26949

Universidade de São Paulo

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Toxicologia
e Análises Toxicológicas.

OK. detalhada
17/09/05
OK. OK. OK. OK.
22/09/05

OK. Terminada
22/09/05

**Efeitos dos tratamentos crônicos com produtos de
biotransformação do benzeno sobre a mobilização e
função de leucócitos polimorfonucleares na vigência
de resposta inflamatória**

Emerson Luiz Botelho Lourenço

Dissertação para obtenção do grau de

MESTRE

Orientadora: Profa. Dra. Sandra Helena Poliselli Farsky

São Paulo
2005

JB.161

DEDALUS - Acervo - CQ

30100010921

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

L892e Lourenço, Emerson Luiz Botelho
Efeitos dos tratamentos crônicos com produtos de biotransformação
do benzeno sobre a mobilização e função de leucócitos polimorfonucleares
na vigência de resposta inflamatória / Emerson Luiz Botelho
Lourenço. -- São Paulo, 2005.
84p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da
Universidade de São Paulo. Departamento de Análises Clínicas e
Toxicológicas.

Orientador: Farsky, Sandra Helena Poliselli

1. Imunotoxicologia 2. Análise toxicológica 3. Toxicologia
ocupacional I. T. II. Farsky, Sandra Helena Poliselli, orientador.

615.9 CDD

Emerson Luiz Botelho Lourenço

**Efeitos do tratamento crônico com produtos de
biotransformação do benzeno sobre a mobilização e função de
leucócitos polimorfonucleares na vigência de resposta
inflamatória.**

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Profa. Dra. Sandra Helena Poliselli Farsky
Orientadora /presidente

Profa.Dra. Primavera Borelli Garcia

Prof. Dr. Valdemir Melechco Carvalho

São Paulo, 14 de junho de 2005

Aos meus pais
Rubens e Marineide Botelho
Por me mostrarem que a dedicação,
a honestidade e o trabalho são os caminhos

A professora Sandra Helena Poliselli Farsky
pela orientação nesta tese,
pelo apoio constante e pela amizade,
a quem devo grande parte da minha formação

Agradecimentos

À minha esposa Elaine e ao meu filho Bruno pela compreensão, incentivo, apoio e confiança em meu trabalho.

A minha família, Luiz, Leopoldina, Junior, Kátia, Marcos, Caio Vinícius, Marcos Eduardo, Carmem, Juliano, Daniele, Natália, Silvio, Néri, Sidney, Ronaldo, Lucinha, Adilson, Marcelo, Paula e Adélia, pelo apoio constante.

Aos colegas do Laboratório de Análises Toxicológicas, funcionários e estagiários, Alessandro, Mônica, Paula, Carmem, Ângelo, Helena, Roseli, Carla, Dalva e Luzia, pela colaboração e amizade.

Aos Professores Whotan, Dulcinéia, Primavera, Emani e Regina, por cederem os laboratórios e colaborarem para execução deste trabalho.

Ao amigo Maurício Yonamine pelos conselhos, pelo apoio constante, por trabalhar com um grande pesquisador e por ser um exemplo de profissional a ser seguido.

Aos meus companheiros pós graduandos e estagiários de laboratório, Cristina, Sandra, Juan, Priscila, Renata, Suelen, por estarem sempre presentes nos bons e maus momentos.

Aos meus amigos Danielle e Alexandre, pelo apoio constante durante todo o desenvolvimento deste trabalho.

Ao grupo de alunos de pós graduação em Toxicologia, Carolina, Daniel, Danielle, Claudia Isabel, Fábio, Fabriciano, Humberto, Michela, Nádia, Paula, Patrícia, Simone, Virginia, Zé Luiz, pela amizade conquistada.

A Universidade Paranaense - UNIPAR, pelo incentivo e auxílio financeiro.

A Fapesp pelo apoio financeiro

Aos colegas de trabalho da UNIPAR Arquimedes, Orlando, Douglas, Nelton, Márcia, Julio, Juliana, Ezilda, Rosemeres, Jorge, Hellen, Gonçalves, Eliane, Flávio, Elizabeth, Aristeu, Francisco, Irinéia, Sirlei e Vânia, pelo incentivo.

Aos colegas de Republica Fausto, Marcio, Marcelo, Paulo, Fernando, Cássia, Igo, Murilo, Alexandre, Michel e José Antônio, por estarem sempre presentes.

Meus Agradecimentos.

ÍNDICE

1.INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Intoxicações por solventes orgânicos.....	1
1.2 Toxicocinética e determinação analítica dos produtos de biotransformação do benzeno	2
1.3 Imunotoxicidade do Benzeno.....	6
1.4 Resposta inflamatória aguda.....	10
2. OBJETIVOS	16
3. MATERIAL E MÉTODOS	17
3.1 Animais	17
3.2 Padrões e Reagentes	17
3.3 Determinação da concentração de FE e HQ.....	18
3.3.1 Padronização do método analítico.....	18
3.3.2 Validação do método	20
3.3.2.1 Recuperação	20
3.3.2.2 Limite de detecção e limite de quantificação	21
3.3.2.3 Linearidade.....	21
3.3.2.4 Precisão intra e interensaio	21
3.4 Protocolos de intoxicação.....	21
3.5 Parâmetros hematológicos	22
3.5.1 Determinação do leucograma.....	22
3.5.2 Determinação do mielograma.....	22
3.5.3 Critérios para classificação das células brancas.....	23
3.6 Resposta inflamatória no tecido subcutâneo.....	24
3.6.1 Indução da bolsa de ar no tecido subcutâneo	24

3.6.2 Indução da resposta inflamatória e coleta do exsudato.....	24
3.7 Indução da resposta inflamatória alérgica pulmonar.....	25
3.7.1 Sensibilização dos animais	25
3.7.2 Coleta do lavado broncoalveolar (LBA) e quantificação celular.....	26
3.7.3 Determinação da atividade de mieloperoxidase (MPO).....	27
3.8 Reação anafilática <i>in vitro</i>	28
3.9 Anafilaxia cutânea passiva (PCA).....	29
3.10 Determinação da produção de íon superóxido.....	29
3.11 Determinação da concentração de nitrito e nitrato.....	30
3.12 Análise estatística.....	31
4 RESULTADOS	32
4.1 Resultados da validação do método para determinação de FE, HQ e CAT em urina por SPME e GC/MS	32
4.1.1 Recuperação.....	32
4.1.2 Limite de detecção e limite de quantificação.....	32
4.1.3 Linearidade.....	33
4.1.4 Precisão intra e interensaio.....	33
4.1.5 Cromatogramas característicos da análise de FE, HQ e CAT em urina de animais expostos aos metabólitos do benzeno por SPME-GC/MS.....	34
4.1.6 Resultados obtidos da análise de FE, HQ e CAT em urina de ratos.	36
4.2 Efeitos dos tratamentos com FE ou HQ sobre a capacidade de migração leucocitária na vigência de resposta inflamatória inata.....	37
4.3 Efeitos dos tratamentos químicos sobre a produção e mobilização de células brancas.....	39
4.4 Efeitos dos tratamentos químicos sobre a capacidade de mobilização leucocitária na vigência de resposta inflamatória	42
4.5 Efeitos dos tratamentos com FE e HQ sobre a produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio.....	45

4.5.1 Espécies reativas de nitrogênio.....	45
4.5.2 Espécies reativas de oxigênio.....	47
4.6 Efeitos dos tratamentos com FE ou HQ sobre a capacidade de migração leucocitária na vigência de resposta inflamatória mediada por anticorpos....	48
4.7 Efeitos dos tratamentos com FE ou HQ sobre a produção de imunoglobulinas e capacidade de desgranulação mastocitária.....	51
5 DISCUSSÃO	54
6 CONCLUSÕES	64
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	65
8 ANEXO A	83
Anexo B	84

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	Esquema de biotransformação do benzeno	3
FIGURA 2	Esquema do procedimento de microextração em fase sólida desenvolvido para determinação de FE, HQ e CAT em urina	19
FIGURA 3	Perfil cromatográfico obtido com a análise por SPME-GC/MS de amostras de urina	35
FIGURA 4	Efeitos dos tratamentos com FE e HQ sobre a mobilização de leucócitos para o tecido subcutâneo inflamado (Modelo da bolsa de ar)	38
FIGURA 5	Efeitos dos tratamentos com FE e HQ sobre o leucograma	40
FIGURA 6	Efeitos dos tratamentos com FE e HQ sobre o número de leucócitos na medula em suas diferentes etapas de maturação.....	41
FIGURA 7	Efeitos do tratamento com FE ou HQ sobre a mobilização de leucócitos para o sangue circulante na vigência de resposta inflamatória inata.....	43
FIGURA 8	Efeitos dos tratamentos químicos sobre a produção de NO	46
FIGURA 9	Efeitos dos tratamentos com FE e HQ sobre a capacidade de geração de íon superóxido	47
FIGURA 10	Efeitos dos tratamentos com FE e HQ sobre a mobilização de leucócitos para o lavado broncoalveolar (LBA)	49
FIGURA 11	Efeitos dos tratamentos com FE e HQ sobre a mobilização de leucócitos PMN para o tecido pulmonar.....	50
FIGURA 12	Efeito dos tratamentos químicos sobre a capacidade de contração da traquéia <i>in vitro</i> desafiada com OVA	52
FIGURA 13	Efeitos dos tratamentos com FE e HQ sobre a anafilaxia passiva cutânea.....	53

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	Valores de recuperação obtidos com a aplicação do método proposto em amostras de urina adicionadas com FE, HQ e CAT em três concentrações (5, 20, 40mg/L)	32
TABELA 2	Valores de limite de detecção e limite de quantificação de FE, HQ e CAT para o método desenvolvido	33
TABELA 3	Valores de precisão intra-ensaio obtidos com a aplicação do método proposto em amostras de urina contendo FE, HQ e CAT	33
TABELA 4	Valores de precisão interensaio obtidos com a aplicação do método proposto em amostras de urina contendo FE, HQ e CAT	34
TABELA 5	Resultados das análises das amostras de urina coletadas de ratos tratados com FE (pool de urina de 5 animais)	36
TABELA 6	Resultados das análises das amostras de urina coletadas de ratos tratados com HQ.....	36
TABELA 7	Efeito do tratamento com FE ou HQ sobre a mobilização de leucócitos circulantes na vigência de resposta inflamatória. Análise diferencial.....	44

RESUMO

Apesar da ampla demonstração do potencial tóxico do benzeno ao sistema imune, os mecanismos envolvidos nos seus diferentes efeitos não estão totalmente esclarecidos. Desta forma, o presente trabalho avaliou a mobilização e função de leucócitos polimorfonucleares (PMN) na vigência de resposta inflamatória aguda em ratos expostos a metabólitos do benzeno. Ratos Wistar, machos foram tratados por período de tempo prolongado (50 mg/kg; i.p.; 1 uma vez ao dia, 13 ou 16 doses diárias com intervalos de 2 dias a cada 5 doses) com hidroquinona (HQ), fenol (FE) ou veículo. As respostas inflamatória inata ou adquirida foram induzidas 24 hs após a última dose dos tratamentos. Para avaliar a intensidade de intoxicação, um método analítico foi padronizado para a extração de HQ e FE da urina dos animais por microextração em fase sólida, para subsequente análise por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa. Os dados da validação mostraram que a técnica analítica é adequada, e a análise das amostras demonstrou o aumento na concentração urinária de HQ, FE e catecol (CAT) em urina dos ratos expostos, confirmando assim a exposição ao FE ou a HQ. A avaliação da resposta inflamatória inata demonstrou que o tratamento com HQ acarretou aumento acentuado no influxo de PMN para a cavidade inflamada. A análise do leucograma mostrou que o tratamento com HQ promoveu neutrofilia, que pode ser decorrente da mobilização destas células da medula, uma vez que número menor de células segmentadas na última etapa de maturação foi encontrado nestes animais. No entanto, durante a vigência de resposta inflamatória, a neutrofilia esperada para este processo não foi detectada nestes animais. Espécies reativas de nitrogênio podem participar dos efeitos aqui detectados em animais tratados com HQ, já que valores aumentados de óxido nítrico (NO) foram mensurados no sangue após o tratamento e no exsudato inflamatório. Diferentemente da exposição à HQ, a administração de FE não alterou a migração de PMN para o foco de lesão na vigência de resposta inflamatória aguda inata. Apesar do tratamento com FE ter acarretado linfocitopenia, a produção das células brancas no compartimento medular e a leucocitose em resposta ao processo inflamatório foram equivalentes ao encontrado em animais controles. No que concerne à resposta inflamatória alérgica, ambos os tratamentos inibiram o influxo de leucócitos para o lavado bronco-alveolar (LBA) e para o tecido pulmonar. A investigação dos mecanismos envolvidos que a exposição à HQ interfere com a síntese de imunoglobulina E e, eventualmente, com a desgranulação de mastócitos. Por outro lado, a exposição ao PHE não alterou estes parâmetros. Em conjunto, os dados aqui apresentados sugerem que os tratamentos com HQ ou FE provocam efeitos distintos na gênese de respostas inflamatórias de diferentes origens quanto à migração leucocitária, e que os mecanismos envolvidos com a imunotoxicidade induzida pelo benzeno é altamente complexa.

SUMMARY

Despite toxicity of benzene has been fully demonstrated, the mechanisms involved on its immunotoxicity are not fully comprehended. Then, the present work studied the mobilization and functions of polymorphonuclear cells (PMN) during acute inflammatory reactions in rats exposed to benzene metabolites. Male Wistar rats were treated with hydroquinone (HQ) or phenol (Phe) for prolonged period of time (50 mg/Kg; i.p.; once a day, 13 or 16 doses, 2 days intervals after each 5 doses). Innate or acquired inflammatory reactions were carried out 24 hours after the last dose of treatments. Animals treated with vehicle were employed as control. In order to determine the intensity of intoxications, an extraction method was developed in urine using a solid phase micro-extraction fiber. The subsequent analysis was performed on gas chromatography coupled to mass spectrometry. Data from validation showed the adequacy of methodology and demonstrated the presence of HQ, PHE and CAT in urine from exposed rats, corroborating the exposition to PHE or HQ. The evaluation of innate inflammatory reaction showed that HQ exposition promoted increment on the number of PMN cells to inflamed area. The leucogram demonstrated that treatment evoked neutrophilia, probably due to mobilizations of segmented cells in the last phase of maturation from bone marrow. However, during the inflammatory process, the characteristic neutrophilia was not detected. Nitrogen reactive species may participate of the intoxication, since elevated values of nitric oxide (NO) were found in blood after intoxication and in inflammatory exudates. Differentially from HQ exposition, administrations of PHE did not alter the migration of PMN into inflammatory focus. Despite the treatment promoted reductions on number of lymphocytes, the production of white cells on bone marrow and the neutrophilia during and inflammatory process were equivalent to those found in control animals. Regarding acquired inflammation, both treatments significantly inhibited the influx of leukocytes to bronchoalveolar fluid. This pattern of response did not reflect the accumulation of PMN cells on pulmonary tissue, since the myeloperoxidase activity was not higher when compared to control rats. The investigations of the mechanisms involved in the inhibited leukocyte recruitment, showed that HQ treatment probably impairs the immunoglobulin E synthesis and mast cell degranulation. On the other hand, FE exposition did not present these effects. Together, data herein suggest that HQ or PHE treatments promote singular effects on PMN recruitment during inflammatory reactions elicited by different agents, and the complexity of mechanisms responsible for the immunotoxicity induced by benzene.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Intoxicações por Solventes Orgânicos

Os solventes orgânicos compõem um grupo de substâncias químicas empregadas como solubilizantes, dispersantes ou diluentes em diferentes processos industriais, especialmente em petroquímicas e suas ramificações. Dentre os solventes mais utilizados destacam-se os hidrocarbonetos alifáticos, aromáticos e halogenados; os álcoois; cetonas e éteres. Além do emprego industrial, os solventes orgânicos são encontrados em produtos de uso doméstico. Dentre os hidrocarbonetos aromáticos, o benzeno é um dos mais empregados, principalmente como solventes para tintas, colas, vernizes, materiais de limpeza e na indústria do couro.

No Brasil, a partir de 1º de janeiro 1997, a utilização do benzeno passou a ser altamente controlada e sua utilização restrita às indústrias que o produzem ou utilizam-no em processos de síntese química, na composição de combustíveis e derivados do petróleo ou em análises laboratoriais, neste último caso, somente quando não for possível sua substituição (BRASIL, 2001).

A "American Conference of Governmental Industrial Hygienists" (ACGIH), uma organização científica americana, classificou o benzeno como um sensibilizante A1, ou seja, reconhecidamente carcinogênico. No entanto, seus produtos de biotransformação; entre os quais fenol (FE) e hidroquinona (HQ) possuem classificação A4, não carcinógeno humano e A3 carcinogênico para animais, com relevância desconhecida para seres humanos, respectivamente (ACGIH, 2003).

Dentre as intoxicações pelo benzeno, as mais comuns são as ocupacionais. No entanto, não são irrelevantes os casos de acidentes domésticos e de contaminação ambiental, devido à sua volatilidade. Neste último caso, vale ressaltar que o benzeno é um contaminante comum do meio ambiente, comumente gerado pelo processamento, combustão e

evaporação de petróleo, além de ser um componente da fumaça do cigarro (Rothman *et al.*, 1996; Linet *et al.*, 1996; Wallace, 1996; Muzyka *et al.*, 1998; Javelaud *et al.*, 1998; Yaneva *et al.*, 1998; Zhang *et al.*, 1999; Bogadi-Sare *et al.*, 2000; Boscolo *et al.*, 2000; para revisão ver Nietert & Silver, 2000).

As intoxicações por solventes orgânicos, entre os quais pelo benzeno, afetam por diferentes mecanismos e intensidade vários sistemas endógenos. De uma maneira geral, os efeitos se manifestam por alterações no sistema nervoso central, comprometimento hepático e renal, doenças respiratórias, doenças do tecido conjuntivo, alterações marcadas na hematopoese e no sistema imune, com a conseqüente gênese de anemias e leucemias, além de neoplasias de diferentes origens (para revisões ver Schenker & Jacobs, 1996; Gralewics, 1999; Garabrant & Dumas, 2000; Nietert & Silver 2000; Waidynatha *et al.*, 2004).

1.2. Toxicocinética e determinação analítica dos produtos de biotransformação do benzeno

Uma vez absorvido, o benzeno é metabolizado extensivamente pelo fígado. O passo inicial é a oxidação do benzeno a epóxido (óxido de benzeno) pela ação da enzima CYP2E1 (Chepiga *et al.*, 1991; Nakajima *et al.*, 1990; Johansson & Ingelman-Sundberg, 1998, Snyder, 2004). O óxido de benzeno é metabolizado por três vias, a saber: 1) conjugação com a glutathione, formando o ácido pré mercaptúrico, que posteriormente é convertido a ácido fenil mercaptúrico; 2) rearranjo não enzimático, com formação de fenol (FE) e 3) hidratação pela epóxido hidrolase, gerando os metabólitos FE, catecol (CAT), hidroquinona (HQ) e 1,2,4, benzenotriol hidroxilados (Seaton *et al.*, 1994). Estes compostos fenólicos são detoxificados por conjugação por sulfato, glutathione ou glucuronídeo (Figura 1).

Figura 1. Esquema de biotransformação do benzeno.

De fato, tem sido bem descrito que os compostos fenólicos formados no fígado são transportados através do sangue para a medula óssea, onde são substratos para peroxidases, como a mieloperoxidase (MPO) e ciclooxigenase (COX). Nesta localização são hidroxilados e/ou oxidados a quinonas e semiquinonas, metabólitos com alto potencial tóxico por reagirem com estruturas nucleofílicas como DNA, RNA e proteínas; ou por gerarem espécies reativas de oxigênio que causam o estresse oxidativo (Thomas *et al.*, 1990; Kolachana *et al.*, 1993; Ross *et al.*, 1996). Também na medula, o processo de detoxificação envolve a conjugação com sulfatos, glutathione ou glicuronídeos. No entanto, a sulfatação não é um mecanismo potente de detoxificação, devido à presença de elevados níveis de sulfatase na medula óssea que podem quebrar os conjugados sulforados para fenóis livres (Low *et al.*, 1995). Adicionalmente, a enzima NAD(P)H: quinona oxidoreductase (NQO1) na medula participa do processo de detoxificação pela sua habilidade de reduzir a benzoquinonas (Ross *et al.*, 1994). Tem sido proposto que a relação entre a concentração de MPO e NQO1 celular pode representar o balanço entre bioativação e detoxificação, influenciando, desta forma, susceptibilidade à toxicidade por compostos fenólicos (Ganousis *et al.*, 1992).

Na exposição inalatória, considerada a mais comum em intoxicações ambientais e ocupacionais, aproximadamente 12% do benzeno absorvido é excretado na sua forma inalterada, a maior parte é exalado pelos pulmões e uma pequena fração é excretada pela urina (Clayton *et al.*, 1999). Desta forma, a grande maioria do solvente sofre intensa metabolização e seus produtos de biotransformação são reconhecidos e estudados como biomarcadores da exposição ao solvente (Qu *et al.*, 2000).

Vários produtos de biotransformação do benzeno têm sido empregados como biomarcadores de exposição. Neste contexto, tem se demonstrado a correlação entre excreção urinária dos compostos fenólicos, bem como dos ácidos S-fenil mercaptúrico e do ácido t-trans-mucônico e a exposição ocupacional ao benzeno.

Uma grande variedade de métodos é utilizada para separação, quantificação e identificação dos produtos de biotransformação do benzeno (Schad et al, 1992). A determinação da concentração biológica do benzeno e de seus produtos de biotransformação pode ser realizada em diferentes matrizes biológicas, entre as quais o ar exalado, o sangue e a urina. Análises do benzeno na respiração podem ser conduzidas com tubo coletor de ar exalado e sua subsequente análise direta por cromatografia gasosa (GC) ou cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (CG/MS) (Brega *et al.*, 1990; Schad *et al.*, 1992; Lee *et al.*, 1993; Laurens *et al.*, 2002; Waidynatha *et al.*, 2004). Entretanto, estas técnicas são menos confiáveis quando comparadas às análises em sangue e urina (Ong & Lee, 1994). A preparação das amostras de urina e sangue para determinação dos compostos fenólicos geralmente envolvem uma fase de hidrólise ácida ou enzimática, seguida de extração líquido-líquido em solvente orgânico. Nestes casos, os métodos espectrofotométricos são empregados para determinação de componentes fenólicos totais, enquanto que os cromatográficos são apropriados para determinação seletiva destes compostos. Acetilação, benzilação, benzoilação, alquilação, sililação são métodos que tem conquistado terreno na literatura para análises de cromatografia gasosa de fenóis (Fiamegos et al, 2003).

Os métodos analíticos empregados para monitorização biológica devem ser precisos e sensíveis para identificação de biomarcadores mesmo em baixas condições de exposição, uma vez que a utilização de um método inadequado pode dificultar ou fornecer dados errôneos na determinação de parâmetros toxicológicos importantes, como a relação entre exposição e dose-resposta e o efeito ("end-point") (Ong & Lee, 1994). Desta forma, a investigação analítica caminha no sentido de desenvolver métodos mais sensíveis e precisos para determinação de marcadores biológicos que indiquem alterações fisiológicas precocemente.

1.3. Imunotoxicidade do benzeno

Uma série de trabalhos relata que os produtos de biotransformação do benzeno são potencialmente mais tóxicos que o próprio solvente. Neste contexto, estudos experimentais *in vivo* e *in vitro* têm demonstrado as concentrações dos metabólitos do benzeno necessárias para os efeitos imunotóxicos são menores que as requeridas pelo benzeno (Irons *et al.*, 1985; Ewens *et al.*, 1999; Fabiani *et al.*, 2001).

A exposição por períodos prolongados é um fator importante na toxicidade do benzeno, mas não parece ser primordial para o efeito. Uma série de trabalhos epidemiológicos, publicados como resultado de um estudo realizado na China com aproximadamente 76.000 trabalhadores expostos ao benzeno por 15 anos, mostrou alterações acentuadas no sistema imune, com conseqüente aumento na incidência de doenças de origem hematopoiética e neoplásicas, responsáveis pelo maior número de óbitos nessa população (Lin *et al.*, 1996; Yin *et al.*, 1996; Hayes *et al.*, 1996; Rothman *et al.*, 1996). Estas observações foram corroboradas por Yaneva *et al.* (1998) que demonstraram incidência de anemias, neutropenia e ativação de linfócitos e monócitos em marinheiros que trabalharam em petroleiros durante anos. Por outro lado, estudos experimentais têm evidenciado que a exposição ao benzeno ou a seus metabólitos por períodos de tempo curtos promove modificações marcadas na eritropoiese e na produção, mobilização e função de leucócitos (Woo *et al.*, 1989; Morimoto, 1993; Robinson *et al.*, 1997; Farris *et al.*, 1997; Bogadi-Sare *et al.*, 2000; Velasco Lezama *et al.*, 2001).

O benzeno e seus metabólitos, especialmente as quinonas, são estimuladores *in vitro* e *in vivo* da diferenciação de granulócitos e promovem supressão da hematopoese *in vivo* (para revisão ver De Caprio, 1999). Tais observações provêm de estudos que mostraram que a exposição de animais de experimentação ao benzeno e seus metabólitos reduz o número de células hematopoiéticas no sangue periférico (Gill *et al.*, 1980; Snyder *et al.*, 1980; Green *et al.*, 1981; Cronkite *et al.*, 1986; 1989; Farris *et al.*, 1997), na

medula e em órgãos linfóides secundários (Robinson *et al.*, 1997; Farris *et al.*, 1997; Kalf *et al.*, 2000; Velasco-Lezama, 2001). É importante salientar que estes efeitos são corroborados em intoxicações humanas (Zhang *et al.*, 1999; Boscolo *et al.*, 2000; Bogadi-Sare *et al.*, 2000).

A granulocitose induzida pelo benzeno tem sido atribuída à incompleta diferenciação celular, de mieloblasto a mielócito, com aumento no número de mielócitos. Este efeito ocorre devido a biotransformação do benzeno, sendo que a oxidação da HQ à p-benzoquinona pela MPO parece ser etapa fundamental. Os mecanismos envolvidos não estão bem determinados, mas parecem ser dependentes de diferentes vias de biotransformação. O solvente suprime o ciclo celular mediado por p53 e aumenta a expressão de p21, um inibidor de quinase ciclo dependente, não resultando em uma simples supressão da hemopoiese, mas propriamente uma mudança dinâmica da hemopoiese durante e após a exposição ao benzeno. (Yoon *et al.*, 2001). Ainda, foi demonstrado que o mecanismo da incompleta diferenciação celular é dependente de proteína quinase C e da subsequente ativação da via da 5-lipoxigenase, com consequente produção de leucotrieno D4, um fator essencial na diferenciação granulocítica (Hazel *et al.*, 1995; 1996a). Adicionalmente, a HQ oxidada pela MPO também inibe a apoptose de mieloblastos, contribuindo para o efeito (Hazel *et al.*, 1996b).

A literatura é ampla e controversa quanto aos mecanismos propostos para os efeitos do benzeno e seus produtos de biotransformação sobre a hematopoese. O tempo de exposição, concentração dos agentes tóxicos e a complexidade do processo contribuem para a diversidade de mecanismos propostos para as alterações tanto na produção, maturação e circulação das diferentes linhagens de leucócitos.

Tem sido proposto que o benzeno e seus metabólitos, especialmente HQ e benzoquinona, prejudicam a clivagem do precursor de interleucina-1 α e β (IL-1 α e IL-1 β). Uma linha de investigações na década de 90 sugeriu que, nos casos de intoxicação humana e experimental por benzeno, HQ e benzoquinona, células competentes da medula óssea perdem a capacidade de clivar a pro-interleucina-1 (pro-IL-1) em IL-1 α e β , formas biologicamente

ativas que estimulam a síntese de fatores de crescimento da colônia hematopoiética. O mecanismo desta deficiência parece ser dependente da inibição da atividade da calpaína, uma protease dependente de grupos sulfidril que cliva a pro-IL-1. No modelo proposto, a benzoquinona, metabólito formado a partir da HQ por peroxidases de células da medula, interage com os grupos sulfidril da calpaína inibindo sua atividade (Renz & Kalf, 1991; Miller *et al.*, 1994; Niculescu & Kalf, 1995; Niculescu *et al.*, 1995; Niculescu *et al.*, 1996; Kalf *et al.*, 1996).

Outra linha de evidências bastante aceita para os mecanismos tóxicos do benzeno e seus metabólitos fenólicos, é a geração endógena de compostos derivados do oxigênio e nitrogênio. No processo de metabolização do solvente via citocromo P450 CYP2E1, espécies reativas de oxigênio (ROS) são geradas e podem induzir estresse oxidativo *in vivo*. Adicionalmente, o benzeno pode gerar ROS diretamente na medula pela ação de MPO (para revisão ver Parke, 1996). Tem sido descrito que a intoxicação *in vivo* e *in vitro* pelo benzeno e seus produtos de biotransformação promove lesão no DNA de células da medula óssea de camundongos e de linfócitos, monócitos e neutrófilos humanos por um mecanismo dependente de reações oxidativas (Laskin *et al.*, 1995; 1996; Wu *et al.*, 1998; Tuo *et al.*, 1999a,b; Wiemels *et al.*, 2001; Fabiani *et al.*, 2001). Valores aumentados na concentração de metabólitos estáveis do óxido nítrico (NO) - nitrato e nitrito - nestes ensaios sugerem que a lesão possa ser decorrente da geração de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (Tuo *et al.*, 1999a, b). Nesta linha de evidências, Wu *et al.* (1998) já haviam demonstrado a correlação entre a atividade exacerbada da enzima superóxido dismutase (SOD), a leucocitopenia e a lesão do DNA de linfócitos em amostras de sangue coletadas de pacientes intoxicados. Ainda, Laskin *et al.* (1995) haviam descrito que células da medula humana, tratadas com benzeno ou seus produtos de biotransformação *in vitro* produzem concentrações maiores de NO em resposta a diferentes estímulos.

Adicionalmente, demonstrou-se recentemente que solventes orgânicos, entre os quais tolueno e derivados do benzeno, estimulam o

“burst” respiratório de granulócitos humanos com geração de metabólitos ativos do oxigênio, através de um mecanismo que envolve fosfolipase C cálcio-dependente, fosfolipase D e proteína C quinase (Myhre *et al.*, 2000). Este trabalho ratifica observações prévias de MacEachern *et al.* (1992) que demonstraram que granulócitos e monócitos da medula óssea de camundongos intoxicados por benzeno apresentam produção de peróxido de hidrogênio e atividade quimiotóxica aumentadas. O incremento na produção de derivados do oxigênio parece ser um dos mecanismos envolvidos na indução de apoptose de leucócitos polimorfonucleares (PMN), demonstrada nos casos de intoxicação experimental e em diferentes linhagens de células *in vitro* (Ross *et al.*, 1996; Vojdani *et al.*, 1997; Kuo *et al.*, 1999; para revisão ver Robertson & Orrenius, 2000). Os efeitos sobre apoptose, entretanto, também parecem depender de alterações intracelulares acarretadas diretamente pelos agentes tóxicos, que interferem com diferentes mensageiros do processo entre os quais as caspases, e a sinalização via ceramidas e NF Kappa B (Vojdani *et al.*, 1997; Kuo *et al.*, 1999; Bratton *et al.*, 2000; Pyatt *et al.*, 1998, 2000). Recentemente, tem sido proposto que compostos fenólicos, entre os quais a HQ, inibe a ativação de NF-Kappa B em várias linhagens celulares, com bloqueio na formação do complexo NF-kappa B/DNA. Entre os inúmeros efeitos desta inibição, o prejuízo na síntese de citocinas e a maior susceptibilidade das células à apoptose contribuem efetivamente para a supressão da hematopoese e de funções leucocitárias (Kerzic *et al.*, 2003; Ma *et al.*, 2003).

Os dados de literatura descritos anteriormente, ainda que sumarizados, mostram que o benzeno, especialmente via seus produtos de biotransformação que geram quinonas, promovem diferentes alterações na produção e função de leucócitos, que são responsáveis pela toxicidade sobre o sistema imune descrita em humanos e em animais de experimentação. Apesar do grande número de trabalhos sobre o assunto, os mecanismos envolvidos são complexos e ainda não estão esclarecidos completamente.

1.4. Resposta inflamatória aguda

O sistema imune compreende um complexo conjunto de células e tecidos que tem por função proteger o organismo da invasão de agentes estranhos e manter as condições apropriadas para detecção de estímulos antigênicos. Em condições fisiológicas, o organismo está apto a se proteger por intermédio de uma série de reações, denominadas, de uma maneira geral, de resposta imune. No caso desta resposta ser insuficiente, o organismo fica susceptível à infecções e neoplasias, e por outro lado, se a resposta for exacerbada, lesões teciduais podem prejudicar os mecanismos de reparo e regeneração.

Os leucócitos são células de defesa do organismo, e suas adequadas atividades funcionais e interações com as demais células e tecidos durante as reações imunes são fundamentais para a manutenção da integridade orgânica, em condições fisiológicas e patológicas.

O sistema imunológico apresenta dois mecanismos de defesa: o mecanismo de imunidade inespecífica ou natural e o mecanismo de imunidade específica ou adquirida. O primeiro representa a primeira linha de defesa do organismo, e caracteriza-se por apresentar pouca especificidade contra microorganismos, não guardar memória e depender da ação dos fagócitos (neutrófilos e macrófagos) e células NK. Há participação de mediadores de origem celular e plasmática. O macrófago é uma célula importante nos mecanismos de respostas porque, entre outras funções, tem a habilidade de ligar a imunidade natural com a imunidade específica pelo processamento e apresentação de antígenos. (para revisão ver Calich & Vaz, 2001)

A imunidade específica, como o nome já diz, apresenta grande especificidade contra microorganismos, guarda memória, manifesta-se após 4 a 7 dias e depende da ação de linfócitos. Os antígenos que não são totalmente destruídos pelos fagócitos, durante a imunidade natural, são drenados para os vasos linfáticos e para o linfonodo. No linfonodo, os

antígenos entram em contato com os linfócitos B e T que estão em constante recirculação (para revisão ver Calich e Vaz, 2001).

Os leucócitos são provenientes de um precursor comum na medula óssea, que prolifera em duas linhagens, a saber: 1) a de células mielóides, que darão origem aos granulócitos e 2) a de células linfóides que originarão os linfócitos. Enquanto as células mielóides permanecem na medula, onde as linhagens proliferam e maturam, as células linfóides, em diferentes fases de seu desenvolvimento, migram, carregadas pelo sangue, para os órgãos linfóides, onde a maturação dos linfócitos será completada. A maneira simplificada da leucocitopoiese descrita acima não reflete o processo na íntegra, uma vez que este é altamente complexo, dependente de substâncias químicas produzidas no local, como citocinas e fatores de crescimento que interagem entre si em processos de retro-alimentação (para revisão ver Cotran *et al.*, 1996).

Já maduros, os leucócitos caem na circulação, permanecem por um período de tempo específico e variável, e em seguida, migram para os tecidos. Uma pequena parcela de leucócitos interage com as células endoteliais dos vasos de diferentes tecidos, para onde migram e completam seu ciclo de vida. Tem sido bem descrito na literatura que as células brancas nos tecidos entram em apoptose e são fagocitadas por macrófagos residentes. Os linfócitos possuem um padrão complexo de migração, dependente do seu estado de ativação e memória, que difere da migração unidirecional do sangue para os tecidos, descrita acima para as demais células brancas. Eles recirculam, ou seja, são lançados pelo sistema linfático para a circulação e desta para os tecidos, e retornam continuamente para o sangue e tecidos linfóides secundários (para revisão ver Wiedle *et al.*, 2001).

Na vigência de resposta inflamatória de diferentes origens, quer seja físico, químico ou biológico, todo o quadro descrito acima é exacerbado. Nestes casos, ocorre incremento na hematopoese e na mobilização destas células para a corrente sangüínea e para o tecido injuriado.

Em condições normais, a interação dos leucócitos circulantes com o endotélio é muito pequena, uma vez que estes circulam no centro da

corrente sangüínea envoltos pelos eritrócitos. Fazem parte das poucas exceções, o “pool” periférico de leucócitos aderidos à parede dos vasos da microcirculação, principalmente pulmonar, e a recirculação dos linfócitos, que interagem com células endoteliais especializadas de tecidos linfóides secundários. No entanto, em situações de estresse, como em processos inflamatórios agudos e crônicos, alterações reológicas e hemodinâmicas acarretadas pela ação de mediadores químicos liberados na fase inicial do processo, fazem com que as células brancas presentes no sangue circulante marginem o endotélio de microvasos, predominantemente de vênulas pós-capilares próximas à área lesada (Harlan, 1985). Em contato direto com o endotélio, os leucócitos deslizam e aderem à parede vascular, para a migração por entre as junções interendoteliais (para revisão ver Harlan, 1985; Rampart, 1994; Wiedle *et al.*, 2001). Os fenômenos de interação leucócito-endotélio são denominados de “rolling” e aderência e são etapas iniciais e fundamentais para o recrutamento de células para o tecido lesado. Algumas doenças caracterizadas por imunodeficiências são decorrentes da incapacidade de leucócitos interagirem adequadamente com o endotélio e, conseqüentemente, alcançarem o tecido lesado, prejudicando a resolução do processo (para revisões ver Rampart, 1994; Granger & Kubes, 1994).

No tecido, os leucócitos possuem a habilidade de locomover-se orientadamente em direção ao foco de lesão, através da emissão de pseudópodes e da perfeita interação com componentes da matriz extracelular. A locomoção depende de um mecanismo intrínseco complexo, com harmonia entre receptores de membrana e ativação de mensageiros intracelulares que, através de reações específicas, desencadeiam a reorganização de receptores de membrana e organelas intracelulares. A reorganização de microtúbulos e microfilamentos é responsável pela orientação e locomoção celular, respectivamente (Malech *et al.*, 1977; Zigmond *et al.*, 1981; Sullivan *et al.*, 1984).

No foco de lesão, os leucócitos, principalmente neutrófilos e macrófagos, fagocitam o agente injuriante, com sua conseqüente destruição por atividades microbidas. Durante o processo de fagocitose, os fagócitos

iniciam um alto consumo de oxigênio. Este processo, conhecido como “burst” respiratório, é dependente da ativação de um sistema enzimático, no qual a NADPH oxidase ligada à membrana é capaz de oxidar o NADPH produzido durante o ciclo da hexose-monofosfato. O alto consumo de oxigênio culmina com a produção de derivados da redução do oxigênio, como o íon superóxido e peróxido de hidrogênio. O radical superóxido não tem poder bactericida; entretanto, rápida ou espontaneamente, ou por ação da enzima superóxido-dismutase (SOD) é convertido a peróxido de hidrogênio. O passo seguinte leva à formação de potentes agentes microbicidas, entre os quais do radical hidroxila, pela reação de Fenton, e o ácido hipocloroso, em reação catalisada pela mieloperoxidase liberadas de grânulos intracelulares. Estes agentes reativos do oxigênio, em associação com enzimas liberadas de grânulos específicos dos leucócitos, destroem o material fagocitado (Babior *et al.*, 1973; Edwards, 1996). Em sistemas biológicos, estas são as principais vias de formação de radicais livres de oxigênio. Estes produtos são altamente destrutivos, quer seja para agentes agressores, quer seja para o tecido onde ocorre a reação.

Desta forma, a remoção das células fagocíticas do sítio de lesão é importante para o término da reação. A manutenção das células ativas no tecido pode ser prejudicial, uma vez que secretam e geram substâncias que passam a ser tóxicas para o tecido em regeneração. A resolução do processo foi por muito tempo alvo de investigações, mas atualmente é reconhecido que as células fagocíticas entram em apoptose e são fagocitadas por macrófagos residentes (Homburg & Ross, 1996; Haslett, 1997; Hussain *et al.*, 1998).

É importante salientar que os processos de defesa e regeneração são dependentes da adesão celular, da ampla e complexa mediação química e da interação com diferentes sistemas endógenos.

Até a descrição das moléculas de adesão na década de 80, os mecanismos envolvidos na adesão celular eram pouco conhecidos e controversos. Atualmente sabe-se que receptores glicoproteicos expressos nas membranas celulares, que interagem entre si ou com ligantes

específicos, medeiam à ligação célula-célula em processos orgânicos importantes como a reprodução, crescimento e manutenção da integridade tecidual, entre os quais os processos de defesa e regeneração tecidual. Neste contexto, vale ressaltar que várias famílias de moléculas de adesão, classificadas de acordo com sua estrutura química, participam da mobilização de células brancas de seus compartimentos de reserva até o acúmulo no tecido lesado além dos processos de interação necessários para destruição do agente lesivo e de regeneração tecidual (Gregory *et al.*, 1998; para revisões ver Worthylake & Burridge, 2001; Westermann *et al.*, 2001; Gazitt *et al.*, 2001; Steeber & Tedder, 2001).

A mediação química da resposta imune é complexa e específica. Mediadores de origem plasmática e celular são gerados e/ou secretados no decorrer do processo de defesa para mediar os diferentes eventos. A participação de derivados do ácido araquidônico, interleucinas, fatores de crescimentos, fator de necrose tumoral, aminas biogênicas, bradicinina, fatores derivados do sistema complemento e NO, entre outros, tem sido amplamente demonstrada na mediação da resposta imune (para revisão ver Cotran *et al.*, 1996). Vale ressaltar, no entanto, que alguns mediadores, entre os quais algumas interleucinas (IL-4, IL-10, IL-12 e IL-15) e, em algumas situações o NO, atuam como antiinflamatórios e imunossupressores em diferentes etapas dos processos (para revisão ver Baggiolini, 2001).

O papel do NO como mediador pró ou antiinflamatório é controverso para alguns eventos do processo (para revisões ver Hickey *et al.*, 2001; Chung *et al.*, 2001). Tem sido sugerido que a habilidade do NO induzir ou inibir etapas do processo é dependente da concentração do mediador no local da lesão e o tipo de resposta inflamatória (para revisão ver Hickey, 2001; Chung *et al.*, 2001). No entanto, a capacidade do NO de reagir com a molécula de oxigênio e radicais superóxidos, produzindo diferentes espécies reativas mais lesivas tem sido proposta como o mecanismo de lesão tecidual do NO (Davis *et al.*, 2001). Espécies reativas do oxigênio e do nitrogênio exercem papéis importantes na manutenção da homeostasia e dos processos

de defesa. As sinalizações dependentes de NO são moduladas pelo ânion superóxido e pela SOD, que catalisam a formação de peróxido de hidrogênio e a forma molecular do oxigênio. Aumentos na produção destes agentes contribuem para os efeitos deletérios do NO. O peróxinitrito, gerado pela reação do NO com o íon superóxido, parece ser o mais potente agente citotóxico associado ao NO pela sua capacidade de reagir com compostos tióis, lipídios, proteínas e DNA de diferentes células (para revisões ver Gow & Ischiropoulos, 2001; Tarpey & Fridovich, 2001). Desta forma, o NO tem sido proposto como um agente mediador dos processos de defesa, e ao mesmo tempo capaz de induzir efeitos prejudiciais pela sua capacidade de interagir com espécies reativas de oxigênio.

Apesar da descrição resumida sobre os processos envolvidos com a resposta inflamatória aguda apresentada acima, fica claro que a deficiência ou exacerbação de qualquer um dos passos da resposta quer seja na função celular ou na mediação desta, acarreta prejuízos ao organismo. Desta forma, a caracterização dos mecanismos de ação de agentes que modifiquem a capacidade de resposta inflamatória, bem como os reflexos destas alterações na manutenção da integridade orgânica são cruciais para a compreensão dos processos fisiopatológicos, para a indicação de marcadores biológicos e para implantação de estratégias terapêuticas adequadas.

2. OBJETIVOS

Como descrito anteriormente, o benzeno é um solvente que pode provocar sérios problemas a humanos, principalmente, a trabalhadores de diversas ramificações industriais. Apesar da ampla descrição da literatura sobre o assunto, a gênese das intoxicações ainda não está completamente elucidada.

Por estes motivos, este trabalho avaliou, experimentalmente, o efeito do tratamento por período de tempo prolongado com produtos de biotransformação do benzeno – hidroquinona (HQ) e fenol (FE) sobre o recrutamento e função de leucócitos polimorfonucleares (PMN) na vigência de resposta inflamatória aguda.

Inicialmente, foi padronizado método analítico de extração em urina, para quantificação dos produtos de biotransformação do benzeno após as exposições, por CG/MS.

Em seguida, os ensaios foram delineados para investigar:

- os efeitos dos tratamentos sobre a capacidade de migração celular em uma resposta inflamatória inata e resposta mediada por anticorpos;
- os efeitos dos tratamentos sobre o leucograma e mielograma;
- os efeitos sobre a mobilização periférica de leucócitos na vigência de resposta inflamatória;
- os efeitos dos tratamentos sobre a atividade microbicida de PMN no foco inflamatório, através da determinação da produção de íon superóxido;
- os efeitos dos tratamentos sobre a produção de NO em dois compartimentos distintos: sangue circulante e no exsudato;
- os efeitos dos tratamentos sobre a produção de anticorpos e a desgranulação mastocitária na vigência de resposta alérgica e pulmonar.

3. MATERIAL E MÉTODOS

O Projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.

3.1. Animais

Foram empregados ratos Wistar machos, pesando entre 150-200g, fornecidos pelo Biotério da Faculdade de Ciências Farmacêuticas/Instituto de Química da Universidade de São Paulo. Os animais foram mantidos em condições normais de biotério, com livre acesso à ração e água durante todo o período de tratamento químico.

3.2. Padrões e Reagentes

Hidroquinona (HQ; Sigma, St. Louis, MO, USA; cód. H9003); Fenol (FE, Sigma, St. Louis, MO, USA; cód.P5566), Catecol (Sigma, St. Louis, MO, USA; cód. 135011); Etanol (Merck & Co, NJ, USA); Ovalbumina (OVA, grau II, Sigma, St. Louis, MO, USA; cód A5253); Albumina sérica bovina (BSA, fração V, Sigma, St. Louis, MO, USA; cód. A9543); Água oxigenada (Lab Synth, cód. P1013 01); Orto-dianisidina (Sigma, St. Louis, MO, USA; cód.D9143); Pentobarbital sódico (Hypnol®, Cristália, Brasil); Glicogênio de ostra (Sigma, St. Louis, MO, USA, cód. 8751); Cloridato de cetamina (Vetaset®, Lab. Font Dodte, USA); Cloridato de xilazina (Vensol®, Lab. Konie); Heparina (Liquemine®, Roche); EDTA (Sigma, St. Louis, MO, USA, cód. E 5391); Hexametil (Sigma, St. Louis, MO, USA, cód. H5882); Corantes Giemsa e May-Grünwald (Merck, SA); Acetato de forbol miristato (PMA, Sigma, St. Louis, MO, USA, cód.P8139), Azul de metileno, nitrito de sódio, cloreto de sódio, cloreto de cálcio, cloreto de potássio, bicarbonato de sódio,

fosfato di-básico de potássio, cloreto de cálcio, sulfato de magnésio, Glicose (Merck,SA); Hidroquinona D6 (Lab. Cambridge Isotope Laboratories, Inc, Cód. 2306-1); Catecol D6 (Lab. Cambridge Isotope Laboratories, Inc, Cód. DLM 1912-5); Fenol D5 (Lab. Cambridge Isotope Laboratories, Inc, Cód. DLM 695-1).

3.3. Determinação da concentração de FE e HQ

3.3.1. Padronização do método do analítico

Foi empregada uma alíquota de 1 mL da amostra (urina normal), na qual foi adicionada 100 μ L de ácido clorídrico concentrado. Em seguida, a solução foi submetida à hidrólise a 90°C durante 90 minutos. Após resfriamento até temperatura ambiente, a amostra foi neutralizada com solução de KOH 5M (cerca de 270 μ L), seguida da adição de 100 μ L de ácido acético glacial. Posteriormente, os analitos (fenol, catecol e hidroquinona) foram extraídos por microextração em fase sólida (SPME) utilizando fibra de poliacrilato, a qual foi inserida na solução da amostra durante 20 minutos, sob agitação magnética. Posteriormente, a fibra foi retraída e imediatamente exposta aos vapores do reagente de derivação hexametildisilazano (submetido a 80°C) durante 20 minutos. Após o período de derivação, o dispositivo de SPME foi transferido para o injetor do GC/MS, onde a fibra permaneceu exposta durante 20 minutos. Um esquema do procedimento de extração dos analitos está demonstrado na Figura 2.

Figura 2. Esquema do procedimento de microextração em fase sólida, desenvolvido para determinação de FE, HQ e CAT em urina.

Foi utilizado espectrômetro de massa modelo 5972 associado a um equipamento de cromatografia em fase gasosa modelo 6890 (GC/MS), ambos da Hewlett Packard (Little Falls, EUA), equipado com coluna capilar de sílica fundida HP-5MS (Hewlett Packard) com as seguintes dimensões: 30m x 0,25mm x 0,25µm.

As condições cromatográficas foram as seguintes:

- Gás de arraste: hélio, a um fluxo constante de 0,6mL/min; Temperatura do injetor: 250°C; Temperatura da interface: 250°C; Programação da Temperatura do Forno: 50°C (2min); 13°C/min até 250°C (5min).
- O modo de operação do espectrômetro de massa: impacto de elétrons e monitoramento seletivo de íons (SIM). Os seguintes fragmentos foram

selecionados para os trimetilsilil-derivados dos analitos formados e os respectivos padrões internos deuterados: FE (151, 152, 166); Fe-d5 (156, 171); CAT (239, 240, 254); CAT-d5 (243, 258); HQ (239, 240, 254) e HQ-d5 (243, 258). Os íons utilizados para quantificação estão sublinhados.

-

3.3.2. Validação do método

A validação do método foi realizada pela determinação dos valores de recuperação, limite de detecção (LOD) e limite de quantificação (LOQ), linearidade, precisão intra e interensaio.

3.3.2.1. Recuperação

Os estudos de recuperação de FE, HQ e CAT foram conduzidos levando-se em consideração as possíveis perdas dos analitos devido à decomposição térmica, à volatilização que poderiam ter ocorrido durante o procedimento hidrólise.

Para ambos os estudos, dois grupos de amostras de urina de diferentes concentrações foram analisados. No grupo A, consistindo de três concentrações das substâncias pesquisadas (5, 20, 40 mg/L), analitos foram adicionados em 1mL de urina e analisados de acordo com o método descrito no item 3.3.1. em seis replicatas para cada concentração. No grupo B, também consistindo de seis replicatas para cada concentração (5, 20, 40 mg/L), os padrões dos analitos foram adicionados às amostras imediatamente antes do processo de SPME. A recuperação absoluta foi avaliada pela resposta média obtida no grupo A em relação à resposta média obtida no conjunto B.

3.3.2.2. Limite de detecção e limite de quantificação

O limite de detecção (LOD) foi determinado como sendo a concentração correspondente à resposta obtida da relação sinal/ruído, multiplicado por três, e o limite de quantificação foi à concentração correspondente à resposta obtida da relação sinal/ruído multiplicado por dez.

3.3.2.3. Linearidade

O estudo de linearidade foi realizado pela análise das amostras de urina submetidas ao método padronizado em triplicata nas seguintes concentrações: FE=LOQ 8 e 15 mg/L; HQ e CAT=LOQ 8, 15, 30; 50 e 60mg/L. Curvas de calibração foram construídas e os coeficientes de correlação foram calculados.

3.3.2.4. Precisão intra e interensaio

A precisão intra e interensaio foram determinadas indiretamente pelo cálculo de imprecisão através da determinação do coeficiente de variação do método (CV). As amostras de urina foram analisadas em três dias diferentes e continham as seguintes concentrações: para FE 5,0 e 10 mg/L e para HQ e CAT 20 e 40mg/L. As análises foram realizadas em sextuplicata para cada concentração.

3.4. Protocolos de Intoxicação

O protocolo de intoxicação foi baseado no descrito por MacEachern *et al.*, (1992) e Velasco Lezama *et al.* (2001). O esquema de intoxicação utilizou administrações intraperitoneais diárias dos produtos de biotransformação do benzeno (dose 50 mg/kg em um volume final de 1 ml). HQ e FE foram dissolvidos em etanol absoluto (5% da solução final) e

volume foi completado com solução salina estéril. Os animais receberam 13 ou 16 doses dos tratamentos, com intervalos de 2 dias a cada 5 doses. Este intervalo foi realizado com a finalidade de simular uma exposição humana, visto que os trabalhadores possuem uma jornada de trabalho com 5 dias consecutivos. Animais controles receberam volumes equivalentes dos veículos pela mesma via. Os animais foram avaliados 24 horas após a última dose dos tratamentos. Foi realizada a medição do peso corpóreo dos animais antes e após os tratamentos.

3.5. Parâmetros hematológicos

3.5.1. Determinação do leucograma

Os animais foram anestesiados com pentobarbital sódico (Cristália, 65 mg/Kg, via i.p.) e o sangue coletado, em ambiente estéril, por meio de punção da aorta abdominal, utilizando-se EDTA 10%, como anticoagulante. Para determinação do leucograma antes e após a indução de resposta inflamatória, o sangue foi coletado do plexo orbital com auxílio de capilar e sob ação anticoagulante do EDTA 10%.

O número de leucócitos foi determinado em câmara de Neubauer, utilizando-se a diluição de 1:20 em líquido de Turk (Dacie & Lewis, 1995).

Os valores relativo e absoluto do número de leucócitos foram determinados em extensões sangüíneas realizadas após a coleta do sangue e coradas pela coloração de May Grunwald-Giensa, modificada (Rosenfeld, 1947).

3.5.2. Determinação do mielograma

Os animais foram anestesiados com pentobarbital sódico (65 mg/Kg, via i.p.), e após a coleta do sangue da aorta abdominal, iniciou-se o

procedimento para coleta das células da medula óssea. As células foram obtidas por meio de lavagem da cavidade femoral com meio McCoy's 5A[®] modificado (Sigma[®], Chemical Company, USA), utilizando-se seringa de 1mL e agulha de calibre 26 mm. A suspensão celular foi colocada em tubos plásticos, cuidadosamente homogeneizada com pipeta tipo Pasteur e mantida em banho de gelo. A obtenção de células de medula óssea dos animais do grupo controle foi realizada seguindo os mesmos procedimentos técnicos.

As células obtidas da medula óssea foram quantificadas em hemocitômetro de Neubauer, após diluição de 1:100 Líquido de Türk, diluente composto por uma solução de 1% de ácido acético glacial.

Para avaliação morfológica foram feitas lâminas obtidas por citocentrifugação de amostras da suspensão celular e posteriormente submetidas à coloração de May-Grunwald-Giensa, modificado (Rosenfeld, 1947) e peroxidase (método de Graham-Knoll modificado), para identificação e quantificação dos diferentes tipos celulares.

3.5.3. Critérios para classificação das células brancas

A classificação das células da linhagem granulocítica nos órgãos hemopoéticos dos animais foram baseadas na relação núcleo-citoplasma, afinidade tensorial do citoplasma, e das organelas celulares, na presença ou não de granações primária e secundária no citoplasma, no padrão de cromatina nuclear, na presença ou não de nucléolos, no diâmetro e segmentação, ou não do núcleo. Na série granulocítica consideraremos quatro etapas maturativas: BLASTOS envolvendo o hemocitoblasto e mieloblasto; FORMAS JOVENS englobando as etapas de promielócito e mielócito; FORMAS EM ANEL, correspondentes ao metamielócito e ao bastonete; SEGMENTADOS envolvendo as formas segmentadas a partir de 2 lóbulos nucleares (Borelli *et al*, 1995).

As identificações dos monoblastos e plasmoblastos seguiram os

critérios morfológicos do padrão de cromatina nuclear e basofilia do citoplasma. Promonócitos, monócitos e macrófagos serão reunidos em um grupo de células denominadas de **MONO-MACROFÁGICAS**.

As células da linhagem linfóide envolvendo prolinfócitos, linfócitos típicos ou atípicos foram agrupadas como linfócitos.

3.6. Resposta inflamatória no tecido subcutâneo

3.6.1. Indução da bolsa de ar no tecido subcutâneo

A bolsa de ar no dorso dos animais foi induzida pela injeção de 20 ml de ar estéril utilizando filtro millex HV 0,45µm no tecido subcutâneo do dorso depilado no 7º dia após o início dos tratamentos. Para manter a bolsa inflada, foi injetada a mesma quantidade de ar três dias antes da injeção do agente flogístico. Este protocolo é baseado no descrito por Edwards *et al.*, 1981.

3.6.2. Indução da resposta inflamatória e coleta do exsudato

A indução da resposta inflamatória foi realizada no 18º dia após o início dos tratamentos e 10 dias após a indução da bolsa de ar. Animais previamente anestesiados com pentobarbital sódico (65 mg/Kg, via i.p.), foram injetados com solução de glicogênio de ostra (solução salina 5%, 1 mL) diretamente dentro da bolsa de ar. Após 6 horas, os animais foram novamente anestesiados e sacrificados por dessangramento pela aorta abdominal. Em seguida foi feita a lavagem da bolsa com 4 mL de solução tampão fosfato-salina (PBS), contendo heparina (5UI/mL), e o exsudato foi coletado por aspiração com auxílio de pipeta Pasteur plástica. O exsudato foi centrifugado a 1500 rpm, 10 min, e o sobrenadante foi congelado a -70°C. As células foram ressuspensas em 1 mL de PBS para contagem. O número

total e diferencial de leucócitos foi determinado em câmara de Neubauer e em esfregaços corados por Giemsa, respectivamente.

Dias de tratamentos:

3.7. Indução da resposta inflamatória alérgica pulmonar

3.7.1. Sensibilização dos animais

Os animais receberam 10 µg de ovoalbumina (OVA, grau II) dissolvida em hidróxido de alumínio (10 mg) por via intraperitoneal. Após 7 dias da sensibilização, os animais receberam 0,2 ml de solução de ovoalbumina a 0,1% (reforço) por via subcutânea. Decorridos 6 dias do reforço, a reação anafilática foi desencadeada expondo os animais a broncoprovocação, sendo realizada da seguinte maneira: os animais foram submetidos á exposição pela via inalatória utilizando-se um aparelho nebulizador contendo ovoalbumina acoplado a uma câmara fechada durante 15 minutos. O período total de 13 dias de sensibilização foi baseado no protocolo proposto por Coleman *et al.* (1983), que verificou que após a injeção intraperitoneal de OVA emulsificada em alúmen, os níveis circulantes de anticorpos (IgE) aumentam rapidamente entre 7 e 14 dias. Abaixo está esquematizado o protocolo empregado para os tratamentos químicos e a sensibilização.

Dias:

3.7.2. Coleta do lavado broncoalveolar (LBA) e quantificação celular

A coleta do LBA foi realizada de acordo com Tavares de Lima *et al.* (1998), 24 horas após a broncoprovocação com o antígeno (OVA). Para tanto, os animais foram anestesiados com cloridrato de quetamina e xilazina (0,3 ml) e a cavidade peritoneal foi exposta e o dessangramento foi realizado pela aorta abdominal. Foi feita incisão longitudinal na região cérico-ventral, a traquéia foi exposta e canulada utilizando uma válvula reguladora com três entradas. Foi acoplada a uma das entradas uma cânula de polietileno; à segunda, uma seringa de plástico contendo 20 ml de PBS e, à terceira, uma seringa vazia. A cânula foi inserida na traquéia e foi realizada a lavagem do espaço broncoalveolar. Esta lavagem foi efetuada em etapas, injetando-se lentamente no espaço alveolar um volume de 10 ml de PBS. A seguir, a válvula ligada à seringa contendo PBS foi fechada, abrindo-se aquela ligada à seringa vazia, sendo feita à aspiração do PBS injetado, acompanhada de

delicadas massagens no pulmão. Esse procedimento foi repetido até que todo o volume de PBS fosse injetado.

O LBA obtido foi centrifugado por 10 min a 1.000 rpm. O sobrenadante foi armazenado a -70 °C e as células ressuspensas em 1 ml de PBS. A contagem do número total de células foi realizada em câmara de Neubauer e a diferencial por microscopia óptica comum. Foram contadas no mínimo 400 células, diferenciando-as segundo o tipo celular (células mononucleares, neutrófilos e eosinófilos). Para tanto, alíquotas da amostra (90 µl) foram acrescidas de 10 µl de cristal violeta a 0,2% dissolvido em ácido acético (30%); desta solução, uma alíquota (10 µl) foi diluída com 90 µl de PBS; totalizando uma diluição de 1:100.

Para a contagem diferencial das células, alíquotas da amostra (70 µl) foram colocadas em Citospin® (Fanem) e centrifugadas a 1.000 rpm por 5 minutos. As lâminas obtidas foram coradas pelo método de May-Grünwald-Giemsa modificado segundo Rosenfeld.

3.7.3. Determinação da atividade de mieloperoxidase (MPO)

O influxo de neutrófilos para o pulmão foi investigado pela da determinação da atividade da enzima MPO. Decorrido o tempo desejado de estudo, os animais foram anestesiados (hidrato de cloral 400 mg/Kg, ip), submetidos a laparotomia mediana e dessangrados pela aorta abdominal. Subseqüentemente, a cavidade torácica foi aberta e o leito vascular do pulmão imediatamente perfundido com PBS contendo heparina (5 UI/mL) utilizando-se uma cânula inserida na artéria pulmonar.

O tecido pulmonar livre de sangue foi pesado e a ele adicionados 3 mL/g de tampão fosfato (pH 6,2 contendo 0,5% de brometo de hexadeciltrimetilamônio e 5 mM EDTA). A seguir, as amostras foram homogeneizadas em Politron® (Brinckman), por 2 vezes consecutivas, por um período de 30 segundos cada. Os homogenatos resultantes foram então, submetidos a

ondas ultrassônicas (Vibra Cell – Sonics Materials) durante 2 minutos por 3 vezes, na frequência de 40 Hz em intervalos regulares de 5 segundos. As amostras foram centrifugadas a 17.500 rpm durante 15 minutos à temperatura de 4°C, e o sobrenadante utilizado para determinação da atividade de MPO.

Foram adicionados a tubos de vidro, 680 µl de PBS contendo 0,25% de albumina sérica bovina (BSA), 500 µl de tampão fosfato pH 6.2, 100 µl de água oxigenada (0,0005%), 40 µl da amostra e 100 µl de orto-dianisidina (1,25 mg/ml). Após 15 minutos, a reação foi paralisada pela adição de 100 µl de azida sódica (1%). A quantificação da absorbância foi feita por espectrofotometria (450 nm) em leitor de placas (Spectra Max Plus® – Molecular Devices).

3.8. Reação anafilática *in vitro*

Estes experimentos foram conduzidos para avaliar indiretamente se a síntese de imunoglobulinas é afetada pelos tratamentos químicos. Para tanto, investigamos a contração da musculatura lisa de traquéia isolada de ratos desafiados “*in vitro*” com OVA. Os animais foram sacrificados por excesso de anestésico (hidrato de cloral; > 400 mg/kg i.p.), dessangrados pela aorta abdominal e, a seguir, o tórax foi aberto. A traquéia foi removida e o tecido conjuntivo adjacente foi removido cuidadosamente. A seguir, a traquéia distal (região correspondente aos 5 últimos anéis cartilagosos próximos à narina) foi preparada para registro isométrico de força. Neste estudo foram utilizados transdutores F-60 Narco, acoplados a fisiógrafo da mesma marca. Os segmentos de traquéia foram montados em cubas para órgão isolado (8 mL), contendo solução de Krebs-Henseleit (NaCl, 115,0mM; KCl, 4,6mM; CaCl₂ 2.H₂O, 2,5mM; KH₂ PO₄, 1,2mM; MgSO₄.7 H₂O, 2,5mM; NaHCO₃, 25,0mM e glicose, 11,0mM) aerada com 95% de O₂ e 5% de CO₂.

Os segmentos de traquéia distal, uma vez montados, foram expostos a uma carga inicial de 500 mg. Durante o período de equilíbrio (60 minutos), a solução de Krebs-Henseleit foi trocada a cada 15 minutos. Decorrido este período, a tensão foi novamente ajustada, passando para 1 g. A capacidade contrátil (viabilidade tecidual) dos segmentos de traquéia foi avaliada substituindo-se o tampão Krebs-Henseleit por tampão KCl despolarizante (60 mM). Somente segmentos que apresentaram resposta contrátil, frente a despolarização com KCl, foram 15 minutos mais tarde desafiados com 100 µg/mL de OVA.

3.9. Anafilaxia cutânea passiva (PCA)

Estes experimentos foram conduzidos para avaliar se a síntese de imunoglobulinas é afetada pelos tratamentos químicos. Para tanto, foi utilizada a técnica descrita por Mota & Wong (1969). Em síntese, os soros obtidos de animais submetidos a 21 dias de tratamentos e sensibilizados foram diluídos e posteriormente administrados por via intradérmica nos dorsos de ratos não manipulados e não sensibilizados (limpo). Decorridas 24 horas, os animais receberam, por via venosa, 1,0 ml de solução contendo 500 µg de ovoalbumina associada a 2,5 mg do corante azul de Evans. Após 30 minutos, os animais foram sacrificados, a pele removida e o diâmetro dos halos azuis determinados. O título de anafilaxia cutânea passiva (PCA) foi representado pela maior diluição na qual o soro determinou halo maior que 5 mm de diâmetro.

3.10. Determinação da produção de íon superóxido

A determinação da produção de íon superóxido foi realizada em leucócitos obtidos dos exsudatos inflamatórios coletados da bolsa de ar. As células foram contadas e suspensas em solução tampão de Hanks contendo

0,1 % de BSA. Em seguida, 1×10^6 leucócitos polimorfonucleares (PMN), suspensos em 550 μ L de solução de Hanks, foram incubados com 100 μ L de solução 100nM de acetato de forbol miristato (PMA) ou volume equivalente de salina estéril (para determinar a produção espontânea) e 100 μ L de solução de citocromo c a 7,5 M durante 20 minutos a 37°C. Tubos contendo somente a solução de Hanks, PMA e citocromo c foram considerados controle (Blank). Após o período de incubação, os tubos foram colocados em banho de gelo durante 10 min e posteriormente centrifugados por 10 min a 4 °C. Os sobrenadantes foram utilizados para leitura em espectrofotômetro a 550 nm de comprimento de onda. (Jones & Hancock, 1994). Os resultados foram calculados pela diferença dos valores obtidos nos tubos testes e tubos controles e expressos como média $\pm$ erro padrão da média.

3.11. Determinação da concentração de nitrito e nitrato

Utilizou-se o equipamento NOA TM 280 (Sievers, USA), um detector de alta sensibilidade para determinação de $\cdot$ NO baseado na reação de quimioluminescência entre NO e ozônio (fase gasosa):

A redução do nitrato com cloreto de vanádio, em ácido clorídrico, foi usado para converter nitrato em $\cdot$ NO. A redução foi realizada a 90° C.

As curvas de calibração com níveis múltiplos foram realizadas usando padrão externo (nitrito de sódio), utilizando-se o software Bag Program (versão 2.2, Sievers, USA). As amostras de plasma ou exsudatos inflamatórios foram extraídas com etanol gelado (0,5 mL de amostra e 1,0 mL de etanol a 0°C). Após agitação em vortex, a solução foi mantida em repouso no gelo por 30 minutos e, em seguida centrifugada a 14.000 rpm

durante 5 minutos. O sobrenadante foi retirado e analisado no equipamento NOA TM 280 (Sievers, USA).

3.12. Análise estatística

Os resultados obtidos estão sendo apresentados com média $\pm$ erro padrão da média e foram analisados estatisticamente pelo teste "t" de Student ou pela Análise de Variância (ANOVA), seguida do teste de TUKEY.

4. RESULTADOS

4.1. Resultados da validação do método para determinação de FE, HQ e CAT em urina por SPME e GC/MS

4.1.1. Recuperação

Na tabela 1 são apresentados os valores de recuperação (%) obtidos para análise de FE, HQ e CAT em urina.

TABELA 1 – Valores de recuperação obtidos com a aplicação do método proposto em amostras de urina adicionadas com FE, HQ e CAT em três concentrações (5, 20, 40mg/L).

	Recuperação (%)		
	FE	HQ	CAT
CQ1	85,1	92,2	89,7
CQ2	76,4	77,2	81,3
CQ3	86,7	85,6	80,6

FE=fenol;HQ=hidroquinona;CAT=catecol;CQ1= 5mg/L, CQ2 =20mg/L, CQ3 = 40mg/L

4.1.2. Limite de detecção e limite de quantificação

Os limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) dos analitos obtidos para o método proposto para determinação de FE, HQ e CAT em urina estão apresentados na Tabela 2.

TABELA 2. Valores de limite de detecção e limite de quantificação de FE, HQ e CAT para o método desenvolvido.

	FE	HQ	CAT
LOD (mg/L)	0,30	0,15	0,02
LOQ (mg/L)	0,90	0,40	0,10

FE=fenol; HQ=hidroquinona; CAT=catecol; LOD=limite de detecção; LOQ=limite de quantificação.

4.1.3. Linearidade

O método demonstrou ser linear na faixa de concentração estudada para todos os analitos pesquisados. Curvas de calibração foram obtidas do LOQ a 60mg/L. As equações de regressão linear e os coeficientes de correlação obtidos foram: FE: $Y=0,184X - 0,183$; $r^2=0,998$; HQ: $Y=0,123X + 0,0988$; $r^2=0,999$ e CAT: $Y=0,1289 - 0,3767$; $r^2=0,987$.

4.1.4. Precisão intra e interensaio

Nas Tabelas 3 e 4 estão apresentados os valores de precisão, intra e interensaio, definidos pelo coeficiente de variação do método (CV), obtidos para análise de FE, HQ e CAT em urina.

TABELA 3. Valores de precisão intra-ensaio obtidos pela aplicação do método proposto em amostras de urinas contendo FE, HQ e CAT.

Amostras	Precisão intra-ensaio (CV%)		
	FE	HQ	CAT
CQ1	3,3	7,2	6,6
CQ2	3,9	4,2	5,7
CQ3	3,9	7,2	7,8

FE=fenol; HQ=hidroquinona; CAT=catecol; para fenol CQ1=5mg/L e CQ2=10mg/L; para hidroquinona e catecol; CQ1=20mg/L e CQ2=40mg/L; CV% = coeficiente de variação

TABELA 4. Valores de precisão interensaio obtidos com a aplicação do método proposto em amostras de urina contendo FE, HQ e CAT.

Amostras	Precisão interensaio (CV%)		
	FE	HQ	CAT
CQ1	3,5	4,9	2,6
CQ2	1,0	2,3	1,0
CQ3	3,7	1,4	2,4

FE=fenol; HQ=hidroquinona; CAT=catecol; para fenol CQ1=5mg/L e CQ2=10mg/L; para hidroquinona e catecol; CQ1=20mg/L e CQ2=40mg/L; CV% = coeficiente de variação

4.1.5. Cromatogramas característicos da análise de FE, HQ e CAT em urina de animais expostos aos metabólitos do benzeno por SPME-GC/MS

Os gráficos apresentados na figura 3 representam os perfis cromatográficos obtidos no método aqui padronizado e validado para determinação da concentração urinária de FE, HQ e CAT. Os cromatogramas representam os seguintes resultados: amostra de urina negativa contendo os padrões internos e deuterados (Figura 3 A); amostra de urina negativa contendo somente os padrões deuterados (Figura 3 B) e um pool de urina coletada de ratos tratados com FE (Figura 3 C). Os picos mostram que a técnica é seletiva para cada metabólito, permitindo a separação adequada de todos os componentes, uma vez que os picos foram obtidos em tempos de retenção distintos.

Figura 3. (A) Perfil cromatográfico obtido com a análise por SPME-GC/MS de amostra de urina adicionada com os padrões de fenol (FE), hidroquinona (HQ) e catecol (CAT) e os respectivos padrões internos deuterados fenol-d5 (FE-d5), hidroquinona-d6 (HQ-d6) e catecol-d6 (CAT-d6). (B) Amostra de referência negativa. (C) Amostra de animal tratado com FE (relativo ao final da quarta semana de tratamento), apresentando as seguintes concentrações dos analitos: FE=13,6mg/L; HQ=27,0mg/L e CAT=11,7mg/L.

4.1.6. Resultados obtidos da análise de FE, HQ e CAT em urina de ratos

Amostras de urina de ratos foram coletadas após 5 doses dos tratamentos químicos conforme protocolo descrito em 3.6.1. Os resultados das análises das amostras coletadas do grupo tratado com FE ou HQ estão apresentados nas Tabelas 5 e 6, respectivamente.

TABELA 5. Resultados das análises das amostras de urina coletadas de ratos tratados com FE (pool de urina de 5 animais)

	Concentração (mg/L)		
	FE	HQ	CAT
Antes do tratamento	4,3	59,8	13,8
Após 1 semana	31,5	47,5	16,7
Após 2 semanas	38,2	41,6	17,6
Após 3 semanas	21,7	32,1	21,8
Após 4 semanas	13,7	26,9	11,7

FE=fenol; HQ=hidroquinona; CAT=catecol

TABELA 6. Resultados das análises das amostras de urina coletadas de ratos tratados com HQ

	Concentração (mg/L)		
	FE	HQ	CAT
Antes do tratamento	2,41	17,45	22,47
Após 1 semana	13,9	30,7	15,0
Após 2 semanas	14,4	20,3	23,4
Após 3 semanas	9,9	38,7	24,3
Após 4 semanas	12,3	48,7	21,0

FE=fenol; HQ=hidroquinona; CAT=catecol

4.2. Efeitos dos tratamentos com FE ou HQ sobre a capacidade de migração leucocitária na vigência de resposta inflamatória inata

Os dados apresentados na Figura 4 mostram o influxo leucocitário para o tecido subcutâneo inflamado em animais tratados com FE, HQ e respectivos controles. Os valores obtidos demonstram que o tratamento com FE não alterou a capacidade de migração de leucócitos para o foco de lesão, uma vez que o número total e diferencial de leucócitos foi equivalente no grupo de animal tratado e controle. Por outro lado, os resultados obtidos em animais tratados com HQ mostraram que o número de leucócitos acumulados no tecido subcutâneo inflamado foi significativamente maior que o obtido em animais tratados com veículo. A análise diferencial destas células mostrou que a migração foi predominantemente de PMN. É importante salientar que a composição basal de células brancas na bolsa de ar é de $0,28 \times 10^6$ PMN e $2,8 \times 10^6$ MN.

Figura 4. Efeitos dos tratamentos com FE e HQ sobre a mobilização de leucócitos para o tecido subcutâneo inflamado (Modelo da bolsa de ar). Foram determinados os números de leucócitos presentes no exsudato inflamatório de animais tratados com FE ou HQ (13 doses diárias de 50 mg/kg em volume de 1mL, via i.p) ou com volume equivalente de veículo pela mesma via (controles). A reação inflamatória no tecido subcutâneo foi induzida pela injeção de glicogênio de ostra (1 mL a 5%) e o exsudato foi coletado 6 horas após. O número total de leucócitos foi determinado em câmaras de Neubauer e o diferencial em esfregaços corados por May-Grunwald e Giemsa. Os valores expressam a média $\pm$ e.p.m. de 8 a 12 animais em cada grupo. *P<0,05 em relação ao valor obtido em animais do grupo controle.

4.3. Efeitos dos tratamentos químicos sobre a produção e mobilização de células brancas

A determinação do leucograma mostrou que o tratamento com FE promoveu leucopenia, caracterizada pela diminuição no número de linfócitos circulantes. Diferentemente, o número total de leucócitos não foi alterado pelo tratamento com HQ, no entanto a análise diferencial mostrou que a HQ acarretou aumento significativo no número de PMN (Figura 5).

A quantificação do número de leucócitos em suas diferentes fases de produção e maturação na medula demonstrou que os tratamentos não alteraram o número de células totais. O estudo diferencial mostrou que somente o número de PMN segmentados está diminuído na medula em animais tratados com HQ (Figura 6).

Figura 5. Efeitos dos tratamentos com FE e HQ sobre o leucograma. Os animais foram tratados com FE ou HQ (13 doses diárias de 50 mg/kg em volume de 1mL, via i.p) ou com volume equivalente de veículo pela mesma via (controles). 24 horas após a última dose dos tratamentos, os animais foram anestesiados pelo pentobarbital sódico (65 mg/kg, via i.p.) e submetidos a coleta do sangue circulante pela punção da aorta abdominal. O número de leucócitos totais foi quantificado em câmara de Neubauer e o diferencial em esfregaços corados por solução de May-Grunwald e Giemsa. Os valores expressam a média $\pm$ e.p.m de 5-6 animais em cada grupo. * $P < 0,05$ em relação aos respectivos valores encontrados em animais do grupo controle.

Figura 6. Efeitos dos tratamentos com FE e HQ sobre o número de leucócitos na medula em suas diferentes etapas de maturação. Os animais foram tratados com FE ou HQ (13 doses diárias de 50 mg/kg em volume de 1mL, via i.p) ou com volume equivalente de veículo pela mesma via (controles). 24 horas após a última dose dos tratamentos, os animais foram anestesiados pelo pentobarbital sódico (65 mg/Kg, i.p.) e o conteúdo medular do fêmur foi coletado com meio de cultura McCoy's 5A[®] modificado. O número de leucócitos totais foi quantificado em câmara de Neubauer e o diferencial em esfregaços corados por solução de May-Grunwald e Giemsa. Os valores expressam a média $\pm$ e.p.m de 5-6 animais em cada grupo. *P<0,05 em relação aos respectivos valores encontrados em animais do grupo controle.

4.4. Efeitos dos tratamentos químicos sobre a capacidade de mobilização leucocitária na vigência de resposta inflamatória.

Com o intuito de avaliar se, sob estímulo inflamatório, os tratamentos químicos interfeririam com a capacidade de mobilização das células brancas dos compartimentos de reserva para a circulação, o leucograma foi determinado 6 horas antes e 6 horas após a injeção de glicogênio de ostra no tecido subcutâneo dos animais.

Os dados obtidos mostram que o tratamento com FE não interferiu com a habilidade de recrutamento leucocitário após a injeção de glicogênio no tecido subcutâneo dos animais, uma vez que o incremento de leucócitos no sangue foi equivalente ao observado em animais controles. Diferentemente, em animais tratados com HQ os valores de leucograma antes e após a indução da resposta inflamatória foram equivalentes (Figura 7). A análise diferencial de leucócitos mostrou que a leucocitose desencadeada após a indução do processo inflamatório em animais controles e tratados com FE é decorrente de neutrofilia, e que em animais tratados com HQ não há incremento de neutrófilos circulantes (Tabela 7).

Figura 7. Efeitos do tratamento com FE ou HQ sobre a mobilização de leucócitos para o sangue circulante na vigência de resposta inflamatória inata. Foram determinados os números de leucócitos presentes no sangue circulante antes e após a indução de resposta inflamatória (injeção de 1 mL de glicogênio de ostra a 5% no tecido subcutâneo) de animais tratados com FE ou HQ (13 doses diárias de 50 mg/kg em volume de 1mL, via i.p) ou com volume equivalente de veículo pela mesma via (controles). O número total de leucócitos foi determinado em câmaras de Neubauer. Os valores expressam a média $\pm$ e.p.m. de 8 a 12 animais em cada grupo. * $P < 0,05$ em relação ao valor obtido em animais controles

Tabela 7. Efeito do tratamento com FE ou HQ sobre a mobilização de leucócitos circulantes na vigência de resposta inflamatória. Análise diferencial

	Linfócitos	Monócitos	Neutrófilos	Eosinófilos
	(Células/mm ³)			
Antes da resposta inflamatória				
Controle	6299±489,78	341±63,57	1881±121,68	
FE	5161±602,27	382±56,75	2099±329,64	-
HQ	6152±443,16	158±51,41	2825±350,30**	-
Após a Resposta Inflamatória				
Controle	7044±574,12	352±51,35	3033±249,61*	
FE	6334±585,13	430±59,19	4098±387,0*	-
HQ	5485±365,58	558±71,81	2284±207,40	

Foram determinados os números de leucócitos presentes no sangue circulante antes e após a indução de resposta inflamatória (injeção de 1 mL de glicogênio de ostra a 5% no tecido subcutâneo) de animais tratados com FE ou HQ (13 doses diárias de 50 mg/kg em volume de 1mL, via i.p) ou com volume equivalente de veículo pela mesma via (controles). O número diferencial de leucócitos foi determinado em esfregaços corados por May-Grunwald e Giemsa. Os valores expressam a média ± e.p.m. de 8 a 12 animais em cada grupo. *P<0,05 em relação ao valor obtido nos respectivos grupos de animais antes da resposta inflamatória e **P<0,05 em relação aos valores encontrados nos animais do grupo controle.

4.5. Efeitos dos tratamentos com FE e HQ sobre a produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio

4.5.1. Espécies reativas de nitrogênio

Com o objetivo de avaliar os efeitos dos tratamentos com os produtos de biotransformação do benzeno sobre a produção de espécies reativas de nitrogênio, a concentração de óxido nítrico (NO) no sangue circulante e no exsudato inflamatório do tecido subcutâneo dos animais submetidos aos tratamentos químicos foi determinada. Neste caso, a concentração dos metabólitos estáveis do NO (NO_2/NO_3) foi determinada no sangue antes e após a exposição e no exsudato inflamatório.

Os resultados obtidos mostraram que após 13 doses de FE a concentração de NO no plasma não foi alterada, uma vez que os valores obtidos antes e após o tratamento e no grupo de animal controle foram de mesma magnitude (Figura 8A). Por outro lado, os valores conseguidos em animais tratados com HQ mostraram que o tratamento químico acarreta aumento significativo na concentração de NO circulante. O valor obtido após o tratamento foi maior que o obtido antes do início do tratamento e que os valores de animais controles (Figura 8A).

Da mesma forma que no soro, somente o tratamento com HQ aumentou a concentração de NO no exsudato inflamatório. O valor encontrado no grupo tratado com HQ foi significativamente maior que o observado em animais controles (Figura 8B).

Figura 8. Efeitos dos tratamentos químicos sobre a produção de NO. A concentração de NO_2/NO_3 no plasma de animais tratados com FE, HQ ou com volume equivalente de veículo pela mesma via (controles). Os animais receberam 13 doses de FE ou HQ em 13 doses diárias de 50 mg/kg de FE em volume de 1mL, via i.p. **A.** O plasma foi obtido do sangue coletado do plexo orbital antes e após os tratamentos químicos. **B** O exsudato foi coletado do tecido subcutâneo dorsal 6 hs após a injeção de 1 mL de solução de glicogênio de ostra 1%. Os valores expressam a média $\pm$ e.p.m. de plasmas obtidos de 5 a 8 animais para cada grupo. * $P < 0,05$ em relação aos respectivos valores obtidos em animais controles

4.5.2. Espécies reativas de oxigênio

Com o intuito de investigar se os tratamentos químicos interferiram com a habilidade de leucócitos PMN gerarem espécies reativas de oxigênio, neutrófilos obtidos no exsudato inflamatório da bolsa de ar foram ensaiados quanto à sua capacidade de gerar íon superóxido. Os dados apresentados na Figura 9 mostram que neutrófilos obtidos dos três grupos de animais estudados (controles, FE e HQ) produziram concentrações equivalentes de íon superóxido em condições basais ou sob estimulação com o PMA.

Figura 9. Efeitos dos tratamentos com FE e HQ sobre a capacidade de geração de íon superóxido. A produção de ânion superóxido foi aferida em neutrófilos coletados do exsudato inflamatório na bolsa de ar de animais tratados com HQ, FE (13 doses diárias de 50 mg/kg em volume de 1mL, via i.p) ou com volume equivalente de veículo pela mesma via (controles). A resposta inflamatória foi induzida pela injeção de glicogênio de ostra (1mL de solução a 5%) e as células coletadas 6 horas após. Os valores expressam a média ± e.p.m. de células obtidas de 5 a 8 animais para cada grupo. *P<0,05 em relação aos respectivos dados basais.

4.6. Efeitos dos tratamentos com FE ou HQ sobre a capacidade de migração leucocitária na vigência de resposta inflamatória mediada por anticorpos.

Com o objetivo de investigar os efeitos dos tratamentos sobre a capacidade de migração de leucócitos em resposta inflamatória mediada por anticorpos, os animais foram sensibilizados a OVA simultaneamente aos tratamentos químicos. Após 13 dias da sensibilização e 23 dias após o início dos tratamentos químicos, os animais foram broncoprovocados e 24 horas após o LBA foi coletado para quantificação do número de leucócitos. Os valores obtidos mostraram que ambos os tratamentos químicos inibiram a capacidade de migração de leucócitos para o LBA. Os números de leucócitos MN foram significativamente menores em animais expostos aos produtos de biotransformação do benzeno que em animais controles, expostos ao veículo (Figura 10). No entanto, somente o grupo de animais tratados com HQ apresentou valores significativamente menores de células PMN em relação aos valores obtidos em animais controles. O número basal de PMN e de MN no LBA é $0,17 \times 10^6$ e $5,08 \times 10^6$, respectivamente.

Para avaliar se a ausência de células no LBA refletia um acúmulo de leucócitos no tecido pulmonar e sua incapacidade de migrar para o espaço alveolar, foi determinado o número de PMN através da dosagem da enzima mieloperoxidase. Os dados obtidos indicam que o número de leucócitos PMN é equivalente nos três grupos de animais estudados (Figura 11). Vale ressaltar que o valor basal da atividade mieloperoxidase no pulmão não inflamado é de $0,04 \pm 0,001$.

Figura 10. Efeitos dos tratamentos com FE e HQ sobre a mobilização de leucócitos para o lavado broncoalveolar (LBA). Animais foram tratados com HQ ou FE (16 doses diárias de 50 mg/kg em volume de 1mL, i.p.) ou com volume equivalente de veículo pela mesma via, e sensibilizados pela OVA (10 dias após início do tratamento, 10µg/10mg hidróxido de alumínio, i.p.). No 23º dia após o início dos tratamentos químicos e 13 após a sensibilização, os animais foram broncoprovocados pela inalação por 15 min de 10 mL de solução de OVA 1%. O LBA foi coletado 24 horas após. O número de leucócitos totais foi quantificado em câmara de Neubauer e o diferencial em esfregaços corados por solução de May-Grunwald e Giemsa. Os valores expressam a média $\pm$ e.p.m de 5-6 animais em cada grupo. *P<0,05 em relação aos valores obtidos em animais controles.

4.7. Efeitos dos tratamentos com FE ou HQ sobre a produção de imunoglobulinas e capacidade de desgranulação mastocitária

Os efeitos dos tratamentos químicos sobre a produção de imunoglobulinas após sensibilização foram avaliados em dois modelos experimentais: 1) Na reação anafilática *in vitro*, traquéias obtidas dos diferentes grupos de animais sensibilizados e tratados quimicamente foram submetidas ao desafio *in vitro* com OVA, e sua capacidade de contração foi avaliada; 2) Na anafilaxia cutânea passiva (PCA), onde o soro obtido dos animais sensibilizados e tratados quimicamente foi diluído seriadamente e injetado via intradérmica em animais normais. 24 horas após, os animais foram desafiados com OVA, via e.v., e receberam simultaneamente e pela mesma via, solução de Azul de Evans, um corante que se liga à proteínas plasmáticas. O extravasamento protéico no sítio intradérmico foi mensurado pela dimensão do halo formado no local de injeção.

Os resultados da reação anafilática *in vitro* mostraram que o tratamento com FE não alterou a capacidade de contração da traquéia. A tensão aferida foi semelhante à determinada pela traquéia de animais controles. Por outro lado, o tratamento com HQ inibiu significativamente a capacidade de contração da traquéia quando comparada à contração obtida em traquéias de animais controles (Figura 12).

A Figura 13 representa os dados obtidos no ensaio de PCA. Os dados mostram que os títulos de PCA foram equivalentes em animais controles e tratados com FE, indicando que em ambos os casos a concentração do soro necessária para provocar extravasamento de proteínas dependente de IgE foi equivalente. Por outro lado, o título de PCA com o soro de animais tratados com HQ foi muito menor que o observado em animais controles, demonstrando que o soro de animais tratados com HQ necessita de maior concentração para alcançar a mesma resposta, ou seja, o halo de extravasamento protéico é maior que 5 mm, preconizado neste estudo.

Figura 12. Efeito dos tratamentos químicos sobre a capacidade de contração da traquéia *in vitro* desafiada com OVA. Os animais foram sensibilizados com OVA (10 μ g/10mg hidróxido de alumínio, i.p.) 10 dias após o início dos tratamentos com FE, HQ (50 mg/kg, i.p., 16 doses, com intervalos de 2 dias a cada 5 doses) ou veículo. No 13º dia após a sensibilização, segmentos distais das traquéias foram isolados e desafiados *in vitro* com OVA (100 μ g/mL). Os dados expressam a média $\pm$ de 6 a 10 animais em cada grupo. *P<.0,05 em relação aos valores obtidos em animais controles.

Figura 13. Efeitos dos tratamentos com FE ou HQ sobre a anafilaxia passiva cutânea. Os animais foram sensibilizados ($10\mu\text{g}/10\text{mg}$ hidróxido de alumínio, i.p.) no 10º dia após o início do tratamento com FE, HQ (50 mg/kg , i.p., 16 doses com intervalos de dois dias a 5 doses) ou controles (veículo) e o sangue foi coletado da aorta abdominal para obtenção de soro. Os soros foram diluídos em série e injetados via i.d. em ratos normais. Após 24 horas, os animais foram desafiados pela injeção endovenosa de OVA ($500\text{ }\mu\text{g}/1\text{mL}$) e receberam simultaneamente solução de azul de Evans ($2,5\text{ mg/mL}$, e.v.). Os animais foram sacrificados 30 min após e o halo formado pelo extravasamento protéico no local da injeção foi mensurado. Os resultados expressam a recíproca da diluição mais alta de soro imune capaz de provocar lesão de pelo menos 5 mm. Os dados representam a média $\pm$ e.p.m. de 5 animais em cada grupo. * $P < 0,05$ em relação aos valores encontrados em animais controles.

5. DISCUSSÃO

Como descrito na introdução, a intoxicação por benzeno acarreta alterações graves ao sistema imune, que se manifestam clinicamente por leucemia, anemia e neoplasia (Linnet *et al.*, 1996; Yin *et al.*, 1996; Hayes *et al.*, 1996; Rothman *et al.*, 1996; para revisão ver De Caprio, 1999). Devido a seu potencial tóxico, o emprego do benzeno tem sido monitorizado para que os trabalhadores não sejam expostos inadequadamente. No entanto, nem sempre as normas são cumpridas a contento, e ainda pouco se sabe sobre as conseqüências da exposição a baixas concentrações por período prolongado de tempo. Desta forma, estudos que investigam a gênese das intoxicações, identificam novos marcadores de exposição e implementam técnicas analíticas para monitorização biológica ainda são de grande relevância para a prevenção e tratamento das intoxicações.

Neste contexto, um método analítico para determinação de produtos de biotransformação do benzeno (FE, HQ e CAT) na urina foi desenvolvida e sua eficácia foi demonstrada pela mensuração destes compostos em amostras de animais intoxicados. Os dados obtidos da investigação da capacidade de resposta inflamatória em animais previamente expostos aos compostos fenólicos – FE e HQ –, indicam a complexidade dos efeitos sobre o sistema imune e podem fornecer subsídios para a compreensão dos mecanismos envolvidos na imunotoxicidade do benzeno e de seus metabólitos.

Vale ressaltar que a exposição a produtos de biotransformação do benzeno, responsáveis pelas alterações no sistema imunológico, tem sido uma estratégia bastante empregada experimentalmente, uma vez que o benzeno é bastante irritante, e a lesão nos tecidos injetados pode interferir com a elucidação dos mecanismos da imunotoxicidade. Ainda, apesar da exposição pelas vias aéreas ser a mais adequada para representar a intoxicação ocupacional pelo benzeno, administrações pelas via subcutânea ou intraperitoneal do mesmo ou de seus produtos de biotransformação têm

sido descritas na literatura (MacEachern *et al.*, 1992; MacEachern & Laskin, 1992; Punjabi *et al.*, 1994; Velasco Lezama *et al.*, 2001).

Algumas técnicas analíticas, como a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), a cromatografia em fase gasosa (GC) e a espectrometria de massa associada à cromatografia em fase gasosa (GC/MS) são empregadas para determinação de compostos fenólicos em matrizes biológicas. Primeiramente, a preparação das amostras para determinação dos compostos por estas técnicas envolve uma fase inicial de hidrólise ácida ou enzimática para liberação dos analitos conjugados, seguida, geralmente, de extração líquido-líquido (ELL) com solventes orgânicos. Entretanto, o uso de grande quantidade de solventes e a evaporação de compostos voláteis no extrato durante a fase de concentração, característicos na ELL, prejudicam a recuperação e, conseqüentemente, a determinação analítica. Por estes motivos, a investigação de técnicas mais eficazes para extração de amostras fenólicas têm sido testadas.

Nos últimos anos, a microextração em fase sólida (SPME) ganhou espaço na área da toxicologia analítica (Lord & Pawliszyn, 2000; Theodoridis *et al.*, 2000). A SPME compreende uma fibra coberta com fase estacionária, que exposta a uma amostra aquosa, por um breve intervalo de tempo (minutos), retém as substâncias a serem analisadas. Em seguida, a fibra é acondicionada dentro do injetor do cromatógrafo a gás, onde os analitos são desorvidos pela alta temperatura. Desta forma, o emprego de SPME pode tornar a extração mais rápida, simples, sem perda dos analitos e sem o emprego excessivo de solventes.

Neste trabalho verificou-se que a SPME é uma técnica que se mostrou adequada à extração dos compostos fenólicos oriundos da metabolização do benzeno - FE, HQ e CAT-, e que os benefícios descritos acima se aplicam a esta estratégia de extração em amostras de urina de ratos. Após extração, os analitos foram submetidos à derivação química, devido à sua polaridade conferida pela presença de grupos hidroxila. Compostos polares, em geral, não possuem boas características cromatográficas, gerando picos assimétricos devido à interação desses

grupamentos polares com a fase estacionária (fenilmetilsiloxano). Assim, no método aqui proposto foi utilizado o hexametildisilazano, como reagente de derivação. De fato, o hexametildisilazano promoveu a rápida reação dos analitos retidos na fibra de SPME (*on-fiber derivatization*), formando trimetilsilil-derivados, que produziram picos cromatográficos simétricos para identificação e quantificação dos compostos por GC/MS. Vale ressaltar que o método é inovador para a análise simultânea de três analitos.

A análise da urina de animais expostos à HQ e FE mostrou dados bastante peculiares. Verificou-se que as amostras coletadas antes da exposição à HQ ou FE continham HQ, FE e CAT. A literatura relata que estes compostos, principalmente a HQ, são produtos da dieta, e ainda podem ser encontrados em vários alimentos (Doepker et al, 2000, Vallini *et al.*, 2001; Coates *et al.*, 2002). Assim, é possível que os valores aqui encontrados sejam provenientes da dieta oferecida aos animais. Nas amostras de animais tratados com FE, aumento marcado do composto foi detectado logo na primeira semana de exposição, que se manteve até a segunda semana. No entanto, após este período de tempo, houve redução destes valores. Apesar dos valores de HQ não terem aumentado após as duas primeiras de tratamento com FE, o mesmo padrão de redução de excreção detectado para o FE foi encontrado para HQ. Estes dados indicam algumas hipóteses: 1) que os metabólitos estejam se acumulando no organismo destes animais; 2) a deficiência de metabolização ou excreção por toxicidade hepática ou renal, respectivamente; ou 3) a saturação ou estimulação de alguma via enzimática, como a enzima prostaglandina sintetase (PHS) pelo FE, que converte HQ em radicais fenoxil na medula óssea (Parkinson, 2001). Estas hipóteses serão investigadas futuramente. Interessantemente, após a exposição ao FE não houve diferença na concentração de CAT em amostras coletadas antes ou após a exposição. Poder-se-ia esperar aumento na concentração após exposição, uma vez que uma via metabólica do FE dependente de enzimas do citocromo P450 gera CAT (Seaton *et al.*, 1994, Johansson & Ingelman-Sundberg, 1998, Snyder, 2004). Neste sentido, é importante ressaltar que a espécie animal aqui

empregada não é responsável por possíveis diferenças nas vias de metabolização, uma vez que as enzimas envolvidas na biotransformação do benzeno estão presentes e ativas em diferentes espécies animais, entre os quais ratos da linhagem Wistar (Lovern *et al.*, 1997), que utilizamos neste trabalho.

Associados, os dados da determinação analítica mostraram a exposição ao FE e HQ e, a singularidade dos mesmos conduzirá para ensaios que poderão contribuir para elucidação das vias de metabolização para exposição prolongada a compostos fenólicos.

O tempo de exposição aos produtos de biotransformação do benzeno aqui proposto foi determinado com base na cinética da produção e maturação para a série granulocítica, porque neste estudo foi focado a capacidade de resposta celular às reações inflamatórias agudas, onde PMN são os principais efetores do processo. O período de 13 ou 18 dias de exposição é suficiente para que granulócitos, que possam ter sofrido alterações na hematopoese, alcancem a circulação na ocasião da indução das respostas inflamatórias. Os granulócitos são produzidos na medula óssea e passam por diferentes etapas de maturação, que se prolongam por aproximadamente 14 dias. A partir de então, já maduros, os PMN são mobilizados para o sangue periférico. Nesta localização circulam por 6 a 7 horas, e migram, subsequentemente, para os tecidos adjacentes, onde permanecem por aproximadamente 2 dias antes de entrarem em apoptose, e em seguida, serem fagocitados por células competentes no interstício (para revisão ver Ryan *et al.*, 2001a,b).

A determinação do leucograma é parâmetro relevante na monitorização de trabalhadores expostos e na intoxicação experimental a solventes orgânicos (Kipen *et al.*, 1988; Ward *et al.*, 1996; Robinson *et al.*, 1997; Niculescu & Kalf, 1995; Bogadi-Sare *et al.*, 2000; Yoon *et al.*, 2001; Biró *et al.*, 2002). Os resultados aqui obtidos demonstraram que a HQ acarretou neutrofilia, e que este aumento no número destes PMN circulantes pode refletir a maior mobilização de leucócitos segmentados nas fases finais de maturação na medula óssea. Interessantemente não foi verificado

comprometimento na produção destas células. Estes dados corroboram parcialmente a literatura, uma vez que tem sido demonstrado que a HQ afeta a produção e a diferenciação de granulócitos em várias etapas de sua maturação *in vitro* e *in vivo* (Gill *et al.*, 1980; Snyder *et al.*, 1980; Green *et al.*, 1981; Cronkite *et al.*, 1989; 1989; Hazel *et al.*, 1995; Hazel *et al.*, 1996a;b; Hedli *et al.*, 1996; Farris *et al.*, 1997; Henschler *et al.*, 1996). No entanto, a diferença nos dados aqui apresentados pode estar relacionada aos protocolos de intoxicação, porque as doses e o tempo de exposição para supressão das células precursoras de granulócitos foram maiores que os aqui preconizados (Tunek *et al.*, 1981; Wierda *et al.*, 1982; Eastmond *et al.*, 1987; Henschler *et al.*, 1996).

A neutrofilia resultante do tratamento com HQ pode ter sido determinante para o padrão de recrutamento leucocitário no foco de lesão e no sangue periférico após indução de resposta inflamatória aguda inata. O influxo de PMN para o tecido subcutâneo inflamado foi significativamente maior que o observado em animais controles. Por outro lado, o número de PMN na circulação, já elevado pelo tratamento, não foi alterado após a injeção de agente irritante. Vale ressaltar que o incremento no número de leucócitos circulantes, predominantemente de PMN, é evento característico em respostas inflamatórias agudas induzidas por diferentes agentes flogísticos (Sasson *et al.*, 1998; Ordonez *et al.*, 2000).

Em conjunto, os dados analisados até o momento permitem inferir algumas hipóteses para esclarecer os mecanismos da HQ envolvidos com a mobilização leucocitária na vigência de resposta inflamatória:

- 1) o número elevado de PMN na circulação após o tratamento com HQ facilitaria o influxo destas células para o foco de lesão e que, a inalteração do leucograma após estímulo lesivo reflete o elevado influxo celular para o sítio inflamatório. No entanto, não é possível descartar alterações na produção de leucócitos da série granulocítica em situações de recrutamento exacerbado, como no caso da resposta inflamatória aguda;

- 2) as células brancas circulantes podem estar sendo mobilizadas em estado de ativação celular alterado. Neste contexto, a expressão de moléculas de adesão, responsáveis pelo recrutamento leucocitário, poderia estar exacerbada em PMN ou na célula endotelial;
- 3) a produção e/ou secreção de diversos mediadores pode estar alterada pelo tratamento químico, o que certamente interferiria com o estado de ativação celular. A geração de compostos derivados do oxigênio e de nitrogênio está relacionada a uma série de efeitos na intoxicação pelo benzeno, entre os quais a toxicidade ao sistema imune e lesão ao DNA (Laskin *et al.*, 1995; 1996; Wu *et al.*, 1998; Tuo *et al.*, 1998; 1999a,b; Wiemels *et al.*, 2001; Fabiani *et al.*, 2001; Vestergaard *et al.*, 2002). Desta forma, investigamos a produção de óxido nítrico (NO) no sangue circulante e no exsudato inflamatório. Os resultados obtidos mostraram que plasma e o exsudato inflamatório de animais tratados HQ possuem concentrações maiores de NO em relação às encontradas em animais controles. O NO é um mediador importante em inúmeros processos fisiopatológicos, entre os quais a hematopoese, onde exerce papel inibitório sobre o processo (Selleri *et al.*, 1997; Selleri & Maciejewski, 2001). Neste contexto, tem sido demonstrado que o prejuízo na hematopoese acarretada pela intoxicação por benzeno é dependente, pelo menos em parte, de NO. Tem sido demonstrado que células da medula provenientes de animais tratados ou estimuladas *in vitro* pelo benzeno ou por seus metabólitos, entre os quais a HQ, aumentam acentuadamente a produção de NO, via expressão da enzima óxido nítrico sintetase indutível (Punjabi *et al.*, 1994; Rao & Snyder, 1995; Laskin *et al.*, 1995; 1996). No entanto, os dados aqui apresentados são inéditos, uma vez que não existem dados na literatura que mostrem o aumento da concentração de NO na circulação ou em exsudatos inflamatórios após a exposição à HQ *in vivo*. O NO é sintetizado em condições fisiológicas e patológicas por inúmeras células, entre as quais o endotélio e leucócitos (para revisão ver Ricciardolo, 2004). Diferentemente do efeito sobre a hematopoese, o papel do NO sobre o

recrutamento leucocitário para o foco de lesão é bastante controverso, principalmente no que tange à interação leucócito-endotélio (para revisão ver Hickey *et al.*, 2001). Assim, a relação do NO com a maior capacidade de migração neutrofílica para o tecido subcutâneo inflamado em animais tratados com HQ ainda não pode ser associada. Estudos complementares precisam ser realizados para avaliar este possível mecanismo.

Quantidades excessivas de NO podem desencadear lesão celular, através da reação com espécies reativas de oxigênio, formando peroxinitritos (para revisões ver Virag *et al.*, 2003; Salvemini *et al.*, 2003). Tem sido bem descrito que o benzeno e seus metabólitos fenólicos estimulam a produção de ânions superóxidos *in vivo* e *in vitro* (Kukielka & Cederbaum, 1994; Rao & Snyder, 1995), e que espécies de O₂ em associação a compostos derivados do nitrogênio participam da gênese da intoxicação por diferentes mecanismos, a saber: ou pela formação de peroxinitrito, como descrito acima (Wiseman & Halliwell, 1996), ou por uma via não enzimática, pela oxidação direta a quinonas (Urios *et al.*, 2003). Durante resposta inflamatória, radicais de oxigênio são produzidos por granulócitos durante o processo de fagocitose, pela ativação do “burst” oxidativo. O processo tem início com a rápida ativação da enzima de superfície NADPH oxidase, que oxida o NADPH em NADP⁺ e no processo reduz o oxigênio ao ânion superóxido. Pela ação da enzima superóxido dismutase, localizada intracelularmente, o ânion é convertido a peróxido de hidrogênio, altamente reativo e com capacidade microbicida. No entanto, em granulócitos, onde a enzima mieloperoxidase está presente, o peróxido reage com íon halóide, como o cloro, e forma o hipoclorito, poderoso agente microbicida (para revisões ver Hampton *et al.*, 1998; Karlsson & Dahlgren, 2002). Com o intuito de avaliar a possibilidade dos tratamentos afetarem a produção de íon superóxido, foi avaliado a capacidade de ativação do “burst” oxidativo de neutrófilos obtidos dos exsudatos inflamatórios, pela dosagem do ânion superóxido. Os dados aqui encontrados mostraram que o tratamento com HQ não alterou a produção de ânion superóxido por

neutrófilos, mesmo quando estas células eram estimuladas com acetato de forbol miristato, uma agente lipossolúvel que age intracelularmente ativando proteína quinase C. Estes dados foram surpreendentes e não corroboram com os resultados de literatura descritos acima, nem os achados de Wu *et al.*, 1998, que mostraram valores aumentados de enzima superóxido dismutase em pacientes intoxicados. É possível que o “burst” deva ser ativado pela ação local de HQ, e no nosso caso, a HQ foi administrada via intraperitoneal 24 horas antes da indução da resposta inflamatória. Vale ressaltar que a incubação de neutrófilos com HQ *in vitro* estimulou a produção, dose-dependente, de ânion superóxido (dados não mostrados).

Surpreendentemente, os resultados obtidos em animais tratados com FE foram, para maioria dos parâmetros investigados, diferentes dos obtidos em animais tratados com HQ. Poder-se-ia esperar as mesmas alterações observadas no tratamento com HQ, já que conforme foi salientado na Introdução, em uma das etapas de sua metabolização, o FE é biotransformado para HQ. Animais expostos ao FE não apresentaram alterações na série granulocítica, mas mostraram redução no número de leucócitos totais, decorrente de linfocitopenia. Diminuições nos números de linfócitos T e Natural killer foram relatadas em animais de experimentação (Chen & Eastmond, 1995) e em pacientes ocupacionalmente expostos ao FE (Baj *et al.*, 1994). Os nossos dados indicam que a linfocitopenia não é decorrente de modificações na produção e/ou maturação destas células na medula. Estes dados discordam da literatura, uma vez que foi demonstrado que camundongos tratados com FE ou tratamento *in vitro* provocam alterações em células progenitoras de células mononucleadas, especialmente em células CD34⁺ (Chen & Eastmond, 1995). Adicionalmente, tem sido demonstrado que a HQ inibe a proliferação de diferentes linhagens linfocitárias, e que este efeito está relacionado a modificações na fase G1 do ciclo celular e à produção de IL-2 (Li *et al.*, 1996; Poirier *et al.*, 2002; Mc Cue *et al.*, 2000; 2003). É possível que diferenças nos protocolos de tratamentos sejam responsáveis pela diversidade de resultados, e a causa de

linfocitopenia, se decorrente de proliferação ou aderência à vasos específicos, será investigada.

Com o objetivo de estudar os efeitos dos tratamentos sobre a capacidade de resposta inflamatória mediada por anticorpos, os animais foram sensibilizados uma semana após o início da administração dos agentes químicos. O modelo experimental escolhido foi de hipersensibilidade imediata descrito por Coleman *et al.*, 1983, onde concentrações aumentadas de IgE são observadas a partir do 14º dia de sensibilização.

Os dados aqui obtidos mostraram que ambos os tratamentos inibem significativamente o número de leucócitos PMN no lavado broncoalveolar (LBA). A diminuição do número de PMN no LBA não reflete o acúmulo destas células no tecido pulmonar, uma vez que o número de neutrófilo no tecido pulmonar, quantificado pela atividade da enzima MPO, foi equivalente nos grupos de animais tratados e controles. Adicionalmente, este último dado sugere que os tratamentos interferem com a migração leucocitária para o tecido pulmonar, porque as baixas concentrações da enzima MPO em animais controles indicam a migração destas células do tecido pulmonar para o LBA. Portanto, em animais tratados quimicamente, onde a migração para o LBA é muito menor que observado em animais controles, poder-se-ia esperar valores maiores de atividade enzimática, caso a migração para o tecido pulmonar tivesse sido equivalente a obtida em animais controles. Em conjunto, os dados indicam que a administração de FE ou HQ inibe a migração de PMN e MN para o pulmão na vigência de uma resposta mediada por anticorpos. Os ensaios subseqüentes investigaram os possíveis mecanismos envolvidos no efeito e mostraram, mais uma vez, que o FE e a HQ interfere com a resposta de maneiras distintas.

Os ensaios de PCA e da avaliação da capacidade de contração da traquéia mostraram, respectivamente, que o tratamento com HQ promoveu diminuição na produção de IgE e, conseqüentemente, com a capacidade de desgranulação mastocitária. No entanto, a etapa na produção de anticorpos que foi afetada ainda não está esclarecida. Neste sentido, os ensaios em andamento visam avaliar os efeitos da HQ sobre a apresentação do

antígeno, a proliferação linfocitária e a capacidade de produção de anticorpos por linfócitos B.

Interessantemente, o FE parece inibir a reação inflamatória mediada por anticorpos por mecanismos distintos da HQ, já que o PCA e a capacidade de contração da traquéia não foram alterados pelo tratamento. Os valores encontrados em ambos os métodos foram equivalentes aos encontrados em animais controles. Estes dados são surpreendentes, uma vez que a linfocitopenia detectada após o tratamento com FE (dados mostrados previamente) poderia interferir com as etapas de sensibilização dos animais e, conseqüentemente, com a produção de IgE.

É importante considerar que os tratamentos não provocaram danos aparentes aos animais, uma vez que não foram observados alopecia nem prejuízo no ganho de peso corporal (Δ peso antes e após 13 doses de: FE= $107,8 \pm 4,89$; HQ= $104,5 \pm 10,14$ e Veículo= $115,6 \pm 8,13$).

Em conjunto, os dados aqui apresentados sugerem que a exposição prolongada a compostos fenólicos, produtos da biotransformação do benzeno, promove alterações distintas e importantes na função de células imunocompetentes.

6. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste trabalho permitiram concluir que:

- 1) a extração de compostos fenólicos da urina de ratos por microextração de fase sólida foi eficaz;
- 2) a exposição à HQ e FE elevou as concentrações urinárias destes metabólitos, portanto o protocolo de intoxicação e a metodologia de extração aqui propostos foram eficazes;
- 3) somente a exposição à HQ promoveu exacerbação da resposta inflamatória aguda, visualizada pelo maior acúmulo de leucócitos pmn;
- 4) a exposição à HQ acarretou neutrofilia, possivelmente pela aceleração na última etapa de maturação de células da série granulocítica na medula; a exposição ao Fe não alterou o número de leucócitos circulantes, mas provocou linfocitopenia;
- 5) somente a exposição à HQ inibiu a neutrofilia característica de resposta inflamatória aguda;
- 6) somente a exposição à HQ acarretou aumento na concentração de no circulante e no exsudato inflamatório;
- 7) a produção de íon superóxido por pmn coletados do exsudato inflamatório de animais expostos a HQ ou FE foi equivalente a produção por pmn de animais controles;
- 8) tanto a exposição à HQ quanto ao FE inibiu a migração de leucócitos para o LBA e tecido pulmonar na vigência de resposta inflamatória mediada por anticorpos;
- 9) somente a exposição à HQ promoveu diminuição na produção de IgE e na reatividade vascular.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMERICAN CONFERENCE OF GOVERNMENTAL INDUSTRIAL HYGIENISTS 2003 *TLVS and BEIS based on the documentation for threshold limit values for Chemical Substances and Physical Agents and biological exposure indices*. Cincinnati: ACGIH, 2003. 219p.
- BABIOR, B.M.; KIPNES, R.S.; CURNETTE, J.T. Biological defense mechanisms: the production by leukocytes by superoxide, a potential bactericidal agent. *J.Clin.Invest.*, v.52, p.741-750, 1973.
- BAGGIOLINI, M. Chemokines in pathology and medicine. *J.Int.Med.*, v.250, n.2, 91-104, 2001.
- BAJ, Z.; MAJEWSKA, E.; ZEMAN, K.; POKOCA, L.; DWORNIK, D.; PARADOWSKI, M.; TCHORZEWSKI, H. The effect of chronic exposure to formaldehyde, phenol and organic chlorohydrocarbons on peripheral blood cells and the immune system in humans. *J.Investig.Allergol.Clin.Immunol.*, v.4, n.4, p.186-191, 1994.
- BIRO, A.; PALLINGER, E.; MAJOR, J.; JAKAB, M.G.; KLUPP, T.; FALUS, A.; TOMPA, A. Lymphocyte phenotype analysis and chromosome aberration frequency of workers occupationally exposed to styrene, benzene, polycyclic aromatic hydrocarbons or mixed solvents. *Immunol.Lett.*, v.81, n.2, p.133-140, 2002.
- BOGADI-SARE, A.; ZAVALIC, M.; TROSIC, I.; TURK, R.; KONTOSIC, I.; JELCIC, I. Study of some immunological parameters in workers occupation exposed to benzene. *Int. Arch. Occup. Environ. Health.*, v.73, n.6, p.397-400, 2000.
- BORELLI, P.; MARIANO, M.; BOROJEVIC, R. Protein Malnutrition: Effect On Myeloid Cell-Production And Cell Mobilization Into Inflammatory Reactions In Mice. *Nutritional Research*, v.15, n.10, p.1477-1485, 1995.
- BOSCOLO, P.; DI GIOACCHINO, M.; SABBIONI, E.; DI GIACOMO, F.; REALE, M.; VOLP, A.R.; DI SCIASCIO, M.B.; CONTI, P.; GIULIANO, G. Lymphocyte subpopulations, cytokines and trace elements in asymptomatic atopic women exposed to an urban environment. *Life Sci.*, v.67, n.10, p.1119-26, 2000.

- BRASIL. *Segurança e medicina do trabalho*; lei nº 6514, de 22 de dezembro de 1977. São Paulo: Editora Atlas, 2001. 690p.
- BRATTON, SB.; LAU, S.S.; MONKS, T.J. The putative benzene metabolite 2,3, 5-tris(glutathion-S-yl)hydroquinone depletes glutathione, stimulates sphingomyelin turnover, and induces apoptosis in HL-60 cells. *Chem.Res.Toxicol.*, v.13, n.7, p.550-556, 2000.
- BREGA, A.; PRANDINI, P.; AMAGLIO, C.; PAFUMI, E. Determination of phenol, m-, o- and p-cresol, p-aminophenol and nitrophenol in urine by high-performance liquid chromatography. *J.Chromatogr.*, v.535, n.1/2, p.311-316, 1990.
- CALICH, V.; VAZ, C. In: *Imunologia*. Rio de Janeiro: Editora Revinter, 2001, p. 260.
- CHEN, H.; EASTMOND D, A. Synergistic increase in chromosomal breakage within the euchromatin induced by na interaction of the benzene metabolites phenol and hydroquinone in mice. *Carcinogenesis*, v.16, p.1963-1969, 1995.
- CHEPIGA,T.A.; YANG, C.S.; SNYDER, R. Benzene metabolism in two purified reconstituted rat hepatic mixed functions oxidase systems. In: WITTMER, C.M.; SNYDER,; R; JOLLOW, D.J.(eds). *Biological reactive intermediates IV. Molecular and cellular effects and their impact on human health*. New York : Plenum Press, 1991, p.261-265.
- CHUNG, H.T.; PAE, H.O.; CHOI, B.M.; BILLIAR, T.R.; KIM, Y.M. Nitric oxide as a bioregulator of apoptosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v.282, n.5, p.1075-1079, 2001.
- CLAYTON, C.A.; PELLIZZARI, E.D.; WHITMORE, R.W.; PERRITT, R.L.; QUACKENBOSS, J.J. National Human Exposure Assessment Survey (NHEXAS): distributions and associations of lead, arsenic and volatile organic compounds in EPA region 5. *J. Expo. Anal. Environ. Epidemiol.*, v.9, n.5, p.381-392, 1999.
- COATES, J.D.; CHAKRABORTY, R.; MC INEMEG, M.J. Anaerobic benzene biodegradation a new era. *Res. Microbiol.*, v.153, n.10, p.621-628,2002.

- COLEMAN, J.W.; LAYTON, G.T.; STANWORTH, D.R. The kinetics of *in vivo* sensitization of rat peritoneal and lung mast cells: temporal dissociation from circulating levels of IgE. *Eur. J. Immunol.*; v.13, n.12, p.994-998, 1983.
- COTRAN, R.S. Inflamação e reparo. In: COTRAN, RS; KUMAR, V; ROBBINS, SR; SCHOEN, FJ., eds. *Robbins Patologia Estrutural e Funcional*. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 1996. p.45-83.
- CRONKITE, E.P. Benzene hematotoxicity and leukemogenesis. *Blood Cells*, v.12, n.1, p.129-137, 1986.
- CRONKITE, E.P.; DREW, R.T.; INOUE, T.; HIRABAYASHI, Y.; BULLIS, J.E. Hematotoxicity and carcinogenicity of inhaled benzene. *Environ. Health. Perspect.*, v.82, p.97-108, 1989.
- DACIE, J.V.; LEWIS, S.M. In: *Practical haematology*, Churchill Livingstone, ed. 1995. P. 57-58.
- DAVIS, K.L.; MARTIN, E.; TURKO, I.V.; MURAD, F. Novel effects of nitric oxide. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, v.41, p.203-236, 2001.
- DE CAPRIO, A.P. The Toxicology of Hydroquinone- Relevance to Occupational and Environmental Exposure. *Critical Reviews in Toxicology*, v.29, n.3, p.283-330, 1999.
- DOEPKER, C.L.; DUMONT, K.W.; O'DONOGHE, J.; ENGLISH, J.C. Lack of induction of micronuclei in human peripheral blood lymphocytes treated with hydroquinone. *Mutagenesis*, v.15, n.6, p.479-487, 2000.
- EASTMOND, D.A.; SMITH, M.T.; IRONS, R.D. An interaction of benzene metabolites reproduces the myelotoxicity observed with benzene exposure. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, v.91, n.1, p. 85-95, 1987.
- EDWARDS, J.C.; SEDWICK, A.D.; WILLOUGHBY, D.A. The formation of a structure with the features of synovial lining by subcutaneous injection of air: *in vivo* tissue culture system. *J. Pathol.*, v.134, n.2, p.147-156, 1981.
- EDWARDS, S.W. The O₂⁻ generating NADPH oxidase by phagocytes: structure and methods of detection. *Methods: a Companion to Methods in Enzymology*, v.9, p.563-77, 1996.

- EWENS, S.; WULFERINK, M.; GOEBEL, C.; GLEICHMANN, E. T-cell dependent immune reactions to reactive benzene metabolites in mice. *Arch. Toxicol.*, v.73, n.3, p.159-167, 1999.
- FABIANI, R.; DE BARTOLOMEO, A.; ROSIGNOLI, P.; SCAMOSCI, M.; LEPORE, L.; MORG, G. Influence of culture conditions on the DNA-damaging effect of benzene and its metabolites in human peripheral blood mononuclear cells. *Environ. Mol. Mutagen.*, v.37, n.1, p.1-6, 2001.
- FARRIS, G.M.; ROBINSON, S.N.; WONG, B.A.; WONG, V.A.; HANH, W.P.; SHAH, R. Effects of benzene on splenic, thymic, and femoral lymphocytes in mice. *Toxicology*, v.28, n.118, p.137-148, 1997.
- FIAMEGOS, Y.C.; NANOS, C.G.; PILIDIS, G.A.; STALIKAS, C.D. Phase-transfer catalytic determination of phenols as methylated derivatives by gas chromatography with flame ionization and mass-selective detection. *Journal Chromatography A*, v.983, n.1/2, p.215-223, 2003.
- GANOUSIS, L.G.; GOON, D.; ZYGLEWSKA, T.; WU, K.K.; ROOS, D. Cell-specific metabolism in mouse bone marrow stroma: studies of activation and detoxification of benzene metabolites. *Mol. Pharmacol.*, v.42, n.6, p.1118-1125, 1992.
- GARABRANT, D.H.; DUMAS, C. Epidemiology of organic solvents and connective tissue disease. *Arthritis Res.*, v.2, n.1, 5-15, 2000.
- GAZITT, Y.; SHAUGHNESSY, P.; LIU, Q. Expression of adhesion molecules on cd34(+) cells in peripheral blood of non-hodgkin's lymphoma patients mobilized with different growth factors. *Stem Cells*, v.19, n.2, p.134-143, 2001.
- GILL, D.P.; JENKINS, V.R.; KEMPEN, R.R.; ELLIS, S. The importance of pluripotential stem cells in benzene toxicity. *Toxicology*, v.16, n.2, p.163-171, 1980.
- GOW, A.; ISCHIROPOULOS, H. Nitric oxide chemistry and cellular signaling. *J. Cell. Physiol.*, v.187, n.3, p.277-282, 2001.
- GRALEWICS, S. Organic solvents and time-dependent sensitization. *Int. J. Occup. Med. Environ. Health*, v.12, n.4, 371-381, 1999.

- GRANGER, D.N.; KUBES, P. The microcirculation and inflammation: modulation of leukocyte-endothelial cell adhesion. *J. Leukoc. Biol.*, v.55, n.5, p.662-675, 1994.
- GREEN, J.D.; SNYDER, C.A.; LO BUE, J.; GOLDSTEIN, B.D.; ALBERT, R.E. Acute and chronic dose/response effects of inhaled benzene on multipotential hematopoietic stem (CFU-S) and granulocyte/macrophage progenitor (GM-CFU-C) cells in CD-1 mice. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, v.58, n.3, p.492-503, 1981.
- GREGORY, C.D.; DEVITT, A.; MOFFATT, O. Roles of ICAM-3 and CD14 in the recognition and phagocytosis of apoptotic cells by macrophages. *Biochem. Soc. Trans.*, v.26, n.4, p.644-649, 1998.
- HAMPTON, M.B.; KETTLE, A.J.; WINTERBOURN, C.C. Inside the neutrophil phagosome: oxidants, myeloperoxidase, and bacterial killing. *Blood*, v.92, n.9, p.3007-3017, 1998.
- HARLAN, J.M. Leukocyte-endothelial interactions. *Blood*, v.65, n.3, p.513-525, 1985.
- HASLETT, C. Granulocyte apoptosis and inflammatory disease. *Br. Med. Bull.*, v.53, n.3, p.669-683, 1997.
- HAYES, R.B.; YIN, S.N.; DOSEMECI, M.; LI, G.L.; WACHOLDER, S.; CHOW, W.H.; ROTH, N.; WANG, Y.Z.; DAÍ, T.R.; CHAO, X.J.; JIANG, Z.L.; Y, P.Z.; ZHAO, H.B.; KOU, Q.R.; ZANG, W.Y.; MENG, J.F.; ZHO, J.S.; DING, C.Y.; ZHANG, Z.N.; LI TRAVIS, L.B.; BLOT, W.J.; LINET, M.S. Mortallity among benzene- exposed workers in China. *Environ. Health Pespect.*, v.104, sppl.6, p.1359-1362, 1996.
- HAZEL, B.A.; BAUM, C.; KALF, G.F. Hydroquinone, a bioreactive metabolite of benzene, inhibits apoptosis in myeloblasts. *Stem Cells*, v.14, n.6, p.730-742, 1996b.
- HAZEL, B.A.; O` CONNOR, A.; NICULESCU, R.; KALF, G.F. Induction of granulocytic differenttiation in a mouse model by benzene and hydroquinone. *Environ. Health Perspect.*, v.104, n.6, p.1257-1264, 1996a.

- HAZEL, B.A.; O'CONNOR, A.; NICULESCU, R.; KALF, G.F. Benzene and its metabolite, hydroquinone, induce granulocytic differentiation in myeloblasts by interacting with cellular signaling pathways activated by granulocyte colony-stimulating factor. *Stem Cells*, v.13, n.3, p.295-310, 1995.
- HEDLI, C.C.; RAO, N.R.; REUHL, K.R.; WITMER, C.M.; SNYDER, R. Effects of benzene metabolite treatment on granulocytic differentiation and DNA adduct formation in HL-60 cells. *Arch.Toxicol*, v.70, n.3-4, p.135-144, 1996.
- HENSCHLER, R.; GLATT, H.R.; HEYWORTH, C.M. Hydroquinone stimulates granulocyte-macrophage progenitor cells *in vitro* and *in vivo*. *Environ. Health Perspect.*, v.104, suppl.6, p.1271-1274, 1996.
- HICKEY, M.J. Role of inducible nitric oxide synthase in the regulation of leucocyte recruitment. *Clin. Sci.*, v.100, n.1, p.1-12, 2001.
- HICKEY, M.J.; GRANGER, D.N.; KUBES, P. Inducible nitric oxide synthase (iNOS) and regulation of leucocyte/endothelial cell interactions: studies in iNOS-deficient mice. *Acta Physiol. Scand.*, v.173, n.1, p.119-126, 2001.
- HOMBURG, C.H.; ROOS, D. Apoptosis of neutrophils. *Curr. Opin. Hematol.*, v.3, n.1, p.94-99, 1996.
- HUSSAIN, N.; WU, F.; ZHU, L.; THRALL, R.S.; KRESCH, M.J. Neutrophil apoptosis during the development and resolution of acid-induced acute lung injury in the rat. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, v.19, n.6, p.867-874, 1998.
- IRONS, R.D. Quinones as toxic metabolites of benzene. *J. Toxicol. Environ. Health*, v.16, n.5, p.673-678, 1985.
- JAVELAUD, B.; VIAN, L.; MOLLE, R.; ALLAIN, P.; ALLEMAND, B.; ANDRE, B.; BARBIER CHURET, A.M.; DUPUIS, J.; GALAND, M.; MILLET, F.; TALMON, J.; TOURON, C.; VAISS, M.; VECHAMBRE, D.; VIEULES, M.; VIVER, D. Benzene exposure in car mechanics and road tanker drivers. *Int. Arch. Occup. Environ. Health*, v.71, n.4, p.277-288, 1998.
- JOHANSSON, I.; INGELMAN-SUNDBERG, M. Benzene metabolism by ethanol, acetone, and benzene inducible cytochrome P450 2E1 in rat and liver microsomes. *Cancer Res.*, v.48, p.5387-5390, 1998.

- JONES, O.T.; HANCOCK, J.T.; Assays of plasma membrane NAPH oxidase. *Methods Enzymol.*, v.233, p.222-229, 1994.
- KALF, G.F. Recents advances in the metabolism and toxicity of benzene. *Crit. Rev. Toxicol.*, v.18, n.2, p.141-159, 1987.
- KALF, G.F. Utility of a mouse model for studying the effects of benzene on myeloid lineage: effects of hidroquinone on a model myeloid system. *J.Toxicol. Environ. Health A*, v.61, n.5/6, p.399-411, 2000.
- KALF, G.F.; RENZ, J.F.; NICULESCU, R. P-benzoquinone, a reactive metabolite of benzene, prevents processing of pro-interleukins-1 alpha and -1 beta to active cytokines by inhibition of the processing enzymes, calpain, a interleukin-1 beta converting enzyme. *Environ. Health Perspect.*, v.04, n.6, p.1251-256, 1996.
- KARLSSON, A.; DAHLGREN, C. Assembly and activation of the neutrophil NADPH oxidase in granule membranes. *Antioxid.Redox Signal*, v.4, n.1, p.49-60, 2002.
- KERZIC, P.J.; PYATT, D.W.; ZHENG, J.H.; GROSS, A.S.; LE, A.; IRONS, R.D. Inhibition of NF-Kappa B by hydroquinone sensitizes human bone marrow progenitor cells to TNF-alfa-induced apoptosis. *Toxicology*, v.187, n.2/3, p.127-137, 2003.
- KIPEN, H.M.; CODY, R.P.; CRUMP, K.S.; ALLEN, B.C.; GOLDSTEIN, B.D.. Hematologic effects of benzene: a thirty-five year longitudinal study of rubber workers. *Toxicol.Ind. Health*, v.4, n.4, p.411-430, 1988
- KUO, M.L.; SHIAH, S.G.; WANG, C.J.; CHUANG, S.E. Suppression of apoptosis by Bcl-2 to enhance benzene metabolites- induced oxidative DNA damage and mutagenesis: A possible mechanism of carcinogenesis. *Mol. Pharmacol.*, v.55, n.5, p.894-901, 1999.
- KUKIELKA, E.; CEDERBAUM, A.I. DNA strand cleavage as a sensitive assay for the production of hydroxyl radicals by microsomes: role of cytochrome P4502E1 in the increased activity after ethanol treatment. *Biochem.J.*, v.302, n.3, p.773-779, 1994.

- LASKIN, D.L.; HECK, D.E.; PUNJABI, C.J.; LASKIN, J.D. Role of nitric oxide in hematosuppression and benzene-induced toxicity. *Environ. Health Perspect.*, v.104, n.6, p.1283-1287, 1996.
- LASKIN, J.D.; RAO, N.R.; PUNJABI, C.J.; LASKIN, D.L.; SNYDER, R. Distinct actions of benzene and its metabolites on nitric oxide production by bone marrow leukocytes. *J. Leukoc. Biol.*, v.57, n.3, p.422-426, 1995.
- LAURENS, J.B.; MBIANDA, X.Y.; SPIES, J.H.; UBBINK, J.B.; VERMAAK, W.J. Validated method for quantitation of biomarkers for benzene and its alkylated analogues in urine. *J. Chromatogr. B.*, v.774, n.2, p.173-185, 2002.
- LEE, B.L.; ONG, H.Y.; SHI, C.Y.; ONG, C.N. Simultaneous determination of hydroquinone, catechol and phenol in urine using high-performance liquid chromatography with fluorimetric detection. *J. Chromatogr.*, v.619, n.2, p.259-266, 1993.
- LI, N.; HALLDEN, G.; HJEMDAHL, P. A whole-blood flow cytometric assay for leukocyte Cd11b expression using fluorescence signal triggering. *Eur. J. Haem.*, v.65, p.57-65, 2000.
- LI, Q.; GEISELHART, L.; MITTLER, J.N.; MUDZINSKI, S.P.; LAWRENCE, D.A.; FREED, B.M. Inhibition of human T lymphoblast proliferation by hydroquinone. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, v.39, n.2, p.317-323, 1996.
- LINET, M.S.; YIN, S.N.; TRAVIS, L.B.; LI, C.Y.; ZANG, Z.N.; LI, D.G.; ROTHMAN, N.; LI, G.L.; CHOW, W.H.; DONALDSON, J.; DOSEMECI, M.; WACHOLDER, S.; BLOT, W.J.; HAYES, R.B. Clinical features of hematopoietic malignancies and related disorders among benzene-exposed workers in China. *Environ. Health Perspect.*, v.114, n.6, p.1353 - 1364, 1996.
- LORD, H.; PAWLISZYN, J. Microextraction of drugs. *J. Chromatogr. A.*, v.902, n.1, p.17-63, 2000.
- LOVERN, M.R.; TURNER, M.J.; MEYER, M.; KEDDERIS, G.L.; BECHTOLD, W.E.; SCHLOSSER, P.M. Identification of benzene oxide as a product of benzene metabolism by mouse, rat, and human liver microsomes. *Carcinogenesis*, v.18, n.9, p.1695-700, 1997.

- LOW, L.K.; LAMBERT, C.E.; MEEKS, J.R.; NARO, P.A.; MACKERER, C.R.
Tissue-specific metabolism of benzene in lymphoid and other solid tumor target tissues in rats. *J. Am. Coll. Toxicol.*, v.14, p.40-60, 1995.
- MA, Q.; KINNER, K.; YE, J.; CHEN, B.J. Inhibition of nuclear factor Kappa B by phenolic antioxidants: interplay between antioxidant signaling and inflammatory cytokine expression. *Mol. Pharmacol.*, v.64, p.211-219, 2003.
- MACEACHERN, L.; LASKIN, D.L. Increased production of tumor necrosis factor- α by bone marrow leukocytes following benzene treatment of mice. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, v.113, n.2, p.260-266, 1992.
- MACEACHERN, L.; SNYDER, R.; LASKIN, D.L. Alterations in the morphology and functional activity of bone marrow phagocytes following benzene treatment in mice. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, v.117, n.2, p.147-154, 1992.
- MALECH, H.L.; ROOT, R.K.; GALLIN, J.I. Structural analysis of human neutrophil migration. Centriole, microtubule and microfilament orientation in function during chemotaxis. *J. Cell Biol.*, v.75, n.3, p.666-693, 1977.
- MCCUE, J.M.; LINK, K.L.; EATON, S.S.; FREED, B.M. Exposure to cigarette tar inhibits ribonucleotide reductase and blocks lymphocyte proliferation. *J. Immunol.*, v.165, n.12, p.6771-6775, 2000.
- MCCUE, J.M.; LAZIS, S.; JOHN COHEN, J.; MODIANO, J.F.; FREED, B.M. Hydroquinone and catechol interfere with T cell cycle entry and progression through the G1 phase. *Mol. Immunol.*, v.39, n.16, p.995-1001, 2003.
- MILLER, A.C.; SCHATTENBERG, D.G.; MALKINSON, A.M.; ROSS, D. Decreased content of the IL-1 α processing calpain murine bone marrow-derived macrophages after treatment with benzene metabolite hydroquinone. *Toxicol. Lett.*, v.74, n.2, p.177-184, 1994.
- MORIMOTO, K. Induction of sister delays in human lymphocytes by microsomal activation of benzene. *Cancer Res.*, v.43, p.1330-1334, 1993.

- MOTA, I.; WONG, D. Homologous and heterologous passive cutaneous anaphylactic of mouse antisera during the course of immunization. *Life Sci.*, v.8, p.813-820, 1969.
- MUZYKA, V.; VEIMER, S.; SCHMIDT, N. On the carcinogenic risk evaluation of diesel exhaust: benzene airborne particles and alterations of heme metabolism in lymphocytes as markers of exposure. *Sci. Total Environ.*, v.217, n.1/2, p.103-111, 1998.
- MYHRE, O.; VESTAD, T.A.; SAGSTUEN, E.; ARNES, H.; FONNUM, F. The effects of aliphatic (n-nonane), naphtenic (1,2, 4-trimethylcyclohexane), and aromatic (1,2,4-trimethylbenzene) hydrocarbons on respiratory burst in human neutrophil granulocytes. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, v.167, n.3, p. 222 -230, 2000.
- NAKAJIMA, T.; ELOVAARA, E.; PARK, S.S.; GELBAIN, H.V.; HIETANEN, E.; VAINIO, H. Monoclonal antibody-directed characterization of benzene, ethoxy-resorufin and pentoxy-resorufin in metabolism in rat liver microsomes. *Biochem. Pharmacol.*, v.40, n.6, p.1255-1261, 1990.
- NICULESCU, R.; BRADFORD, H.N.; COLMAN, R.W.; KALF, G.F. Inhibition of the conversion of pro-interleukins-1 alpha and 1 beta to mature cytokines by p-benzoquinone, a metabolite of benzene. *Chem. Biol. Interact.*, v.98, n.3, p.211-222, 1995.
- NICULESCU, R.; KALF, G.F. A morphological analysis of the short-term effects of benzene on the development of the hematological cells in the bone marrow of mice and the effects of interleukin-1 alpha on the process. *Arch. Toxicol.*, v.69, n.3, p.141-148, 1995.
- NICULESCU, R.; RENZ, J.F.; KALF, G.F. Benzene-induced bone marrow cell depression caused by inhibition of the conversion of pre-interleukins-1 alpha and 1 beta to activated cytokines by hydroquinone, a biological reactive metabolite benzene. *Adv. Exp. Med. Biol.*, v.387, p.329-337, 1996.
- NIETERT, P.J.; SILVER, R.M. Systemic sclerosis: environmental and occupational risk factor. *Curr. Opin. Rheumatol.*, v.12, n.6, p.520-526, 2000.

- ONG, CN.; LEE, B.L. Determination of benzene and its metabolites: application in biological monitoring of environmental and occupational exposure to benzene. *J. Chromatography B.*, v.660, n.1, p.1-22, 1994.
- ORDONEZ, C.L.; SHAUGHNESSY, T.E.; MATTHAY, M.A.; FAHY, J.V. Increased neutrophil numbers and IL-8 levels in airway secretions in acute severe asthma. *Am. J. Respir. Crit. Care. Med.*, v.161, p.1185-1190, 2000.
- PARKE, D.V. Personal Reflections on 50 Years of Study of Benzene Toxicology. *Environ. Health Perspect.*, v.104, n.6, p.1-12, 1996.
- PARKINSON, A. Biotransformation of Xenobiotics. In: KLAASSEN, C.D. *Casarett and Doull's Toxicology*, 6ed. New York: McGraw-Hill, 2001, p.133-224.
- POIRIER, M.; FOURNIER, M.; BROUSSEAU, P.; MORIN, A. Effects of volatile aromatics, aldehydes, and phenols in tobacco smoke on viability and proliferation of mouse lymphocytes. *J. Toxicol. Environ. Health A*, v.65, n.19, p.1437-1451, 2002.
- PUNJABI, C.J.; LASKIN, J.D.; HWANG, S.; MACEACHERN, L.; LASKIN, D.L. Enhanced production of nitric oxide by bone marrow cells and increased sensitivity to macrophage colony-stimulating factor (CSF) and granulocyte-macrophage CSF after benzene treatment of mice. *Blood*, v.83, n.11, p.3255-3263, 1994.
- PYATT, D.W.; STILLMAN, W.S.; IRONS, R.D. Hydroquinone, a reactive metabolite of benzene, inhibits NF Kappa B in primary human CD4⁺ T lymphocytes. *Toxicol. App. Pharmacol.*, v.149, n.2, p.178-184, 1998.
- PYATT, D.W. ; YANG, Y.; LE, A. ; STILLMAN, W.S.; IRONS, RD. QU, Q.; MELIKIAN, A.A.; LI, G.; SHORE, R.; CHEN, L.; COHEN, B.; YIN, S.; KAGAN, M.R.; LI, H.; MENG, M.; JIN, X.; WINNIK, W.; LI, Y.; MU, R.; LI, K. Validation of Biomarkers in Humans Exposed to Benzene: Urine Metabolites. *Am. J. Ind. Medicine*, v.327, p.522 -531; 2000.
- RAMPART, M. Neutrophil-endothelial cell interactions. In: BRAIN, S.D., ed. *The Handbook of Immunopharmacology. Microcirculation*. San Diego: Academic Press, 1994. p.77-107.

- RAO, N.R.; SNYDER, R. Oxidative modifications produced by HL-60 cells on exposure to benzene metabolites. *J. Appl. Toxicol.*, v.15, n.5, p.403-409, 1995
- RENZ, J.F.; KALF, G.F. Role for interleukin-1 (IL-1) in benzene-induced hematotoxicity: inhibition of conversion of pre-IL-1 alpha to mature cytokine in murine macrophages by hydroquinone and prevention of benzene-induced hematotoxicity in mice by IL-1 alpha. *Blood*, v.78,n.4, p.938-944, 1991.
- RICCIARDOLO, F.; STERK, P.J.; GASTON, B.; FOLKERTS, G. Nitric oxide in health and disease of the respiratory system. *Physiol.Rev.*, v.84, p.731-765, 2004.
- ROBERTSON, J.D.; ORRENIUS, S. Molecular mechanisms of apoptosis induced by cytotoxic chemicals. *Crit. Rev. Toxicol.*, v.30, n.5, p.609-627, 2000.
- ROBINSON, S.N.; SHAH, R.; WONG, B.A.; WONG, V.A.; FARRIS, G.M. Immunotoxicological effects of benzene inhalation in male Sprague-Dawley rats. *Toxicology*, v.119, n.3, p.227-237, 1997.
- ROSENFELD, G. Método rápido de coloração de esfregaços de sangue: noções práticas sobre corantes pancrômicos e estudo de diversos fatores. *Mem. Inst. Butantan*, v.20, p.315-328, 1947.
- ROSS, D.; BEALL, H.; TRAVER, R.D.; SIEGEL, D.; PHILIPS, R.M.; GIBSON, N.W. Bioactivation of quinones by DT-diaphorase , molecular, biochemical, and chemical studies. *Oncol. Res.*, v.6, n.10/11, p.493-500, 1994.
- ROSS, D.; SIEGEL, D.; SCHETTENBERG, D.G.; XIAOMING, M.S.; MORAN, J.L. Cell-specific activation and detoxification of benzene metabolites in mouse and human bone marrow: identification of target cells and a potential role of modulation of apoptosis in benzene toxicity. *Environ. Health Perspect.*, v.104, suppl.6, p.1177-1182, 1996.

- ROTHMAN, N.; SMITH, T.H.; HAYES, R.B.; LI, G.L.; IRONS, R.D.; DOSEMECI, M.; HAA STILLMAN, W.S.; LINET, M.; XI, LQ.; BECHTOLD, W.E.; WIEMELS, J.; CAMPLEMAN, S.; ZHANG, L.; QUINTANA, P.J.; TITENKO - HOLLAND, N.; WANG, Y.Z.; LU, W.; KOLACHAV MEYER, KB.; YIN, S. An epidemiologic study of early biologic effects of benzene in Chinese workers. *Environ. Health Pespect.*, v.104, n.6, p.1365-1370, 1996.
- RYAN, D.H. Examination of the blood. In: BUTLER, E; LICHTMAN, MA; COLLER, BS; KIPPS, T.J.; SELIGSOHN, V., eds. *Williams Hematology.* , 6th ed., Nova York.:McGraw-Hill, 2001.p.15-52 (a).
- RYAN, D.H. Examination of the marrow. In: BUTLER, E; LICHTMAN, MA; COLLER, BS; KIPPS, T.J.; SELIGSOHN, V., eds. *Williams Hematology.* , 6th ed., Nova York.:McGraw-Hill, 2001.p.52-86 b.
- SALVEMINI, D.; ISCHIROPOULOS, H.; CUZZOCREA, S. Roles of nitric oxide and superoxide in inflammation. *Methods Mol. Biol.*, v.225, p.291-303, 2003.
- SASSON, Y.; ZELTSER, D.; ROGOWSKI, O.; KASSIRER, M.; MAHARSHAK, N.; NISSENKORN, A.; LEBOVITZ, E.; HALPERIN, P.; SHARVIT, D.; SORKINE, P.; ARBER, N.; BERLINER, S. Neutrophilia of infection/inflammation: are we really dealing with "inflamed" leukocytes? *J. Med.*, v.29, n.3/4, p.217-229, 1998.
- SCHAD, H.; SCHAFER, F.; WEBER, L.; SEIDEL, H.J. Determination of benzene metabolites in urine of mice by solid -phase extraction and high - performance liquid chromatografy. *Journal of Chromatogr.*, v.593, n.1/2, p.147-151,1992.
- SCHENKER, M.B.; JACOBS, J.A. Respiratory effects of organic solvents exposure. *Tuber Lung Dis.*, v.77, n.1, p.4-18, 1996.
- SEATON, M.J.; SCHLOSSER, P.M.; BOND, J.A.; ,MEDINSKY, M.A. Benzene metabolism human liver microsomes in relation to cytochrome P450 2E1 activity. *Carcinogenesis*, v.15, n.9, p.1799-1806, 1994.

- SELLERI, C.; SATO, T.; RAIOLA, A.M.; ROTOLI, B.; YOUNG, N.S.; MACIEJEWSKI, J.P. Induction of nitric oxide synthase is involved in the mechanism of Fas-mediated apoptosis in haemopoietic cells. *Br. J. Haematol.*, v.99, n.3, p.481-489, 1997.
- SELLERI, C.; MACIEJEWSKI, J.P. The role of FAS-mediated apoptosis in chronic myelogenous leukemia. *Leuk.Lymphoma*, v.37, n.3/4, p.283-297, 2000.
- SNYDER, C.A.; GOLDSTEIN, B.D.; SELAKUMAR, A.R.; BROMBERG, I.; LASKIN, S.; ALBERT, R.E. The inhalation toxicology of benzene: incidence of hematopoietic neoplasmas and hematotoxicity in AKR/J and C57BL/6J mice. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, v.54, n.2, p.323-331, 1980.
- SNYDER, R. Xenobiotic Metabolism and the Mechanism(s) of Benzene Toxicity. *Drug metabolism Reviews*, v.36, n.3-4, p.531-547, 2004.
- STEEBER, D.A.; TEDDER, T.F. Adhesion molecule cascades direct lymphocyte recirculation and leukocyte migration during inflammation. *Immunol. Res.*, v.22, n.2-3, p.299-317, 2001.
- SULLIVAN, S.J.; DAUKAS, G.; ZIGMOND, S.H. Assymetric distribution of the chemotactic peptide receptor on polymorphonuclear leukocytes. *J. Cell Biol.*, v.99, n.4, p.1461-1467, 1984.
- TARPEY, M.M.; FRIDOVICH, I. Methods of detection of vascular reactive species. Nitric oxide, superoxide, hydrogen peroxide and peroxynitrite. *Circ. Res.*, v.89, n.3, p.224-236, 2001.
- TAVARES DE LIMA, W.; STEIL, A.A.; RUSSO, M.; STAROBINAS, N.; TEIXEIRA, C.F.; JANCAR, S. Lipid mediators, tumor necrosis factor and nitric oxide and their interactions in immune-complex-induced lung injury. *Eur. J. Pharmacol.*, v.358, n.1, p.69-75, 1998.
- THEODORIDIS, G.; KOSTER, E.H.M.; JONG, G.J. Solid-phase microextraction for the analysis of biological samples. *J. Chromatogr. B*, v.745, n.1, p.49-82, 2000.

- THOMAS, D.J.; SADLER, A.; SUBRAHMANYAM, V.; SIEGEL, D.; REASOR, M.J.; WIERDA, D.; ROSS, D. Bone marrow stromal cell bioactivation and detoxification of the benzene metabolite hydroquinone: comparison of macrophages of fibroblastoid cells. *Mol. Pharmacol.*, v.37, n.2, p.255-262, 1990.
- TUNEK, A.; OLOFSSON, T.; BERLIN, M. Toxic effects of benzene and benzene metabolites on granulopoietic stem cells and bone marrow cellularity in mice. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, v.59, n.1, p.149-156, 1981.
- TUO, J.; DENG, X.; LOFT, S.; POULSEN, H.E. Dexamethasone ameliorates oxidative DNA damage induced by benzene and LPS in mouse bone marrow. *Free Radic. Biol. Med.*, v.30, n.1, p.29-36, 1999b.
- TUO, J.; LOFT, S.; POULSEN, H.E. Enhanced benzene-induced DNA damage in PMA-stimulated cell *in vitro* and in LPS-treated animals. *Free Radic. Biol. Med.*, v. 26, n.7/8, p.801-808, 1999a.
- URIOS, A.; LÓPEZ-GREAS, M.P.; GONZÁLEZ, M.C.; PRIMO, J.; MARTÍNEZ, A.; HERRERA, G.; ESCUDERO, J.C.; O'CONNOR, J.E.; BLANCO, M. Nitric oxide promotes strong cytotoxicity of phenolic compounds against *Escherichia coli*: the influence of antioxidant defenses. *Free Radic. Biol. Med.*, v.35, n.11, p.1373-1381, 2003.
- VALLINI, G.; FRASSINET, S.; D'ANDREA, F.; CATELANI, G.; AGNOLUCCI, M. Biodegradation of 4-(1-nonyl) phenol by axenic cultures of the yeast *Candida aquatextoris*: Identification of microbial breakdown products and proposal of a possible metabolic pathway. *Int. Biodegrad. Biodeg.*, v.47, p.133-140, 2001.
- VELASCO LEZAMA, R.; BARRERA ESCORCIA, E.; MUNOZ TORRES, A.; TAPIA AGUILA GONZALEZ RAMIRES, C.; GARCIA LORENZANA, M.; ORTIZ MONROY, V.; BRTANCOU RULE, M. A model for induction of aplastic anemia by subcutaneous administration of benzene in mice. *Toxicology*, v.162, n.3, p.179-191, 2001.
- VESTERGAARD, S.; LOFT, S.; MOLLER, P. Role of inducible nitrogen oxide synthase in benzene-induced oxidative DNA damage in the bone marrow of mice. *Free Radic. Biol. Med.*, v.32, n.5, p.481-484, 2002.

- VIRAG, L.; SZABO, E.; GERGELY, P.; SZABO, C. Peroxynitrite-induced cytotoxicity: mechanism and opportunities for intervention. *Toxicol. Lett.*, v.140-141, p.113-124, 2003.
- VODJANI, A.; MORDECHAI, E.; BRAUTBAR, N. Abnormal apoptosis and cell cycle progression in humans exposed to methyl tertiary-butyl ether and benzene contaminating water. *Hum. Exp. Toxicol.*, v.16, n.9, p.485-494, 1997.
- WAIDYNATHA, S.; ROTHMAN, N.; LI, G.; SMITH, M.T.; YIN, S.; RAPPAPORT, S.M. Rapid determination of six metabolites in occupationally exposed and unexposed subjects. *Analytical biochemistry*, v.327, n.2, p.184-199, 2004.
- WALLACE, L. Environmental exposure to benzene. An update. *Environ. Health Perspect.*, v.104, n.6, p.1129-1136, 1996.
- WARD, E.M.; FAJEN, J.M.; RUDER, A.M.; RINSKY, R.A.; HALPERIN, W.E.; FESSLER-FLESC, C.A. Mortality study of workers employed in 1,3-butadiene production units identified from a large chemical workers cohort. *Toxicology*, v.113, n.1/3, p.157 -168, 1996.
- WESTERMANN, J.; ENGELHARDT, B.; HOFFMANN, J.C. Migration of T cells *in vivo*: molecular mechanisms and clinical implications. *Ann. Intern. Med.*, v.135, n.4, p.279-295, 2001.
- WIEDLE, G.; DUNON, D.; IMHOF, B.A. Current concepts in lymphocyte homing and recirculation. *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.*, v.38, n.1, p.1-31, 2001.
- WIEMELS, J.L.; SMITH, R.N.; TAYLOR, G.M.; EDEN, O.B.; ALEXANDER, F.E.; GREAVES, M.F. Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) polymorphisms and risk of molecularly defined subtypes of childhood acute leukemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v.27;98, n.7, p.4004-9, 2001.
- WIERDA, D.; IRONS, R.D. Hydroquinone and catechol reduce the frequency of progenitor B lymphocytes in mouse spleen and bone marrow. *Immunopharmacology*, v.4, n.1, p.41-54, 1982.

- WISEMAN, H.; HALLIWELL, B. Damage to DNA by reactive oxygen and nitrogen species: role in inflammatory disease and progression to cancer. *Biochem. J.*, v.313, n.1, 17-29, 1996.
- WOO, L.W.; JOHNSON, T.J.; GARDNER, D.C. Inhibitory effects of benzene metabolites on nuclear DNA synthesis in bone marrow cells. *J. Toxicol. Environ. Health*, v.26, p.277-291, 1989.
- WORTHYLAKE, R.A.; BURRIDGE, K. Leukocyte transendothelial migration: orchestrating the underlying molecular machinery. *Curr. Opin. Cell Biol.*, v.13, n.5, p.569-577, 2001.
- WU, T.; YUAN, Y.; WU, Y.; HE, H.; ZHANG, G.; TANGUAY, R.M. Presence of antibodies to heat shock proteins in workers exposed to benzene and patients with benzene poisoning. *Cell Stress Chaperones*, v.3, n.3, p.161-167, 1998.
- YANEVA, S.; ZLATEV, Z.; TOTCHEVA, T. Hematological changes in sailors from chemical cargo tankers. *Int. Arch. Occup. Environ. Health*, v.71, suppl.50-54, 1998.
- YIN, S.N.; HAYES, R.B.; LINET, M.S.; LI, G.L.; DOSEMECI, M.; TRAVIS, L.B.; ZHANG, D.G.; CHOW, W.H.; WACHOLDER, S.; BLOT, W.J. An expanded cohort study of cancer among benzene- exposed workers in China. Benzene Study Group. *Environ. Health Perspect.*, v.104, n.6, p.1339-1341, 1996.
- YOON, B-II.; HIRABAYASHI, Y.; KAWASAKI, Y.; KODAMA, Y.; KANEKO, T.; KIM, D.Y.; INOUE, T. Mechanism of action of benzene toxicity: Cell cycle suppression in hemopoietic progenitor cells (CFU-GM). *Experimental Hematology*, v.29, n.3, p.278-285, 2001.
- ZHANG, L.; ROTHMAN, N.; WANG, Y.; HAYES, R.B.; YIN, S.; TITENKO-HOLLAND, N.; DOSEMECI, M.; WANG, Y.Z.; KOLACHANA, P.; LU, W.; XI, L.; LI, G.L.; SMITH, M.T. 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.*, v.34, n.4, p.260-268, 1999.

ZIGMOND, S.H.; LEVITSKY, H.I.; KREEL, B.J. Cell polarity: an examination of its behavioral expression and its consequences for polymorphonuclear leukocyte chemotaxis. *J.Cell. Biol.*, v.89, n 3, p 585 -592, 1981.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Comissão de Ética em Experimentação Animal

Of. CEEA n° 25

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto “Efeitos do tratamento crônico com produtos de biotransformação do benzeno sobre a mobilização e função de leucócitos polimorfonucleares na vigência da resposta inflamatória” (Protocolo n°21), sob a responsabilidade do(a) Sr(a). Emerson Luiz Botelho Lourenço e do orientador(a) Sandra Helena P. Farsky, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA) desta Faculdade, em 01/09/2003.

São Paulo, 02 de setembro de 2003.

Elfriede Bacchi

*Prof. Assoc. Elfriede Marianne Bacchi
Coordenadora da CEEA*

sandra

De: "Journal of Chromatography B" <chromb@elsevier.com>
Para: <sfarsky@usp.br>
Enviada em: segunda-feira, 25 de abril de 2005 07:39
Assunto: Journal of Chromatography B Submission: Manuscript Number Assigned

Ms. No.: JCB-05-304

Title: Simultaneous determination of phenolic metabolites of benzene in urine using solid-phase microextraction and on-fiber derivatization

Corresponding Author: Dr Sandra Helena Poliselli Farsky

Authors: Emerson L.B. Lourenço, Student; Mauricio Yonamine, PhD; Alexandre Ferreira, Student; Ernani Pinto, PhD;

Dear Dr Farsky,

Your submission, referenced above, has been assigned the following manuscript number: JCB-05-304

You will be able to check on the progress of your paper by logging on to the Elsevier Editorial System as an author:

<http://ees.elsevier.com/chromb/>

Thank you for submitting your work to Journal of Chromatography B.

With kind regards,

Journal of Chromatography B, Editorial Office

E-mail: chromb@elsevier.com

Simultaneous determination of phenolic metabolites of benzene in urine using solid-phase microextraction and on-fiber derivatization

Emerson Luiz Botelho Lourenço ^{a,b}, Mauricio Yonamine ^a, Alexandre Ferreira ^a, Ernani Pinto ^a, Sandra Helena Poliselli Farsky ^{a,*}

^a Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo–USP, Av. Prof. Lineu Prestes, 580 B13B CEP: 05508-900, São Paulo-SP, Brazil.

^b Universidade Paranaense, UNIPAR, Praça Mascarenhas de Moraes, snº CEP 87500-000, Umuarama–PR, Brazil.

Abstract

A gas chromatography-mass spectrometry method for the simultaneous determination of benzene metabolites (phenol (PHE), hydroquinone (HQ) and catechol (CAT) in urine was developed and validated. The method was based on the acidic hydrolysis of conjugated phenolic metabolites and further extraction of analytes using solid-phase microextraction (SPME). Analytes were extracted by submersing the polar polyacrylate coated fiber (85 μm) into urine (adjusted to pH 3.0 with glacial acetic acid) for 20 minutes under magnetic stirring. Extracted compounds on the fiber were exposed to hexamethyldisilazane reagent in vapor phase for 20 minutes to yield the corresponding trimethylsilylated derivatives. Gas chromatography/mass spectrometry (GC-MS) was operated in selected ion monitoring mode (SIM). The method showed to be simple, rapid and sensitive. The limits of detection were 0.3 $\mu\text{g/ml}$ for PHE, 0.15 $\mu\text{g/ml}$ for HQ and 0.02 $\mu\text{g/ml}$ for CAT. Good inter and intra-assay precision was also observed (coefficient of variation < 8%) with the use of deuterated internal standards. For comparison to real samples, the method had been applied to evaluate the metabolites in urine from either none or PHE exposed Wistar rats. Concentrations of PHE varied from 1.1 to 38.2 $\mu\text{g/ml}$:

HQ ranged from 26.9 to 92.8 µg/ml and CAT varied from 9.5 to 28.3 µg/ml. This method can be readily utilized to follow the metabolism in many toxicological studies.

Key words: benzene metabolites, phenol, hydroquinone, catechol, SPME.

* Corresponding author Fax: + 55 -11-3091-2197

E-mail address: sfarsky@usp.br (S. Farsky)

1. Introduction

Benzene has been classified as carcinogenic to humans (group I) by the International Agency for Research on Cancer (IARC). It is a component of gasoline, a constituent of engine emissions and tobacco smoke, and widely used in industrial synthesis of plastics and pharmaceuticals. Chronic exposure to benzene can lead to progressive degeneration of the bone marrow, which may be manifested initially as anemia, leukopenia and thrombocytopenia. Continued exposure may result in marrow aplasia and pancytopenia, which frequently is fatal. The aplastic anemia may progress to acute myelogenous leukemia [1,2]. Although the toxic effects have long been associated with benzene, the mechanisms of action are not completely elucidated and are closely related to metabolites [3,4].

Approximately 20% of absorbed dose is eliminated as unaltered benzene in breath and urine. The remaining 80% is converted to benzene oxide-oxepin by the hepatic microsomal mixed function oxidase (CYP2E1) [5,6]. This is further metabolized via both enzymatic and nonenzymatic pathways to many biotransformed products including phenolic compounds (i.e. phenol, hydroquinone, catechol and 1,2,4-trihydroxybenzene), *trans,trans*-muconic acid, and *s*-phenylmercapturic, which are eliminated in urine either

free or as sulphate and glucuronide conjugates. To the formation of hydroquinone, muconic acid and trihydroxybenzene is indispensable a second CYP2E1 oxidation (Fig. 1) [3-9]. Phenolic compounds, such as phenol, catechol, and hydroquinone are substrates for myeloperoxidase and other peroxydases present in the marrow bone, and are responsible for immune and hematological toxic effects [10,11].

Urinary metabolites of benzene, such as *trans-trans* muconic acid and *s*-phenylmercapturic acid have long been recognized and studied as useful biomarkers of its occupational exposure. Quantitative methods for the determination of benzene metabolites in urine have been described in the scientific literature using high-performance liquid chromatography (HPLC) [12,13], capillary gas chromatography (GC) [14], and gas chromatography–mass spectrometry (GC/MS) [9,15]. Aside from applications involving biomonitoring, the determination of urinary metabolites of benzene is useful to understand its metabolic pathways at different levels of exposure.

The extraction step is a necessary prerequisite to isolate and pre-concentrate analytes prior to chromatographic analysis. Conventional liquid-liquid extraction (LLE) is the most frequently sample preparation technique used for determination of phenolic compounds. However, it produces emulsions and sometimes requires an additional cleanup step which gives rise to further losses. Besides, it requires large amounts of solvents and it is a time-consuming and laborious technique as well [16]. Solid-phase extraction (SPE) has been extensively used for the analyses of organic compounds present in biological samples, which can be retained into the cartridges and eluted with an adequate solvent. However, SPE has some important limitations since it is a multi-step process and relatively high solvent volumes are necessary to clean up and elute the analytes [16,17].

In the last years, a simple, rapid and solvent-free extraction technique was developed. Firstly introduced in 1990 by Arthur and Pawliszyn, the solid-phase

microextraction (SPME) does not require the use of organic solvent for extraction [18]. Nowadays, SPME has been successfully used to determine a series of organic compounds in biological specimens. Its mechanism is based on the equilibrium of analytes concentration between the sample and that in solid-phase fiber coating [16]. After a predetermined extraction time, the fiber is placed into the injector port of gas chromatograph in order to strip the adsorbed substances.

In the present study, a method for the simultaneous analysis of phenol (PHE), hydroquinone (HQ) and catechol (CAT) in urine was firstly developed using SPME and GC/MS. The feasibility of applying this method was also evaluated by investigating the limits of detection and quantification (LOD and LOQ), recovery values, linear dynamic ranges and reproducibility for the analytes. Urine samples collected from rats treated with phenol were submitted to the validated method. In addition, this method can be a sensitive tool to follow the toxic kinetics of benzene as well as to detect benzene derivatives in food, pharmaceuticals and other products.

2. Experimental

2.1. Reagents and standards of reference

Phenol (99.5% purity), hydroquinone (99%) and catechol (99%) were purchased from Sigma (St. Louis, USA). Their respective deuterated-labeled analogues, phenol-d₅ (98%), catechol-d₆ (98%) and hydroquinone-d₆ (98%) were purchased from Cambridge Isotope Laboratories (Andover, USA). Hexamethyldisilazane was obtained from Merck (Darmstadt, Germany). Other reagents of common use in the laboratory were of analytical grade purchased from Merck (Darmstadt, Germany).

2.2. Preparation of standards solutions

Working solutions of PHE, phenol-d5 (PHE-d5), HQ, hydroquinone-d6 (HQ-d6), CAT and catechol-d6 (CAT-d6) at a concentration of 1000µg/ml, and 100µg/ml were prepared with deionized water in volume glassware.

2.3. Instrumentation

Solid-phase microextraction (SPME) devices obtained from Supelco (Bellefonte, PA, USA) were equipped with 85 µm polyacrylate coated fiber. GC/MS analyses for PHE, HQ and CAT were performed using a gas chromatograph model 6890 coupled with a mass selective detector (MSD) model 5972 (Hewlett Packard, Little Falls, DF, x 0.25mm x 0.10µm film thickness) using helium as carrier gas at 0.6 ml/ min in a constant flow rate mode. MSD was operated by electronic impact (70 eV) in select ion monitoring (SIM) mode. The injector port and interface temperature was 250°C. The oven temperature was maintained at 50°C for 2 min, programmed at 13° C/min to 250°C with a hold at 250°C for 5 min. The following ions were chosen for SIM analyses (quantification ions underlined): PHE: 151, 152, 166; PHE-d5: 156, 171; HQ: 239, 240, 254; HQ-d6: 243, 258; CAT: 239, 240, 254; CAT-d6: 243, 258.

2.4. Treatment of animals and urine sample collection

Adult male Wistar rats (180-230g) were housed in cages, where they had free access to rodent feed and filtered water. The animals were maintained on a 12-hours light-dark cycle at 20-22°C with relative humidity of 55±5%. Three groups of five animals were submitted to different expositions: animals from group I and II were exposed to 10mg/kg/day or 50mg/kg/day, respectively. Animals from group III (control group) received equivalent volume of vehicle. Expositions were carried out during four weeks (five doses a week with an interval of two days), intraperitoneally, in a final volume of 1 ml. PHE was dissolved in absolute ethanol (5% of the final solution) and the volume was completed with

sterile saline solution. Vehicle was ethanol plus sterile saline. In the fifth day of each series of administrations, urine samples of all animals were collected in sterile glass vessels and pooled. The samples were stored at -20°C until analysis.

2.5. Sample preparation

Urinary conjugated phenolic metabolites were hydrolyzed by concentrated hydrochloric acid by adding 0.1ml of concentrated HCl to 1.0 ml of urine sample. The solution was heated for 90 minutes at 95°C. After cooling, deuterated internal standards of PHE-d5 (5µg), HQ-d6 (10µg) and CAT-d6 (10µg) were added. Afterwards, the solution was neutralized with approximately 0.27ml of KOH 5M and the volume was completed to 2ml with deionized water. The solution was acidified with 0.1ml of glacial acetic acid to adjust pH to approximately 3.0. Analytes were extracted using SPME, dipping an 85µm polyacrylate fiber solution for 20minutes under magnetic stirring to obtain an optimal exchange surface. After the extraction time, the fiber was immediately exposed to the headspace (vapor phase) over 100µl of hexamethyldisilazane reagent (heated to 80°C) for 20 minutes to yield the corresponding trimethylsilylated derivatives of PHE, HQ and CAT (on-fiber derivatization). The SPME device was then directly inserted into the GC injector port at 250° C for a 20 min desorption.

2.6. Validation of the method

Validation of the method was performed by establishing recovery values, linearity, intra- and inter-assay precision, limits of detection (LOD) and quantification (LOQ). Negative urine samples, used in these studies, were prepared as follows: urine samples collected from rats non-exposed to PHE were added with 10% of concentrated hydrochloric acid and boiled until complete evaporation of water. Afterwards, the residue

was resuspended with the same volume of deionized water. This procedure was performed to eliminate any phenols present in urine.

2.6.1. Recovery

The recovery studies for PHE, HQ and CAT were performed taking into consideration the possible loss of the analytes by thermal decomposition after the hydrolysis procedure. For this study, two set of samples of different concentrations were analyzed. One of them (set A), consisting of three concentrations for all substances (5.0; 20 and 40 μ g/ml) was analyzed according to the method described in Section 2.5 in six replicates for each concentration (processed). In the second one (Set B), also consisted of six replicates for each concentration (5.0; 20 and 40 μ g/ml), the standards solutions (PHE, HQ and CAT) were spiked to the sample after the hydrolysis procedure (unprocessed). The absolute recovery was evaluated by comparison of the mean response obtained for the set A (processed) and the response of set B (unprocessed). The unprocessed response represented 100 % recovery.

2.6.2. Linearity

The study of linearity was carried out by the analysis of urine samples in triplicate submitted to the method with the following concentrations for PHE, HQ and CAT: (LOQ; 8.0; 15; 30; 60; 100 μ g/ml).

2.6.3. Intra- and inter-assay precision

Precision, defined as the relative standard deviation or coefficient of variation (CV), was determined by intra- and inter-assay. They were carried out by analyzing urine samples (quality controls) on three different days at the following concentrations for PHE,

HQ and CAT: 5.0; 20 and 40 µg/ml. The analyses were performed in six replicates for each concentration.

2.6.4. Limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ)

The LOD was considered the concentration that produced signal-to-noise ratio about 3:1 and the LOQ was considered the concentration that produced signal-to-noise ratio about 10:1. The LOD and LOQ should still satisfy the predetermined acceptance criteria of qualification (retention time within 1% of standards and ion ratios within 20%).

3. Results

Fig. 2 shows chromatograms obtained with the practical use of SPME and GC/MS analyses of urine samples (a blank sample, a sample spiked with PHE, HQ and CAT at the concentration of 10 µg/ml each and a sample deriving from a PHE treated animal). In the latter sample, the analysis revealed the presence of PHE at a concentration of 13.6 µg/ml, HQ (27.0 µg/ml) and CAT (11.7 µg/ml).

The calibration curves were linear over the specified range for all analytes (from the LOQ to 100 µg/ml). The linear regression equations and coefficients of correlation were: $Y=0.184X - 0.183$; $r^2=0.998$ (PHE); $Y=0.123X + 0.099$; $r^2=0.999$ (HQ), and $Y=0.129 - 0.377$; $r^2=0.987$ (CAT), where Y and X represents the relationship between the peak area ratio (compound/internal standard) and the corresponding calibration concentration, respectively.

The confidence parameters of the validated method (LOD, LOQ, intra- and inter-assay precision and recoveries) for the determination of PHE, HQ and CAT are shown in Table1.

Urine samples collected from animals were submitted to the proposed method. The results from animals exposed diary to different doses of PHE during four weeks or from exposed to vehicle (control group) are shown in Table 2.

4. Discussion

Benzene exposures have been extensively evaluated via measurement of urinary metabolites, mainly by *trans-trans* muconic and s-phenylmercapturic acids. Despite a lot of methods have been proposed to quantify biotransformation products of benzene, none of them employed solid phase microextraction (SPME) for the determination of its metabolites. In the present work, a method was developed using SPME and gas chromatography-mass spectrometry (GC/MS), making possible the simultaneous quantification of the three benzene metabolites in urine (PHE, HQ and CAT).

However, since phenolic metabolites of benzene are excreted as glucuronide or sulphate conjugates in urine, a hydrolysis step was necessary before the extraction procedure of the analytes. Acidic and enzymatic hydrolyses are the techniques used for this purpose. Although enzymatic hydrolysis is used in some methods [12,19], this approach is hampered by the long time required for complete hydrolysis of benzene metabolites [20]. For this reason, acidic hydrolysis was chosen with the use of concentrated hydrochloric acid and incubation of samples at 95°C for 90 minutes.

In the scientific literature, only LLE or SPE are used in methods for determination of benzene metabolites in urine [9 -14,17]. Recently, solid-phase microextraction (SPME), a relatively new technique, has gained considerable interest in a broad field of analysis. All steps of the conventional liquid-liquid extraction (LLE) such as extraction, concentration, derivatization and transfer to the chromatograph are integrated into one device, considerably simplifying the sample preparation technique. In the present method. over 20

urine samples could be extracted, injected and analyzed by one person in approximately 8 hours. The polar polyacrylate fiber showed to be suitable to extract phenolic compounds in urine. More than a hundred injections could be performed with the use of the same fiber.

The acidic protons present on PHE, HQ and CAT require a chemical derivatization step before the injection into the GC equipment [21-25]. The most derivatization procedures used to block active protons in phenolic hydroxyl group are acetylation, alkylation and silylation [9,15,21-26]. The formation and extraction of derivatives in the aqueous solution by a single-step procedure would be highly desirable. Nevertheless, the aqueous acetylation with acetic anhydride according to the method described by Llompart et al. [27] is not suitable for HQ and CAT since they are prone to oxidative degradation at pH above 8 [26]. Hence, a SPME step followed by on-fiber derivatization procedure was necessary. Acetic anhydride was also used as reagent to produce acetylated derivatives of PHE, HQ and CAT in our initial experiments with on-fiber derivatization. The reaction was well succeeded, however after only 4-6 derivatization, the coating of the fiber was stripped off. Probably this derivatizing reagent dissolved the epoxy that holds the fiber. This problem was solved with the use of hexamethyldisilazane that promoted a rapid conversion of the phenolic compounds to trimethylsilyl derivatives without damaging the fiber.

The analytical technique proposed for the determination of PHE, HQ and CAT in urine showed to be highly precise with the use of the respective deuterated internal standards. Good sensitivity and linearity were also obtained for all analytes. The application of the validated SPME and GC/MS method in real samples was tested by analyzing urine samples of treated rats with PHE at two different doses. Background levels of phenolic metabolites of benzene could also be determined by the analysis of urine collected from animals of control group. The relevance of this method to clarify the benzene metabolism can be herein represented, since the exposition to higher dose of

PHE induced decrease on PHE, HQ and CAT elimination after third and fourth week of exposition. The possibility that elevated dose of PHE could have caused damage on hepatic or renal tissues, saturation of metabolic pathways or activation of distinct pathways of metabolization will be further investigated.

Together, our data show a method standardized to efficiently quantify PHE, HQ and CAT in urine samples; however it could be probably useful for the simultaneous identification of other benzene metabolites and/or other phenolic compounds present in urine.

References

- [1] WHO.1993. WHO Environmental health criteria 155: biomarkers and risk assessment. concepts and principles. IPCS, Geneva.
- [2] J.V. Bruckner, D.A. Warren, in: C.D. Klaassen (Ed.), Casarett and Doull's Toxicology, the Basic Science of Poisons, 6th ed., McGraw-Hill, New York, 2001, p. 869, Chapter 24.
- [3] R. Snyder, Crit. Rev. Toxicol. 32 (2002) 155.
- [4] R. Snyder, J. Toxicol. Environm. Health. A. 61 (2000) 339.
- [5] A.B. Lindstrom, K. Yeowell–O'Connell, S. Waidyanatha, B.T. Golding, R. Tornero-Velez, S.M. Rappaport, Carcinogenesis. 18 (1997) 1637.
- [6] M.R. Lovern, M.J. Turner, M. Meyer, G.L. Kedderis, W.E. Bechtold, P.M. Schlosser, Carcinogenesis. 18 (1997) 1695.
- [7] N. Rothman, W.E. Bechtold, S.N. Yin, M. Dosemeci, G.L. Li, Y.Z. Wang, W.C. Griffith, M.T. Smith, R.B. Hayes, Occup. Environ. Med. 55 (1998) 705.
- [8] Q. Qu, A.A. Melikian, G. Li, R. Shore, L. Chen, B. Cohen, S. Yin, M.R. Kagan, H. Li, M. Meng, X. Jin, W. Winnik, Y. Li, R. Mu, K. Li, Am. J. Ind. Med. 37 (2000) 522.
- [9] S. Waidyanatha, N. Rothman, G. Li, M.T. Smith, S. Yin, S.M. Rappaport, Anal. Biochem. 327 (2004) 184.
- [10] R.D. Irons, J. Toxicol. Environ. Health. 16 (1985) 673.
- [11] M. T. Smith, J. W. Yager, K. Steinmetz, D.A. Eastmond, Environ. Health. Perspect. 82 (1989) 23.
- [12] H. Schad, F. Schafer, L. Weber, H. J. Seidel, J. Chromatogr. 593 (1992) 147.
- [13] B.L. Lee, H.Y. Ong, C.Y. Shi, C.N. Ong, J. Chromatogr. 619 (1993) 259.
- [14] C.N. Ong, B.L. Lee, H.Y. Ong, L.E. Heng, J. Anal. Toxicol. 12 (1988) 159.

- [15] J.B. Laurens, X.Y. Mbianda, J.H. Spies, J.B. Ubbink, W.J.H. Vermaak, J. Chromatogr. B. 774 (2002) 173.
- [16] M.R. Lee, Y.C. Yeh, W.S. Hsiang, C.C. Chen, J. Chromatogr. B. 707 (1998) 91.
- [17] M.A. Crespín, M. Gallego, M. Valcarcel, J. Chromatogr. B. 773 (2002) 89.
- [18] H. Lord, J. Pawliszyn, J. Chromatogr. A. 902 (2000) 17.
- [19] J. Wittig, S. Wittemer, M. Veit, J. Chromatogr. B. 761 (2001) 125.
- [20] C. N. Ong, B. L. Lee, J. Chromatogr. B. 660 (1994) 1.
- [21] C. Schelett, B. Pfeifer, Wasser 79 (1992) 65.
- [22] H. -B. Lee, L. -D. Weng, A.S.Y. Chau, J. Assoc. Off. Anal. Chem. 67 (1984) 1086.
- [23] H.D. Winkler, K. Levsen, Z. Anal. 334 (1989) 340.
- [24] A. Geissler, H.F. Schoeler, Wasser 80 (1993) 357.
- [25] K. Schhoene, H.J. Bruckert, J. Steinhanses, A. Koenig, Fresenius' Z. Anal. Chem. 348 (1994) 364.
- [26] K. -R. Kim, H. Kim, J. Chromatogr. A. 866 (2000) 87.
- [27] M. Llompart, M. Lourido, P. Landín, C. Garcia-Jares, R. Cela. J. Chromatogr. A. 963 (2002) 137.

Fig. 1. Metabolic pathways of benzene.

Fig. 2. (A) Chromatographic profile obtained with the SPME and GC-MS analysis of a spiked urine sample containing 10 µg/ml of phenol (PHE), hydroquinone (HQ) and catechol (CAT). (B) Blank sample. (C) urine sample of PHE treated rat. Concentrations of 13.6 µg/ml of PHE; 27.0 µg/ml of HQ and 11.7 µg/ml of CAT were determined.

Table 1

Confidence parameters of the validated method for the determination of phenol, hydroquinone and catechol in urine samples.

	Phenol	Hydroquinone	Catechol
Recovery (%)			
QC1	85.10	92.50	89.70
QC2	76.40	77.20	81.30
QC3	86.70	85.60	80.30
LOD ($\mu\text{g/ml}$)	0.30	0.15	0.02
LOQ ($\mu\text{g/ml}$)	0.90	0.40	0.10
Intra-assay precision (CV %)			
QC1	3.30	7.20	6.60
QC2	3.90	4.20	5.70
QC3	3.90	7.20	7.80
Inter-assay precision (CV %)			
QC1	3.50	4.90	2.60
QC2	1.00	2.30	1.00
QC3	3.70	1.40	2.40

LOD=limit of detection; LOQ=limit of quantification; QC1=5.0 $\mu\text{g/ml}$; QC2=20 $\mu\text{g/ml}$; QC3=40 $\mu\text{g/ml}$.

Table 2

Results of analysis of urine samples collected from rats exposed to 10mg/kg/day (group I), 50mg/kg/day (group II) or rats exposed to vehicle (control group). Expositions were performed through intraperitoneal route, once a day, during 4 weeks, with 2 days intervals after each 5 doses.

	Concentration ($\mu\text{g/ml}$)		
	PHE	HQ	CAT
Control group	4.30	59.80	13.80
Group I- 10 mg/Kg/day			
First week	1.10	34.70	9.40
Second week	3.10	46.40	11.80
Third week	2.30	50.10	15.40
Fourth week	2.40	53.10	28.30
Group II- 50 mg/Kg/day			
First week	31.50	47.50	16.70
Second week	38.20	41.60	17.60
Third week	21.70	32.10	21.80
Fourth week	13.70	26.90	11.70

PHE = phenol; HQ=hydroquinone; CAT=catechol.