, tanto dos cinco indivíduos selecionados no início do estudo, quanto para os indivíduos controles e os trabalhadores expostos ao benzeno.

Para avaliar se a alteração em algum gene poderia influenciar nos resultados de MN, FISH, hemograma e tempo de profissão, foram utilizadas medidas resumo (média, desvio padrão, mediana, mínimo e máximo) (Kirkwood e Sterne, 2006) e comparados os valores de MN e FISH entre os genótipos com uso de testes Mann-Whitney e o leucograma com uso dos testes t-Student (Kirkwood e Sterne, 2006).

As análises foram interpretadas utilizando grau de significância de 5% ($p < 0,05$).

4.RESULTADOS

4. RESULTADOS

No presente estudo foram avaliados vinte trabalhadores expostos ao benzeno, 18 com diagnóstico de intoxicação por benzeno, e dois com suspeita de intoxicação pelo benzeno e vinte controles, ambos do sexo masculino. No momento em que as amostras foram coletadas, todos os trabalhadores encontravam-se afastados de suas atividades ocupacionais. Grande parte do grupo exposto era proveniente da cidade de Cubatão, SP. A idade dos trabalhadores expostos ao benzeno (20 indivíduos) variou de 25 a 62 anos sendo a média de $46,8 \pm 9,33$ anos. No grupo controle a idade variou entre 31 e 62 anos sendo a idade média de $45,7 \pm 8,00$ anos (Tabela 1).

4.1 Perfil das populações estudadas

A Tabela 1 apresenta os principais dados sócio-demográficos dos grupos estudados. Verificou-se que as populações eram semelhantes quanto à escolaridade sendo que, 40% dos expostos e 30% do controles relataram ter nível superior ou pós-graduação. Quando questionados quanto a sua auto-definição de cor de pele, foi verificado que entre os trabalhadores 20% eram de cor negra, 25% brancos, 45% pardos e 10% não sabiam definir seu grupo a partir da cor de pele. No grupo controle 10% eram negros, 40% brancos, 45% pardos e apenas um indivíduo (5%) não soube definir sua cor de pele (Tabela 1). Quanto ao estado civil 70% dos expostos e 60% dos controles declararam ser casados, sendo que 85% dos trabalhadores e 80% dos controles relataram ter filhos (Tabela 1).

Embora o questionário tenha sido aplicado somente aos homens, questões quanto à saúde dos filhos e o número de abortos espontâneos também foram investigadas. Dentre os pais expostos, 9 (45%) relataram que tinham filhos com problemas de saúde, em comparação com apenas um caso no grupo controle (C10), que relatou ter um filho com rinite alérgica ($p=0,007$ - Tabela 2). No grupo exposto, um trabalhador (E12) teve uma filha

com cardiopatia que veio a falecer aos 11 meses de idade, outro (E2) relatou ter dois filhos com a Síndrome de Asperger, e outro (E19) relatou que três de seus cinco filhos faleceram logo após o nascimento. As demais queixas foram principalmente relativas a problemas alérgicos. Também no grupo de trabalhadores foi relatado o dobro da frequência do número de abortos espontâneos de suas mulheres (20%) quando comparado com o número de abortos espontâneos no grupo controle (10%), conforme apresentado na Tabela 2.

Quando comparadas as condições de saúde a partir de informações coletadas nas entrevistas, verificou-se que apenas três (15%) dos trabalhadores expostos ao benzeno se consideravam fisicamente saudáveis em comparação com 65% dos controles, diferença essa estatisticamente significativa ($p=0,001$ – Tabela 2).

Embora nem todos tomassem medicamentos e a quantidade de medicamentos consumidos, tanto para os indivíduos expostos quanto para os controles fossem semelhantes, essas variáveis foram levadas em consideração. Sendo assim, os trabalhadores expostos relataram consumir remédios para hipertensão (20%), problemas cardíacos (30%) e depressão (10%). Entre os controles 15% faziam consumo de medicamentos para hipertensão arterial e apenas um deles (5%) tomava antidepressivos. A diferença entre os grupos não foi significativa (Tabela 2).

Apesar da dificuldade em se quantificar hábitos de consumo e de alimentação de uma população, essas perguntas foram realizadas com intuito de identificar possíveis diferenças que pudessem de alguma maneira, contribuir para melhor avaliação dos dois grupos. Foi verificado que apenas um (5%) dos trabalhadores expostos relatou ser fumante, 10 (50%) eram ex-fumantes, com tempos de abstinência que variaram de 2 meses a 38 anos, e 4 (20%) relataram viver junto com fumantes (Tabela 2). No grupo controle quatro indivíduos (20%) eram fumantes e 30% deles relataram ser ex-fumantes por períodos que variaram de 2 a 25 anos, e 6 (30%) relatam viver junto com fumantes (Tabela 2). A diferença entre os grupos em relação ao consumo de tabaco não foi estatisticamente significativa ($p=0,22$ – Tabela 2).

O consumo de drogas psicoativas como maconha e cocaína, e de bebidas alcoólicas foi muito semelhante entre os dois grupos conforme apresentado na Tabela 2.

Tabela 1: Distribuição de fatores sócio-demográficos nos grupos de trabalhadores expostos ao benzeno e de controles

Variável	GRUPOS	
	Expostos	Controles
	20 (%)	20 (%)
Idade Média $\pm$ dp (Anos)	46,8 $\pm$ 9,32	45,7 $\pm$ 8,00
Cor da Pele		
Negro	4 (20)	2 (10)
Branco	5 (25)	8 (40)
Pardo	9 (45)	9 (45)
Não Sabe Definir	2 (10)	1 (5)
Escolaridade		
Até 1º grau		2 (10)
1º grau	3 (15)	3 (15)
2º grau	9 (45)	9 (45)
Superior	6 (30)	2 (10)
Pós-graduação	2 (10)	4 (20)
Estado Civil		
Solteiro	4 (20)	4 (20)
Casado	14 (70)	12 (60)
Separado	1 (5)	2 (10)
Viúvo	1 (5)	2 (10)
Filhos		
Sim	17 (85)	16 (80)
Não	3 (15)	4 (20)
TOTAL	20	20

Tabela 2: Comparação da frequência de consumo de bebidas, cigarros, drogas, medicamentos, problemas de saúde e número de abortos nos grupos de trabalhadores expostos ao benzeno e de controles

Variável	Tipo				P
	Exposto		Controle		
	n	%	n	%	
Fumo					0,224#
Não	9	45	10	50	
Sim	1	5	4	20	
Somente no passado	10	50	6	30	
Vivem com Fumantes	4	20	6	30	
Drogas					>0,999*
Não	18	90	19	95	
Sim	2	10	1	5	
Bebida					0,136#
Não	3	15	4	20	
Sim	16	80	11	55	
Somente no passado	1	5	5	25	
Medicamento					0,507
Não	14	70	12	60	
Sim	6	30	8	40	
Avaliação pessoal					0,001
Com saúde	3	15	13	65	
Sem saúde	17	85	7	35	
Saúde Filhos^a					0,007*
Sem problema	8	47,1	15	93,8	
Com problema	9	52,9	1	6,3	
Aborto					>0,999*
Não	16	80	16	80	
Sim (Espontâneo)	4	20	2	10	
Sim (Provocado)			2	10	
Total	20	100	20	100	

* Resultado do teste exato de Fisher, # Resultado do teste da razão de verossimilhanças, ^a Alguns não possuem filhos.

4.2 Atividade ocupacional das populações estudadas

Dentre os trabalhadores investigados nessa pesquisa doze (60%) eram funcionários do Petróleo Brasileiro S/A (Petrobrás) (sendo onze da Refinaria Presidente Bernardes (RPBC) localizada no município de Cubatão e um da Refinaria de Capuava (RECAP), localizada no município paulista de Mauá), e oito (40%) da Companhia Siderúrgica Paulista (COSIPA), hoje integrada ao sistema USIMINAS, também localizada na cidade de Cubatão (Tabela 3). Uma parte destes trabalhadores (7) moravam na cidade de São Vicente – SP; cinco moravam na cidade de Santos – SP; quatro no Guarujá e os demais viviam em Cubatão (3) e Mongaguá (1) - SP, três (15%) moravam próximo às indústrias.

Todos os trabalhadores da RPBC investigados trabalhavam no refino de petróleo, sendo oito técnicos de operação, dois oficiais de manutenção, um despachante aduaneiro e um operador de máquinas. No trabalho desenvolvido pelos funcionários da COSIPA, na fabricação e tratamento do aço, dois eram operadores de máquinas, dois eram soldadores, um era moldador, um canaleiro, um controlador de produção e um manobreiro (Tabela 3).

Dentre os trabalhadores da COSIPA, cinco estavam aposentados por invalidez devido ao diagnóstico de intoxicação pelo benzeno (E13, E14, E15, E18 e E19) – Tabela 4. O tempo médio de trabalho do grupo estudado foi de $18,00 \pm 10,41$ anos. A partir dos dados obtidos no questionário observou-se que o maior contingente de trabalhadores possuía entre 20 e 30 anos de serviço. Todos os trabalhadores avaliados neste estudo estavam afastados de seus cargos há nove anos ($9,27 \pm 7,94$) em média, Tabela 4.

Quando questionados a respeito do tempo de exposição em relação à jornada de trabalho foi relatado que dez indivíduos (50%) estiveram expostos a compostos químicos durante grande parte da jornada (> 20 h/semana), por 20 anos ou mais e quatro (20%) estiveram expostos durante 10 anos ou menos. Quatro (20%) relataram uma exposição moderada (< 20 h/semana - contato regular) e dois (10%) relataram exposição esporádica (<

1 h/semana). Dentre os compostos químicos citados, os trabalhadores relataram não somente exposição ao benzeno, mas também aos seguintes compostos durante a jornada de trabalho: xileno, tolueno, nafta petroquímica, diesel, asbesto, tiner, cloro, sulfato de alumínio, gás de coqueria, benzina e melaço (resultante do processo de centrifugação ou de decantação no processo de fabricação do açúcar).

Todos relataram fazer uso de equipamentos de proteção individual tais como luvas, capacetes, óculos, protetores auriculares, botas e máscaras. Acidentes de trabalho foram relatados por oito (40%) funcionários, sendo que cinco (25%) deles sofreram queimaduras nos braços, mãos e rosto e três (15%) sofreram fraturas em dedos das mãos.

Praticamente todos os funcionários (90%) relataram trabalhar em condições de muito ruído, e as principais fontes de ruído citadas foram às bombas, válvulas, caldeiras, motores, compressores, forno, turbinas, sirene, ponte rolante e buzina locomotiva.

As ocupações desenvolvidas pelo grupo controle também foram avaliadas, sendo dois deles (10%) aposentados. Três (15%) exerciam funções relacionadas à educação; dois (10%) funções administrativas; um (5%) estava desempregado no momento da entrevista, um (5%) era lavrador, mas estava trabalhando em SP como pedreiro há aproximadamente dois anos; três indivíduos (15%) eram motoristas (dois de ônibus e um particular); um cobrador de ônibus (5%); dois (10%) eram seguranças particulares; três (15%) exerciam funções dentro de laboratórios de análises clínicas e um (5%) era operador de fabricação de produtos de limpeza. Seis (30%) indivíduos controles relataram que faziam uso de equipamentos de proteção individual (EPI) tais como luvas, avental e máscaras. Acidentes de trabalho foram relatados por quatro (20%) dos controles, sendo que três (15%) sofreram fraturas na mão, pé e dedo e um (5%) sofreu acidente com resíduos de produtos utilizados para a limpeza, tais como Veja e Ajax.

Tabela 3: Perfil ocupacional dos trabalhadores expostos ao benzeno nas Refinarias Presidente Bernardes de Cubatão (RPBC) e de Capuava (RECAP) e na Companhia Siderúrgica Paulista (COSIPA)

Variável	Expostos ao benzeno	
	RPBC/RECAP (%)	COSIPA (%)
Número de Indivíduos	12 (60)	8 (40)
Ramo de Atividade		
Refino de Petróleo	12 (100)	
Siderurgia		8 (100)
Função		
Técnico de Operação	8 (67)	
Oficial de Manutenção	2 (17)	
Exportador e Importador	1 (8)	
Operador de Máquinas	1 (8)	2 (25)
Soldador		2 (25)
Moldador		1 (12,5)
Canaleiro		1 (12,5)
Manobra		1 (12,5)
Controlador de Produção		1 (12,5)
Jornada de Trabalho		
Turno 12 horas	10 (83,33)	6 (75)
Turno 8 horas	2 (16,66)	2 (25)
Aposentado		
Sim		5 (62,5)
Não	12 (100)	3 (37,5)
Tempo de Exposição Média $\pm$ dp (Anos)	23,83 $\pm$ 5,77	9,62 $\pm$ 8,98
Grau de Exposição		
(> 20h/semana)	9 (75)	5 (62,5)
(< 20h/semana)	3 (25)	1 (12,5)
Raramente (<1 h/semana)		2 (25)
Acidente de Trabalho		
Sim	6 (50)	4 (50)
Não	6 (50)	4 (50)

Tabela 4: Perfil ocupacional dos trabalhadores expostos ao benzeno (E) nas refinarias de petróleo (RPBC/RECAP) ou na siderúrgica (COSIPA) relacionando local de trabalho, função, tempo de trabalho, função, tempo de trabalho, grau de exposição e acidente de trabalho

Expostos	Local de Trabalho	Função	Tempo de Trabalho* (anos)	Afastado** (anos)	Grau de Exposição (horas/semana)	Acidente de Trabalho
E1	RPBC	Operador de Máquinas	34	7	> 20	Não
E2	RPBC	Importador e Exportador	25	3	> 20	Sim
E3	RPBC	Oficial de Manutenção	27	4	> 20	Não
E4	RPBC	Técnico de Operação	21	10	> 20	Sim
E5	RPBC	Técnico de Operação	25	5	< 20	Sim
E6	RPBC	Técnico de Manutenção Plena	30	5	> 20	Não
E7	RPBC	Técnico de Operação	21	10	> 20	Sim
E8	RPBC	Técnico de Operação	6	4	< 20	Não
E9	RPBC	Técnico de Operação	23	10	> 20	Sim
E10	RPBC	Técnico de Operação	25	6	> 20	Não
E11	RECAP	Técnico de Operação	24	1	> 20	Sim
E12	RPBC	Técnico de Operação	16	4	< 20	Não
E13	COSIPA	Manobreiro	2	17	> 20	Não
E14	COSIPA	Canaleiro	2	25	> 20	Sim
E15	COSIPA	Operador de Máquinas	31	12	< 1	Não
E16	COSIPA	Operador de Máquinas	4	0,4	> 20	Sim
E17	COSIPA	Controlador de Produção	10	5	< 20	Sim
E18	COSIPA	Soldador	20	27	> 20	Sim
E19	COSIPA	zelador/moldador	10	24	> 20	Não
E20	COSIPA	Soldador	4	6	< 1	Não

* tempo de trabalho: média $\pm$ dp: 18,00 $\pm$ 10,41 anos; **tempo de afastamento: média $\pm$ dp: 9,27 $\pm$ 7,94 anos.

4.3 Avaliação clínica dos trabalhadores expostos ao benzeno

Todos os trabalhadores avaliados foram encaminhados ao Serviço de Saúde Ocupacional por sindicatos (petroleiros ou metalúrgicos de Santos) com suspeita ou diagnóstico de intoxicação por benzeno.

Os cinco trabalhadores da COSIPA que estavam aposentados por um período médio de $13,2 \pm 7,52$ anos, foram diagnosticados com o benzenismo na década de 80, quando o nível de exposição ao benzeno na COSIPA era muito elevado. As principais reclamações desses trabalhadores estavam relacionadas a repetidas gripes, frequente sonolência, dores de cabeça, fraqueza e cansaço. A série histórica de hemogramas demonstrava queda no número de leucócitos, neutrófilos e linfócitos. Esses trabalhadores permaneceram afastados da indústria por um período de aproximadamente sete anos antes de se aposentar.

Os indivíduos E16 e E17 foram encaminhados para avaliação médico-ocupacional no SSO por suspeita de intoxicação pelo benzeno, devido principalmente a série histórica de hemogramas e ao conjunto de sinais e sintomas característicos da exposição ao benzeno. Esse acompanhamento e avaliação vêm sendo realizado pelo médico do trabalho desde 2008. O paciente E16 trabalhou na COSIPA durante 4 anos e estava, no momento da coleta, afastado há 5 meses, o E17 trabalhou durante 10 anos e estava afastado há 5 anos.

Apenas o trabalhador E8 estava empregado na indústria há seis anos, todos os demais 11 trabalhadores da Petrobrás estavam empregados no setor de refino do petróleo há mais de 15 anos. Os trabalhadores da RPBC são acompanhados pelo médico do trabalho desde 2006. Todos possuem diagnóstico de intoxicação por benzeno e encontravam-se afastados de seus cargos no momento da pesquisa. Quando foram afastados, todos apresentavam neutropenia, leucopenia, tonturas, gripes, sonolência, cansaço e dores no corpo.

No momento da pesquisa, três trabalhadores da RPBC (E2, E8 e E12), haviam sido realocados para a mini-refinaria em Santos, onde estavam

exercendo cargos administrativos há aproximadamente quatro anos. O trabalhador E11 foi realocado para a sala de controle no setor de craqueamento do petróleo em 2001, pois naquele momento a sua série histórica de hemogramas demonstrava normalização do quadro de intoxicação. No entanto, em 2009, o trabalhador voltou a apresentar hemogramas com queda no número de neutrófilos, plaquetas e leucócitos, sendo afastado novamente da fonte de exposição, porém em 2010 retomou suas atividades na refinaria.

4.4 Exames laboratoriais: hemograma

O hemograma completo foi realizado nos dois grupos estudados, uma única vez, no início desta pesquisa. Os resultados obtidos no eritrograma e no leucograma encontram-se descritos nas Tabelas 5 e 6.

Na comparação conjunta entre a média dos valores obtidos nos hemogramas dos trabalhadores expostos ao benzeno e dos controles somente a avaliação da amplitude de distribuição dos eritrócitos, medido como coeficiente de variação em percentagem (RDW-CV) ou medido como desvio padrão (RDW-SD), foi menor nos expostos do que nos controles, sendo a diferença significativa tanto para RDW-CV ($p=0,031$) como para RDW-SD ($p=0,008$), conforme apresentado na Tabela 5.

Os trabalhadores expostos apresentaram volume plaquetário médio (VPM) inferior ($10,62 \pm 0,71$) ao observado nos controles ($11,78 \pm 1,07$), sendo esta diferença considerada estatisticamente significativa ($p<0,001$) conforme apresentado na Tabela 5.

Quanto à análise do leucograma verificou-se um número maior de diferenças estatisticamente significantes entre os grupos, conforme apresentado na Tabela 6: os trabalhadores expostos apresentaram menor frequência de leucócitos ($4,51 \pm 0,94$), em relação aos controles ($6,99 \pm 1,86$), com $p<0,001$; de neutrófilos ($2,38 \pm 0,72$ e $4,23 \pm 1,51$), com $p<0,001$; de segmentados ($2,34 \pm 0,68$ e $4,14 \pm 1,57$) com $p <0,001$; de linfócitos ($1,62$

$\pm 0,45$ e $2,02 \pm 0,51$) com $p=0,013$ e de monócitos ($0,37 \pm 0,15$ e $0,52 \pm 0,20$), com $p=0,010$.

A descrição dos resultados individuais, obtidos no eritograma e no leucograma dos trabalhadores expostos ao benzeno e dos controles encontram-se no Anexo C. Todos os índices obtidos a partir da análise dos eritrócitos de expostos e de controles estavam dentro do esperado no valor de referência do exame. Entretanto, na análise do leucograma dos trabalhadores expostos verificamos desvios nos valores de referência para o número de leucócitos (E5, E8, E13, E14, E16, E17) para o número de neutrófilos (E5, E13, E17), para o número de segmentados (E13), de linfócitos (E10), e para o número de monócitos (E13). O paciente E13 apresentou diminuição no número de leucócitos, neutrófilos, segmentados e monócitos.

Tabela 5: Comparação da média de células vermelhas (eritrograma) avaliadas no hemograma dos 20 indivíduos expostos e 20 indivíduos controles

	Exposto (Média ± DP)	Controle (Média ± DP)	Valor de Referência	P
Eritrócitos (milhões/mm ³)	4,94 ± 0,32	4,99 ± 0,42	4,4 - 5,9 (milhões/mm ³)	0,638
Hemoglobina (g/dL)	14,49 ± 0,74	14,80 ± 1,18	13,0 - 18,0 (g/dL)	0,324
Hematócrito (%)	42,90 ± 2,14	44,07 ± 2,97	40,0 - 52 (%)	0,160
VCM (fL)	87,10 ± 3,51	88,45 ± 4,15	80,0 - 100,0 (fL)	0,274
HCM (pg)	29,43 ± 1,58	29,67 ± 1,58	27,0 - 32,0 (pg)	0,633
CHCM (g/dL)	33,78 ± 1,03	33,55 ± 1,03	32,0 - 37,0 (g/dL)	0,484
RDW - CV (%)	13,04 ± 0,61	13,65 ± 1,04	9,5 - 16,0 (%)	0,031
RDW - SD (fL)	40,74 ± 1,97	43,22 ± 3,46	34,0 - 54,0 (fL)	0,008
Plaquetas (mil/mm ³)	211,40 ± 35,55	231,10 ± 55,40	140 - 450 (mil/mm ³)	0,190
VPM (fL)	10,62 ± 0,71	11,78 ± 1,07	6,5 - 12,5 (fL)	<0,001

VCM: Volume Corpuscular Médio em fentolitros como fL; g/dL: grama/decilítro; HCM: Hemoglobina Corpuscular Média em pictogramas como pg; CHCM: Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média; RDW-CV: Amplitude de distribuição dos eritrócitos medido como coeficiente de variação; RDW-SD: Amplitude de distribuição dos eritrócitos medido como desvio padrão; VPM: Volume Plaquetário Médio; dp: desvio padrão.

Tabela 6: Comparação da média de células brancas (leucograma) avaliadas no hemograma dos 20 indivíduos expostos e 20 controles

	Exposto (Média ± DP)	Controle (Média ± DP)	Valor de Referência (mil/mm ³)	P
Leucócitos (mil/mm ³)	4,51 ± 0,94	6,99 ± 1,86	4,0 - 11,0	<0,001
Neutrófilos (mil/mm ³)	2,38 ± 0,72	4,23 ± 1,51	1,6 - 7,0	<0,001
Bastonetes (mil/mm ³)	0,08 ± 0,06	0,10 ± 0,04	0,0 - 0,7	0,445*
Segmentados (mil/mm ³)	2,34 ± 0,68	4,14 ± 1,57	1,3 - 7,0	<0,001
Eosinófilos (mil/mm ³)	0,13 ± 0,17	0,16 ± 0,15	0,05 - 0,5	0,560
Basófilos (mil/mm ³)	0,01 ± 0,03	0,03 ± 0,06	0,0 - 0,2	0,414*
Linfócitos (mil/mm ³)	1,62 ± 0,45	2,02 ± 0,51	0,9 - 3,4	0,013
Monócitos (mil/mm ³)	0,37 ± 0,15	0,52 ± 0,20	0,2 - 0,9	0,010

mil/mm³: mil/milímetro cúbico; * Resultado do Teste Mann-Whitney.

4.5 Testes moleculares

A análise dos polimorfismos *CYP1A1*, *GSTM1*, *GSTT1*, *CYP2E1*, *NQO1* e *MPO* foram realizadas nos 20 trabalhadores expostos e nos 20 indivíduos controle. Os resultados obtidos encontram-se descritos na Tabela 7. Apesar da diferença observada na frequência dos polimorfismos avaliados entre os grupos, a análise estatística não revelou ser essa diferença significativa (*GSTT1*- $p=0,4$; *GSTM1*- $p=0,3$; *CYP2E1*- $p=0,3$; *CYP1A1*- $p=0,67$; *NQO*- $p=0,71$ e *MPO*- $p=0,62$ - Tabela 7).

Tabela 4: Frequências alélicas dos genes *CYP1A1/MspI*, *CYP2E1/PstI*, *GSTM1*, *GSTT1*, *NQO1/HinfI* e *MPO/AciI* nos grupos de trabalhadores expostos e controles

		<i>Expostos</i>		<i>Controle</i>		X^2	P
		<i>N</i>	%	<i>N</i>	%		
<i>GSTT1</i>	Presença	15	75	18	90	0,7	0,4
	Deleção	5	25	2	10		
<i>GSTM1</i>	Presença	16	80	12	60	1	0,3
	Deleção	4	20	8	40		
<i>CYP2E1/ PstI</i>	GG	20	100	19	95	1	0,3
	GT	-	-	1	5		
<i>CYP1A1/MspI</i>	AA	16	80	17	85	0,2	0,67
	AG	4	20	3	15		
<i>NQO1/HinfI</i>	CC	15	75	13	65	0,13	0,71
	CT	4	20	6	30		
	TT	1	5	1	5	0	0,92
	CT + TT	5	25	7	35	0,11	0,73
<i>MPO/AciI</i>	GG	11	55	9	45	0,23	0,62
	GA	8	40	11	55		
	AA	1	5	-	-	0,78	0,37
	GA + AA	9	45	11	55	0,1	0,75

GSTM1 e *GSTT1*: Presença = pelo menos um alelo mutado; *nulo* = deleção total do gene; *CYP1A1*: AA = homozigoto selvagem, AG = heterozigoto, GG = homozigoto mutado; *CYP2E1*: GG=homozigoto selvagem; GT = heterozigoto; TT = homozigoto mutado; *NQO1*: CC = homozigoto selvagem; CT = heterozigoto, TT = homozigoto mutado; *MPO*: GG= homozigoto selvagem; GA= heterozigoto; AA= homozigoto mutado.

Figura 4: Produtos das reações de PCR para os genes: *CYP2E1*, *GSTT1*, *GSTM1*, *NQO1*, *CYP1A1* e *MPO*. (A) *CYP2E1* digerido com *Pst*I: homozigotos selvagens apresentam 410 pb; heterozigotos: 410, 290 e 120 pb; não foram observados indivíduos homozigotos para a mutação. (B) Produto da reação multiplex para *GSTT1/GSTM1*: *GSTT1* é representado pelo fragmento de 480 pb enquanto que o gene *GSTM1* corresponde ao fragmento de 215 pb. Os indivíduos com ausência somente do gene *GSTM1* (*GSTM1 null*) não apresentam o fragmento de 215 pb, enquanto que os homozigotos para a ausência do gene *GSTT1* (*GSTT1 null*) não apresentam o fragmento de 480 pb; indivíduos portadores dos dois genes apresentam fragmento adicional de 312 pb que corresponde ao controle interno da reação. (C) *NQO1* digerido com a enzima *Hinf*I: a completa digestão do fragmento de 230 pb gera um produto de PCR de 195 pb para o alelo selvagem e um fragmento de 151 pb para o alelo variante. (D) *CYP1A1* digerido com a enzima *Msp*I: homozigotos para o polimorfismo apresentam fragmentos de 200 e 140 pb, heterozigotos para o polimorfismo apresentam fragmentos de 340 pb, 200 pb e 140 pb. (E) *MPO* digerido com a enzima *Acc*II – A enzima *Acc*II gera um sítio de restrição invariável que produz um fragmento de 61 pb visto em todas as colunas; homozigotos selvagens apresentam fragmentos de 289 pb e 61 pb; homozigotos mutantes apresentam os fragmentos de 169, 120 e 61pb; enquanto que os indivíduos heterozigotos apresentam, 289pb, 169pb, 120pb e 61 pb. A= marcador de peso molecular de 100 pb (figuras B e D) e 50 pb (figuras A, C e E). As análises foram realizadas em gel de agarose a 2% corado com brometo de etídeo.

4.6 Testes citogenéticos

4.6.1 Teste do micronúcleo com bloqueio da citocinese (CBMN)

A análise citogenética para avaliação da frequência de células com MN foi possível nos 20 trabalhadores expostos ao benzeno e nos 20 controles. Foram consideradas 1.000 células por indivíduo, perfazendo um total de 40.000 células analisadas nos dois grupos. Foram identificadas somente células com um MN além de células binucleadas com pontes núcleoplasmáticas (PNPs), tendo sido ambas incluídas na análise final.

A frequência de linfócitos com MN e de células binucleadas com PNPs foi três vezes maior ($1,95 \pm 2,37$) no grupo de trabalhadores expostos do que no grupo controle ($0,65 \pm 0,75$), sendo a diferença considerada estatisticamente significativa ($p=0,024$) por meio do teste Mann-Whitney (Tabela 8). As PNPs foram encontradas somente no grupo de trabalhadores expostos (E5, E6, E9, E11 e E15) conforme representado na Figura 5 (C). O número de células com MN e PNPs variou de zero a oito no grupo exposto e de zero a dois nos controles (Tabela 8).

Quando as PNPs foram excluídas da análise estatística a frequência de células com MN no grupo de expostos ao benzeno ($1,70 \pm 2,11$) foi maior do que a observada no grupo controle, ($0,65 \pm 0,75$), mas a diferença não foi estatisticamente significativa ($p=0,108$) pelo teste de Mann-Whitney.

Figura 5: Células Coradas com Feulgen-Fast-Green. A: Célula Binucleada. B: Célula Binucleada com seta indicando a presença de micronúcleo. C: Célula Binucleada com seta indicando a presença de PNP.

A cinética de divisão celular, a partir da adição da citocalisina B nos linfócitos em divisão *in vitro*, foi calculada por meio do índice de divisão nuclear (IDN). A análise de outras 1000 células viáveis revelou não haver diferença estatisticamente significativa ($p=0,099$) na comparação do IDN observado nos trabalhadores expostos ($2,04 \pm 0,04$) e nos controles ($2,01 \pm 0,05$), conforme descrito na tabela 8.

A frequência de alterações citogenéticas observadas não foi modificada pela idade dos trabalhadores expostos ($46,8 \pm 9,32$) e dos controles ($45,7 \pm 8$), e a diferença não foi estatisticamente significativa ($p=0,799$) pelo teste de correlação de Spearman.

Assim como a frequência de alterações citogenéticas não alterou de forma significativa a idade, a correlação entre o tempo de trabalho ($p=0,062$), que variou de 2 a 34 anos, e o tempo de afastamento ($p=0,080$) também não modificaram os resultados obtidos. Embora as amostras sejam reduzidas, foram considerados também outros fatores intervenientes como o consumo de bebidas alcoólicas, o consumo de tabaco, drogas, uso de medicamentos, problemas de saúde, problemas de saúde dos filhos e número de abortos que poderiam estar associados com algum tipo de dano ao DNA, em conjunto ou não com a exposição ocupacional. A Tabela 9 descreve os resultados obtidos quando essas variáveis foram avaliadas no grupo de indivíduos expostos e a Tabela 10 no grupo controle. No entanto a correlação entre essas variáveis e a frequência de MN não foi considerada estatisticamente significativa.

Tabela 5: Frequência de células com MN, pontes nucleoplasmáticas (PNP), e índice de divisão nuclear (IDN) observadas nos linfócitos do sangue periférico dos trabalhadores expostos ao benzeno (E) e controles (C)

Expostos	MN e PNPs ^a	IDN ^c	Controles	MN ^b	IDN ^d
E1	2	2.04	C1	2	2.04
E2	1	2.1	C2	0	2.01
E3	1	1.98	C3	1	2.00
E4	1	2.06	C4	0	2.00
E5	1	2.08	C5	1	1.98
E6	2	1.99	C6	0	1.90
E7	2	2.00	C7	0	1.95
E8	1	1.97	C8	2	1.97
E9	8	1.98	C9	1	1.94
E10	0	2.06	C10	1	2.09
E11	8	2.04	C11	0	2.05
E12	1	2.08	C12	0	2.13
E13	1	2.06	C13	0	1.98
E14	0	2.06	C14	0	2.10
E15	4	2.15	C15	1	2.08
E16	0	2.04	C16	1	1.98
E17	4	2.06	C17	0	2.06
E18	0	2.05	C18	2	2.02
E19	2	2.08	C19	0	2.02
E20	0	2.05	C20	1	2.07
Média ± DP	1,95 ± 2,37	2,04 ± 0,04		0,65 ± 0,75	2,01 ± 0,05

Análise estatística realizada por meio do teste de Mann-Whitney: *a x b*: P = 0,024; *c x d*: P = 0,099.

Tabela 6: Distribuição da frequência de MN e PNPs em relação ao tabaco, drogas, bebidas, medicamentos, saúde do trabalhador, saúde dos filhos e número de abortos nos indivíduos expostos

Frequência de CBMN				
Variável	Expostos			
	N	Média	DP	P
Fumo				
Não	9	1,67	2,35	0,264*
Sim	1	0	.	
Somente no passado	10	1,9	2,02	
Drogas				
Não	18	1,78	2,18	0,758**
Sim	2	1	1,41	
Bebida				
Não	3	1	1	0,408*
Sim	16	1,94	2,26	
Somente no passado	1	0	.	
Medicamento				
Não	14	2,14	2,35	0,153**
Sim	6	0,67	0,82	
Saúde				
Normal	3	1	1	0,765**
Problema	17	1,82	2,24	
Saúde Filhos^a				
Sem problema	8	1,63	2,39	0,606**
Com problema	9	1,78	2,11	
Aborto				
Não	16	1,13	1,2	0,122**
Sim	4	4	3,46	

ANOVA * Resultado do teste Kruskal-Wallis; ** Resultado do teste Mann-Whitney.

Tabela 7: Distribuição da frequência de MN e PNPs em relação ao tabaco, drogas, bebidas, medicamentos, saúde do trabalhador, saúde dos filhos e número de abortos no grupo controle

Variável	Frequência de CBMN			
	Controles			
	N	Média	DP	P
Fumo				
Não	10	0,4	0,7	0,275*
Sim	4	1	0,82	
Somente no passado	6	0,83	0,75	
Drogas				
Não	19	0,68	0,75	0,500**
Sim	1	0	.	
Bebida				
Não	4	0,75	0,96	0,527*
Sim	11	0,45	0,52	
Somente no passado	5	1	1	
Medicamento				
Não	12	0,5	0,67	0,343**
Sim	8	0,88	0,83	
Saúde				
Sem problema	13	0,54	0,66	0,485**
Com problema	7	0,86	0,9	
Saúde Filhos^a				
Normal	15	0,6	0,83	0,625**
Problema	1	1	.	
Aborto				
Não	16	0,63	0,72	0,892**
Sim	4	0,75	0,96	

ANOVA * Resultado do teste Kruskal-Wallis; Teste t-Student ** Resultado do teste Mann-Whitney.

4.6.2 Teste de FISH

A pesquisa da t(15; 17)(q22; q21), frequentemente realizada em células da medula óssea para fins de diagnóstico de leucemia promielocítica aguda, foi realizada na presente investigação em linfócitos do sangue periférico, obtidos após cultura de 72 horas *in vitro*.

Primeiramente foi estabelecida a frequência de células com fusão e/ou presença de outras alterações citogenéticas, identificáveis pela técnica de FISH, em linfócitos de cinco indivíduos sem o diagnóstico da doença. Também foram utilizadas células de aspirado de medula óssea, provenientes de um paciente com diagnóstico de leucemia promielocítica aguda (Figura 6- A).

Desta análise foram obtidos os seguintes valores para os 300 núcleos interfásicos das células da medula óssea: 93 (31%) células com a dupla fusão (dois sinais amarelos) além de um sinal verde e um sinal vermelho (2F 1VD 1VM), 30 (10%), células com uma fusão, um sinal verde e um sinal vermelho (1F 1VD e 1VM) e cinco (1,66%) células com a dupla fusão (2F), seis (2%) células com dois sinais verdes e um sinal vermelho (2 VD e 1VM) e 10 (3,33%) células com 2 sinais verdes e 3 sinais vermelhos (2VD e 3VM). A análise dos linfócitos dos cinco indivíduos revelou ausência de células típicas (com translocação), que caracterizam a leucemia promielocítica aguda, ou seja, duas fusões (sinais amarelos) e dois sinais isolados (verde e vermelho). Entretanto, células com uma única fusão foram observadas, associadas ou não à presença de outros sinais: verificou-se 21(1,4%) células com uma fusão mais um sinal verde e um sinal vermelho – (Figura 6 - E), 29 (1,933%) células com dois sinais verdes e um sinal vermelho – (Figura 6 - D) e 12 (0,8%) células com um sinal verde e dois sinais vermelhos – (Figura 6 - C). A partir desses resultados foi estabelecido o valor de corte (cutoff negativo) para os sinais encontrados em ambos os tipos de células. Para os linfócitos obtivemos: 2 VD e 1 VM = 5,1% ; 1VD e 2VM = 4,4%; 1F 1VD 1VM = 6,3% e 2F 1VD 1 VM = 1,5%; Para as células de medula : 2 VD e 1 VM = 2,5%; 2 VD 3 VM = 3,0%; 1F 1VD 1VM = 6,0%; 2F 1VD 1 VM = 13,0% E 2 F = 2,07%.

Figura 6: Núcleos interfásicos demonstrando os sinais típicos e atípicos encontrados nas células a partir da utilização de FISH para t(15;17). A - Núcleo Interfásico positivo para o rearranjo *PML-RAR α* , com um sinal verde, um vermelho e a dupla fusão com a t(15;17) sinal amarelo. B - Núcleo interfásico demonstrando dois sinais verdes (gene *RAR α*) e dois sinais vermelhos (gene *PML*) - (sinal normal). C – Núcleo interfásico que apresenta dois sinais vermelhos e um sinal verde. D - Núcleo interfásico que apresenta dois sinais verdes e um sinal vermelho. E – Núcleo interfásico com um sinal vermelho, um sinal verde e um sinal de fusão, podendo haver perda do sítio de hibridação do *PML* e do *RAR α* . F – Núcleo interfásico com dupla fusão.

A pesquisa do rearranjo *PML/RAR α* em linfócitos de sangue periférico dos 19 trabalhadores expostos ao benzeno e 19 controles, totalizou 11.400 células, sendo 300 núcleos interfásicos por indivíduo. A cultura de linfócitos não foi possível em apenas um dos controles (C17) e um dos trabalhadores expostos (E20), provavelmente por problemas técnicos.

Os trabalhadores expostos ao benzeno apresentaram uma frequência menor de células sem alterações ($260,05 \pm 10,77$) quando comparados com o grupo controle ($270,42 \pm 7,05$), diferença essa considerada estatisticamente significativa ($p=0,001$), conforme apresentado nas Tabelas de 11 a 13.

Diferente da análise de células da medula, os linfócitos não apresentaram células com dupla fusão, além de um sinal verde e um sinal vermelho isolados, compatíveis com o rearranjo *PML/RAR α* . Entretanto, foram observadas células com uma fusão associadas ou não com outros sinais, verdes ou vermelhos em ambos os grupos avaliados.

Ao final verificou-se que as células com uma fusão com ou sem sinais verdes e/ou vermelhos, estiveram presentes em 17 (90%) dos trabalhadores expostos e em 14 (75%) controles. Entretanto quando comparada a frequência de células com pelo menos uma fusão nos trabalhadores expostos ($9,79 \pm 9,54$) e nos controles ($3,94 \pm 3,17$) essa diferença ($t=2,53$; 21gl) revelou ser estatisticamente significativa ($p=0,019$) conforme apresentado nas Tabelas 11, 12 e 13.

Foram encontradas células com ausência de sinais verdes e/ou vermelhos em ambos os grupos estudados (expostos: $30,16 \pm 8,56$ e controles: $25,63 \pm 6,22$) sendo que a comparação destas alterações não revelou diferenças estatisticamente significantes ($p=0,070$), conforme apresentado na Tabela 13.

Tabela 11: Frequência de células normais, células com pelo menos uma fusão e de células com alterações no número de sinais que foram observadas nos trabalhadores expostos ao benzeno pela técnica de FISH

Amostra	Céls. Normais (2VD 2VM)	Céls c/pelo menos 1F	Céls c/alteração de sinal	Total
E1	267	10	23	300
E2	265	6	29	300
E3	261	4	35	300
E4	266	5	29	300
E5	260	18	22	300
E6	265	10	25	300
E7	263	6	31	300
E8	255	10	35	300
E9	239	34	27	300
E10	263	10	27	300
E11	247	17	36	300
E12	250	2	22	300
E13	266	1	33	300
E14	242	0	58	300
E15	250	28	22	300
E16	274	2	24	300
E17	261	15	24	300
E18	271	0	29	300
E19	244	16	40	300
Total	4933	194	573	5700
Média ± DP	260,05 ± 10,77	9,79 ± 9,54	30,16 ± 8,56	

Tabela 12: Frequência de células normais, células com pelo menos uma fusão e de células com alterações no número de sinais que foram observadas no grupo controle pela técnica de FISH

Amostra	Céls. Normais (2VD 2VM)	Céls c/pelo menos 1F	Céls c/alteração de sinal	Total
C1	272	2	26	300
C2	269	7	24	300
C3	272	8	20	300
C4	268	3	29	300
C5	266	3	31	300
C6	273	6	21	300
C7	279	5	16	300
C8	270	0	30	300
C9	281	4	15	300
C10	258	7	35	300
C11	270	0	30	300
C12	256	9	35	300
C13	263	9	28	300
C14	267	3	30	300
C15	278	0	22	300
C16	274	0	26	300
C18	267	6	27	300
C19	272	0	28	300
C20	283	3	14	300
Total	5138	75	487	5700
Média ± DP	270,42 ± 7,05	3,94 ± 3,17	25,63 ± 6,22	

Tabela 13: Comparação, pelo teste t-Student, das frequências de células normais, de células com pelo menos uma fusão, e de células com alterações no numero esperado de sinais verdes e vermelhos observada na análise citogenética por FISH de células dos trabalhadores expostos ao benzeno e dos controles

Variável	Grupo	Média	DP	Mediana	Mínimo	Máximo	N	p
Céls. Normais (2VD 2VM)	Expostos	260,05	10,77	263	231	276	19	0,001
	Controles	270,42	7,06	270	256	283	19	
Céls c/pelo menos 1F	Expostos	9,79	9,54	6	0	34	19	0,019
	Controles	3,95	3,17	3	0	9	19	
Céls c/alteração de sinal	Expostos	30,16	8,56	29	22	58	19	0,07
	Controles	25,63	6,22	27	14	35	19	

Os resultados obtidos na análise citogenética não foram modificados pela idade dos trabalhadores e nem pelo tempo de trabalho ou afastamento das funções, conforme apresentado nas Tabelas 14 e 15, respectivamente.

Não foi observada a contribuição de outras variáveis como o consumo de bebidas alcoólicas, tabaco, drogas ilícitas, e medicamentos na modificação das frequências de alterações citogenéticas observadas (dados não apresentados). Por outro lado, variáveis que avaliaram a condição de saúde dos trabalhadores e de seus filhos alteraram de forma significativa as frequências observadas. Os trabalhadores expostos ao benzeno que declararam ter filhos com problemas de saúde apresentaram uma frequência maior de células com pelo menos uma fusão ($13,44 \pm 7,49$) quando comparados com trabalhadores que informaram não ter filhos com problemas de saúde ($3,63 \pm 4,14$), sendo essa diferença considerada estatisticamente significativa ($p=0,005$), conforme apresentado na Tabela 16.

A contribuição dos polimorfismos genéticos nas alterações citogenéticas observadas e nos testes hematológicos foi avaliada somente nos trabalhadores expostos. Verificou-se que células com pelo menos uma fusão foram mais frequentes em indivíduos que apresentavam o genótipo selvagem para o gene *CYP1A1* ($p=0,033$), e que a frequência de células com MN e PNPs estava associada ao genótipo *GSTT1* ($p=0,053$), conforme apresentado nas Tabelas 17 e 18.

A avaliação individual de cada trabalhador exposto foi realizada na tentativa de identificar alguma correlação entre os testes utilizados e a exposição ao benzeno. Em 50% dos trabalhadores expostos foram observadas dez ou mais células com pelo menos um sinal de fusão e 30% apresentavam valores de leucócitos abaixo dos parâmetros estabelecidos como normais (Tabela 19). Dos trabalhadores avaliados, observamos que todos aqueles com pelo menos 10 fusões, exceto um (E10) também apresentaram células com micronúcleo (Tabela 19). É interessante ressaltar que os indivíduos E14 e E18 não apresentaram células com alteração cromossômica e estavam afastados do trabalho por mais de 20 anos, embora o indivíduo E14 tenha apresentado leucopenia (Tabela 19). Dos seis

trabalhadores com baixos índices de leucócitos, quatro estavam afastados por períodos que variaram de cinco meses a cinco anos

.

Tabela 14: Correlação da idade com a frequência de células normais, células com pelo menos uma fusão, e de células com alterações no número de sinais verdes e/ou vermelhos, identificados pela técnica de FISH, observadas no grupo de expostos ao benzeno e nos controles

Variável	Exposto			Controle			Total		
	Correlação	N	p	Correlação	N	p	Correlação	N	p
Céls. Normais (2VD 2VM)	0,043	19	0,86	0,067	19	0,786	0,001	38	0,995
Céls c/pelo menos 1F	-0,421	19	0,073	-0,113	19	0,644	-0,263	38	0,11
Céls c/alteração de sinal	0,414	19	0,078	-0,018	19	0,942	0,258	38	0,118

Tabela 15: Correlação do tempo de trabalho e afastamento com a frequência de células normais, células com pelo menos uma fusão, e de células com alterações no número de sinais verdes e/ou vermelhos, identificados pela técnica de FISH, observadas no grupo de expostos ao benzeno e nos controles

Variável	Tempo de afastamento			Tempo no trabalho		
	Correlação	N	P	Correlação	N	P
Céls. Normais (2VD 2VM)	-0,223	19	0,357	0,433	19	0,064
Céls c/pelo menos 1F	-0,146	19	0,550	-0,181	19	0,459
Céls c/alteração de sinal	0,025	19	0,919	-0,343	19	0,150

Tabela 16: Distribuição do número de células normais, células com pelo menos uma fusão e células com alteração de sinal no grupo de trabalhadores intoxicados segundo problemas de saúde dos filhos

Variável	Saúde Filhos	Média	DP	Mediana	Mínimo	Máximo	N	p
Céls. Normais (2VD 2VM)	Sem problema	262,88	10,22	265,5	242	272	8	0,342
	Com problema	258,33	8,86	263	244	267	9	
Céls c/pelo menos 1F	Sem problema	3,63	4,14	2	0	10	8	0,005
	Com problema	13,44	7,49	15	5	28	9	
Céls c/alteração de sinal	Sem problema	33,50	10,66	31	25	58	8	0,233
	Com problema	28,22	6,63	29	22	40	9	

Tabela 17: Descrição das medidas segundo o genótipo de CYP1A1 e resultado dos testes comparativos

Variável	CPY1A1	Média	DP	Mediana	Mínimo	Máximo	N	p
CBMN#	Homozigoto selvagem	1,94	2,21	1	0	7	16	0,178
	Heterozigoto com mutação em um dos genes	0,75	1,5	0	0	3	4	
FISH#	Homozigoto selvagem	11,38	9,6	10	0	34	16	0,033
	Heterozigoto com mutação em um dos genes	1,33	1,15	2	0	2	3	
Leucócitos*	Homozigoto selvagem	4,51	1,03	4,46	3,11	6,65	16	0,959
	Heterozigoto com mutação em um dos genes	4,48	0,5	4,45	3,97	5,07	4	
Neutrófilos*	Homozigoto selvagem	2,34	0,79	2,25	1	3,8	16	0,611
	Heterozigoto com mutação em um dos genes	2,55	0,38	2,7	2	2,8	4	
RDW - CV (%)	Homozigoto selvagem	12,94	0,5	12,95	12,3	13,9	16	0,437
	Heterozigoto com mutação em um dos genes	13,43	0,91	13,2	12,7	14,6	4	
RDW - SD (fL)	Homozigoto selvagem	40,51	1,81	40,15	38,1	45,7	16	0,437
	Heterozigoto com mutação em um dos genes	41,65	2,61	40,7	39,7	45,5	4	
VPM (fL)	Homozigoto selvagem	10,49	0,69	10,65	9,4	11,8	16	0,178
	Heterozigoto com mutação em um dos genes	11,15	0,61	11,05	10,6	11,9	4	
Tempo de trabalho	Homozigoto selvagem	18,6	9,65	21	2	34	16	0,82
	Heterozigoto com mutação em um dos genes	15,5	14,66	14,5	2	31	4	

* Resultado do teste t-Student

Resultado do teste Mann-Whitney

Tabela 18: Descrição das medidas segundo o genótipo de *GSTT1* e resultado dos testes comparativos

Variável	<i>GSTT1</i>	Média	DP	Mediana	Mínimo	Máximo	N	p
CBMN#	Deleção	0,40	0,55	0	0	1	5	0,053
	Positivo	2,13	2,26	1	0	7	15	
FISH#	Deleção	9,00	7,87	10	0	18	5	0,964
	Positivo	10,07	10,33	6	0	34	14	
Leucócitos*	Deleção	4,53	0,92	4,18	3,85	6,11	5	0,943
	Positivo	4,50	0,97	4,66	3,11	6,65	15	
Neutrófilos*	Deleção	2,52	0,74	2,50	1,70	3,60	5	0,629
	Positivo	2,33	0,73	2,30	1,00	3,80	15	
RDW - CV (%)	Deleção	13,34	0,80	13,3	12,6	14,6	5	0,445
	Positivo	12,94	0,52	12,9	12,3	13,9	15	
RDW - SD (fL)	Deleção	41,30	2,81	40,9	38,1	45,5	5	0,672
	Positivo	40,55	1,70	40,3	38,5	45,7	15	
VPM (fL)	Deleção	10,72	0,89	10,7	9,4	11,9	5	0,735
	Positivo	10,59	0,68	10,6	9,4	11,8	15	
Tempo de trabalho	Deleção	16,32	12,76	21	2	30	5	0,735
	Positivo	18,53	10,01	21	2	34	15	

* Resultado do teste t-Student
Resultado do teste Mann-Whitney

Tabela 19: Distribuição das idades, dados clínicos (leucócitos) com os testes citogenéticos (CBMN e FISH) nos trabalhadores expostos ao benzeno

Exposto	Idade	CBMN ^a	FISH ^b	Leucócitos	Tempo de trabalho (anos)	Afastamento (anos)
E1	54	2	10	4.36	34	7
E2	56	1	6	4.66	25	3
E3	53	1	4	6.65	27	4
E4	46	1	5	6.11	21	10
E5	47	1	18	3.11*	25	5
E6	48	2	10	4.55	30	5
E7	51	2	6	5.51	21	10
E8	35	1	10	3.27*	6	4
E9	44	8	34	4.07	23	10
E10	49	0	10	4.18	25	6
E11	49	8	17	5.08	24	1
E12	37	1	2	4.32	16	4
E13	45	1	1	3.18*	2	17
E14	52	0	0	3.97*	2	25
E15	52	4	28	5.07	31	12
E16	25	0	2	3.85*	4	0,4
E17	33	4	15	3.53*	10	5
E18	60	0	0	5.18	20	27
E19	62	2	16	4.74	10	24
E20	38	0	-	4.71	4	6
Mean ± DP	46,8 ± 9,32	1,9 ± 2,39	9,79 ± 9,54	6,98 ± 1,85	18 ± 10,41	9,27 ± 7,94

^a Resultados do teste estatístico Mann-Whitney; ^b Resultado do teste estatístico Student T test; DP, desvio padrão; *Índices abaixo do valor de referência estabelecido para leucócitos.

5. DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

Nas últimas décadas, a exposição ocupacional tem representado uma preocupação constante para o setor industrial, uma vez que os trabalhadores são continuamente expostos a uma ampla gama de agentes potencialmente genotóxicos. Por outro lado, o biomonitoramento ambiental e individual representa, nos dias atuais, um instrumento importante na avaliação dos riscos à saúde e na elaboração de estratégias que permitam melhorar as condições de segurança no ambiente de trabalho.

A indústria de refinaria do petróleo, em especial, representa um enorme contingente de trabalhadores, estimado em 500.000, se consideradas as 700 grandes plataformas no mundo. Tanto os operadores de processos como os trabalhadores da manutenção estão expostos a uma variedade de substâncias presentes no petróleo *in natura*, nos fluxos de processo, produtos intermediários, catalisadores, aditivos e produtos finais (Barregard et al., 2009).

O benzeno é considerado carcinogênico com suficiente evidência em estudos experimentais com animais de laboratório e no homem, após exposição ocupacional (WHO, 1993; INCA, 2010), sendo principalmente associado a leucemias.

Os efeitos adversos do benzeno são resultantes principalmente do processo de metabolização que gera quinonas e espécies reativas de oxigênio, com afinidade por macromoléculas, inclusive DNA e proteínas. Como resultado da ação direta dos metabólitos, podem ocorrer danos oxidativos e/ou quebras no DNA. Esse processo de genotoxicidade parece ser o responsável pelos agravos à saúde, como intoxicação crônica, hematotoxicidade e leucemia (Andreoli et al., 1997; Ross et al., 2000). Embora a hipótese mais provável para explicar a ação genotóxica seja a formação de reativos intermediários, polimorfismos em genes de metabolização do benzeno ou de reparo do dano gerado no DNA podem também contribuir de forma significativa (Angelini et al., 2011, 2012). Assim sendo, a identificação dos efeitos biológicos adversos, associados com a caracterização da

suscetibilidade individual, pode modificar a resposta a esses agentes, principalmente no ambiente ocupacional (Angelini et al., 2012).

Na presente investigação, foram utilizados biomarcadores citogenéticos e moleculares para investigar os possíveis efeitos genotóxicos decorrentes da intoxicação ao benzeno em 20 trabalhadores de siderurgias e refinarias de petróleo. Foi observado aumento de três vezes na frequência de células binucleadas com MN e/ou PNPs, e de linfócitos com fusão do gene PML/RAR α nos trabalhadores expostos ao benzeno quando comparados com os controles. Nenhum trabalhador foi diagnosticado com leucemia, entretanto, na presente investigação 30% deles apresentou alterações hematológicas, incluindo leucopenia e neutropenia, mesmo após longos períodos de afastamento da fonte de exposição.

Os trabalhadores avaliados na presente investigação eram provenientes de refinarias de petróleo (60%) e da indústria siderúrgica. O trabalhador da refinaria de petróleo está exposto não só ao benzeno, mas também a uma ampla gama de produtos químicos que variam em razão do tipo de atividade. Dentre os produtos destacam-se os solventes orgânicos como o tolueno, xileno, etilbenzeno, nitrobenzeno, fenol e benzina. Esses compostos podem causar irritação nos olhos, nariz e garganta e ainda provocar náuseas, vertigens, dores de cabeça e redução da força física, sendo classificados, no entanto, como não carcinogênicos para seres humanos (IARC, 1999a, 2012; INCA, 2010). Além destes produtos, os trabalhadores investigados estavam expostos à nafta petroquímica, diesel, gás de coqueria, entre outros, conforme relatado nas entrevistas.

Não existe um consenso sobre quais são os valores seguros para exposição ocupacional ao benzeno, alguns autores consideram que por ser o benzeno uma substância carcinogênica, não há limite de exposição ocupacional seguro (Costa, 2009; Galbraith et al., 2010). Nas refinarias modernas a concentração sugerida deve ser inferior a 3 mg/m³ (0,5 ppm) como recomendado pela ACGIH (2009). Desde 1995, o Brasil tem adotado valores de 1 ppm para a refinaria de petróleo e 2,5 ppm para a indústria de

aço, valores esses estabelecidos unicamente para o funcionamento das indústrias (NR-15/Anexo 13-A).

Na presente investigação, não foram dosados os índices de exposição ao benzeno em nenhum dos locais de trabalho, principalmente porque todos os trabalhadores estavam afastados de suas ocupações na ocasião das entrevistas. A confirmação do diagnóstico clínico de intoxicação serviu de indicação quanto à exposição ao benzeno. Os padrões de exposição para todos os investigados não foram os mesmos, embora a maior parte deles (70%) tenham desenvolvido suas funções na década de 80, quando os níveis de exposição nas indústrias da Baixada Santista, especificamente em Cubatão, variavam de 30 a 40 ppm (Barbosa, 1997).

O diagnóstico clínico de intoxicação por benzeno é baseado não só no relato individual da exposição ocupacional atual e/ou pregressa, como também na série histórica de hemogramas. O Ministério da Saúde (2006) estabeleceu como procedimento, nos casos dos trabalhadores intoxicados por benzeno, o afastamento e o acompanhamento médico, com a finalidade de assegurar a identificação precoce de agravos à saúde, principalmente neoplasias. Embora o quadro clínico de toxicidade se caracterize por uma repercussão orgânica múltipla, o comprometimento da medula óssea é o componente mais frequentemente associado. Os sintomas de astenia, mialgia, sonolência, tontura, e sinais infecciosos de repetição, ocorrem em aproximadamente 60% dos casos. As alterações hematológicas mais relevantes incluem neutropenia, leucopenia, eosinofilia, linfocitopenia, monocitopenia, macrocitose, pontilhado basófilo, pseudo Pelger e plaquetopenia (Ministério da Saúde, 2006).

Embora existam dados convincentes sobre a ação do benzeno nos eritrócitos, leucócitos e plaquetas, ainda não existe um consenso sobre qual elemento figurado do sangue é o mais sensível. Para alguns autores as principais alterações incluem a neutropenia (Qu et al., 2002), para outros a linfocitopenia (Rothman et al., 1996), além de anemia e macrocitose (Collins et al., 1991; Khuder et al., 1999). Outros autores consideraram que a ampla

ação do benzeno, em praticamente todos os subtipos sanguíneos, é um forte indício de toxicidade nas células progenitoras da medula (Lan et al., 2004).

As alterações hematológicas periféricas encontradas em pacientes cronicamente expostos ao benzeno são extremamente variáveis, sendo os danos observados frequentemente associados com exposição ocupacional às altas concentrações de benzeno (Aksoy et al., 1971; Wiwanitkit et al., 2007; Zhang et al., 2011a). Outros estudos parecem indicar que a exposição às baixas concentrações de benzeno (inferiores a 0,05 ppm) não alteram de forma significativa, os diferentes parâmetros hematológicos (Swaen et al., 2010).

Na presente investigação os trabalhadores, mesmo após em média nove anos de afastamento, revelaram alterações hematológicas significantes, 30% deles (6/20) apresentaram índices de leucócitos abaixo do valor de referência, 15% (3/20) no número de neutrófilos e 5% (1/20) nos segmentados, linfócitos e monócitos. Nenhum indivíduo do grupo controle apresentou no leucograma índices abaixo do valor de referência. O valor médio de leucócitos ($4,51 \pm 0,94$; $p < 0,001$), neutrófilos ($2,38 \pm 0,72$; $p < 0,001$), segmentados ($2,34 \pm 0,68$; $p < 0,001$), linfócitos ($1,62 \pm 0,45$; $p = 0,013$) e monócitos ($0,37 \pm 0,15$; $p = 0,010$) observado nos expostos foi inferior ao observado no grupo controle.

Os resultados obtidos parecem ser concordantes com outros estudos publicados inclusive no Brasil, com trabalhadores expostos ao benzeno em siderurgias e pólos petroquímicos da região sudeste (São Paulo, Rio de Janeiro, Minas Gerais e Espírito Santo), do Rio Grande do Sul e da Bahia (Ruiz et al., 1993; Arcuri e Cardoso, 2005; Côrrea, 2008). Nesses estudos os principais achados referem-se a alterações no número de leucócitos, neutrófilos, plaquetas e eritrócitos. Os estudos realizados nas empresas do Complexo Petroquímico de Camaçari Bahia, com 7.356 trabalhadores expostos ao benzeno revelaram 216 indivíduos com valores de leucócitos e neutrófilos abaixo do estabelecido como referência (Miranda et al., 1998). Já os estudos realizados nas indústrias de Cubatão revelaram que a leucopenia por diminuição de neutrófilos foi a alteração hematológica mais

frequentemente encontrada (Ruiz, 1993). Além da neutropenia, a leucopenia nesses pacientes ocorreu também por redução global de todos os leucócitos ou, mais raramente, por linfocitopenia (Ruiz, 1989).

Outros índices avaliados, como o volume plaquetário médio, também se mostraram alterados nos trabalhadores expostos ao benzeno quando comparados ao grupo controle ($p < 0,001$). Por outro lado, não houve alteração no número de plaquetas. Aparentemente não existem muitos estudos que associam o volume plaquetário médio à exposição ao benzeno, apesar de os efeitos tóxicos do benzeno no sistema hematopoiético ser descritos por mais de um século (Lan et al., 2006). Os índices observados para VPM parecem não ser um valor recorrente em outros relatos de trabalhadores expostos ao benzeno (Ruiz et al., 1993; Ward et al., 1996) embora tenha sido também observado na literatura (Pesatori et al., 2009; Schnatter et al., 2010). Esses achados devem ser analisados com cautela pois, no presente estudo os trabalhadores revelaram valores de VPM dentro do limite normal de referência para a população masculina adulta enquanto cinco indivíduos controles apresentaram índices de VPM alterados (acima dos valores de referência).

Estudos de acompanhamento dos indivíduos expostos ou com diagnóstico de intoxicação pelo benzeno não são muito frequentes na literatura; poucos foram capazes de avaliar os parâmetros hematológicos de expostos ao benzeno e de acompanhá-los por um longo período, a fim de determinar as doenças subsequentes à exposição, como por exemplo, a anemia aplástica e leucemia (Bogadi-Sare et al., 2003). No entanto, pouco se sabe sobre quais efeitos hematológicos são mais suscetíveis em conduzir a doenças permanentes e graves, o que implica no acompanhamento por longos períodos dos trabalhadores que possuem diagnóstico de intoxicação pelo benzeno.

Em alguns casos, ocorre à reversão do quadro hematológico após um período de afastamento (Ruiz, 1989) embora a “normalidade” do quadro hematimétrico não deva ser considerada cura, pois ainda existe a possibilidade de evolução para hemopatias malignas ou anemia aplástica

tardia (Ministério da Saúde, 2006). Alguns autores sugerem que nas alterações histológicas da medula óssea há necessidade de pelo menos cinco anos de afastamento da fonte de exposição, para se observar ação reparadora dos danos ocorridos (Wan et al., 2002; Augusto et al., 2005).

Os trabalhadores expostos ao benzeno, avaliados neste estudo, também revelaram alterações significantes somente em relação ao tamanho dos glóbulos vermelhos e não no número de eritrócitos. O RDW (Red Cell Distribution Width) é um índice que indica a anisocitose (variação de tamanho) das hemácias, analisado eletronicamente pela variação de pulsos obtidos durante a leitura. O índice de anisocitose se altera precocemente na deficiência de ferro, mesmo antes da alteração de outros parâmetros, como a alteração do VCM e a diminuição da Hemoglobina (Grotto, 2008). Embora esses parâmetros hematológicos sejam importantes na caracterização de populações expostas ao benzeno, deve ser levado em consideração o tipo de análise realizada. Existe variabilidade entre os analisadores hematológicos automatizados, o que dificulta a interpretação dos parâmetros utilizados nas publicações. Outros fatores como o tipo de tecnologia utilizada, efeito dos anticoagulantes, temperatura e tempo de estocagem do material, também podem interferir na determinação destes valores (Gulati et al., 2002; Kakkar e Garg, 2005).

Na presente investigação os resultados obtidos devem ser interpretados com cautela em decorrência do tamanho das amostras estudadas e dos controles utilizados. O grupo controle foi primeiramente selecionado com base na idade e sexo, e deveria ser coletado no mesmo dia do caso investigado. Por esta razão, ao final foram incluídos um mecânico e três motoristas de ônibus, que trabalhavam na cidade de São Paulo. A inclusão de uma amostra maior de trabalhadores expostos e de controles seria fundamental para uma melhor avaliação, principalmente dos parâmetros hematológicos.

Os riscos da exposição ao benzeno parecem se estender também aos descendentes biológicos destes trabalhadores (Savitz et al., 1989). Em geral

as principais queixas referem-se a abortos espontâneos e baixo peso dos filhos ao nascimento.

Na presente investigação, verificou-se nas famílias dos trabalhadores expostos um caso de cardiopatia congênita, que resultou em óbito da criança aos 11 meses de idade; outro caso de um pai que relatou ter perdido três dos seus cinco filhos logo após o nascimento, e outro de um trabalhador com dois filhos com a Síndrome de Asperger (síndrome de espectro autista, que se diferencia o autismo por não comportar atraso ou retardo global no desenvolvimento cognitivo ou da linguagem do indivíduo), em comparação a apenas um dos controles, que relatou rinite em um de seus filhos. As demais queixas em relação a problemas de saúde dos filhos, no grupo exposto, foram relativas a problemas alérgicos. Embora este tipo de informação muitas vezes seja de difícil compreensão e resposta, principalmente quando formulada ao pai e não à mãe, também foram avaliados casos de abortos espontâneos e induzidos para ambos os grupos.

No grupo exposto foi informada a ocorrência de quatro abortos espontâneos, todos no primeiro trimestre de gestação, embora essa frequência não tenha sido estatisticamente diferente da observada no grupo controle, onde foram relatados quatro casos de abortos, sendo dois espontâneos e dois induzidos. Aumento na frequência de aborto espontâneo, por exposição paterna ao benzeno, foi relatado na literatura, principalmente em populações da China (Lindbohm et al., 1991). Outro estudo revelou aumento de 2,5 vezes no risco de aborto espontâneo para mulheres que estavam expostas ao benzeno em uma indústria petroquímica da China (Xu et al., 1998).

Um dos mecanismos provavelmente associado com o risco de aborto seria o aumento da não disjunção cromossômica nos espermatozoides (Crow, 2000). Em estudo realizado na China, com 33 trabalhadores expostos ao benzeno, os autores verificaram associação do benzeno, em baixas doses (1 ppm), com a dissomia dos cromossomos X e Y e dos cromossomos 1 e 21, além de deleções no braço curto do cromossomo 1, em espermatozoides de trabalhadores expostos (Xing et al., 2010). Marchetti e

colaboradores (2012) sugeriram que a exposição ocupacional ao benzeno pode estar associada ao aumento da incidência de espermatozóides anormais, devido a rearranjos cromossômicos (duplicações e deleções do cromossomo 1) em células-tronco de espermatogônias.

Nem todo trabalhador exposto responde da mesma forma quanto aos possíveis efeitos genotóxicos, isso pode ocorrer devido a polimorfismos em genes de metabolização e detoxificação do benzeno na medula óssea, assim como em genes de metabolização de xenobióticos da fase I e da fase II envolvidos na metabolização do benzeno no fígado.

Na presente investigação, não foram observadas diferenças estatisticamente significantes entre os grupos quando as frequências de polimorfismos nos genes de metabolização xenobióticos da fase I (*CYP2E1* e *CYP1A1*) e da fase II (*GSTM1* e *GSTT1*), assim como polimorfismos em genes de metabolização e de detoxificação de metabólitos do benzeno (*MPO* e *NQO1*) foram avaliados.

Estudos prévios têm demonstrado que a toxicidade do benzeno pode resultar principalmente de seus metabólitos tóxicos (Snyder, 2000; Ross, 2000). Polimorfismos genéticos nos genes que codificam enzimas envolvidas na ativação ou detoxificação do benzeno podem ser responsáveis pela suscetibilidade humana à intoxicação pelo benzeno, isto se deve provavelmente a modificação da atividade enzimática que conseqüentemente pode alterar a capacidade de metabolizar o benzeno (Shou-Yong et al., 2007).

A mieloperoxidase, enzima responsável pela transformação dos metabólitos intermediários do benzeno em quinonas tóxicas, pode alterar também a formação de adutos de DNA e proteínas, além da produção de espécies reativas de oxigênio (Zhang et al., 2007). Assim como, a detoxificação das quinonas pode ocorrer via *NQO1* ou via enzimas da fase II de metabolização de xenobióticos como as *GSTs*, resultando em produtos menos tóxicos como as diidroquinonas (Ross et al., 2000). Outras enzimas de metabolização, incluindo *CYP1A1*, *CYP1A2*, *CYP1B1* e epóxido hidrolase solúvel (*sEH*; *EPHX2*), podem converter o benzeno e seus metabólitos, no

fígado, em outros metabólitos intermediários, que também podem contribuir para a toxicidade do benzeno (Sun et al., 2008).

Em um estudo realizado na China com 156 trabalhadores com diagnóstico de intoxicação pelo benzeno e, 152 trabalhadores que se encontravam expostos ao benzeno, os autores verificaram que os trabalhadores fumantes e consumidores de bebidas alcoólicas, com polimorfismo no gene *NQO1* em homozigose (609 T/T) tinham risco 8 vezes maior de intoxicação pelo benzeno. Também foi verificada uma suscetibilidade maior aos efeitos tóxicos do benzeno nos indivíduos com polimorfismo *CYP2E1* e genótipo *GSTT1* nulo (Wan et al., 2002). Esses resultados em relação ao *NQO1* não foram confirmados em trabalho semelhante, também realizado na China (Sun et al., 2008). Entretanto, Chen e colaboradores (2007) observaram que em 100 trabalhadores com diagnóstico de intoxicação pelo benzeno e 90 trabalhadores expostos ao benzeno, somente nos intoxicados houve um aumento de 2,8 vezes no risco de intoxicação nos indivíduos com o gene *NQO1* em homozigose (609 T/T) comparado aqueles que carregavam o genótipo mutado (T/T) e o selvagem (C/C). Além disso, também foi relatado que os indivíduos com o genótipo *GSTT1* nulo apresentavam um aumento de 1,9 vezes no risco de intoxicação pelo benzeno.

Trabalhos realizados por Carrieri e colaboradores (2011) indicaram que a excreção de metabólitos do benzeno como o ácido S-fenil mercaptúrico (S-PMA), em trabalhadores que estavam expostos a baixos níveis de benzeno, pode ser influenciada pelo consumo de tabaco e presença do genótipo *GSTT1* nulo. Resultados semelhantes foram observados com mais de 300 trabalhadores de um pólo petroquímico na Itália, não só em relação ao *GSTT1* nulo como também ao *GSTM1* nulo. Os dois autores sugeriram a utilização destes polimorfismos como marcadores de suscetibilidade individual ao benzeno (Mansi et al., 2011).

No presente estudo, foram observadas diferentes distribuições na frequência de *GSTT1* nulo entre os indivíduos expostos (25%) e o grupo controle (10%). O grupo controle revelou frequência duas vezes maior de

GSTM1 nulo (40%) quando comparado ao grupo exposto (20%), embora esses dados não tenham sido considerados estatisticamente significantes, dados da população residente em São Paulo com 594 indivíduos, oriundos de diferentes regiões do Brasil, revelaram frequência de 23% *GSTT1* nulo e 44% de *GSTM1* nulo (Kato et al., 2004). Estudos realizados por Lima e colaboradores (2009) em 55 pacientes com neutropenia por exposição ao benzeno versus 330 indivíduos controles demonstraram que a distribuição dos genes *GSTM1* nulo e *GSTT1* nulo foram similares em ambos os grupos.

O polimorfismo de G > A no locus 463 do gene *MPO* diminui a atividade enzimática pela perda do sítio de ligação ao fator de transcrição (Piedrafita et al., 1996; Williams, 2001; Kiyohara et al., 2005). A frequência do alelo A no gene *MPO* varia em cada população, tendo sido descrita em 23,4% dos Caucasianos e 14,4% dos asiáticos (Kiyohara et al., 2005). O genótipo variante de *MPO* 463 G > A tem sido associado ao risco reduzido de se desenvolver leucemia aguda, capacidade que é frequentemente atribuída à ativação diminuída dos carcinógenos por esta variante (Zhang et al., 2007). Na presente investigação, não foram encontradas diferenças entre os grupos avaliados. Esse achado corrobora com dados encontrados em outros estudos (Wan et al., 2002; Kim et al., 2008; Sun et al., 2008).

O polimorfismo do gene de metabolização de fase I *CYP1A1*, cuja variante é observada em 15% da população caucasóide (Gonçalves et al., 2011), foi encontrado com maior frequência no grupo de trabalhadores expostos em comparação ao grupo controle, embora essa diferença não tenha sido estatisticamente significativa. Principalmente em decorrência do tamanho das amostras estudadas, não foi observada diferença estatisticamente significativa quando comparados os dois grupos, em relação a todos os polimorfismos genéticos estudados.

Apesar de não ter sido avaliada na presente investigação, a expressão de genes de reparo do DNA poderia explicar a menor frequência dos alelos desfavoráveis no grupo exposto em comparação com o grupo controle como sugerido em outros estudos da literatura (Kiyohara et al., 2005; Kim et al., 2008).

Recentemente, a associação dos polimorfismos em genes de reparo do DNA, assim como o gene xeroderma pigmentoso (*XPD*), com diversos tipos de câncer tem sido estudada (Duell et al., 2001; Chen et al., 2002). Acredita-se que os mecanismos de reparo do DNA também desempenham um papel importante na toxicidade do benzeno. Em particular, o comprometimento do reparo no DNA pode aumentar a suscetibilidade à indução de danos ao DNA pelo benzeno. O mecanismo responsável pela remoção do benzeno que induz dano ao DNA ainda é desconhecido. Entretanto, as vias de reparo por excisão de base são consideradas altamente relevantes para a remoção das lesões geradas ao DNA pelos metabólitos do benzeno (fenol e quinonas) – (Duell et al., 2000; Chanvaivit, 2007).

Na presente investigação também foram avaliados o efeito dos polimorfismos nos genes de metabolização de fase I e de fase II, sobre a frequência de MN e PNPs. Entretanto, nenhum dos polimorfismos nos genes de metabolização avaliados foi significativamente associado a essa frequência, provavelmente em decorrência do tamanho das amostras estudadas. Embora aparentemente não existam estudos que associem a frequência de MN e PNPs aos polimorfismos genéticos, em trabalhadores refinarias ou siderurgias, intoxicados pelo benzeno, a avaliação de guardas de trânsito na Itália não revelou associação entre a frequência de MN e de polimorfismos em genes de reparo do DNA, tais como *APEX1*, *hOGG1*, *NBS1*, *XPD*, *XRCC1*, e *XRCC3* (Angelini et al., 2012).

5.1 Avaliação citogenética

A frequência de aberrações cromossômicas em linfócitos do sangue periférico tem sido utilizada nas últimas décadas como biomarcador de efeito precoce para avaliação de substâncias cancerígenas genotóxicas, tanto para exposições ocupacionais quanto ambientais (Albertini et al., 2000; Bonassi et al., 2005). As aberrações cromossômicas nos linfócitos podem ser representativas de alterações específicas em tecidos alvo da carcinogênese.

Os linfócitos, por circularem por todo o corpo estão expostos a diferentes agentes, independentemente da via de entrada (oral, cutânea, nasal), e uma pequena fração deles pode sobreviver por um longo período de tempo (> 1 ano) e manifestar os danos ocorridos no DNA (Smith e Zhang, 1998b). Desta forma, a quantidade de dano observado nos linfócitos pode refletir possíveis riscos em tecidos mais propensos (Bonassi et al., 2005; Norppa et al., 2006).

Estudos epidemiológicos indicaram que a frequência de AC foi maior nos linfócitos do sangue periférico de trabalhadores expostos a agentes genotóxicos, sugerindo que esta avaliação pode ser preditiva do aumento do risco de câncer. Uma possível explicação para esses achados pode estar relacionada à influência que a instabilidade genética e a suscetibilidade individual desempenham na determinação da associação entre as aberrações cromossômicas e o câncer (Norppa et al., 2004, 2006).

Dados da literatura indicaram correlação entre a exposição a altos níveis de benzeno (>10 ppm) e o aumento na frequência de aberrações cromossômicas, avaliados em linfócitos do sangue periférico e células da medula óssea de trabalhadores expostos (Bogadi-Sare et al., 1997; Zhang et al., 2002). O benzeno é um agente clastogênico cujo efeito parece estar associado com a formação de adutos de DNA, danos oxidativos e inibição da topoisomerase II (Whysner et al., 2004). Tem sido relatado na literatura que o benzeno pode gerar aumento de aberrações cromossômicas em linfócitos do sangue periférico sendo que, a detecção poderia servir como marcador de efeito na avaliação da exposição (Zhang et al., 2002).

Em geral, as alterações genéticas induzidas pelo benzeno incluem as aneuploidias, deleções e translocações. O benzeno e seus metabólitos (1,2,4-benzotriol) são conhecidos por causar alterações citogenéticas em cromossomos específicos, especialmente os cromossomos do grupo C e o cromossomo X, em seres humanos (Milteman et al., 1978, 1981; Crane et al., 1989). Outros autores verificaram que metabólitos tóxicos do benzeno como a hidroquinona, também são capazes de induzir aberrações cromossômicas estruturais e numéricas em trabalhadores expostos ao benzeno (Eastmond et al., 1994). Os estudos *in vitro* demonstraram que a

hidroquinona pode causar perdas cromossômicas específicas (monossomias 5, 7 e 8) em células da linhagem de linfoblastos humanos (Stillman et al., 1997) e células CD34 + da medula óssea quando comparados com linfócitos do sangue periférico (Stillman et al., 2000).

Outro teste informativo quanto à frequência de quebras no DNA e de erros no processo de disjunção dos cromossomos na mitose, é o teste do micronúcleo com bloqueio da citocinese. Este teste vem sendo utilizado como um biomarcador de eventos genotóxicos e de instabilidade cromossômica, desde que permite incluir alterações nucleares como pontes nucleoplasmáticas e brotos nucleares (Fenech et al., 2011a).

A hipótese de associação da frequência de MN, em diferentes tecidos como preditivo do risco de câncer encontra subsídios em estudos realizados em pacientes com câncer que apresentaram maior frequência de MN em comparação aos indivíduos controles (Duffaud et al., 1997; Murgia et al., 2008).

Na presente investigação a análise de linfócitos binucleados do sangue periférico do grupo exposto revelou o triplo da frequência de células com MN e PNPs quando comparado ao grupo controle, sendo a diferença considerada estatisticamente significativa ($p=0,024$). As células com PNPs foram incluídas na análise final primeiro porque foram observadas somente no grupo exposto, segundo porque as PNPs representam a formação de cromossomos dicêntricos e de anéis cromossômicos nas células binucleadas durante a anáfase e terceiro porque estudos realizados com trabalhadores expostos ao benzeno revelaram alterações cromossômicas compatíveis com a formação de PNPs (Forni, 1996; Zhang et al., 2002),

Os resultados obtidos são em parte concordantes com dados da literatura, embora ainda não exista um consenso, pois variáveis que incluem histórico de exposição, tipo de ocupação e tempo de trabalho podem influenciar nas frequências de MN observadas.

Basso e colaboradores (2011) demonstraram que trabalhadores expostos ao benzeno e que estavam na ativa, no momento da pesquisa em refinarias de petróleo, revelaram aumento na frequência de MN quando

comparados com controles. Por outro lado, o aumento na frequência de células com MN em trabalhadores expostos ao benzeno só foi observado por outros autores quando o tempo de exposição foi superior a 19 anos (Roma-Torres et al., 2006), embora esse resultado seja questionável pois na divisão dos grupos o maior contingente de trabalhadores (32) encontravam-se no grupo de expostos há 19 anos.

A análise do MN também foi realizada em outro tipo de trabalhador exposto ao benzeno como frentistas e policiais de trânsito. Pesquisas realizadas com policiais de trânsito expostos ao benzeno, não revelaram aumento na frequência de MN em trabalhadores das cidades de Genova (Bolognesi et al., 1997) e Roma (Leopardi et al., 2003). Outros autores observaram aumento na frequência de MN e PNPs em linfócitos do sangue periférico de frentistas quando comparados aos controles (Rekhadevi et al., 2010). A avaliação dos danos gerados ao material genético por agentes como o benzeno também pode ser realizada por meio do teste de CBMN em células da mucosa oral ou em outros tipos de células esfoliativas (Fenech et al., 2011b; Bonassi et al., 2011). Apesar de também não existir um consenso sobre a frequência de MN em amostras de células da mucosa oral e/ou células esfoliativas em avaliações de trabalhadores expostos ao benzeno, alguns estudos demonstraram aumento significativo na frequência de células com MN em trabalhadores expostos nas refinarias de petróleo, quando comparados aos controles (Celik et al., 2003; Singaraju et al., 2012). Outros estudos, em nossa população, revelaram aumento na frequência de MN entre frentistas expostos ao metanol, etanol e gasolina quando comparados ao grupo controle (Gattás et al., 2001).

No presente estudo, os trabalhadores expostos ao benzeno relataram ter exercido diferentes funções por períodos que variaram de dois a 34 anos (média $18,15 \pm 10$ anos). Os tempos de trabalho e de afastamento não alteraram a frequência de células com MN e PNPs observadas, embora 50% dos trabalhadores estudados tenham desenvolvido funções semelhantes na refinaria de petróleo, por períodos que variaram de 20 a 29 anos.

Diferentes fatores inerentes às populações estudadas, além da exposição ao benzeno, podem influenciar nas frequências de MN como, por exemplo, o sexo, a idade, o consumo de tabaco, o uso abusivo de bebidas alcoólicas, uso de drogas e/ou medicamentos, entre outros (Fenech e Bonassi, 2011c).

Na presente investigação os grupos estudados eram bastante semelhantes quanto à idade, sexo e hábitos de consumo de tabaco e álcool. Tanto o grupo de trabalhadores expostos quanto o grupo controle eram do sexo masculino, principalmente pelo tipo de função exercida. Sendo assim, a variável sexo não pode ser considerada, embora alguns autores relatem frequências aumentadas de MN em populações femininas (Fenech, 1998; Bonassi et al, 2001).

A variável idade também não alterou a frequência de células com MN e PNPs, pois os grupos selecionados para estudo possuíam idades bastante semelhantes (média de $46,8 \pm 9,33$; $p=0,68$). Tem sido postulado que o efeito da idade pode refletir um aumento progressivo na instabilidade cromossômica, associada com o acúmulo de danos no DNA, devido também à diminuição da capacidade de reparo do DNA (Barnett e King, 1995). O efeito também pode ser atribuído ao aumento de perda de cromossomos durante o envelhecimento (Fenech, 1998). Além disso, outros possíveis fatores intervenientes como consumo de tabaco, álcool, drogas, e medicamentos também não alteraram de forma significativa as frequências de MN observadas.

O benzeno e seus metabólitos tóxicos podem gerar não somente células com MN como também células com aberrações cromossômicas em trabalhadores cronicamente expostos (Bogardi-Sare et al., 1997; Zhang et al., 2002), incluindo aberrações cromossômicas frequentemente observadas na leucemia mielóide aguda (McHale et al., 2012).

A associação da exposição ao benzeno e o risco de leucemia foi primeiramente descrito em 1928 (Delore e Borgomano, 1928). Entretanto, foi somente em 1970 que estudos epidemiológicos, realizados na Itália e na Turquia, demonstraram a associação da exposição pelo benzeno com a

LMA (Vigliani e Saita, 1964; Vigliani e Forni, 1976; Aksoy, 1971 e 1989). É interessante ressaltar que os principais estudos epidemiológicos foram realizados na China e servem como referência até os dias atuais (Hayes et al., 1997; Glass et al., 2005). Os resultados desses estudos demonstraram que o principal fator associado ao diagnóstico de leucemia, em pacientes internados era o histórico anterior de intoxicação crônica por benzeno (Yin et al., 1987; Hayes et al., 2000).

Diferentes estudos relacionaram a ocorrência do aumento de aberrações cromossômicas em pacientes com leucemia à exposição pelo benzeno por meio de testes citogenéticos clássicos (Zhang et al., 2002). As aberrações cromossômicas frequentemente observadas referiam-se às aneuploidias dos cromossomos do grupo C, como perda do cromossomo 7 e ganho dos cromossomos 8 e 9 (Zhang et al., 1999).

Alguns autores relataram casos isolados da translocação envolvendo o gene LLM, t(4;11)(q21;q23), característico da leucemia linfóide aguda (Solé et al., 1990). As translocações entre os cromossomos 8 e 21, também foram associadas à exposição ao benzeno em trabalhadores expostos em fábricas da China, a níveis que variaram de 1 a ≥ 25 ppm (Smith et al., 1998a). Casos isolados, descritos em um artigo de revisão também corroboram para esta associação entre benzeno e leucemia (Galbraith et al., 2010).

Além das translocações, os estudos citogenéticos parecem indicar um aumento na frequência de ploidias e deleções de cromossomos específicos em linfócitos do sangue periférico de trabalhadores expostos ao benzeno nas fábricas chinesas, assim como del(5q), del(7q), monossomias e trissomias do cromossomo 7 (Zhang et al., 1998a), aparentemente, não há explicação para a observação deste fenômeno nos linfócitos do sangue periférico dos trabalhadores expostos ao benzeno.

No Brasil, o primeiro relato de morte com diagnóstico de leucemia associado ao benzeno ocorreu em 1984, com um funcionário da COSIPA (Augusto, 1991). Posteriormente, em 1990, faleceu um médico com quadro de aplasia de medula, e um trabalhador de leucemia mielóide crônica,

ambos do Complexo Petroquímico de Camaçari. Somente em 2004, há relatos de um trabalhador da RPBC que faleceu com um quadro de LMA (Costa, 2009). Os dados no Brasil são contrastantes em relação aos estudos conduzidos principalmente na China, Turquia, Estados Unidos e Europa que começaram a documentar o histórico de exposição ao benzeno a partir de aproximadamente 1950.

Conforme anteriormente mencionado, a leucemia mielóide aguda é uma das principais consequências clínicas da exposição crônica ao benzeno. Esse tipo de leucemia é frequentemente caracterizada pela presença de aberrações cromossômicas numéricas nos cromossomos 5, 7 e 8 ou de translocações entre os cromossomos 8 e 21, e entre os cromossomos 15 e 17, nas células da medula óssea (Pedersen-Bjergaard e Rowley, 1994; Forni, 1996; Smith et al., 1998 a,b). As alterações cromossômicas geradas parecem conferir vantagens na proliferação celular, resistência na diferenciação, bem como melhor sobrevivência à apoptose, transformando o clone maligno, de origem mielóide, em um tipo de glóbulo branco dominante no sangue e na medula óssea (Irons et al., 1996; Russel, 1997).

Entre as leucemias mielóides agudas, a leucemia promielocítica aguda (LPA) é um subgrupo com achados biológicos e clínicos peculiares. Está associada à síndrome hemorrágica que já era conhecida por hematologistas franceses desde 1949. Entretanto, foi somente em 1957, que Hillestad a descreveu como um subtipo distinto de LMA, caracterizada pela presença de promielócitos, hipofibrinogenemia (diminuição da taxa de fibrinogênio no sangue) e hemorragia. Ocorre em aproximadamente 10 a 15% dos adultos com diagnóstico de LMA e com idade média de 40 anos (Löwenberg et al., 2003).

A LPA caracteriza-se geneticamente por alterações cromossômicas estruturais recorrentes, em sua maioria translocações, envolvendo o locus gênico para o receptor alfa do ácido retinóico (*RARα*), localizado no braço longo do cromossomo 17 (17q21), levando a formação de genes quiméricos e oncoproteínas de fusão (Zhou et al., 2005). Aproximadamente 98% dos

casos apresentam a translocação cromossômica recíproca $t(15;17)(q22;q21)$ entre o locus gênico para o *PML*, localizado no braço longo do cromossomo 15 (15q22), e o locus gênico para o receptor alfa do ácido retinóico (*RAR α*), localizado no braço longo do cromossomo 17 (17q21), levando a formação de dois genes híbridos: *PML-RAR α* , localizado no derivativo do cromossomo 15 [der(15)], e o *RAR α -PML*, localizado no derivativo do cromossomo 17 [der(17)]. O transcrito de fusão *PML-RAR α* pode ser detectado em 100% dos pacientes com a $t(15;17)$, enquanto o recíproco *RAR α -PML* pode estar ausente em 10% a 20% desses casos (Grimwade et al., 2000; Zhou et al., 2005).

Em aproximadamente 30% a 40% dos indivíduos com a LPA são observadas outras alterações citogenéticas adicionais a $t(15;17)$, sendo as mais frequentes: trissomia do cromossomo 8, anormalidades estruturais no cromossomo 9, trissomia do cromossomo 21, isocromossomo no braço longo do cromossomo 17. Entretanto, o papel dessas alterações cromossômicas adicionais no prognóstico da doença não está claro (Xu et al., 2001; Wan et al., 2003), em aproximadamente 2% dos casos o gene *RAR α* pode estar fusionado a outros genes que não o *PML*, formando proteínas de fusão, conhecidas como X- *RAR α* , resultado de alterações estruturais, em sua maioria translocações alternativas, envolvendo o locus gênico para o *RAR α* no cromossomo 17q21 e não o locus gênico para o *PML* (Grimwade et al., 2000).

O diagnóstico da LPA pode ser realizado por meio de diversos métodos laboratoriais, tais como: hemograma, mielograma, biópsia de medula óssea, citometria de fluxo, imunofluorescência com anticorpos anti-*PML*, citogenética convencional e molecular (FISH), além de RT-PCR. De modo simplificado, o hemograma deve evidenciar a pancitopenia e em alguns casos a leucocitose (Jácomo et al., 2008). As lâminas com amostras de sangue periférico apresentam blastos com morfologia de promielócitos; o mielograma evidencia infiltração maciça de promielócitos neoplásicos que se coram fortemente a reação da mieloperoxidase e ao Sudan Black; a citometria de fluxo revela blastos com elevada autofluorescência com padrão

imunofenotípico distinto; já as técnicas de citogenética e biologia molecular permitem visualizar alterações genéticas e translocações características da doença, anteriormente descritas e, por fim, a imunofluorescência com anticorpos anti-PML permite observar a redistribuição subcelular da proteína PML (Lo-Coco e Ammatuna, 2006; Jácomo et al., 2008).

Na presente investigação foi pesquisada a presença da t(15;17) associada à LMA-M3 (LPA) em linfócitos do sangue periférico, principalmente por se tratar de um subtipo que vem sendo associado à exposição ao benzeno e que foi identificado em um dos trabalhadores que fazia parte deste grupo, funcionário da RPBC, que veio a falecer da doença antes do início desta pesquisa.

Nenhum trabalhador avaliado no presente estudo fez biópsia da medula ou foi diagnosticado com LMA, incluindo o subtipo LPA. A pesquisa da t(15;17) em linfócitos de sangue periférico, pela técnica de FISH, revelou aumento de três vezes na frequência de células com pelo menos uma fusão, no grupo de trabalhadores expostos ao benzeno quando comparados aos controles ($p=0,019$). Foram observadas 186 células no grupo de trabalhadores expostos ao benzeno com pelo menos uma fusão, em comparação com 75 células no grupo controle.

Apesar de não ter sido observado nos linfócitos do sangue periférico a translocação recíproca que caracteriza a LPA, a presença de células com pelo menos uma fusão foi mais frequente nos linfócitos dos trabalhadores expostos do que no controle, variando de zero a 11% no grupo de trabalhadores expostos e no máximo até 3% no grupo controle. Além disso, dois trabalhadores intoxicados pelo benzeno, ambos da RPBC (E8 e E12) apresentaram 11% e 10% de células com fusão, respectivamente.

Os mecanismos por meio dos quais os trabalhadores intoxicados pelo benzeno apresentaram frequências aumentadas de t(15;17) ainda não estão claros. Entretanto, alguns estudos sugeriram que para desenvolver leucemia, os metabólitos tóxicos do benzeno provavelmente causam mutação em um gene específico ou em um conjunto de genes que estão relacionados à proliferação e diferenciação das células tronco humanas, por

meio de aberrações cromossômicas (aneuploidias, translocações, inversões e deleções), de alterações epigenéticas e de mutações gênicas (Smith et al., 2010).

Um possível mecanismo pode estar relacionado aos efeitos dos metabólitos do benzeno sobre a inibição da topoisomerase II (Chen e Eastmond, 1995), uma vez que pacientes portadores de LMA, com t(21q22), t(15;17) e t(16;16), relataram ter sido submetidos a tratamento com medicamentos que inibem a topoisomerase II (Mistry et al., 2005; Pedersen-Bjergaard et al., 2007; McHale et al., 2012). De fato, o aumento na inibição da funcionalidade de topo II e o aumento das quebras no DNA, foram associadas à exposição pelo benzeno *in vivo* (Eastmond et al., 2001) e aos metabólitos hidroquinona e benzoquinona *in vitro*, todas elas avaliadas em ratos (Lindsey et al., 2004, 2005). Outra possível interpretação está relacionada à posição desses dois cromossomos no núcleo das células. Tem sido sugerido que as translocações cromossômicas recíprocas em células malignas, estão localizadas fisicamente próximas das regiões promotoras e de locais estruturais específicos da cromatina, essa localização faz com que eles se tornem mais suscetíveis a quebras e rearranjos (Misteli, 2011). Os genes *PML* e *RARA*, na leucemia promielocítica aguda, estão em estreita proximidade em fases específicas do ciclo celular nas células hematopoéticas de diferentes linhagens e estágios de diferenciação (Neves et al., 1999). Aparentemente, a disposição dos cromossomos pode ser alterada em decorrência do tipo celular, dos diferentes momentos da diferenciação ou até mesmo na presença de doenças, como por exemplo, o câncer (Meaburn e Misteli, 2007; Misteli, 2011). Além disso, a localização espacial dos cromossomos também parece influenciar a ativação ou não de genes específicos (Lanctôt et al., 2007). Um exemplo da importância deste fenômeno foi visto nos glóbulos brancos onde o cromossomo 18 geralmente se encontra próximo à membrana nuclear, enquanto que o cromossomo 19 ocupa preferencialmente a posição central. Essa tendência de cada cromossomo, de se localizar com maior proximidade ou distância da

membrana nuclear pode facilitar, ou não, rearranjos específicos entre eles (Misteli, 2011).

Pesquisas que avaliam a frequência de translocações em linfócitos de sangue periférico de trabalhadores expostos ao benzeno vêm sendo descritas na literatura e sua utilização no biomonitoramento sugerida. A $t(8;21)$, frequente na leucemia mieloide aguda, foi avaliada em linfócitos de 43 trabalhadores de diversas fábricas na China expostos ao benzeno, pela técnica de coloração dos respectivos cromossomos por FISH. Foi observado aumento de 15 vezes na frequência de translocação, associado ao grau de exposição, quando comparado com o grupo controle ($p < 0,0001$). Somente em um dos trabalhadores, com maior nível de exposição ao benzeno, foi detectada a translocação recíproca (Smith et al., 1998a). Posteriormente, nesse mesmo grupo foi identificada a $t(14;18)$ e, embora as translocações envolvendo o cromossomo 11 não tenham sido observadas, esse fato não exclui a possibilidade de outros rearranjos no gene MLL, presente na região 11q23 (Zhang et al., 2007).

Considerando-se o risco elevado da leucemia mieloide aguda e de linfomas em populações expostas ao benzeno, outros autores realizaram a pesquisa das translocações $t(8;21)$, $t(15;17)$, e $t(14;18)$ por técnicas moleculares como PCR em tempo real (McHale et al., 2008). Trabalhadores chineses expostos ao benzeno apresentaram frequência menor de células com $t(14;18)$ quando comparados com controles, onde somente 16% dos expostos apresentou 10 ou mais cópias desta translocação. Os autores sugerem que esta diminuição pode estar associada com a toxicidade a linfócitos B circulantes, embora a mesma seja frequente na população normal (Roulland et al., 2006). Entretanto, o aumento na frequência de fusões e/ou translocações em linfócitos de sangue periférico parece ser um fenômeno que ocorre também em populações não expostas aos agentes genotóxicos (Janz et al., 2003). A $t(15;17)$ estudada na presente investigação, também foi avaliada neste estudo, sendo detectada somente em dois indivíduos, um caso e outro controle (McHale et al., 2008).

A exposição ao benzeno tem sido associada às doenças hematológicas, especialmente as leucemias mielóides agudas. O mecanismo por meio do qual o benzeno induz a efeitos tóxicos nas células progenitoras hematopoiéticas ainda não é bem entendido. Entretanto, por meio de seus metabólitos tóxicos, o benzeno pode gerar diversas alterações que contribuem para o processo leucemogênico. Assim, para avaliar o risco e propor a utilização de marcadores adicionais, que possam auxiliar tanto na compreensão do mecanismo quanto na promoção da saúde, são necessários testes adicionais ao hemograma, (atualmente único teste utilizado para diagnosticar e acompanhar trabalhadores expostos no Brasil), como por exemplo, os testes de CBMN e FISH. Esses testes são capazes de detectar de maneira precoce, alterações no DNA servindo como importantes biomarcadores para a avaliação do risco de leucemias durante e após a exposição ao benzeno.

Na presente investigação, os efeitos citogenéticos observados foram maiores para alguns trabalhadores, embora não tenha sido possível apontar as razões. Isto se deve provavelmente ao tempo de trabalho desenvolvendo a mesma ocupação, em períodos onde os níveis de benzeno eram elevados e não eram controlados no ambiente de trabalho. Esses parâmetros (tempo de trabalho e de afastamento) não modificaram a frequência de células com alterações citogenéticas, entretanto, esses dados devem ser avaliados com cautela, principalmente devido ao número reduzido de trabalhadores avaliados. Foi observado que dois trabalhadores apresentaram valores alterados para todos os testes utilizados, sendo que ambos estavam afastados da fonte de exposição por períodos de cinco anos. É interessante ressaltar que dados da literatura nacional indicaram que são necessários cinco anos em média de afastamento para que haja uma normalização dos padrões hematológicos (Ruiz et al., 1993).

Desta forma a utilização do teste do CBMN e o estudo de outras translocações, que não só a PML/ RAR α , em linfócitos de trabalhadores expostos podem representar um biomonitoramento importante e menos invasivo no acompanhamento destes trabalhadores. A análise de um grupo

maior de trabalhadores, inclusive expostos a baixas concentrações de benzeno pode ser fundamental na validação destes biomarcadores.

6. CONCLUSÕES

6. CONCLUSÕES

A avaliação genotóxica e clínica de 20 trabalhadores de siderurgias e de refinarias de petróleo, sendo 18 deles com diagnóstico de intoxicação pelo benzeno, e que estavam afastados de suas funções por períodos que variaram de cinco meses a 27 anos, permitiu concluir que:

a) os trabalhadores revelaram alterações estatisticamente significantes no leucograma, sendo a leucopenia o parâmetro mais sensível na avaliação dos expostos, mesmo após afastamento das funções.

b) os trabalhadores revelaram alterações estatisticamente significantes nos índices de VPM ($p=0,001$), RDW-CV ($p=0,031$) e RDW-SD ($p=0,008$) quando comparados ao grupo controle.

c) a avaliação de mutagenicidade revelou frequência de MN e PNPs três vezes maior nos trabalhadores expostos em comparação ao grupo controle ($p=0,024$).

d) a avaliação pela técnica de FISH da $t(15;17)$ em linfócitos circulantes dos trabalhadores revelou frequências 3,0 vezes maior nas células com pelo menos uma fusão, quando comparados ao grupo controle ($p=0,019$).

e) os polimorfismos nos genes *GSTM1*, *GSTT1*, *CYP2E1*, *CYP1A1*, *NQO1* e *MPO* revelaram frequências semelhantes às observadas no grupo controle, provavelmente em função do tamanho da amostra estudada.

f) a pesquisa destes marcadores de genotoxicidade foi informativa mesmo após o afastamento dos trabalhadores de suas funções. A aplicação destes testes em um número maior de trabalhadores expostos ao benzeno,

mesmo em baixas concentrações pode ser um instrumento importante no acompanhamento clínico destes trabalhadores.

7. ANEXOS

ANEXO A: Aprovação **APROVAÇÃO**

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 01/07/2009, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **0536/09**, intitulado: "**AValiação CITOGENÉTICA E MOLECULAR DE TRABALHADORES INTOXICADOS POR BENZENO**" apresentado pelo Departamento de **MEDICINA LEGAL, ÉTICA MÉDICA, SOCIAL E MEDICINA DO TRABALHO**, inclusive o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CAPPesq, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10/10/1996, inciso IX.2, letra "c").

Pesquisador (a) Responsável: **Profa Dra Gilka Jorge Fígaro Gattás**

Pesquisador (a) Executante: **Deise Nascimento Crispim dos Santos**

CAPPesq, 01 de Julho de 2009

Prof. Dr. Eduardo Massad
Presidente da Comissão de
Ética para Análise de Projetos
de Pesquisa

Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do HCFMUSP e da FMUSP Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo Rua Ovídio Pires de Campos, 225, 5º andar - CEP 05403 010 - São Paulo - SP Fone: 011 3069 6442 Fax: 011 3069 6492 e-mail: cappesq@hcnet.usp.br / secretariacappesq2@hcnet.usp.br

hf

ANEXO B: Questionário

QUESTIONÁRIO

PROJETO: "AVALIAÇÃO CITOGENÉTICA E MOLECULAR DE
TRABALHADORES EXPOSTOS AO BENZENO"
☐ Caso ☐ Controle

Reg. SSO: _____ Data: ____/____/____ Reg. Proj: _____ Data: ____/____/____

Reg. Lab: _____ Data: ____/____/____

Nome: _____ Data de Nascimento: ____/____/____

Cargo/Função: _____

Local de Nascimento: () N () NE () CO () S () SE () SP capital () SP interior () outro país

Endereço: _____ n.º: _____ apto: _____

Bairro: _____ Cidade: _____ U.F. _____

CEP: _____ Telefone (____) _____

Empresa: _____

Endereço: _____ Bairro: _____

Telefone: (____) _____

Você é registrado nesta empresa? () Sim () Não

Observações:

Procedimento Realizado:

Questionário: sim () não () _____

Sangue: sim () não () _____

Exame Hematológico: sim () não () _____

Exame clínico: sim () não () _____

Diagnóstico: sim () não () _____

Entrevistador: _____

INFORMAÇÕES GERAISA1 Número do Registro:

A2 Data de nascimento: ____/____/____ Idade: _____ Sexo: () F () M

A3 Qual o seu grau de escolaridade?

- () não estudou
 () 1ª a 4ª série
 () 5ª a 8ª série
 () Ensino Médio: () Completo () Em Andamento () Incompleto
 () Ensino Superior: () Completo () Em Andamento () Incompleto
 () Pós-Graduação: () Completo () Em Andamento () Incompleto

A4 Como você classificaria sua cor de pele:

() branca () amarelo (oriental) () pardo (mulato) () negro () não sabe definir

A5 Como você classificaria a cor de pele dos seus pais?

Pai: () branca () amarelo (oriental) () pardo (mulato) () negro () não sabe definir

Mãe: () branca () amarelo (oriental) () pardo (mulato) () negro () não sabe definir

A6 Qual seu estado civil?

() solteiro; () casado; () separado; () vive junto; () viúvo; () outro.

A7 Seus pais são parentes entre si?

() Não sei () Não () Sim Tipo: _____

A8 Você tem filhos? () Não () Sim

A9 Quantos filhos? _____ Quantas filhas? _____

Possuem algum problema de saúde? _____

Sua companheira já sofreu algum aborto? () Não () Sim

Quantos? _____

Provocado ou Espontâneo? _____ Em qual período da gestação? _____ Em qual Data? _____

A10 Quantas pessoas moram com você? _____

A11 Qual a sua renda familiar? _____

INFORMAÇÕES DAS ATIVIDADES PROFISSIONAIS

B1 Há quanto tempo você exerce a profissão? ____ anos; ____ meses

Ramo de Atividade: _____ Função: _____

B2 É aposentado? () Sim () Não ____ anos; ____ Meses.

B3 Exerce esta atividade profissional em outro local? () Não () Sim

Onde? _____ Desde quando? _____
Período: _____

B4 Exerce outra atividade profissional? () Não () Sim

Qual?

Desde quando? _____ Carga horária semanal

B5 Utiliza (Utilizou) compostos químicos ou solventes orgânicos durante sua jornada de trabalho?
() Sim () Não Quais? _____

B6 Em relação a produtos químicos/tóxicos, qual o grau de sua exposição durante suas atividades ocupacionais:

- () grande parte da jornada diária (> 20 h/semana)
- () contato regular (5 a 19 h/semana)
- () contato ocasional (1 a 4 h/semana)
- () apenas raramente (< 1h/semana) ou esporadicamente

B7 Usa equipamentos de proteção individual?

() Não () Sim

Quais? _____

B8 Você já teve algum(s) acidente(s) de trabalho? () Não () Sim

Se afirmativo, descreva _____

B9 Qual o período de afastamento? _____

B9 Você já ficou doente e precisou parar de trabalhar? () Não () Sim

Qual o motivo? _____
Qual o período de afastamento? _____

B10 Já morou (mora) próximo de indústrias? ☐ Não ☐ Sim
Qual: _____ Período (anos/meses): _____
Qual: _____ Período (anos/meses): _____

INFORMAÇÕES SOBRE AS CONDIÇÕES DE TRABALHO

B11 Seu local de trabalho é ruidoso? ☐ Sim ☐ Não

B12 Em caso afirmativo, o ruído é: ☐ Baixo ☐ Médio ☐ Alto.

B13 Quais as fontes do ruído? _____

B14 Durante a sua jornada de trabalho você permanece na maior parte do tempo:
☐ em pé ☐ sentado ☐ ambos ☐ outros

B15 Nesta ocupação, qual a jornada de trabalho?

- ☐ horário comercial (8-17hs)
- ☐ turno rodizante
- ☐ diurno
- ☐ noturno

INFORMAÇÕES SOBRE HÁBITOS

TIPO DE DIETA:

C1. Você mudou seus hábitos alimentares recentemente ou está fazendo dieta para emagrecer ou por qualquer outro motivo?

- (1) Não
- (2) Sim, para perda de peso
- (3) Sim, por orientação médica
- (4) Sim, para dieta vegetariana ou Redução do consumo de carne
- (5) Sim, para redução de sal.
- (6) Sim, para redução de colesterol.
- (7) Sim, para ganho de peso.

Outro motivo: _____

C2. Você está tomando algo para suplementar sua dieta (vitaminas, minerais e outros produtos)?
(1) não (2) sim, regularmente (3) sim, mas não regularmente.

C3. Se a resposta da pergunta anterior for sim, favor preencher o quadro abaixo:

SUPLEMENTO	MARCA COMERCIAL	DOSE	FREQUÊNCIA

--	--	--	--

C4. As questões seguintes relacionam-se ao seu hábito alimentar usual no **PERÍODO DE UM ANO**. Para cada quadro responda, por favor, a frequência que melhor descreva **QUANTAS VEZES** você costuma comer cada item e a respectiva **UNIDADE DE TEMPO** (se por dia, por semana, por mês ou no ano). Depois responda qual a sua **PORÇÃO INDIVIDUAL USUAL** em relação à porção média indicada. **ESCOLHA SOMENTE UM CÍRCULO PARA CADA COLUNA**. Muitos grupos de alimentos incluem exemplos. Eles são sugestões e você pode consumir todos os itens indicados. Se você não come ou raramente come um determinado item, preencha o círculo da primeira coluna (N=nunca come). **NÃO DEIXE ITENS EM BRANCO.**

GRUPO DE ALIMENTOS	Com que frequência você costuma comer?		Qual o tamanho de sua porção em relação à porção média?	
	Quantas vezes você come:	Unidade	Porção Média (M)	Sua Porção
Alimentos e preparações	Número de vezes: 1, 2, 3, etc. (N = nunca ou raramente comeu no último ano)	D= por dia S= por semana M= por mês A= por ano	Porção Média de Referência	P= menor que a porção média M= igual à porção média G= maior que a porção média E= bem maior que a porção média

SOPAS E MASSAS	QUANTAS VEZES VOCÊ COME	UNIDADE	PORÇÃO MÉDIA (M)	SUA PORÇÃO
Sopas (de legumes, canja, creme, etc)	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 O O O O O O O O O O	D S M A O O O O	1 concha média (150g)	P M G E O O O O
Salgados fritos (pastel, coxinha, risólis, bolinho).	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 O O O O O O O O O O	D S M A O O O O	1 unidade grande (80g)	P M G E O O O O
Salgados Assados (esfiha, bauruzinho, torta)	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 O O O O O O O O O O	D S M A O O O O	2 unidades ou 2 pedaços médios (140g)	P M G E O O O O
Macarrão com molho sem carne	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 O O O O O O O O O O	D S M A O O O O	1 prato raso (200g)	P M G E O O O O
Macarrão com molho com carne, lasanha, nhoque	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 O O O O O O O O O O	D S M A O O O O	1 escumadeira ou 1 pedaço pequeno (110g)	P M G E O O O O
Pizza, panqueca	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 O O O O O O O O O O	D S M A O O O O	2 fatias pequenas ou 2 unidades (180g)	P M G E O O O O
Polenta cozida ou frita	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 O O O O O O O O O O	D S M A O O O O	2 colheres de sopa ou 2 fatias pequenas (70g)	P M G E O O O O

CARNES E PEIXES	QUANTAS VEZES VOCÊ COME	UNIDADE	PORÇÃO MÉDIA (M)	SUA PORÇÃO
Carne de boi (bife, cozida,	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M A	1 bife médio ou	P M G E

assada), miúdos, vísceras	O O O O O O O O O O O	O O O O	2 pedaços (100g)	O O O O
Carne de porco (lombo, bifeiteca)	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 O O O O O O O O O O O	D S M A O O O O	1 fatia média (100g)	P M G E O O O O
Carne seca, carne de sol, bacon	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 O O O O O O O O O O O	D S M A O O O O	2 pedaços pequenos (40g)	P M G E O O O O
Lingüiça	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 O O O O O O O O O O O	D S M A O O O O	1 gomo médio (60g)	P M G E O O O O
Embutidos (presunto, mortadela, salsicha)	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 O O O O O O O O O O O	D S M A O O O O	2 fatias médias (30g)	P M G E O O O O
Frango (cozido, frito, grelhado, assado)	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 O O O O O O O O O O O	D S M A O O O O	1 pedaço ou 1 filé pequeno (60g)	P M G E O O O O
Hambúrguer, nuggets, almôndega	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 O O O O O O O O O O O	D S M A O O O O	1 unidade média (60g)	P M G E O O O O
Peixe (cozido, frito, assado) e frutos do mar	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 O O O O O O O O O O O	D S M A O O O O	1 filé pequeno ou 1 posta pequena (100g)	P M G E O O O O

LEITES E DERIVADOS	QUANTAS VEZES VOCÊ COME	UNIDADE	PORÇÃO MÉDIA (M)	SUA PORÇÃO
Leite-tipo: () integral () desnatado () semi-desnatado	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 O O O O O O O O O O O	D S M A O O O O	½ copo requeijão (125 ml)	P M G E O O O O
Iogurte-tipo: () natural () com frutas	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 O O O O O O O O O O O	D S M A O O O O	1 unidade pequena (140g)	P M G E O O O O
Queijo mussarela, prato, parmesão, provolone	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 O O O O O O O O O O O	D S M A O O O O	1 ½ fatias grossas (30g)	P M G E O O O O
Queijo Minas, ricota	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 O O O O O O O O O O O	D S M A O O O O	1 fatia média (30g)	P M G E O O O O

LEGUMINOSAS E OVOS	QUANTAS VEZES VOCÊ COME	UNIDADE	PORÇÃO MÉDIA (M)	SUA PORÇÃO
Ovo (cozido ou frito)	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 O O O O O O O O O O O	D S M A O O O O	1 unidade (50g)	P M G E O O O O
Feijão (carioca, roxo, preto, verde)	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 O O O O O O O O O O O	D S M A O O O O	1 concha média (86g)	P M G E O O O O
Lentilha, ervilha seca, grão de bico, soja	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 O O O O O O O O O O O	D S M A O O O O	1 colher de servir (35g)	P M G E O O O O

Feijoada, feijão tropeiro	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 O O O O O O O O O O O	D S M A O O O O	1 concha média (210g)	P M G E O O O O
---------------------------	---	--------------------	--------------------------	--------------------

VERDURAS E LEGUMES	QUANTAS VEZES VOCÊ COME	UNIDADE	PORÇÃO MÉDIA (M)	SUA PORÇÃO
Alface	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 O O O O O O O O O O O	D S M A O O O O	3 folhas médias (30g)	P M G E O O O O
Tomate	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 O O O O O O O O O O O	D S M A O O O O	3 fatias médias (40g)	P M G E O O O O
Cenoura	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 O O O O O O O O O O O	D S M A O O O O	1 colher de sopa (25g)	P M G E O O O O
Outros Legumes (abobrinha, berinjela, chuchu, pepino)	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 O O O O O O O O O O O	D S M A O O O O	1 colher de sopa cheia (30g)	P M G E O O O O
Outras verduras cruas (acelga, rúcula, agrião)	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 O O O O O O O O O O O	D S M A O O O O	1 prato de sobremesa (38g)	P M G E O O O O
Outras verduras cozidas (acelga, espinafre, escarola, couve)	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 O O O O O O O O O O O	D S M A O O O O	1 colher de servir (30g)	P M G E O O O O
Brócolis, couve-flor, repolho	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 O O O O O O O O O O O	D S M A O O O O	1 ramo ou 2 colheres de sopa (30g)	P M G E O O O O

FRUTAS	QUANTAS VEZES VOCÊ COME	UNIDADE	PORÇÃO MÉDIA (M)	SUA PORÇÃO
Laranja, mexerica, abacaxi	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 O O O O O O O O O O O	D S M A O O O O	1 unidade média ou 1 fatia grande (180g)	P M G E O O O O
Banana	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 O O O O O O O O O O O	D S M A O O O O	1 unidade média (86g)	P M G E O O O O
Maçã, pêra	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 O O O O O O O O O O O	D S M A O O O O	1 unidade média (110g)	P M G E O O O O
Melão, Melancia	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 O O O O O O O O O O O	D S M A O O O O	1 fatia média (150g)	P M G E O O O O
Mamão	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 O O O O O O O O O O O	D S M A O O O O	1 fatia média ou ½ unidade média (160g)	P M G E O O O O

Goiaba	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 O O O O O O O O O O O	D S M A O O O O	Unidade grande (225g)	P M G E O O O O
Abacate	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 O O O O O O O O O O O	D S M A O O O O	2 colheres de sopa cheias (90g)	P M G E O O O O

C5. Por favor, liste qualquer outro alimento ou preparação importante que você costuma comer ou beber pelo menos **UMA VEZ POR SEMANA** que não foram citados aqui (por exemplo: leite-de-coco, outros tipos de carnes, eceitas caseiras, creme de leite, leite condensado, gelatina e outros doces etc.).

ALIMENTO	FREQUÊNCIA POR SEMANA	QUANTIDADE CONSUMIDA

C6. Quando você come carne bovina ou suína, você costuma comer a gordura visível?

(1) nunca ou raramente (2) algumas vezes (3) sempre (9) não sabe

C7. Quando você come frango ou peru, você costuma comer a pele?

(1) nunca ou raramente (2) algumas vezes (3) sempre (9) não sabe

- HÁBITOS DE BEBIDA

C8. Você toma bebidas alcoólicas pelo menos 1 vez por mês?

() sim () não () só no passado

C9. Quando é que você consome ou consumia bebidas alcoólicas?

() nas refeições () entre as refeições () ambos () não consome

C10. Com que idade você começou a beber? _____ anos () não sei () não bebo

C11. Se você bebia anteriormente, há quanto tempo está abstinente (meses)? _____

C12. Teve alguma fase na sua vida em que você bebeu mais?

() Sim () Não () Não sei

Quando: _____ Tipo de bebida: _____

C13. Assinalar com um **X** as opções de bebida ingeridas, indicando a frequência (média), a quantidade e o período em que você bebe ou bebeu as bebidas assinaladas.

Exemplo: se você toma 4 copos grandes (CG) de cerveja diariamente e um copo médio (CM) de vinho, semanalmente, tomando os dois por um período médio de 10 anos em toda a sua vida, complete da seguinte forma:

	Sim	Não	Diariamente		Semanalmente		Mensalmente	
			quantidade	período(anos)	quantidade	período(anos)	quantidade	período(anos)
Cerveja	X		4CG	10				
Bebidas fermentadas (vinho, licores)	X				1CM	10		

Considere em quantidade:

Copo pequeno (cachaça/café): CP (50ml)

Copo médio (refrigerante/chá): CM (100ml)

Copo grande (cerveja): CG (300ml)

Lata: LT (350ml)

Garrafa: GF (700 ml-1L)

	Sim	Não	Diariamente		Semanalmente		Mensalmente	
			quantidade	período(anos)	quantidade	período(anos)	quantidade	período(anos)
Cerveja								
Bebidas destiladas (pinga, saquê, uísque)								
Bebidas fermentadas (vinho, licores)								
Café								
Chá								

C14 Alguém de sua família ou amigos sugeriram que você deixasse de beber?

() Sim () Não () Não bebo

C15 Você já precisou ausentar-se do trabalho por problemas com bebida?

() Sim () Não () Não bebo

C16 Você já teve ou tem o hábito de beber pela manhã?

() Sim () Não () Não bebo

C17 Alguma vez sentiu necessidade de parar de beber?

() Sim () Não () Não bebo

HÁBITOS DE FUMO:

C18 Você fuma ou fumou 1 cigarro diariamente, por pelo menos 1 ano?

() sim () nunca fumou () somente no passado

Se você não fuma cigarro ou nunca fumou, passe para a questão C25.

C19 Com que idade você começou a fumar? _____ () não sei

C20 Há quanto tempo você fuma?
(meses/anos) _____

C21 Há quanto tempo você parou de fumar?
(meses/anos) _____

C22 Qual a quantidade de cigarros por dia:
() 1-3 cigarros () menos que 10 () 10 a 20 () mais que 20 cigarros

C23 Na média, durante quantos anos você realmente fumou? (não incluir períodos superiores há um mês que ficou sem fumar) _____

C24 Você fuma ou já fumou outro tipo de cigarro (de palha, cachimbo e charuto):
() não () sim
Tipo: _____
Frequência: _____

C25 Você usa ou já usou algum tipo de drogas:
() não () sim
Tipo: _____
Frequência: _____

C26 Você vive junto com um fumante?
() Não () Sim

C27 Você trabalha em lugar fechado onde às pessoas fumam?
() Não () Sim

INFORMAÇÕES SOBRE SAÚDE

- QUEIXAS GERAIS

D1 Você tem algum problema de saúde? () Não () Sim
Especifique: _____

D2 Está tomando algum tipo de medicamento (incluindo vitaminas) por pelo menos 3 vezes por semana, por um período de um mês ou mais, com ou sem prescrição médica?
() Sim () Não

Qual o tipo ou nome do medicamento em uso: _____

D3 Esteve exposto a algum tipo de raio-X (nos últimos 6 meses)?

() Não () Sim () Não sei

Tipo: _____

D4 Possui casos de câncer na família? () Não () Sim () Não sei

Qual seu grau de parentesco? (pais, irmãos, avós, bisavós, tios, primos, filhos)

Grau de Parentesco	Tipo de Câncer

D5 Faz ou já fez tratamentos como quimioterapia ou radioterapia?

() Sim () Não

ANEXO C: Descrição dos resultados individuais, obtidos no eritograma e no leucograma dos trabalhadores expostos ao benzeno e dos controles.

Relação dos valores obtidos no hemograma dos 20 trabalhadores expostos ao benzeno, em comparação com os valores de referência

Indivíduos	Eritrócitos (milhões/mm ³)	Hemoglobina (g/dL)	Hematócrito (%)	VCM (fL)	HCM (pg)	CHCM (g/dL)	RDW-CV (%)	RDW - SD (fL)	Plaquetas (mil/mm ³)	VPM (fL)
Valor de Referência	4,4 - 5,9	13,0 - 18,0	40,0 - 52	80,0 - 100,0	27,0 - 32,0	32,0 - 37,0	9,5 - 16,0	34,0 - 54,0	140 - 450	6,5 - 12,5
E1	4,83	14,5	40,9	84,7	30	35,5	13,4	40,5	271	10,4
E2	4,89	14,8	42,2	86,3	30,3	35,1	13	40	211	9,8
E3	4,54	13,8	40	88,1	30,4	34,5	13,4	42	215	10,9
E4	4,6	13,9	40,8	88,7	30,2	34,1	13,3	42,3	220	10,7
E5	5,28	15,3	44,3	83,9	29	34,5	13	39,3	202	11,8
E6	4,92	13,9	44,3	90	28,3	31,4	12,6	40,9	194	10,9
E7	4,59	14,9	43,1	93,9	32,5	34,6	12,3	41,5	198	9,6
E8	5,27	14,2	43,1	81,8	26,9	32,9	12,9	38,5	266	11,2
E9	4,92	13,9	42,1	85,6	28,3	33	13,3	40,9	220	10,9
E10	4,86	14,2	42,5	87,4	29,2	33,4	12,7	39,7	137	11,9
E11	4,6	13,8	40,9	88,9	30	33,7	12,3	39,1	197	10,1
E12	4,79	14,1	41,8	87,3	29,4	33,7	12,8	39,8	206	10,8
E13	5,39	15,8	46,6	86,5	29,3	33,9	12,8	39,9	178	11,1
E14	5,17	14,8	45	87	28,6	32,9	14,6	45,5	276	10,7
E15	5,3	14,7	44	83	27,7	33,4	13,7	40,5	208	11,4
E16	5,42	14,2	42,7	78,8	26,2	33,3	13,5	38,1	267	9,4
E17	4,53	13,1	40,3	89	28,9	32,5	12,3	39,4	166	9,4
E18	5,32	15,9	48	90,2	29,9	33,1	13,9	45,7	198	10,6
E19	4,43	14,3	40,7	91,9	32,3	35,1	12,3	40,3	203	10,2
E20	5,1	15,6	44,6	89	31,1	35	12,7	40,9	195	10,6
Média ± dp	4,93 ± 0,32	14,5 ± 0,73	42,9 ± 2,14	87,1 ± 3,51	29,42 ± 1,57	33,78 ± 1,03	13,04 ± 0,60	40,7 ± 1,97	211,4 ± 35,5	10,62 ± 0,71

VCM: Volume Corporcular Médio em fentolitros como fL; g/dL: grama/decilitro; HCM: Hemoglobina Corporcular Média em pictogramas como pg;
CHCM: Concentração de Hemoglobina Corporcular Média; RDW-CV: Amplitude de distribuição dos eritrócitos medido como coeficiente de variação;
RDW-SD: Amplitude de distribuição dos eritrócitos medido como desvio padrão; VPM: Volume Plaquetário Médio, mil/mm³: milímetro cúbico.

Descrição dos resultados obtidos no leucograma realizado nos 20 indivíduos expostos

Indivíduos	Leucócitos (mil/mm ³)	Neutrófilos (mil/mm ³)	Bastonetes (mil/mm ³)	Segmentados (mil/mm ³)	Eosinófilos (mil/mm ³)	Basófilos (mil/mm ³)	Linfócitos (mil/mm ³)	Monócitos (mil/mm ³)
Valor de Referência	4,0 - 11,0	1,6 - 7,0	0,0 - 0,7	1,3 - 7,0	0,05 - 0,5	0,0 - 0,2	0,9 - 3,4	0,2 - 0,9
E1	4,36	2,1	0,1	2,0	0	0	1,8	0,4
E2	4,66	2,2	0,1	2,1	0,3	0,1	1,9	0,4
E3	6,65	3,4	0,1	3,3	0,7	0	1,9	0,6
E4	6,11	3,6	0,1	3,5	0,3	0,1	1,6	0,5
E5	3,11	1,3	0	1,3	0	0	1,4	0,3
E6	4,55	2,5	0,1	2,4	0	0	1,5	0,6
E7	5,51	2,7	0,1	2,6	0,1	0	2,3	0,4
E8	3,27	2,0	0	2,0	0	0	0,9	0,2
E9	4,07	2,6	0,2	2,4	0,1	0	1,1	0,2
E10	4,18	2,8	0	2,8	0,1	0	0,8	0,4
E11	5,08	3,8	0,1	3,7	0,1	0	1,0	0,3
E12	4,32	2,5	0	2,5	0	0	1,3	0,4
E13	3,18	1,0	0	1,0	0	0	2,1	0
E14	3,97	2,0	0	2,0	0	0	1,7	0,2
E15	5,07	2,8	0,1	2,7	0,2	0	1,6	0,5
E16	3,85	1,7	0,2	1,5	0,2	0	1,7	0,3
E17	3,53	1,5	0,1	2,2	0,1	0	1,6	0,3
E18	5,18	2,3	0,1	2,2	0,1	0	2,5	0,4
E19	4,74	2,2	0,1	2,1	0,2	0	1,9	0,5
E20	4,71	2,6	0,1	2,5	0	0	1,8	0,4
Média ± dp	6,98 ± 1,85	4,23 ± 1,51	0,09 ± 0,03	4,13 ± 1,57	0,15 ± 0,15	0,03 ± 0,05	2,01 ± 0,50	0,51 ± 0,20

mil/mm³: mil/milímetro cúbico.

Descrição dos resultados obtidos no hemograma realizado nos 20 indivíduos controles

Indivíduo	Eritrócitos (milhões/mm³)	Hemoglobina (g/dL)	Hematócrito (%)	VCM (fL)	HCM (pg)	CHCM (g/dL)	RDW-CV (%)	RDW - SD (fL)	Plaquetas (mil/mm³)	VPM (fL)
Valor de Referência	4,4 - 5,9	13,0 - 18,0	40,0 - 52	80,0 - 100,0	27,0 - 32,0	32,0 - 37,0	9,5 - 16,0	34,0 - 54,0	140 - 450	6,5 – 12,5
C1	5	15,4	43	86	30,8	35,8	13,4	41,1	213	11,1
C2	5,36	16	46,8	87,3	29,9	34,2	13,5	42,6	167	11,8
C3	5,71	16,8	49,6	86,9	29,4	33,9	12,4	38,7	244	11,8
C4	4,83	14,9	42,8	88,6	30,8	34,8	13,6	43	153	10,9
C5	5,67	15	43,8	77,2	26,5	34,2	14,5	40,1	270	12
C6	4,81	14,3	43,4	90,2	29,7	32,9	13,6	44	290	10,7
C7	5,2	15,3	44,5	85,6	29,4	34,4	12,2	37,5	188	10,7
C8	4,77	13,4	41,3	86,6	28,1	32,4	13,7	41,9	209	13,1
C9	5,57	17	49,6	89	30,5	34,3	12,2	39,3	267	13
C10	4,82	13,8	42,4	88	28,6	32,5	14,2	44,4	256	10,3
C11	4,71	14,9	44,5	94,5	31,6	33,5	13,1	44	297	11,8
C12	5,68	16,7	50,1	88,2	29,4	33,3	13,5	42,9	158	12,3
C13	4,84	14,1	43,8	90,5	29,1	32,2	13,2	43	290	13,1
C14	4,91	14,7	43,5	88,6	29,9	33,8	15	47,4	256	10,1
C15	4,41	13,4	40,8	92,5	30,4	32,8	13,2	43,8	284	11,4
C16	5,05	12,9	41	81,2	25,5	31,5	15,8	46,3	121	13,2
C17	4,74	14,7	44,6	94,1	31	33	13	43,7	266	13,8
C18	5,01	15,1	44,5	88,8	30,1	33,9	13,3	42,3	191	12,3
C19	4,56	14	42,3	92,8	30,7	33,1	16,1	53,7	306	11,3
C20	4,23	13,5	39,1	92,4	31,9	34,5	13,4	44,7	196	10,8
Média ± dp	4,99 ± 0,42	14,80 ± 1,18	44,07 ± 2,97	88,45 ± 4,15	29,67 ± 1,58	33,55 ± 1,03	13,65 ± 1,04	43,22 ± 3,46	231 ± 55,40	11,78 ± 1,07

VCM: Volume Corpuscular Médio em fentolitros como fL; g/dL: grama/décilitro; HCM: Hemoglobina Corpuscular Média em pictogramas como pg;
CHCM: Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média; RDW-CV: Amplitude de distribuição dos eritrócitos medido como coeficiente de variação;
RDW-SD: Amplitude de distribuição dos eritrócitos medido como desvio padrão;VPM: Volume Plaquetário Médio, mil/mm³: milímetro cúbico;

Relação dos valores obtidos no leucograma dos 20 controles, em comparação com os valores de referência

Indivíduo	Leucócitos (mil/mm ³)	Neutrófilos (mil/mm ³)	Bastonetes (mil/mm ³)	Segmentados (mil/mm ³)	Eosinófilos (mil/mm ³)	Basófilos (mil/mm ³)	Linfócitos (mil/mm ³)	Monócitos (mil/mm ³)
Valor de Referência	4,0 - 11,0	1,6 - 7,0	0,0 - 0,7	1,3 - 7,0	0,05 - 0,5	0,0 - 0,2	0,9 - 3,4	0,2 - 0,9
C1	6,43	4	0,1	3,9	0,5	0	1,6	0,3
C2	5,66	3	0,1	2,9	0,3	0	1,8	0,6
C3	7,17	4,6	0,1	4,5	0,1	0	2	0,6
C4	5,27	2,8	0,1	2,7	0,1	0	2,3	0,2
C5	9,19	6	0,1	5,9	0	0	2,4	0,7
C6	5,31	3,5	0,1	3,4	0	0	1,4	0,5
C7	7,67	3,9	0,1	3,8	0	0	3	0,8
C8	6,29	4,3	0,1	4,2	0,1	0	1,5	0,5
C9	10,39	7,3	0,1	7,2	0,1	0	2,6	0,4
C10	5,55	2,9	0,1	2,8	0,3	0	1,9	0,5
C11	7,29	4,6	0,1	4,5	0,2	0,1	2	0,4
C12	10,08	6,9	0,1	6,8	0,3	0	2,3	0,6
C13	8,16	5,2	0,1	5,1	0,1	0	2,5	0,3
C14	3,56	1,9	0	1,9	0	0	1,3	0,3
C15	7,91	6,1	0,1	6	0,2	0	1,3	0,3
C16	4,18	2,2	0	2,2	0,1	0	1,3	0,5
C17	8,24	5,8	0,1	5,7	0	0,2	1,9	0,4
C18	7,22	3,3	0,1	3,2	0,5	0,1	2,5	0,9
C19	6,53	2,9	0,2	2,7	0,1	0	2,6	0,9
C20	6,93	4,2	0,1	4,1	0,1	0,1	2,1	0,6
Média ± dp	6,99 ± 1,86	4,23 ± 1,51	0,10 ± 0,04	4,14 ± 1,57	0,16 ± 0,15	0,03 ± 0,06	2,02 ± 0,51	0,52 ± 0,20

mil/mm³: milímetro cúbico.

8. REFERÊNCIAS

8. REFERÊNCIAS

- Abdel-Rahman SZ, El-Zein RA, Anwar WA, Au WW. A multiplex PCR procedure for polymorphic analysis of GSTM1 and GSTT1 genes in population studies. *Cancer Lett.* 1996; 107 (2): 229-33.
- Abrantes R, Assunção JV, Pesquero CR, Bruns ER, Nobrega RP. Emission of polycyclic aromatic hydrocarbons from gasohol and ethanol vehicles. *Atmos Environ.* 2009; 43(3):648-654.
- ACGIH - Threshold Limit Values for Chemical Substances and Physical Agents and Biological Exposure Indices. Cincinnati, OH: American Conference of Governmental Industrial Hygienists. 2005.
- ACGIH - TLVs and BEIs. Based on the documentation of the threshold limit values for chemicals substances and physical agents and biological exposure indices. Cincinnati, OH: American Conference for Governmental and Industrial Hygienists. 2009.
- Ahmad Khan H. Benzene's toxicity: a consolidated short review of human and animal studies. *Hum Exp Toxicol.* 2007; 26(9):677-85.
- Aksoy M, Dinçol K, Akgün T, Erdem S, Dinçol G. Haematological effects of chronic benzene poisoning in 217 workers. *Br J Ind Med.* 1971; 28(3):296-302.
- Aksoy M, Dinçol K, Erdem S, Dinçol G. Acute leukemia due to chronic exposure to benzene. *Am J Med.* 1972; 52(2):160-6.
- Aksoy M, Erdem S, Dinçol G. Leukemia in shoe-workers exposed chronically to benzene. *Blood.* 1974; 44(6): 837-41.
- Aksoy M. Benzene Carcinogenicity. *Environ Health Perspect.* 1989; 82: 193 - 7.
- Albertini RJ, Anderson D, Douglas GR, Hagmar L, Hemminki K, Merlo F, et al. IPCS guidelines for the monitoring of genotoxic effects of carcinogens in humans. International Programme on Chemical Safety. *Mutat Res.* 2000; 463(2): 111-72.
- Amorim LCA. Biomarkers for evaluating exposure to chemical agents present in the environment. *Rev Bras Epidemiol.* 2003; 6(2): 158-170.

- Andreoli C, Leopardi P, Crebelli R. Detection of DNA damage in human lymphocytes by alkaline single cell gel electrophoresis after exposure to benzene or benzene metabolites. *Mutat Res.* 1997; 377(1): 95-104.
- Androutsopoulos VP, Tsatsakis AM, Spandidos DA. Cytochrome P450 CYP1A1: wider roles in cancer progression and prevention. *BMC Cancer.* 2009; 9: 187.
- Angelini S, Kumar R, Bermejo JL, Maffei F, Barbieri A, Graziosi F, et al. Exposure to low environmental levels of benzene: Evaluation of micronucleus frequencies and S-phenylmercapturic acid excretion in relation to polymorphisms in genes encoding metabolic enzymes. *Mutat Res.* 2011; 719(1-2): 7-13.
- Angelini S, Maffei F, Bermejo JL, Ravegnini G, L'insalata D, Cantelli-Forti G, et al. Environmental exposure to benzene, micronucleus formation and polymorphisms in DNA-repair genes: A pilot study. *Mutat Res.* 2012; 743(1-2): 99-104.
- Arcuri AS, Cardoso, LMN, organizadores. Acordo e legislação sobre o benzeno – 10 anos. São Paulo: FUNDACENTRO; 2005.
- Atkins PW. Físico-Química-Fundamentos. 3ª edição. São Paulo: LTC; 2003.
- Atkinson TJ. A review of the role of benzene metabolites and mechanisms in malignant transformation: summative evidence for a lack of research in nonmyelogenous cancer types. *Int J Hyg Environ Health.* 2009; 212(1): 1-10.
- ATSDR - Agency for Toxic Substances and Disease Registry. Toxicological Profile for Benzene. Atlanta, Georgia: ATSDR, 1997.
- Au WW, Navasumrit P, Ruchirawat M. Use of biomarkers to characterize functions of polymorphic DNA repair genotypes. *Int J Hyg Environ Health.* 2007; 207(4): 301-13.
- Augusto LGS, Cazarin G. Toxicidade sanguínea do benzeno e vigilância epidemiológica. *Cad. Saúde Colet.* 2005; 13 (4): 999-1016.
- Augusto LGS. Benzolismo em uma siderúrgica. *Revista de Saúde Ocupacional e Segurança-SOS.* 1984; 10: 153-187.

- Augusto LGS. Estudo Longitudinal e morfológico (medula óssea) em pacientes com neutropenia secundária à exposição ocupacional crônica ao benzeno [Dissertação]. Campinas: Universidade Estadual de Campinas; 1991.
- Austin GE, Zhao WG, Zhang W, Austin ED, Findley HW, Murtagh JJ Jr. Identification and characterization of the human myeloperoxidase promoter. *Leukemia*. 1995; 9(5): 848-57.
- Barbosa EM: Exposição ocupacional ao benzeno: o ácido trans-trans-mucônico como indicador biológico de exposição na indústria de refino do petróleo [Dissertação]. Rio de Janeiro: Escola Nacional de Saúde Pública da Fundação Oswaldo Cruz; 1997.
- Barnett YA, King CM. An investigation of antioxidant status, DNA repair capacity and mutation as a function of age in humans. *Mutat Res*. 1995; 338(1-6): 115-28.
- Barregard L, Holmberg E, Sallsten G. Leukaemia incidence in people living close to an oil refinery. *Environ Res*. 2009; 109(8): 985-90.
- Basso E, Cevoli C, Papacchini M, Tranfo G, Mansi A, Testa A. Cytogenetic biomonitoring on a group of petroleum refinery workers. *Environ Mol Mutagen*. 2011; 52 (6): 440-7.
- Boffetta P, van der Hel O, Norppa H, Fabianova E, Fucic A, Gundy S, et al. Chromosomal aberrations and cancer risk: results of a cohort study from Central Europe. *Am J Epidemiol*. 2007; 165(1): 36-43.
- Boffetta P. Biomarkers in cancer epidemiology: an integrative approach. *Carcinogenesis*. 2010; 31(1): 121-6.
- Bogadi-Sare A, Brumen V, Turk R, Karacić V, Zavalić M. Genotoxic effects in workers exposed to benzene: with special reference to exposure biomarkers and confounding factors. *Ind Health*. 1997; 35(3): 367-73.
- Bogadi-Sare A, Zavalić M, Turk R. Utility of a routine medical surveillance program with benzene exposed workers. *Am J Ind Med*. 2003; 44(5): 467-73.

- Bolognesi C, Merlo F, Rabboni R, Valerio F, Abbondandolo A. Cytogenetic biomonitoring in traffic police workers: micronucleus test in peripheral blood lymphocytes. *Environ Mol Mutagen*. 1997; 30(4): 396-402.
- Bonassi S, Coskun E, Ceppi M, Lando C, Bolognesi C, Burgaz S, et al. The HUman MicroNucleus project on eXfoliated buccal cells (HUMN(XL)): the role of life-style, host factors, occupational exposures, health status, and assay protocol. *Mutat Res*. 2011; 728(3): 88-97.
- Bonassi S, Fenech M, Lando C, Lin YP, Ceppi M, Chang WP, et al. Human MicroNucleus project: international database comparison for results with the cytokinesis-block micronucleus assay in human lymphocytes: I. Effect of laboratory protocol, scoring criteria, and host factors on the frequency of micronuclei. *Environ Mol Mutagen*. 2001; 37(1): 31-45.
- Bonassi S, Norppa H, Ceppi M, Strömberg U, Vermeulen R, Znaor A, et al. Chromosomal aberration frequency in lymphocytes predicts the risk of cancer: results from a pooled cohort study of 22 358 subjects in 11 countries. *Carcinogenesis*. 2008; 29(6): 1178-83.
- Bonassi S, Ugolini D, Kirsch-Volders M, Strömberg U, Vermeulen R, Tucker JD. Human population studies with cytogenetic biomarkers: review of the literature and future perspectives. *Environ Mol Mutagen*. 2005; 45(2-3): 258-70.
- Bonassi S, Znaor A, Ceppi M, Lando C, Chang WP, Holland M, et al. An increased micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes predicts the risk of cancer in humans. *Carcinogenesis*. 2007; 28(3): 625-31.
- Burlinson B, Tice RR, Speit G, Agurell E, Brendler-Schwaab SY, Collins AR, et al. In Vivo Comet Assay Workgroup, part of the Fourth International Workgroup on Genotoxicity Testing. Fourth International Workgroup on Genotoxicity testing: results of the in vivo Comet assay workgroup. *Mutat Res*. 2007; 627(1): 31-5.
- Carere A, Antoccia A, Cimini D, Crebelli R, Degraffi F, Leopardi P, et al. Genetic effects of petroleum fuels: II Analysis of chromosome loss and

- hyperploidy in peripheral lymphocytes of gasoline station attendants. *Environ Mol Mutagen*. 1998; 32(2): 130-8.
- Carrieri M, Bartolucci GB, Scapellato ML, Spatari G, Sapienza D, Soleo L, et al. Influence of glutathione S-transferases polymorphisms on biological monitoring of exposure to low doses of benzene. *Toxicol Lett*. 2011. [Epub ahead of print].
- Carstensen U, Alexandrie AK, Hogstedt B, Rannug A, Bratt I, Hagmar L. B- and T-lymphocyte micronuclei in chimney with respect to genetic polymorphism for CYP1A1 and GST1 (class Mu). *Mutat Res*. 1993; 289 (2): 187-95.
- Celik A, Cavaş T, Ergene-Gözükara S. Cytogenetic biomonitoring in petrol station attendants: micronucleus test in exfoliated buccal cells. *Mutagenesis*. 2003; 18(5): 417-21.
- Ceppi M, Biasotti B, Fenech M, Bonassi S. Human population studies with the exfoliated buccal micronucleus assay: statistical and epidemiological issues. *Mutat Res*. 2010; 705(1): 11-9.
- Cetesb - Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental [on-line]. Relatório de estabelecimento de valores orientadores para solos e águas subterrâneas no estado de São Paulo. CETESB, 2001. [citado 29 jun. 2011]. Disponível em: <http://www.ambientenet.eng.br/TEXTOS/ORIENTADOR.PDF>
- Chanvaivit S, Navasumrit P, Hunsonti P, Autrup H, Ruchirawat M. Exposure assessment of benzene in Thai workers, DNA-repair capacity and influence of genetic polymorphisms. *Mutat Res*. 2007; 626: 79–87.
- Chen S, Tang D, Xue K, Xu L, Ma G, Hsu Y, et al. DNA repair gene XRCC1 and XPD polymorphisms and risk of lung cancer in a Chinese population. *Carcinogenesis*. 2002; 23(8): 1321-5.
- Chen Y, Li G, Yin S, Xu J, Ji Z, Xiu X, et al. Genetic polymorphisms involved in toxicant-metabolizing enzymes and the risk of chronic benzene poisoning in Chinese occupationally exposed populations. *Xenobiotica*. 2007; 37(1): 103-12.

- Chetty M, Murray M. CYP-mediated clozapine interactions: how predictable are they? *Curr Drug Metab.* 2007; 8(4): 307-13.
- Christiani DC, Mehta AJ, Yu CL. Genetic susceptibility to occupational exposures. *Occup Environ Med.* 2008;65(6):430-6;quiz 436, 397.
- Collins JJ, Conner P, Friedlander BR, Easterday PA, Nair RS, Braun J. A study of the hematologic effects of chronic low-level exposure to benzene. *J Occup Med.* 1991; 33(5): 619-26.
- CONCAWE - European oil companies organization for environmental and health protection 1994b. Motor Vehicle Emission Regulations and Fuel Specifications 1994 Update. on (Report no.4/94), Brussels: CONCAWE.
- Côrrea MJM. A construção social do silêncio epidemiológico do benzenismo: Uma história negada. [dissertação]. Rio Grande do Sul, PUC, 2008.
- Costa DF. Prevenção da Exposição ao Benzeno no Brasil [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo; 2009.
- Costa MAF, Costa MFB. Benzeno: uma questão de saúde pública. *INCI.* 2002; 27(4): 201-204.
- Crane MM, Keating MJ, Trujillo JM, Labarthe DR, Frankowski RF. Environmental exposures in cytogenetically defined subsets of acute nonlymphocytic leukaemia. *J Ann Med Assoc.* 1989;262: 634-639.
- Crow JF. The origins, patterns and implications of human spontaneous mutation. *Nat Rev Genet.* 2000; 1(1):40–47.
- Cury NM, Russo A, Galbiatti AL, Ruiz MT, Raposo LS, Maniglia JV, et al. Polymorphisms of the CYP1A1 and CYP2E1 genes in head and neck squamous cell carcinoma risk. *Mol Biol Rep.* 2012; 39 (2): 1055-63.
- Decordier I, Kirsch-Volders M. The in vitro micronucleus test: from past to future. *Mutat Res.* 2006; 607(1):2-4.
- Decordier I, Mateuca R, Kirsch-Volders M. Micronucleus assay and labeling of centromeres with FISH technique. *Methods Mol Biol.* 2011; 691: 115-36.
- Delore P, Borgomano C. Leucémie aigue au cours de l'intoxication benzenique. Sur l'origine toxique de certaines leucémies aigues et

- leurs relations avec les anémies graves. *J Med. Lyon*; 1928. 9: 227-233.
- Dougherty D, Garte S, Barchowsky A, Zmuda J, Taioli E. NQO1, MPO, CYP2E1, GSTT1 and GSTM1 polymorphisms and biological effects of benzene exposure--a literature review. *Toxicol Lett*. 2008; 182(1-3): 7-17.
- Duell EJ, Wiencke JW, Cheng TJ, Varkonyi A, Zuo JF, Ashok TD, et al. Polymorphisms in the DNA repair genes XRCC1 and ERCC2 and biomarkers of DNA damage in human blood mononuclear cells. *Carcinogenesis*. 2000; 21: 965-971.
- Duffaud F, Orsière T, Villani P, Pelissier AL, Volot F, Favre R, et al. Comparison between micronucleated lymphocyte rates observed in healthy subjects and cancer patients. *Mutagenesis*. 1997; 12(4): 227-31.
- Eastmond DA, Rupa DS, Hasegawa LS. Detection of hyperdiploidy and chromosome breakage in interphase human lymphocytes following exposure to the benzene metabolite hydroquinone using multicolor fluorescence in situ hybridization with DNA probes. *Mutat Res*. 1994; 322(1): 9-20.
- Eastmond DA, Schuler M, Frantz C, Chen H, Parks R, Wang L, et al. Characterization and mechanisms of chromosomal alterations induced by benzene in mice and humans. *Res Rep Health Eff Inst*. 2001; 103: 1-68; discussion 69-80.
- Fenech M, Bonassi S. The effect of age, gender, diet and lifestyle on DNA damage measured using micronucleus frequency in human peripheral blood lymphocytes. *Mutagenesis*. 2011c; 26(1): 43-9.
- Fenech M, Holland N, Zeiger E, Chang WP, Burgaz S, Thomas P, et al. The HUMN and HUMNxL international collaboration projects on human micronucleus assays in lymphocytes and buccal cells--past, present and future. *Mutagenesis*. 2011b; 26(1): 239-45.
- Fenech M, Kirsch-Volders M, Natarajan AT, Surralles J, Crott JW, Parry J, et al. Molecular mechanisms of micronucleus, nucleoplasmic bridge and

- nuclear bud formation in mammalian and human cells. *Mutagenesis*. 2011a; 26(1): 125-32.
- Fenech M, Holland N, Chang WP, Zeiger E, Bonassi S. The Human Micronucleus Project -- An international collaborative study on the use of the micronucleus technique for measuring DNA damage in humans. *Mutat Res*. 1999; 428(1-2): 271-83.
- Fenech M. The advantages and disadvantages of the cytokinesis-block micronucleus method. *Mutat Res*. 1997; 392(1-2): 11-8.
- Fenech M. Chromosomal damage rate, aging, and diet. *Ann N Y Acad Sci*. 1998; 854: 23-36.
- Fenech M. The in vitro micronucleus technique. *Mutat Res*. 2000; 455(1-2): 81-95.
- Fenech M. Cytokinesis-block micronucleus assay evolves into a "cytome" assay of chromosomal instability, mitotic dysfunction and cell death. *Mutat Res*. 2006; 600(1-2):58-66.
- Fenech M. Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. *Nat Protoc*. 2007; 2(5):1084-104.
- Forni A. Benzene-induced Chromosome Aberrations: A Follow-up Study. *Environ Health Perspect*. 1996; Suppl 6:1309-12.
- Fracasso ME, Doria D, Bartolucci GB, Carrieri M, Lovreglio P, Ballini A, et al. Low air levels of benzene: correlation between biomarkers of exposure and genotoxic effects. *Toxicol Lett*. 2010; 192(1):22-8.
- Franco SS, Nardocci CA, Gunther RMW. PAH biomarkers for human health risk assessment: a review of the state-of-the-art. *Cad. Saúde Pública*. 2008; 24(4): S569 - S580.
- Freitas CM, Barbosa EM, Moraes FFM, Machado JMH, Menezes MAC, Guilan MCR, et al. Exercício Prático de Avaliação e Gerenciamento de Riscos- O caso dos Trabalhadores expostos ao Benzeno, 1997; FIOCRUZ, Rio de Janeiro.
- Fundacentro - Fundação Jorge Duprat Figueiredo de Segurança e Medicina do Trabalho. Benzeno - Subsídios Técnicos à Secretaria de

- Segurança e Saúde no Trabalho. São Paulo: FUNDACENTRO/MTb,1993.
- Fundacentro - Fundação Jorge Duprat Figueiredo de segurança e medicina do trabalho. Benzeno. São Paulo: FUNDACENTRO, 1995.
- Fundacentro - Fundação Jorge Duprat Figueiredo de segurança e medicina do trabalho. Acordo e Legislação sobre o Benzeno – 10 anos. São Paulo: FUNDACENTRO, 2005.
- Fustinoni S, Consonni D, Campo L, Buratti M, Colombi A, Pesatori AC, et al. Monitoring low benzene exposure: comparative evaluation of urinary biomarkers, influence of cigarette smoking, and genetic polymorphisms. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2005; 14(9):2237-44.
- Galbraith D, Gross SA, Paustenbach D. Benzene and human health: A historical review and appraisal of associations with various diseases. *Crit Rev Toxicol.* 2010; 40 Suppl 2:1-46.
- Garcia-Sagredo JM. Fifty years of cytogenetics: a parallel view of the evolution of cytogenetics and genotoxicology. *Biochim Biophys Acta.* 2008; 1779(6-7): 363-75.
- Garte S, Taioli E, Popov T, Bolognesi C, Farmer P, Merlo F. Genetic susceptibility to benzene toxicity in humans. *J Toxicol Environ Health A.* 2008; 71(22): 1482-9.
- Gattás GJ, Cardoso Lde A, Medrado-Faria Mde A, Saldanha PH. Frequency of oral mucosa micronuclei in gas station operators after introducing methanol. *Occup Med (Lond).* 2001; 51(2): 107-13.
- Glass DC, Gray CN, Jolley DJ, Gibbons C, Sim MR. Health Watch exposure estimates: Do they underestimate benzene exposure? *Chem Biol Interact.* 2005; 153–54:23–32.
- Goldstein BD. Benzene as a cause of lymphoproliferative disorders. *Chem Biol Interact.* 2010; 184(1-2): 147-50.
- Gonçalves FT, Francisco G, de Souza SP, Luiz OC, Festa-Neto C, Sanches JA, et al. European ancestry and polymorphisms in DNA repair genes

- modify the risk of melanoma: a case-control study in a high UV index region in Brazil. *J Dermatol Sci*. 2011; 64(1): 59-66.
- Gowans ID, Lorimore SA, McIlrath JM, Wright EG. Genotype-dependent induction of transmissible chromosomal instability by gamma-radiation and the benzene metabolite hydroquinone. **Cancer Res**. 2005; 65(9): 3527-30.
- Grimwade D, Biond A, Mozziconacci MJ, Hagemeijer A, Berger Roland, Neat M, et al. Characterization of acute promyelocytic leukemia cases lacking the classic t(15;17): results of the European Working Party. *Blood*. 2000; 96: 1297-1308.
- Grotto HZW. Diferenciação das anemias microcíticas utilizando a determinação do RDW. *Rev Bras Hematol Hemoter*. 2008; 30 (2): 87-88.
- Guerra M. FISH - conceitos e aplicações na citogenética. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética; 2004.
- Gulati GL, Hyland LJ, Kocher W, Schwarting R. Changes in automated complete blood cell count and differential leukocyte count results induced by storage of blood at room temperature. *Arch Pathol Lab Med*. 2002; 126: 336-42.
- Gyorffy E, Anna L, Kovács K, Rudnai P, Schoket B. Correlation between biomarkers of human exposure to genotoxins with focus on carcinogen-DNA adducts. *Mutagenesis*. 2008; 23(1): 1-18.
- Harth V, Schafer M, Abel J, Maintz L, Neuhaus T, Besuden M, et al. Head and neck squamous-cell cancer and its association with polymorphic enzymes of xenobiotic metabolism and repair. *J Toxicol Environ Health*. 2008; 71: 887–897.
- Hayes RB, Yin SN, Dosemeci M, Li GL, Wacholder S, Travis LB, et al. 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*. 1997; 89 (14): 1065 – 1071.

- Hayes RB, Yin S, Rothman N, Dosemeci M, Li G, Travis RT, et al. Benzene and lymphohematopoietic malignancies in China. *J Toxicol Environ Health A*. 2000; 61(5–6):419 – 432.
- Heddle JA, Cimino MC, Hayashi M, Romagna F, Shelby MD, Tucker JD, et al. Micronuclei as an index of cytogenetic damage: past, present, and future. *Environ Mol Mutagen*. 1991; 18(4):277-91.
- Hillestad LK. Acute Promyelocytic Leukemia. *Acta Med Scand*. 1957; 159: 189-94.
- Hiyama T, Yoshihara M, Tanaka S, Chayama K. Genetic polymorphisms and head and neck cancer risk (Review). *Int J Oncol*. 2008; 32(5): 945-73.
- Holecková B, Piesová E, Sivikova K, Dianovský J. Chromosomal aberrations in humans induced by benzene. *Ann Agric Environ Med*. 2004; 11(2): 175-9.
- Holecková B, Piesova E, Sivikova K, Dianovsky J. FISH detection of chromosome 1 aberration in human interphase and metaphase lymphocytes after exposure to benzene. *Ann Agric Environ Med*. 2008; 15(1): 99-103.
- Hovhannisyan GG. Fluorescence in situ hybridization in combination with the comet assay and micronucleus test in genetic toxicology. *Mol Cytogenet*. 2010; 3:17.
- Hoyos-Giraldo LS, Carvajal S, Cajas-Salazar N, Ruíz M, Sánchez-Gómez A. Chromosome aberrations in workers exposed to organic solvents: Influence of polymorphisms in xenobiotic - metabolism and DNA repair genes. *Mutat Res*. 2009; 666(1-2):8-15.
- Hrelia P, Maffei F, Angelini S, Forti GC. A molecular epidemiological approach to health risk assessment of urban air pollution. *Toxicol Lett*. 2004; 149(1-3): 261-7.
- IARC - Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (1999a) - [on-line]. [citado 20 ago. 2010]. Disponível em: <http://www.iarc.fr/en>
- IARC – Agência Internacional de Pesquisa em Câncer – IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans volume 100F (2012)

- [on-line]. [citado em 26 mar. 2012]. Disponível em: <http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol100F/mono100F-24.pdf>
- Iarmarcovai G, Bonassi S, Botta A, Baan RA, Orsière T. Genetic polymorphisms and micronucleus formation: a review of the literature. *Mutat Res.* 2008; 658 (3): 215-33.
- INCA - Instituto Nacional de Câncer [on-line]. Seminário Nacional de Vigilância do Câncer Ocupacional e Ambiental. Rio de Janeiro: INCA; 2006. [citado 03 ago. 2010]. Disponível em: <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/inca/portal/home>.
- INCA – Instituto Nacional de Câncer [on-line]. Vigilância do câncer relacionado ao trabalho e ao ambiente. 2ª edição. Rio de Janeiro: INCA; 2010. [citado 15 jul. 2011]. Disponível em: http://www1.inca.gov.br/inca/Arquivos/PIV_poeira_2010.pdf.
- INCA – Instituto Nacional de Câncer [on-line]. Estimativa 2012 – Incidência de Câncer no Brasil. [citado 16 mar. 2012]. Disponível em: <http://www1.inca.gov.br/estimativa/2012/>.
- Infante PF. Benzene exposure and multiple myeloma. A Detailed Meta-analysis of Benzene Cohort Studies. *Ann N Y Acad Sci.* 2006; 1076:90-109.
- Ingelman-Sundberg M. Genetic susceptibility to adverse effects of drugs and environmental toxicants. The role of the CYP family of enzymes. *Mutat Res.* 2001; 482 (1-2): 11-9.
- IPCS-International Programme On Chemical Safety. Environmental Health Criteria 150 - Benzene. Geneva: IPCS (United Nations Environment Programme), World Health Organization, 1993.
- Irons RD, Stillman WS. The process of leukemogenesis. *Environ Health Perspect.* 1996; 6 (Suppl. 104) - 1239-1246.
- Iskander K, Jaiswal AK. Quinone oxidoreductases in protection against myelogenous hyperplasia and benzene toxicity. *Chem Biol Interact.* 2005; 153-154: 147-57.

- Jácomo RH, Figueiredo-Pontes L, Rego EM. Do paradigma molecular ao impacto no prognóstico: uma visão da leucemia promielocítica aguda. *Ver Assoc Méd Brás.* 2008; 54: 82-9.
- Jakubowski M, Trzcinka-Ochocka M. Biological monitoring of exposure: trends and key developments. *J Occup Health.* 2005; 47(1): 22-48.
- Janz S, Potter M, Rabkin CS. Lymphoma- and leukemia-associated chromosomal translocations in healthy individuals. *Genes Chromosomes Cancer.* 2003; 36(3): 211 – 223.
- Johansson I, Ingelman-Sundberg M. Genetic Polymorphism and Toxicology - with Emphasis on Cytochrome P450. *Toxicol Sci.* 2011; 120 (1): 1-13.
- Johnson GT, Harbison SC, McCluskey JD, Harbison RD. Characterization of cancer risk from airborne benzene exposure. *Regul Toxicol Pharmacol.* 2009; 55(3): 361-6.
- Kakkar N, Garg G. Cytoplasmatic fragments of leukaemic cells masquerading as platelets in an automated haematology analyser. *J Clin Pathol.* 2005; 58: 224.
- Kasuba V, Rozgaj R, Sentija K. Cytogenetic changes in subjects occupationally exposed to benzene. *Chemosphere.* 2000; 40(3):307-10.
- Kato M, Loomis D, Brooks LM, Gattás GF, Gomes L, Carvalho AB, et al. Urinary biomarkers in charcoal workers exposed to wood smoke in Bahia State, Brazil. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2004; 13(6):1005-12.
- Kato S, Shields PG, Caporaso NE, Hoover RN, Trump BF, Sugimura H, et al. Cytochrome P450IIE1 genetic polymorphisms, racial variation, and lung cancer risk. *Cancer Res.* 1992;52(23):6712-5.
- Kelsey KT, Ross D, Traver RD, Christiani DC, Zuo ZF, Spitz MR, et al. Ethnic variation in the prevalence of a common NAD(P)H quinone oxidoreductase polymorphism and its implications for anti-cancer chemotherapy. *Br J Cancer.* 1997; 76(7): 852-4.

- Khuder SA, Youngdale MC, Bisesi MS, Schaub EA. Assessment of complete blood count variations among workers exposed to low levels of benzene. *J Occup Environ Med*. 1999; 41(9): 821-6.
- Kim YJ, Choi JY, Paek D, Chung HW. Association of the NQO1, MPO, and XRCC1 polymorphisms and chromosome damage among workers at a petroleum refinery. *J Toxicol Environ Health A*. 2008; 71(5): 333-41.
- Kim YJ, Choi JY, Cho YH, Woo HD and Chung HW. Micronucleus-centromere assay in workers occupationally exposed to low level of benzene. *Hum Exp Toxicol*. 2010; 29 (5): 343-50.
- Kirkwood BR and Sterne JAC. *Essential medical statistics*. 2nd ed. Blackwell Science: Massachusetts, USA. 2006; 502.
- Kiyohara C, Yoshimasu K, Takayama K, Nakanishi Y. NQO1, MPO, and the risk of lung cancer: a HuGE review. *Genet Med*. 2005; 7(7): 463-78.
- Kopjar N, Garaj-Vrhovac V, Kasuba V, Rozgaj R, Ramić S, Pavlica V, et al. Assessment of genotoxic risks in Croatian health care workers occupationally exposed to cytotoxic drugs: a multi-biomarker approach. *Int J Hyg Environ Health*. 2009; 212(4): 414-31.
- Korenberg JR, Yang-Feng T, Schreck R, Chen XN. Using fluorescence in situ hybridization (FISH) in genome mapping. *Trends Biotechnol*. 1992; 10(1-2): 27-32.
- Lan Q, Zhang L, Li G, Vermeulen R, Weinberg RS, Dosemeci M, et al. Hematotoxicity in workers exposed to low levels of benzene. *Science*. 2004; 306 (5702): 1774-6.
- Lanctôt C, Cheutin T, Cremer M, Cavalli G, Cremer T. Dynamic genome architecture in the nuclear space: regulation of gene expression in three dimensions. *Nat Rev Genet*. 2007; 8(2): 104-15.
- Lang M, Pelkonen O. Metabolism of xenobiotics and chemical carcinogenesis. *IARC Sci Publ*. 1999; (148): 13-22.
- Larson RA, Wang Y, Banerjee M, Wiemels J, Hartford C, Le Beau MM, et al. Prevalence of the inactivating 609C-->T polymorphism in the NAD(P)H:quinone oxidoreductase (NQO1) gene in patients with

- primary and therapy-related myeloid leukemia. *Blood*. 1999; 94 (2): 803-7.
- Leal AM. Avaliação da Citogenética Convencional e Molecular em portadores de Leucemia Promielocítica Aguda no Serviço de Hematologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2008.
- Leal AM, Kumeda CA and Velloso EDRP. Características genéticas da leucemia promielocítica aguda de novo. *Rev Bras Hematol Hemoter*. 2009; 31(6): 454-462.
- Leopardi P, Zijno A, Marcon F, Conti L, Carere A, Verdina A, et al. 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*. 2003; 41:126–130.
- Lima CS, Lourenço GJ, Lorand-Metze I, Nascimento H, Saad ST, Costa FF. No contribution of GSTM1 and GSTT1 null genotypes to the risk of neutropenia due to benzene exposure in Southeastern Brazil. *Genet Mol Biol*. 2009; 32(4): 709-11.
- Lindbohm ML, Sallmén M, Anttila A, Taskinen H, Hemminki K. Paternal occupational lead exposure and spontaneous abortion. *Scand J Work Environ Health*. 1991; 17(2): 95-103.
- Lindsey RH Jr, Bromberg KD, Felix CA, Osheroff N. 1,4-benzoquinone is a topoisomerase II poison. *Biochemistry*. 2004; 43 (23): 7563-74.
- Lindsey RH Jr, Bender RP, Osheroff N. Effects of benzene metabolites on DNA cleavage mediated by human topoisomerase II alpha: 1,4-hydroquinone is a topoisomerase II poison. *Chem Res Toxicol*. 2005; 18 (4): 761-70.
- Lo-Coco F, Ammatuna E. The biology of acute promyelocytic leucemia and its impact on diagnosis and treatment. *Hematology*. 2006; 156-161.
- Loewenson R. Globalization and occupational health: a perspective from southern Africa. *Bull World Health Organ*. 2001; 79(9): 863-8.

- London SJ, Lehman TA, Taylor JA. Myeloperoxidase genetic polymorphism and lung cancer risk. *Cancer Res.* 1997; 57:5001-5003.
- Löwenberg B, Griffin JD, Tallman MS. Acute myeloid leukemia and acute promyelocytic leukemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 2003; 82-101.
- Machado RA. Avaliação de Compostos Orgânicos Voláteis em Ambientes Interiores Climatizados [Tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo; 2003.
- Manno M, Viau C, Cocker J, Colosio C, Lowry L, Mutti A, et al. Biomonitoring for occupational health risk assessment (BOHRA). *Toxicol Lett.* 2010; 192(1): 3-16.
- Mansi A, Bruni R, Capone P, Paci E, PIGINI D, Simeoni C, et al. Low occupational exposure to benzene in a petrochemical plant: Modulating effect of genetic polymorphisms and smoking habit on the urinary t,t-MA/SPMA ratio. *Toxicol Lett.* 2011; [Epub ahead of print].
- Marchetti F, Eskenazi B, Weldon RH, Li G, Zhang L, Rappaport SM, et al. Occupational exposure to benzene and chromosomal structural aberrations in the sperm of Chinese men. *Environ Health Perspect.* 2012; 120(2): 229-34.
- Marcon F, Zijno A, Dobrowolny G, Carere A, Crebelli R. Detection of 1cen--1q12 lesions in different phases of the cell cycle: dual colour FISH analysis of peripheral lymphocytes from subjects with occupational exposure to petroleum fuels. *Mutagenesis.* 2002; 17 (2): 157-62.
- Mateuca R, Lombaert N, Aka PV, Decordier I, Kirsch-Volders M. Chromosomal changes: induction, detection methods and applicability in human biomonitoring. *Biochimie.* 2006; 88(11):1515-31.
- McDevitt MA, Condon M, Stamberg J, Karp JE, McDiarmid M. Fluorescent *in situ* hybridization (FISH) in bone marrow and peripheral blood of leukemia patients: implications for occupational surveillance. *Mutat Res.* 2007; 629:24-31.

- McHale CM, Lan Q, Corso C, Li G, Zhang L, Vermeulen R, et al. Chromosome Translocations in Workers Exposed to Benzene. *J Natl Cancer Inst Monogr*. 2008; 39: 74-7.
- McHale CM, Zhang L, Hubbard AE, Smith MT. Toxicogenomic profiling of chemically exposed humans in risk assessment. *Mutat Res*. 2010; 705 (3): 172-83.
- McHale CM, Zhang L, Smith MT. Current understanding of the mechanism of benzene-induced leukemia in humans: implications for risk assessment. *Carcinogenesis*. 2012; 33(2): 240-52.
- Meaburn KJ, Misteli T. Cell biology: chromosome territories. *Nature*. 2007; 445(7126): 379-781.
- Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res*. 1998; 16(3): 1215.
- Ministério da Saúde. Doenças Relacionadas ao Trabalho: Manual de procedimentos para os serviços de saúde. Brasília (DF): Ministério da Saúde; 2001.
- Ministério da Saúde. Risco Químico: Atenção à saúde dos trabalhadores expostos ao benzeno. Serie A. Normas e Manuais Técnicos. Brasília (DF): Ministério da Saúde; 2006.
- Ministério do Trabalho. Acordo e Legislação sobre o Benzeno. São Paulo: FUNDACENTRO; 1995.
- Miranda CR, Carlos R, Oliveira LC, Luiz CC, Pena PGL. Exposição ocupacional ao benzeno em trabalhadores do Complexo Petroquímico de Camaçari, Bahia. *Bol Soc Bras Hematol Hemoter*. 1998; 20 (178): 59-63.
- Misteli T. The inner life of the genome. *Sci Am*. 2011; 304 (2): 66-73.
- Mistry AR, Felix CA, Whitmarsh RJ, Mason A, Reiter A, Cassinat B, et al. DNA topoisomerase II in therapy-related acute promyelocytic leukemia. *N Engl J Med*. 2005; 352 (15): 1529-38.
- Mitelman F, Brandt L, Nilsson PG. Relation among occupational exposure to potential mutagenic/carcinogenic agents, clinical findings, and bone

- marrow chromosomes in acute nonlymphocytic leukemia. *Blood*. 1978; 52(6): 1229-37.
- Mitelman F, Nilsson PG, Brandt L, Alimena G, Gastaldi R, Dallapiccola B. Chromosome pattern, occupation, and clinical features in patients with acute nonlymphocytic leukemia. *Cancer Genet Cytogenet*. 1981; 4(3):197-214.
- Mitelman F, Johansson B, Mertens F. The impact of translocations and gene fusions on cancer causation. *Nat Rev Cancer*. 2007; 7(4): 233-45.
- Moorhead PS, Nowell PC, Mellman WJ, Battips DM, Hungerford DA. Chromosome preparations of leukocytes cultured from human peripheral blood. *Exp Cell Res*. 1960; 20: 613-6.
- Mrózek K, Bloomfield CD. Clinical significance of the most common chromosome translocations in adult acute myeloid leukemia. *J Natl Cancer Inst Monogr*. 2008; (39): 52-7.
- Murgia E, Ballardini M, Bonassi S, Rossi AM, Barale R. Validation of micronuclei frequency in peripheral blood lymphocytes as early cancer risk biomarker in a nested case-control study. *Mutat Res*. 2008; 639(1-2): 27-34.
- Neter J, Kutner MH, Nachtsheim CJ, Wasserman W. *Applied Linear Statistical Models*. 4. ed. Illinois: Richard D. Irwing. 1996; 1408.
- Neves H, Ramos C, Silva MGM, Parreira A, Parreira L. The nuclear topography of ABL, BCR, PML and RAR α genes: evidence for gene proximity in specific phases of the cell cycle and stages of hematopoietic differentiation. *Blood*. 1999; 93: 1197-1207.
- Norppa H, Falck GC. What do human micronuclei contain? *Mutagenesis*. 2003; 18(3): 221-33.
- Norppa H. Cytogenetic biomarkers and genetic polymorphisms. *Toxicol Lett*. 2004; 149(1-3): 309-34.
- Norppa H, Bonassi S, Hansteen IL, Hagmar L, Strömberg U, Rossner P, et al. Chromosomal aberrations and SCEs as biomarkers of cancer risk. *Mutat Res*. 2006; 600(1-2): 37-45.

- NR 15 - [on-line]. Atividades e operações insalubres- Anexo nº13-A, 1995. [citado 20 jul 2011]. Disponível em: [http://portal.mte.gov.br/data/files/FF8080812DDC2FF4012DE2BA434D1DE6/NR-15%20\(Anexo%20n%20%C2%BA%2013-A\)%20Benzeno%202011.pdf](http://portal.mte.gov.br/data/files/FF8080812DDC2FF4012DE2BA434D1DE6/NR-15%20(Anexo%20n%20%C2%BA%2013-A)%20Benzeno%202011.pdf) (accessed 25 Ago 2012)
- Pearce D, Crowards T. Assessing the health cost of particulate air pollution in the UK. London: University College London; 1996.
- Pedersen-Bjergaard. J and Rowley. JD. The balanced and the unbalanced chromosome aberrations of acute myeloid leukemia may develop in different ways and may contribute differently to malignant transformation. *Blood*. 1994; 83: 2780-2786.
- Pedersen-Bjergaard J, Christiansen DH, Døst F, Andersen MK. Alternative genetic pathways and cooperating genetic abnormalities in the pathogenesis of therapy-related myelodysplasia and acute myeloid leukemia. *Leukemia*. 2006; 20(11): 1943-9.
- Pedersen-Bjergaard J, Andersen MK, Andersen MT, Christiansen DH. Genetics of therapy-related myelodysplasia and acute myeloid leukemia. *Leukemia*. 2008; 22(2): 240-8.
- Pesatori AC, Garte S, Popov T, Georgieva T, Panev TJ, Bonzini M, et al. Early effects of low benzene exposure on blood cell counts in Bulgarian petrochemical workers. *Med Lav*. 2009; 100(2): 83–90.
- Pesquero CR. Avaliação ambiental de compostos orgânicos aromáticos presentes em atmosferas industriais [Tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo; 2001.
- Piedrafita FJ, Molander RB, Vansant G, Orlova EA, Pfahl M, Reynolds WF. An Alu element in the myeloperoxidase promoter contains a composite SP1-thyroid hormone-retinoic acid response element. *J Biol Chem*. 1996; 271(24): 14412-20.
- Pyatt D. Benzene and hematopoietic malignancies. *Clin Occup Environ Med*. 2004; 4(3): 529-55.

- Qu Q, Shore R, Li G, Jin X, Chen LC, Cohen B, et al. Hematological changes among Chinese workers with a broad range of benzene exposure. *Am J Ind Med*. 2002; 42: 275–285.
- Qu Q, Shore R, Li G, Su L, Jin X, Melikian AA, et al. Biomarkers of benzene: urinary metabolites in relation to individual genotype and personal exposure. *Chem Biol Interact*. 2005; 153-154: 85-95.
- Rekhadevi PV, Rahman MF, Mahboob M, Grover P. Genotoxicity in filling station attendants exposed to petroleum hydrocarbons. *Ann Occup Hyg*. 2010; 54(8): 944-54.
- Relatório RPBC. Documento encaminhado ao Ministério Público do Trabalho. 2ª Região para subsidiar o Procedimento Preparatório no. 2894/2001. Danilo Costa, Luiza M.N. Cardoso, Rui Magrini. 2004.
- Ren X, Lim S, Smith MT, Zhang L. Werner syndrome protein, WRN, protects cells from DNA damage induced by the benzene metabolite hydroquinone. *Toxicol Sci*. 2009; 107(2): 367-75.
- Reynolds WF, Chang E, Douer D, Ball ED, Kanda V. An allelic association implicates myeloperoxidase in the etiology of acute promyelocytic leukemia. *Blood*. 1997; 90(7): 2730-7.
- Rivedal E, Witz G. Metabolites of benzene are potent inhibitors of gap-junction intercellular communication. *Arch Toxicol*. 2005; 79(6): 303-11.
- Roma-Torres J, Teixeira JP, Silva S, Laffon B, Cunha LM, Méndez J, et al. Evaluation of genotoxicity in a group of workers from a petroleum refinery aromatics plant. *Mutat Res*. 2006; 604(1-2): 19-27.
- Roodi N, Dupont WD, Moore JH, Parl FF. Association of homozygous wild-type glutathione S-transferase M1 genotype with increased breast cancer risk. *Cancer Res*. 2004; 64(4): 1233-6.
- Ross D, Siegel D, Schattenberg DG, Sun XM, Moran JL. Cell-specific activation and detoxification of benzene metabolites in mouse and human bone marrow: identification of target cells and a potential role for modulation of apoptosis in benzene toxicity. *Environ Health Perspect*. 1996; 104 (Suppl 6): 1177-82.

- Ross D. The role of metabolism and specific metabolites in benzene-induced toxicity: evidence and issues, *J Toxicol Environ. Health.* 2000; A 61: 357–372.
- Rothman N, Smith MT, Hayes RB, Li GL, Irons RD, Dosemeci M, et al. An epidemiologic study of early biologic effects of benzene in Chinese workers. *Environ Health Perspect.* 1996; 104 suppl 6: 1365-70.
- Rothman N, Smith MT, Hayes RB, Traver RD, Hoener B, Campleman S, et al. Benzene poisoning, a risk factor for hematological malignancy, is associated with the NQO1 609C-->T mutation and rapid fractional excretion of chlorzoxazone. *Cancer Res.* 1997; 57(14): 2839-42.
- Roulland S, Lebailly P, Lecluse Y, Heutte N, Nadel B, et al. Long-term clonal persistence and evolution of t(14;18)-bearing B cells in healthy individuals . *Leukemia.* 2006; 20(1): 158 – 162.
- Ruiz MA. Estudo morfológico da medula óssea em pacientes neutropenicos da Indústria Siderurgica de Cubatão Estado de São Paulo [tese]. Campinas, Universidade de Campinas, 1989.
- Ruiz MA, Vassalo J, Souza CA. Alterações Hematológicas em pacientes expostos cronicamente ao benzeno. *Revista de Saúde Pública.* 1993; 27 (2): 145-51.
- Ruiz-Argüelles GJ, Garcés-Eisele J, Reyes-Núñez V, Gómez-Rangel JD, Ruiz-Delgado GJ. More on geographic hematology: the breakpoint cluster regions of the PML/RARalpha fusion gene in Mexican Mestizo patients with promyelocytic leukemia are different from those in Caucasians. *Leuk Lymphoma.* 2004; 45(7): 1365-8.
- Russell, NH. Biology of acute leukaemia. *Lancet.* 1997; 349: 118-122.
- Sagrillo MR, Cardoso SH, Silva LRJ, Graça CHN, Ferreira E, Hamerschlag N, et al. Leucemia promielocítica aguda: caracterização de alterações cromossômicas por citogenética tradicional e molecular (FISH). *Rev. Bras. Hematol Hemoter.* 2005; 27(2): 94-101.
- Savitz DA, Whelan EA, Kleckner RC. Effect of parents' occupational exposures on risk of stillbirth, preterm delivery, and small-for-gestational-age infants. *Am J Epidemiol.* 1989; 129(6): 1201-18.

- Schnatter RA, Kerzic PJ, Zhou Y, Chen M, Nicolich MJ, Lavelle K, et al. Peripheral blood effects in benzene-exposed workers. *Chem Biol Interact.* 2010; 184(1-2): 174-81.
- Shou-Young G, Zhong-Bin Z, Jun-Xiang W, Xi-Peng J, Zhao-Lin X. Genetic polymorphisms in CYP1A1, CYP2D6, UGT1A6, UGT1A7, and SULT1A1 genes and correlation with benzene exposure in a Chinese occupational population. *J Toxicol Environ Health A.* 2007; 70 (11): 916-24.
- Siegel D, McGuinness SM, Winski SL, Ross D. Genotype-phenotype relationships in studies of a polymorphism in NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1. *Pharmacogenetics.* 1999; 9(1): 113-21.
- Singaraju M, Singaraju S, Parwani R, Wanjari S. Cytogenetic biomonitoring in petrol station attendants: A micronucleus study. *J Cytol.* 2012; 29(1): 1-5.
- Smith MT. The mechanisms of benzene-induced leukemia: a hypothesis and speculations on the causes of leukemia. *Environ Health Perspect.* 1996; 104 (suppl. 6): 1219-1225.
- Smith MT. Advances in understanding benzene health effects and susceptibility. *Annu Rev Public Health.* 2010; 31: 133-48.
- Smith MT, Zhang L, Wang Y, Hayes RB, Li G, Wiemels J, et al. Increased translocations and aneusomy in chromosomes 8 and 21 among workers exposed to benzene. *Cancer Res.* 1998a; 58(10): 2176-81.
- Smith MT, Zhang L. Biomarkers of leukemia risk: benzene as a model. *Environ Health Perspect.* 1998b; 106 (Suppl 4): 937-46.
- Smith MT, Zhang L, McHale C, Skibola CF, Rappaport SM. Benzene, the exposome and future investigations of leukemia etiology. *Chem Biol Interact.* 2011; 192: 155-159.
- Snyder R, Witz G, Goldstein BD. The toxicology of benzene. *Environ Health Perspect.* 1993; 100: 293-306.
- Snyder R: Overview of the toxicology of benzene. *J Toxicol Environm Health* 2000; Part A, 61: 339-346.

- Solé F, Caballín MR, Coll MD, Woessner S, Egozcue J. Acute lymphoblastic leukemia with t(4;11) in a patient previously exposed to a carcinogen. *Cancer Genet Cytogenet.* 1990; 49(1): 133-6.
- Speit G, Hartmann A. The comet assay: a sensitive genotoxicity test for the detection of DNA damage and repair. *Methods Mol Biol.* 2006; 314: 275-86.
- Stillman WS, Varella-Garcia M, Gruntmeir JJ, Irons RD. The benzene metabolite, hydroquinone, induces dose-dependent hypoploidy in a human cell line. *Leukemia.* 1997; 11(9): 1540-5.
- Stillman WS, Varella-Garcia M, Irons RD. The benzene metabolite, hydroquinone, selectively induces 5q31- and -7 in human CD34+CD19- bone marrow cells. *Exp Hematol.* 2000; 28(2): 169-76.
- Sun P, Qian J, Zhang ZB, Wan JX, Wu F, Jin XP, et al. Polymorphisms in phase I and phase II metabolism genes and risk of chronic benzene poisoning in a Chinese occupational population. *Carcinogenesis.* 2008; 29(12): 2325-9.
- Swaen GM, van Amelsvoort L, Twisk JJ, Verstraeten E, Slootweg R, Collins JJ, et al. Low level occupational benzene exposure and hematological parameters. *Chem Biol Interact.* 2010; 184(1-2): 94-100.
- Takahashi CS, Ribeiro LR, Salvadori DMF, Marques EK, organizadores. Testes Citogenéticos in vitro e aneuploidias. In: *Mutagênese Ambiental*. Canoas (RS): Ulbra; 2003.
- Traver RD, Siegel D, Beall HD, Phillips RM, Gibson NW, Franklin WA, et al. Characterization of a polymorphism in NAD(P)H: quinone oxidoreductase (DT-diaphorase). *Br J Cancer.* 1997; 75(1): 69-75.
- Vigliani EC, Saita G. Benzene and leukemia. *N Engl J Med.* 1964; 271: 872-6.
- Vigliani EC, Forni A. Benzene and leukemia. *Environ Res.* 1976; 11: 122-127.
- Vineis P, Perera F. DNA adducts as markers of exposure to carcinogens and risk of cancer. *Int J Cancer.* 2000; 88(3): 325-8.

- Wan J, Shi J, Hui L, Wu D, Jin X, Zhao N, et al. Association of genetic polymorphisms in *CYP2E1*, *MPO*, *NQO1*, *GSTM1*, and *GSTT1* genes with benzene poisoning. *Environ Health Perspect.* 2002; 110(12): 1213-8.
- Wang ZY, Chen Z. Acute promyelocytic leukemia: from highly fatal to highly curable. *Blood.* 2008; 111: 2505-15.
- Ward ER, Hornung JM, Morris J, Rinsky R, Wild D, Halperin W, et al. Risk of low red or white blood cell count related to estimated benzene exposure in a rubber worker cohort (1940–1975). *Am J Ind Med.* 1996; 29: 247–257.
- Waters MD, Jackson M, Lea I. Characterizing and predicting carcinogenicity and mode of action using conventional and toxicogenomics methods. *Mutat Res.* 2010; 705(3): 184-200.
- Weisel CP. Benzene exposure: an overview of monitoring methods and their findings. *Chem Biol Interact.* 2010; 184(1-2): 58-66.
- WHO - World Health Organization - Updating and revision of the Air Quality Guidelines for Europe. Report no. EUR/ICP/EHAZ9405/MT12 [online]. [citado 24 ago. 2010]. Disponível em: <http://www.who.int/globalchange/en/>.
- Whysner J, Reddy MV, Ross PM, Mohan M, Lax EA. Genotoxicity of benzene and its metabolites. *Mutat Res.* 2004; 566 (2): 99-130.
- Williams JA. Single nucleotide polymorphisms, metabolic activation and environmental carcinogenesis: why molecular epidemiologists should think about enzyme expression. *Carcinogenesis.* 2001; 22: 209-214.
- Winterbourn CC, Kettle AJ. Biomarkers of myeloperoxidase-derived hypochlorous acid. *Free Radic Biol Med.* 2000; 29(5): 403-9.
- Wiwanitkit V, Soogarun S, Suwansaksri J. Urine phenol and myeloperoxidase index: an observation in benzene exposed subjects. *Leuk Lymphoma.* 2004; 45(8): 1643-5.
- Wiwanitkit V, Soogarun S, Suwansaksri J. A correlative study on red blood cell parameters and urine trans, trans-muconic acid in subjects with occupational benzene exposure. *Toxicol Pathol.* 2007; 35(2): 268-9.

- Wiwanitkit V. Benzene exposure and hypertension: an observation. *Cardiovasc J Afri*. 2007; 18 (4): 264-5.
- Wolff DJ, Bagg A, Cooley LD, Dewald GW, Hirsch BA, Jacky PB, et al. Guidance for fluorescence in situ hybridization testing in hematologic disorders. Association for Molecular Pathology Clinical Practice Committee; American College of Medical Genetics Laboratory Quality Assurance Committee. *J Mol Diagn*. 2007; 9(2): 134-43.
- Wong O. Risk of acute myeloid leukaemia and multiple myeloma in workers exposed to benzene. *Occup Environ Med*. 1995; 52(6): 380-384.
- Wünsch Filho V, Gattás GJF. Biomarcadores moleculares em câncer. *Cad de Saúde Pública*. 2001; 17: 467-480.
- Xing C, Marchetti F, Li G, Weldon RH, Kurtovich E, Young S, et al. Benzene exposure near the U.S. permissible limit is associated with sperm aneuploidy. *Environ Health Perspect*. 2010; 118(6): 833-9.
- Xu L, Zhao WL, Xiong SM, Su XY, Zhao M, Wang C, et al. Molecular cytogenetic characterization and clinical relevance of additional, complex and/or variant chromosome abnormalities in acute promyelocytic leukemia. *Leukemia*. 2001; 15(9): 1359-68.
- Xu X, Cho SI, Sammel M, You L, Cui S, Huang Y, et al. Association of petrochemical exposure with spontaneous abortion. *Occup Environ Med*. 1998; 55(1):31-6.
- Yamaguti GG, Lourenço GJ, Silveira VS, Tone LG, Lopes LF, Lima CS. Increased risk for acute lymphoblastic leukemia in children with cytochrome P450A1 (CYP1A1) - and NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 (NQO1)-inherited gene variants. *Acta Haematol*. 2010; 124(3): 182-4.
- Yin SN, Li GL, Tain FD, Fu ZI, Jin C, Chen YJ, et al. Leukaemia in benzene workers: a retrospective cohort study. *Br J Ind Med*. 1987; 44 (2): 124-8.
- Zain RB. Cultural and dietary risk factors of oral cancer and precancer--a brief overview. *Oral Oncol*. 2001; 37(3): 205-10.

- Zhang L, Rothman N, Wang Y, Hayes RB, Li G, et al. Increased aneusomy and long arm deletion of chromosomes 5 and 7 in the lymphocytes of Chinese workers exposed to benzene. *Carcinogenesis*. 1998a; 19(11): 1955-61.
- Zhang L, Wang Y, Shang N, Smith MT. Benzene metabolites induce the loss and long arm deletion of chromosomes 5 and 7 in human lymphocytes. *Leuk Res*. 1998b; 22(2): 105-13.
- Zhang L, Rothman N, Wang Y, Hayes RB, Yin S, Titenko - Holland N, et al. Benzene increases aneuploidy in the lymphocytes of exposed workers: a comparison of data obtained by fluorescence in situ hybridization in interphase and metaphase cells. *Environ Mol Mutagen*. 1999; 34(4): 260-8.
- Zhang L, Eastmond DA, Smith MT. The nature of chromosomal aberrations detected in humans exposed to benzene. *Crit Rev Toxicol*. 2002; 32(1): 1-42.
- Zhang L, Lan Q, Guo W, Li G, Yang W, Hubbard AE, et al. Use of OctoChrome Fluorescence in situ hybridization to detect specific aneuploidy among all 24 chromosomes in benzene exposed workers. *Chem Biol Interact*. 2005a; 153-154: 117-122.
- Zhang L, Yang W, Hubbard AE, Smith MT. Nonrandom aneuploidy of chromosomes 1, 5, 6, 7, 8, 9, 11, 12, and 21 induced by the benzene metabolites hydroquinone and benzenetriol. *Environ Mol Mutagen*. 2005b; 45: 388-396.
- Zhang L, Rothman N, Li G, Guo W, Yang W, Hubbard AE, et al. Aberrations in chromosomes associated with lymphoma and therapy-related leukemia in benzene-exposed workers. *Environ Mol Mutagen*. 2007; 48(6): 467-74.
- Zhang L, Ye FL, Chen T, Mei Y, Song SZ. Trans, trans-muconic acid as a biomarker of occupational exposure to high-level benzene in China. *J Occup Environ Med*. 2011a; 53(10): 1194-8.
- Zhang L, Lan Q, Guo W, Hubbard AE, Li G, Rappaport SM, et al. Chromosome-wide aneuploidy study (CWAS) in workers exposed to

an established leukemogen, benzene. *Carcinogenesis*. 2011b; 32(4): 605-12.

Zhou GB, Chen SJ, Chen Z. Acute promyelocytic leukemia: a model of molecular target based therapy. *Hematology*. 2005; 10 Suppl 1: 270-80.