



Ministério da Saúde
Instituto Nacional de Câncer
Coordenação de Pós-Graduação

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER
Pós-graduação em Oncologia

PAULA VIEIRA BAPTISTA DA SILVA

**ANÁLISE DE ALTERAÇÕES EPIGENÉTICAS EM TRABALHADORES DE POSTOS
DE COMBUSTÍVEIS EXPOSTOS AO BENZENO NO MUNICÍPIO DO RIO DE
JANEIRO.**

Orientador(es): Dr^a Sheila Coelho Soares Lima
Prof^a. Dr^a Márcia Sarpa de Campos Mello

Rio de Janeiro

2020



Ministério da Saúde
Instituto Nacional de Câncer
Coordenação de Pós-graduação

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER
Pós-Graduação em Oncologia

PAULA VIEIRA BAPTISTA DA SILVA

ANÁLISE DE ALTERAÇÕES EPIGENÉTICAS EM TRABALHADORES DE POSTOS
DE COMBUSTÍVEIS EXPOSTOS AO BENZENO NO MUNICÍPIO DO RIO DE
JANEIRO

Dissertação de mestrado apresentada ao
Instituto Nacional de Câncer como parte dos
requisitos para a obtenção do título de
Mestre em Oncologia.

Orientador(es): Dr^a Sheila Coelho Soares Lima

Prof^a. Dr^a Márcia Sarpa de Campos Mello

Rio de Janeiro

2020

i

S586a Silva, Paula Vieira Baptista da.

Análise de alterações epigenéticas em trabalhadores de postos de combustíveis expostos ao benzeno no município do Rio de Janeiro. / Paula Vieira Baptista da Silva. – Rio de Janeiro, 2020.
70f.: il. color.

Dissertação (Mestrado em Oncologia) – Programa de Pós-Graduação em Oncologia, Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, 2020.

Orientadora: Profª. Drª. Sheila Coelho Soares Lima

Orientadora: Profª. Drª. Márcia Sarpa de Campos Mello

1. Epigenética. 2. Metilação do DNA. 3. Benzeno. 4. Exposição Ocupacional. 5. Posto de Combustível.
I. Lima, Sheila Coelho Soares (Orient.). II. Mello, Marcia Sarpa de Campos (Orient.). III. Instituto



Ministério da Saúde
Instituto Nacional de Câncer
Coordenação de Pós-graduação
INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER
Pós-Graduação em Oncologia

PAULA VIEIRA BAPTISTA DA SILVA

**ANÁLISE DE ALTERAÇÕES EPIGENÉTICAS EM TRABALHADORES DE POSTOS
DE COMBUSTÍVEIS EXPOSTOS AO BENZENO NO MUNICÍPIO DO RIO DE
JANEIRO**

Orientadores: Dr^a. Sheila Coelho Soares Lima
Prf^a Dr^a. Márcia Sarpa de Campos Mello

Aprovada em: 04/03/2020.

EXAMINADORES:

Dr^a Maria do Socorro Pombo de Oliveira - Presidente
Instituto Nacional do Câncer (INCA)

Dr Francisco José Roma Paumgarten
Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ)

Dr Henrique César Santejo Silveira
Hospital de câncer de Barreto

Dr^a Marianna de Camargo Cancela – Suplente I
Instituto Nacional do Câncer (INCA)

Dr Martin Herman Bonamino – Suplente II
Instituto Nacional do Câncer (INCA)

Rio de Janeiro

2020



Ministério da Saúde
Instituto Nacional de Câncer
Coordenação de Pós-graduação
INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER

**ANÁLISE DE ALTERAÇÕES EPIGENÉTICAS EM TRABALHADORES DE POSTOS DE
COMBUSTÍVEIS EXPOSTOS AO BENZENO NO MUNICÍPIO DO RIO DE JANEIRO.**

RESUMO

Tese de Mestrado

Paula Vieira Baptista da Silva

Introdução: O benzeno é um hidrocarboneto policíclico aromático reconhecido pela *International Agency for Research on Cancer (IARC)* como carcinogênico para humanos (grupo 1A) devido à sua toxicidade ao sistema hematopoiético. Por estar presente em elevadas concentrações na gasolina (1% v/v), expõe milhares de pessoas que trabalham ou transitam pelos postos de combustíveis aos seus potenciais efeitos carcinogênicos. Portanto, conhecer e compreender a ação e interação da substância no organismo é fundamental para a prevenção de danos decorrentes da exposição ao benzeno e, conseqüentemente, prevenir o desenvolvimento de doenças como o câncer. **Materiais e Métodos:** Este foi um estudo de delineamento transversal realizado entre os anos 2014 a 2016 com trabalhadores de postos de revenda de combustíveis (Centro e Zona Sul). Com dois grupos de estudo de trabalhadores expostos ocupacionalmente ao benzeno: Grupo 1 – exposição apenas por via inalatória e Grupo 2 – exposição por via inalatória e dérmica. Também foi formado um grupo de comparação toxicológica com trabalhadores sem exposição ocupacional ao benzeno. Todos maiores de 18 anos com prévia autorização por assinatura de Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). As informações socioeconômicas e clínicas foram coletadas por meio da aplicação de questionários e foi realizada coleta de urina para a avaliação do biomarcador de exposição (ácido trans,trans-mucônico – AttM) e de sangue para análises de genotoxicidade (ensaio cometa) e das alterações epigenéticas. O perfil de metilação dos elementos transponíveis (LINE-1 e Alu) e de genes de reparo *MGMT*, *PARP-1* e *MSH3* foi avaliado por pirosequenciamento. **Resultados:** O estudo contou com a participação de 217 indivíduos, sendo 69 não expostos, 74 do grupo 1 e 74 do grupo 2. No grupo exposto, a maioria eram homens, não brancos, com baixa escolaridade e renda familiar de até três salários mínimos. Neste grupo, a maioria eram trabalhadores de loja de conveniência (grupo 1) e frentistas (grupo 2). No grupo exposto, 16,9% apresentaram um nível de AttM na urina maior que 0,5 mg/g de creatinina, ou seja, níveis acima do limite estabelecido pela legislação brasileira. O grupo exposto apresentou também maiores níveis de dano genotóxico comparado ao não exposto. Porém, estes níveis não foram correlacionados com a concentração de AttM na urina dos mesmos indivíduos. Os níveis de metilação de LINE-1 foram maiores no grupo 2 em comparação ao grupo 1 e não exposto. Por outro lado, Alu foi encontrado hipometilado nos grupos expostos em comparação ao grupo não exposto, sendo essa redução mais pronunciada no grupo 1. Em relação aos genes de reparo, a região promotora de *MGMT* foi encontrada hipometilada no grupo 2 em comparação aos outros grupos. Menores níveis de metilação de *MGMT* também foram encontrados nos indivíduos expostos ao benzeno com danos genotóxicos em comparação aos indivíduos sem danos. *PARP-1* e *MSH3* foram encontrados mais metilados no grupo 1 em comparação a indivíduos não expostos ou grupo 2. **Conclusão:** O AttM urinário não foi capaz de prever os efeitos genotóxicos ou alterações hematológicas, sugerindo que este não seja um bom biomarcador de efeitos deletérios do benzeno. Além disso, a exposição ocupacional ao benzeno foi capaz de afetar os níveis globais de metilação e de genes de reparo o que, em alguns casos, foi dependente da via de exposição (inalatória ou inalatória e dérmica). Assim, nosso trabalho sugere que o benzeno pode atuar também por mecanismos não genotóxicos. Uma vez que as alterações epigenéticas são precoces, sensíveis ao ambiente e reversíveis, elas podem representar um importante mecanismo de biomonitoramento e prevenção dos danos causados pela exposição ocupacional ao benzeno.

Palavras-chave: Epigenética; Metilação do DNA; Benzeno; Exposição Ocupacional; Posto de Combustível.



Ministério da Saúde
Instituto Nacional de Câncer
Coordenação de Pós-graduação
INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER

ANALYSIS OF EPIGENETIC CHANGES IN FUEL STATION WORKERS EXPOSED
TO BENZENE IN THE CITY OF RIO DE JANEIRO.

ABSTRACT

Master's Thesis

Paula Vieira Baptista da Silva

Introduction: Benzene is a polycyclic aromatic hydrocarbon recognized by the International Agency for Research on Cancer (IARC) as carcinogenic for humans (group 1A) due to its toxicity to the hematopoietic system. Because it can be found in high concentrations in gasoline (1% v / v), it exposes thousands of people who work or transit through gas stations to its potential carcinogenic effects. Therefore, knowing and understanding the action and interaction of the substance in the body is essential for preventing benzene-associated damages and, consequently, preventing the development of diseases such as cancer. **Materials and Methods:** This was a cross-sectional study carried out between the years 2014 and 2016 with workers from fuel resale stations (city center and South zone of Rio de Janeiro). The subjects occupationally exposed to benzene were divided in two groups: Group 1 - exposure by inhalation only and Group 2 - exposure by inhalation and dermal contact. A comparison group was also formed with workers without occupational exposure to benzene. All individuals were over 18 years of age and gave prior authorization by signing a Free and Informed Consent Form. Socioeconomic and clinical information was collected by questionnaires and urine was collected to assess the exposure biomarker (trans, trans-muconic acid - AttM). Blood was also collected from all individuals to perform genotoxicity (comet assay) and epigenetic analyses. The methylation profile of transposable elements (LINE-1 and Alu) and of *MGMT*, *PARP-1* and *MSH3* repair genes was evaluated by pyrosequencing. **Results:** A total of 217 individuals was included in the study, 69 of whom were not exposed, 74 from group 1 and 74 from group 2. In the exposed group, the majority were men, non-white, with low education and family income of up to three minimum wages. In this group, most individuals were convenience store workers (group 1) and gas station attendants (group 2). In the exposed group, 16.9% had AttM levels in the urine greater than 0.5 mg/g of creatinine, that is, levels above the limit established by legislation. The exposed group also showed higher levels of genotoxic damage compared to the unexposed individuals. However, these levels were not correlated with the concentration of AttM in the urine. Methylation levels of LINE-1 were higher in group 2 compared to group 1 and unexposed. On the other hand, Alu was found to be hypomethylated in the exposed groups compared to the unexposed group, this reduction being more pronounced in group 1. In relation to the repair genes, *MGMT* promoter region was found to be hypomethylated in group 2 compared to the other groups. Lower levels of *MGMT* methylation were also found in individuals exposed to benzene with genotoxic damage compared to those without damage. *PARP-1* and *MSH3* were found to be more methylated in group 1 compared to unexposed individuals or group 2. **Conclusion:** Urinary AttM was not able to predict the genotoxic effects or hematological changes, suggesting that this is not a good biomarker of benzene's deleterious effects. In addition, occupational exposure to benzene was able to affect overall methylation levels and repair genes, which in some cases was dependent on the route of exposure (inhaled or inhaled and dermal contact). Thus, our work suggests that benzene can also act by non-genotoxic mechanisms. Since epigenetic changes show an early onset, are sensitive to the environment and reversible, they can represent an important mechanism for biomonitoring and preventing damage caused by occupational exposure to benzene.

Keywords: Epigenetics; DNA methylation; Benzene; Occupational Exposure; Fuel station.

DEDICATÓRIA

Dedico a Deus, pois sem Ele nada posso fazer, a toda sociedade e a todos os trabalhadores de postos de revenda de combustíveis.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por me abençoar, capacitar e sustentar em todos os momentos da minha vida.

Aos meus pais e a minha amada avó por todo tempo, investimento, apoio e amor depositado para que meus objetivos e sonhos fossem alcançados.

As minhas orientadoras **Márcia Sarpa de Campos Mello** e **Sheila Coelho Soares Lima** pela oportunidade, confiança, paciência, atenção, dedicação, carinho e amizade. Assim, como a Dr^a **Ubirani Otero** e o Dr **Luis Felipe Ribeiro Pinto** por me receberem no Departamento de Vigilância Ocupacional e Ambiental e Programa Carcinogênese Molecular (PCM) no Instituto Nacional do Câncer, respectivamente, e por todo apoio e palavras de incentivo ao logo dessa jornada.

Aos meus amigos e colegas de laboratório, **Isabela Gonzaga**, **Alda Regina Sampaio**, **Ricardo Cortez** e **Diego Camuzzi** que apoiaram e me ajudaram em todo processo desde a seleção até a bancada e em especial a **Marina Chianello Nicolau Fagundes** por toda ajuda, ensinamento, atenção, cuidado, amor, paciência e principalmente amizade.

A minha epidemiologista e amiga querida **Flávia Nascimento** por toda ajuda estatística e epidemiológica além da paciência, atenção e carinho.

As minhas amigas amadas **Sâmila Ferreira Natiane**, **Antonella Bellomo**, **Jualiana Amazonas**, **Kátia Soares**, **Bárbara Geraldino**, **Juliana Gomes**, **Tahyná Palhares**, **Rafaela Nascimento**, **Yngrid Cabral**, **Rachele Grazreisner**, **Patrícia Moura**, **Ana Luiza Lopez**, **Gracielle Almeida**, **Eduarda Gemaque**, **Jade Freitas**, **Fernanda Mourão**, **Carolina Lopes**, **Tatiana Simão**, **Lilian Brewer** e **Andréa Lopes** por todo apoio, paciência, força, torcida, conversas e café.

Aos membros da banca, Dr^a **Maria do Socorro Pombo de Oliveira**, Dr **Francisco José Roma Paumgarten**, Dr **Henrique César Santejo Silveira**, Dr^a **Marianna de Camargo Cancela** e Dr **Martin Herman Bonamino** pelas contribuições e presença.

E principalmente a todos os trabalhadores dos postos de revenda de combustíveis que participaram do estudo pela confiança depositada.

“E tudo que fizerdes fazei-o de todo o coração como ao Senhor e não aos homens”.

Colossenses 3:23

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Câncer relacionado ao trabalho	3
1.2	Benzeno	5
1.3	Benzeno e postos de revenda de combustíveis	8
1.4	Monitoramento biológico do benzeno	9
1.5	Biotransformação do benzeno	11
1.6	Benzenismo	14
1.7	Neoplasias Hematológicas (Leucemia) e Benzeno	14
1.8	Ação genotóxica e Benzeno	16
1.8.1	Gene de reparo - <i>MGMT</i>	17
1.8.2	Gene de reparo – <i>PARP-1</i>	18
1.8.3	Gene de reparo de mau pareamento – <i>Mismatch repair</i> (homólogo humanos MutS e MutL)	19
1.9	Ação não genotóxica (EPIGENÉTICA) e Benzeno	21
1.9.1	Metilação do DNA	22
1.9.2	Elementos transponíveis	24
2	JUSTIFICATIVA DO ESTUDO	29
3	OBJETIVOS	30
3.1	Geral	30
3.2	Específicos	30
4	MATERIAL E MÉTODOS	31
4.1	Delineamento do estudo	31
4.2	População de estudo	31
4.3	Cálculo amostral do estudo	32
4.4	Critérios éticos	32
4.5	Coleta de Dados	32
4.6	Coleta das amostras biológicas	33

4.7 Avaliação do biomarcador de exposição (AttM)	34
4.8 Teste de genotoxicidade (ENSAIO COMETA)	37
4.9 Análise epigenética (METILAÇÃO DO DNA)	41
4.9.1 Extração do DNA	41
4.9.2 Tratamento com bissulfito de sódio (NaHSO ₃)	43
4.9.3 Reação em cadeia da polimerase (PCR) e Eletroforese	45
4.9.4 Análise de metilação de sítios CpG (PIROSSEQUENCIAMENTO)...	51
4.10 Análise estatística	53
5 RESULTADOS	54
5.1 Dados descritivos – Caracterização da população de estudo	54
5.2 Características ocupacionais dos trabalhadores expostos ao benzeno	55
5.3 Dados clínicos e laboratoriais da população de estudo	58
5.4 Dados de exposição avaliada pelo biomarcador (AttM).....	63
5.5 Dados de genotoxicidade (CITOTOXICIDADE E ENSAIO COMETA)..	65
5.5.1 Dados de alterações hematológicas dos trabalhadores expostos ocupacionalmente ao benzeno.....	69
5.6 Dados não genotóxicos (EPIGENÉTICOS)	70
5.6.1 Perfil global de metilação.....	70
5.6.2 Perfil de metilação dos genes de reparo	76
6 DISCUSSÃO	88
7 CONCLUSÃO	104
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	105
9 ANEXOS	131
9.1 Registro do comitê de ética	131
9.2 Termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE).....	132
9.3 Questionário individual e clínico.....	136

LISTA DE QUADROS

Quadro 1.1 – Características físico-químicas do benzeno.....	5
Quadro 1.2 - Estimativa de incidência e mortalidade de câncer em 2020 e 2040 no mundo e no Brasil.....	16
Quadro 1.3 - Sequências dos <i>primers</i> utilizados nas análises do pirosequenciamento.....	48
Quadro 1.4 - Componentes da reação e condições no termociclador da PCR de cada elemento transponível e gene específico estudo.....	49

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1 - Quantidade de agentes classificados pela monografia (v 1-125) da IARC	8
Tabela 5.1 - Características sociodemográficas de trabalhadores não expostos ocupacionalmente ao benzeno (grupo de comparação) e dos trabalhadores de postos de revenda de combustíveis expostos ocupacionalmente ao benzeno no município do Rio de Janeiro no período de 2014 a 2016 (n = 217).....	55
Tabela 5.2 – Frequência do tipo de ocupação dos trabalhadores de postos de revenda de combustíveis expostos ocupacionalmente ao benzeno em postos de combustíveis no município do Rio de Janeiro (n = 148).....	56
Tabela 5.3 – Frequência das atividades ocupacionais realizadas pelos trabalhadores de postos de revenda de combustíveis expostos por via inalatória e dérmica ao benzeno (n = 74).....	57
Tabela 5.4 – Tipos de combustíveis manipulados pelos trabalhadores de postos de revenda de combustíveis expostos por via inalatória e dérmica ao benzeno (n = 74).....	57
Tabela 5.5 – Frequência dos procedimentos e hábitos ocupacionais realizados durante o expediente pelos trabalhadores de postos de revenda de combustíveis expostos por via inalatória e dérmica ao benzeno (Grupo 2) (n = 74).....	58
Tabela 5.6 – Dados bioquímicos e hematológicos de trabalhadores não expostos ocupacionalmente ao benzeno (grupo de comparação) e dos trabalhadores de postos de revenda de combustíveis expostos ocupacionalmente ao benzeno no município do Rio de Janeiro no período de 2014 a 2016 (n = 217).....	59
Tabela 5.7 – Frequência de doenças pregressas dos trabalhadores de postos de revenda de combustíveis expostos ocupacionalmente ao benzeno (n = 148).....	61
Tabela 5.8 – Principais sinais e sintomas relatados pelos trabalhadores de postos de revenda de combustíveis expostos ocupacionalmente ao benzeno (n=148).....	61
Tabela 5.9 – Dados Reprodutivos das trabalhadoras de postos de revenda de combustíveis expostas ocupacionalmente ao benzeno (n=58).....	63
Tabela 5.10 – Níveis do ácido trans,trans-mucônico nos trabalhadores de postos de revenda de combustíveis expostos ao benzeno (n = 148).....	63

Tabela 5.11 – Níveis do ácido trans,trans-mucônico no trabalhadores expostos ao benzeno de acordo com a localização geográfica do posto de revenda de combustíveis (n = 148).....	64
Tabela 5.12 - Análise de associação entre os hábitos/estilo de vida dos trabalhadores expostos ocupacionalmente ao benzeno e o biomarcador de exposição (n=148).....	65
Tabela 5.13 Distribuição da classe de danos ao DNA nos trabalhadores do grupo não exposto e exposto ao benzeno.....	66
Tabela 5.14 Trabalhadores de postos de revenda de combustíveis expostos ocupacionalmente ao benzeno que apresentaram alterações hematológicas (N=17).....	69
Tabela 5.15 Perfil de metilação dos elementos transponíveis e genes de reparo dos trabalhadores de postos de revenda de combustíveis participantes do estudo (N=217), de acordo com a via de exposição ocupacional ao benzeno.....	87
Tabela 5.16 – Perfil de metilação dos elementos transponíveis e genes de reparo em indivíduos expostos ocupacionalmente ao benzeno (n = 148) estratificados de acordo com a presença de danos genotóxicos.....	87
Tabela 5.17 – Perfil de metilação dos elementos transponíveis e genes de reparo em indivíduos expostos ocupacionalmente ao benzeno (n = 148) estratificados de acordo com a presença de alterações hematológicas.....	87

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1 Estimativa de câncer.....	1
Figura 1.2 Principais causas de câncer.....	2
Figura 1.3 Etapas da carcinogênese.....	3
Figura 1.4 Percentual de todas as mortes relacionadas ao trabalho.....	4
Figura 1.5 Cadeia produtiva do benzeno.....	7
Figura 1.6 Biotransformação do benzeno.....	13
Figura 1.7 Mecanismo de ação de MGMT.....	18
Figura 1.8 Mecanismo de ação de PARP-1.....	19
Figura 1.9 Mecanismo de reparo por mau pareamento em humanos.	21
Figura 1.10 Esquema de Metilação do DNA.	22
Figura 1.11 Metilação do DNA em células normais e tumorais.....	23
Figura 1.12 Classes de elementos transponíveis.....	25
Figura 1.13 Processo de transposição de retrotransposons.não LTRs.....	26
Figura 1.14 Estrutura do elemento Alu.....	27
Figura 4.1 Ilustração dos principais componentes da cromatografia líquida de alta performance (CLAE).....	35
Figura 4.2 Fotomicrografia do teste de fluoresceína. A as células viáveis e B células não viáveis/mortas.....	38
Figura 4.3 Esquema da metodologia do ensaio cometa.....	39
Figura 4.4 Representação esquemática do “cometa” com faixas pretas mostrando a divisão entre a “cauda” e a “cabeça”.....	39
Figura 4.5 Fotomicrografia do ensaio cometa com diferentes classes de dano (0, 1, 2 e 3).....	41
Figura 4.6. DNA tratado com bissulfito de sódio.....	43
Figura 4.7 Conversão da citosina em uracila.....	44

Figura 4.8 Metodologia da técnica de PCR.....	47
Figura 4.9 Gel de agarose de MGMT revelado no aparelho ChemiDoc (Bio Rad®).....	50
Figura 4.10 Princípio do Pirosequenciamento.....	52
Figura 4.11 Pirograma do gene <i>MGMT</i> dado durante o pirosequenciamento.....	53
Figura 5.1 Avaliação do ácido trans,trans-mucônico na urina dos grupos não-exposto e exposto ocupacionalmente ao benzeno.	64
Figura 5.2 Avaliação de genotoxicidade em células do sangue periférico de indivíduos não-expostos e expostos ocupacionalmente ao benzeno.....	66
Figura 5.3 Análises de correlação entre os níveis do biomarcador de exposição ao benzeno e os níveis de genotoxicidade.....	67
Figura 5.4 Avaliação dos níveis do ácido trans,trans-mucônico em indivíduos expostos ocupacionalmente ao benzeno de acordo com a presença de danos genotóxicos no sangue periférico.	68
Figura 5.5 Avaliação dos níveis de ácido trans,trans-mucônico em indivíduos expostos ocupacionalmente ao benzeno de acordo com a presença alterações hematológicas.....	70
Figura 5.6 Perfil de metilação de LINE-1 de acordo com a exposição ocupacional ao benzeno.....	71
Figura 5.7 Perfil de metilação de LINE-1 de acordo com a presença de danos genotóxicos e de alterações hematológicas em indivíduos expostos ocupacionalmente ao benzeno.....	72
Figura 5.8 Correlação entre o perfil de metilação de LINE-1 e o biomarcador de exposição ao benzeno e a quantidade de danos genotóxicos em indivíduos expostos ocupacionalmente ao benzeno.....	73
Figura 5.9 Perfil de metilação de Alu de acordo com a exposição ocupacional ao benzeno.....	74
Figura 5.10 Perfil de metilação de Alu de acordo com a presença de danos genotóxicos e de alterações hematológicas em indivíduos expostos ocupacionalmente ao benzeno.	75

Figura 5.11 Correlação entre o perfil de metilação de <i>Alu</i> e o biomarcador de exposição ao benzeno e a quantidade de danos genotóxicos em indivíduos expostos ocupacionalmente ao benzeno.....	76
Figura 5.12 Perfil de metilação de <i>MGMT</i> de acordo com a exposição ocupacional ao benzeno.....	77
Figura 5.13 Perfil de metilação de <i>MGMT</i> de acordo com a presença de danos genotóxicos e de alterações hematológicas em indivíduos expostos ocupacionalmente ao benzeno.....	78
Figura 5.14 Correlação entre o perfil de metilação de <i>MGMT</i> e o biomarcador de exposição ao benzeno e a quantidade de danos genotóxicos em indivíduos expostos ocupacionalmente ao benzeno.....	79
Figura 5.15 Perfil de metilação de <i>PARP-1</i> de acordo com a exposição ocupacional ao benzeno.....	80
Figura 5.16 Perfil de metilação de <i>PARP-1</i> de acordo com a presença de danos genotóxicos e de alterações hematológicas em indivíduos expostos ocupacionalmente ao benzeno.....	81
Figura 5.17 Correlação entre o perfil de metilação de <i>PARP-1</i> e o biomarcador de exposição ao benzeno e a quantidade de danos genotóxicos em indivíduos expostos ocupacionalmente ao benzeno.....	82
Figura 5.18 Perfil de metilação de <i>MSH3</i> de acordo com a exposição ocupacional ao benzeno.....	83
Figura 5.19 Perfil de metilação de <i>MSH3</i> de acordo com a presença de danos genotóxicos e de alterações hematológicas em indivíduos expostos ocupacionalmente ao benzeno.....	83
Figura 5.20 Correlação entre o perfil de metilação de <i>MSH3</i> e o biomarcador de exposição ao benzeno e a quantidade de danos genotóxicos em indivíduos expostos ocupacionalmente ao benzeno.....	84

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AACR - American Association for Cancer Research
ACGIH - *American Conference of Governmental Industrial Hygienists*
ADH - Álcool Desidrogenase
ADP - *Adenosine diphosphate*
AFM - Ácido Fenilmercaptúrico
AH – Alteração Hematológica
ALDH - Aldeído Desidrogenase
ANP - Agência Nacional de Petróleo
APS - Adenosina fosfossulfato
ATM - *ATM serine/threonine kinase*
ATP - Adenosine triphosphate
ATSDR - *Agency for Toxic Substances and Disease Registry*
AttM - Ácido trans,trans-mucônico urinário
BA – Bahia
BPF – Baixo ponto de fusão
C – Citosina
cDNA - Ácido desoxirribonucleico complementar
CHD2 - *Chromodomain Helicase DNA Binding Protein 2*
CHD4 – *Chromodomain Helicase DNA Binding Protein 4*
CHGM - Concentração de hemoglobina globular média
CLAE - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CNPBz - Comissão Nacional Permanente do Benzeno
CpG – Citosina com ligação fosfodiéster a uma guanina
CPQ – Centro de Qualidade e Pesquisa
CT – Reagente de conversão
CYP2E1 - Citocromo P450 2E1
CYP450 - Citocromo P450
dATP – DesoxiAdenosina Trifosfatada
dCTP- DesoxiCitosina Trifosfatada
DFT - Departamento de Farmacologia e Toxicologia
dGTP - DesoxiGuanina Trifosfatada
DHDH - Diidrodiol desidrogenase
DNA - Ácido desoxirribonucleico
DNMT - DNA metiltransferases
dNTP – Desoxirribonucleotídeos
dTTP – DesoxiTimina Trifosfatada
EDTA - *Ethylenediamine tetraacetic acid*
EH - Enzima hidrolase
ES – Espírito Santo
EU-OSHA - *European Agency for Safety and Health at Work*
EXO 1 - Exonuclease 1
FIOCRUZ - Fundação Oswaldo Cruz

FUNDACENTRO - Fundação Jorge Duprat Figueiredo de Segurança e Medicina do Trabalho
G- Guanina
GAMA GT – Gamaglutamiltranspeptidase
GST – Glutathione-S-transferase
HCI – Hospital do câncer I
HDAC - Histonas desacetilases
HEK293 – Células embrionárias renais humanas
HGM – Hemoglobina Corpuscular Média
HHEX – *Hematopoietically-expressed homeobox*
HPA - Hidrocarboneto Policíclico Aromático
HPLC - *High Performance Liquid Chromatography*
hPMS2 - Proteína homóloga humana 2
IARC - *International Agency for Research on Cancer*
IBMP – Índice biológico máximo permitido
IDL - Loop de inserção/exclusão
INCA - Instituto Nacional do Câncer José Alencar Gomes da Silva
INCQS - Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
KCNJ11 – *Potassium Inwardly Rectifying Channel Subfamily J Member 11*
KNCQ1 – *Potassium Voltage-Gated Channel Subfamily Q Member 1*
KS - *Kolmogorov-Smirnov*
LACAT - Laboratório de Análises Clínicas, Ambientais e Toxicológicas
LDH – Lactato desidrogenase
LEO - Limites de Exposição Ocupacional
LINACH - Lista Nacional de Agentes Cancerígenos para Humanos
LINE - *Long Interspersed Nuclear Elements*
LMA – Leucemia Mielóide Aguda
LTR - Long Terminal Repeats
MBD – *Methyl-CpG-Binding Protein*
MGMT - O⁶-Metilguanina-DNA-Metiltransferase
MLH1 - Homólogo humano 1 de MutL
MLH3 - Homólogo humano 3
MMR - *Mismatch Repair*
MPO – Mieloperoxidase
MRE11 - *Double Strand Break Repair Nuclease*
MS - Ministério da Saúde
MSH2 - Homólogo humano 2 de MutS
MSH3 - Homólogo humano 3 de MutS
MSH6 - Homólogo humano 6 de MutS
MSI - Microsatellite instability
MTE - Ministério do Trabalho e Emprego
MutL - *DNA mismatch repair protein*
MutS - DNA mismatch repair protein of *Escherichia coli*
NAD⁺ - Nicotinamida adenosina
NQO1 - Quinona oxidoreductase 1

NR – Norma regulamentatória
OMS - Organização Mundial de Saúde
OPAS - Organização Pan-Americana da Saúde
ORF - *Open Reading Frames*
OSHA – *Occupational Safety and Health*
PARP- Poli (ADP-ribose) polymerase
PARP-1 - Poli (ADP-ribose) polymerase 1
PBS - *Phosphate buffered saline*
PCM - Programa de Carcinogênese Molecular
PCNA - Proliferação de antígeno nuclear celular
PCR - *Polymerase Chain Reaction*
PCR - Proteína C reativa
PDL - *Periodontal ligament fibroblast cells*
PEL - *Permissible Exposure Limit*
PFAS – *Polyfluoroalkyl substances*
PFN – Ponto de fusão normal
PM20D1 – *Peptidase M20 Domain Containing 1*
PMS1 - Proteína homóloga humana 1
PMS2 - Proteína homóloga humana 2
PPI – Pirofosfato
PRC – Postos de Revenda de Combustíveis
RJ – Rio de Janeiro
RNA - Ácido ribonucleico
RNA_m - Ácido ribonucleico mensageiro
ROC - *Receiver Operating Characteristic Curve*
RPA - Proteína de ligação ao DNA de fita única
SAM - *S-adenosyl-L-methionine*
SINE- *Short Interspersed Nuclear Elements*
siRNA - *Short interfering RNA*
SMD – Síndrome Mielodisplásica
SNC - Sistema Nervoso Central
SP – São Paulo
SPSS - *Statistical Package for the Social Science*
T – Timina
TCLE - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TGO – Transaminase glutâmico-oxalacética
TGP - Transaminase glutâmico-pirúvica
TLV - *Time-Weighted Average*
TPRT - *Target-Primed Transcription Reverse*
TSD - *Termed Target Site Duplications*
TWA - *Threshold Limit Values*
TWA-PEL - *Time-Weighted Average - Permissible Expousure Limit*
U – Uracila
UAT- Unidades Arbitrárias Totais
UNIRIO - Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro

USP – Universidade Federal do estado de São Paulo

UV – Ultra-Violeta

VGM – Volume globular médio

VRT - Valor de Referência Tecnológico

WHO - *World Health Organization*

XRCC1 - *X-Ray Repair Cross Complementing 1*

LISTA DE SÍMBOLOS

HCl	Ácido clorídrico
AttM/g	Ácido trans,trans-mucônico por grama
H ₂ O	Água
NH ₂	Amina
(+)	Anôdo
B	Beta
NaHSO ₃	Bissulfito de sódio
NH ₄ ⁺	Cátion amônio
C/T	Citosina para Timina
MgCl ₂	Cloreto de Magnésio
NaCl	Cloreto de sódio
CA	Concentração da solução amostra
CP	Concentração da solução padrão
Δ	Delta
CO ₂	Dióxido de carbono
H	Eta
2 ⁿ	Expressão potencial
Fl	Fentolitro
x g	Força centrífuga relativa cuja unidade de medida é grama
C ₆ H ₆	Fórmula molecular do benzeno
Γ	Gamma
G	Gramas
g/cm ³	Gramas por centímetro cúbico
g/dl	Gramas por decilitro
g/L	Gramas por litro
°C	Grau Celsius
CH ₃	Grupamento Metil
OH ⁻	Hidróxido
H	Hora
=	Igual
kg/m ³	Kilo por metro cúbico
KPa	Kilopascal
Mg ⁺²	Magnésio
>	Maior que
±	Mais ou menos
m/v	Massa por volume
≤	Menor e igual que
<	Menor que
μg	Micrograma
μg/m ⁻³	Micrograma por metro cúbico
μg/mL	Micrograma por mililitro

μL	Microlitro
μm	Micrômetro
μM	Micromolar
μM/L	Micromolar por litro
mil/ul	Mil células por decilitro
milhões/ul	Milhões de células por decilitro
mA	Miliampere
Mg	Miligrama
mg/dl	Miligrama por decilitro
mg/g	Miligrama por grama
mg/³	Miligrama por metro cúbico
mL	Mililitro
mL/min	Mililitro por minuto
Mm	Milímetro
mm³	Milímetros cúbicos
mM	Milimolar
Min	Minuto
M	Molar
Ng	Nanograma
nm	Nanômetro
nM	Nanomolar
nmol/L	Nanomolar por litro
M0	Número de células com classe de dano "0";
M1	Número de células com classe de dano "1";
M2	Número de células com classe de dano "2"
M3	Número de células com classe de dano "3"
O⁶-meG	O ⁶ -metilguanina
SO₃	Óxido sulfúrico
O₂	Oxigênio
Pb	Pares de base
Ppm	Parte por milhão
%	Porcentagem
pH	Potencial de hidrogênio
MutL	Proteína L da família Mut
MutS	Proteína S da família Mut
RA	Resposta (área ou altura) do pico da solução amostra
RP	Resposta (área ou altura) do pico da solução padrão
Rpm	Rotação por minuto
S	Segundo
HSO₃-	Sulfito de hidrogênio
U	Unidade
Bar	Unidade de pressão
UI/ml	Unidade por mililitro
UI/L	Unidades por litro
X	Vezes

V	Volts (voltagem)
V/cm	Volts por centímetro
V	Volume
v/v	Volume por volume

1. INTRODUÇÃO

Câncer é um termo genérico dado ao conjunto de mais de 200 doenças que se caracterizam pelo crescimento anormal, desordenado, descontrolado das células e pela capacidade de invadir outros órgãos e tecidos (metástases) (VAN MIDDENDORP et al., 2010; MUKHERJEE S. 2012; SAITO *et al.*, 2015; OPAS, 2018; INCA, 2019).

Este conjunto de doenças é a segunda principal causa de morte no mundo com cerca de 9,6 milhões de óbitos em 2018 e 16,3 milhões estimados para 2040 (Figura 1.1) (GLOBOCAN, 2018; AACR, 2019; WHO, 2019). No Brasil, cerca de 625 mil novos casos foram estimados para 2020-2022, com cerca de 300 mil casos em homens e 283 mil em mulheres (INCA, 2020).

Número estimado de mortes para 2018 a 2040, todos os câncer, ambos os sexos, todas as idades

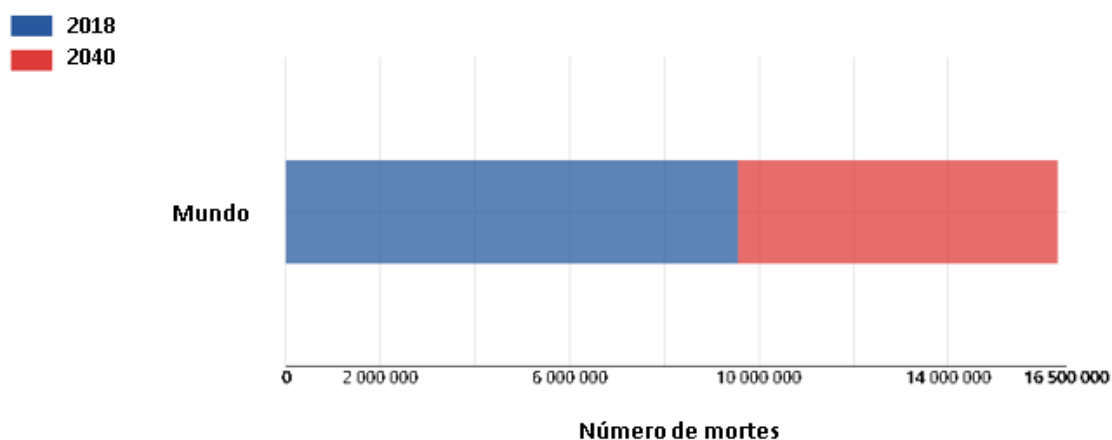


Figura 1.1 Estimativa de câncer. O gráfico mostra a mortalidade de todos os tipos de câncer no ano de 2018 em azul e, em vermelho a estimativa de crescimento em 2040. Fonte: GLOBOCAN, 2018.

O câncer é uma doença considerada complexa e de desenvolvimento longo, cuja etiologia é multifatorial, podendo ser desencadeado por fatores endógenos (hereditários), representando aproximadamente 10 a 20% dos casos, ou exógenos, com cerca de 80 a 90% dos casos de câncer associados a esses fatores (WU *et al.*, 2018; INCA, 2019).

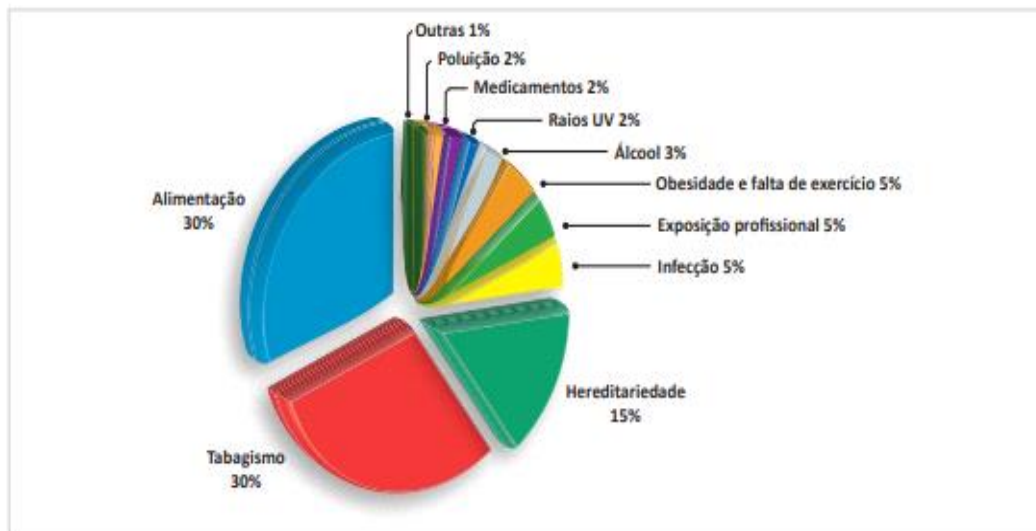


Figura 1.2. Principais causas de câncer. Fonte: INCA, 2017.

Dentre os fatores de riscos exógenos envolvidos na carcinogênese (processo de formação do câncer) está a exposição a agentes cancerígenos que podem ser físicos (como a radiação ultravioleta - UV), químicos (substâncias químicas) ou biológicos (como os vírus) (MILLER & MILLER, 1981; COGLIANO *et al.* 2011; INCA, 2019). A carcinogênese ocorre em três etapas (Figura1.3), sendo elas:

- **Iniciação** – Primeira etapa, as células normais são transformadas em células iniciadas, ou seja, células com um potencial tumoral, sendo uma etapa rápida e irreversível. Etapa em que os agentes cancerígenos (iniciadores) atuam, causando danos genotóxicos e não genotóxicos que se tornam permanentes após divisões celulares.
- **Promoção** – As células iniciadas persistentes se expandem e apresentam características típicas de células tumorais, como a proliferação exacerbada (expansão clonal), perda de adesão celular, resistência à morte celular, entre outros. Esta é uma etapa longa e reversível. Neste ponto, os agentes promotores que promovem a expansão das células iniciadas podem não afetar mais diretamente o DNA, sendo necessárias exposições repetidas ao agente cancerígeno em um determinado intervalo de tempo para que ocorra o efeito biológico.

- Progressão – Etapa final da carcinogênese, momento em que há a conversão de lesões pré-neoplásicas em neoplásicas, em que as alterações genéticas e epigenéticas adquiridas resultam no câncer propriamente dito. Nesta etapa, as células cancerígenas adquirem a capacidade de invadir e colonizar outros órgãos (FERREIRA & ROCHA, 2005; WEINBERG, 2016; KLAUNING & KAMENDULIS, 2008; SAITO *et al.*, 2015).



Figura 1.3. Etapas da carcinogênese. A figura mostra a ação dos agentes carcinogênicos (químico, físico e biológico) atuando na iniciação, promoção e progressão da neoplasia. Fonte: INCA, 2013.

1.1 Câncer relacionado ao trabalho

Câncer relacionado ao trabalho é o câncer que surge em consequência da exposição a agentes químicos, físicos e biológicos classificados como cancerígenos, presentes no ambiente de trabalho (OSHA, 1981; SIMONATO & SARACCI, 1983; LAUWERYS, 1991).

As doenças relacionadas ao trabalho são classificadas de duas formas:

- Doença profissional ou ocupacional: Quando a doença apresenta relação direta com o trabalho, sendo esta causa necessária para o desenvolvimento da doença. Por exemplo, a exposição ao amianto e o desenvolvimento de mesotelioma.

- Doenças relacionada ao trabalho: Onde estão inseridas a maioria das neoplasias, não havendo relação direta e sim um aumento na frequência e gravidade da doença modificado pelo trabalho, sendo compreendida como fatores de risco ou causa suficiente (SHILLING, 1984).

Estima-se que 8 a 16% dos casos totais de câncer são associados a fatores ocupacionais, com 8 a 10,8% em homens e 1 a 2,2% em mulheres, (FRITSCHI & DRISCOLL, 2006; PURDUE *et al.*, 2015). As doenças relacionadas ao trabalho representam 86% de todas as mortes relacionadas ao trabalho em todo mundo e o câncer é responsável por 27% destas (Figura 1.4) (EU-OSHA, 2020).

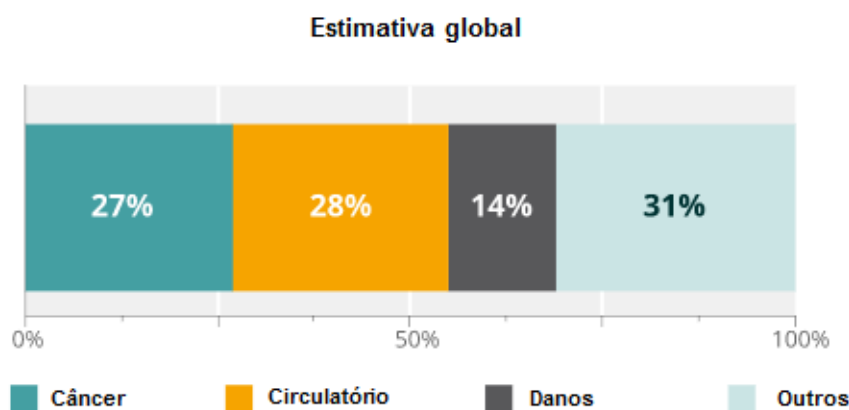


Figura 1.4. Percentual de todas as mortes relacionadas ao trabalho. O gráfico mostra o percentual de mortes relacionadas ao trabalho em escala mundial no ano de 2017. Fonte: Adaptado de *European Agency for Safety and Health at Work*, 2019.

Geralmente, as concentrações de substâncias cancerígenas são mais elevadas no local de trabalho do que no ambiente em geral (INCA, 2013). De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), a exposição ocupacional é a principal forma de exposição a um elevado número de produtos e misturas químicas, visto que apresentam uma maior quantidade e concentração no setor industrial (INCA, 2013; MS, 2018).

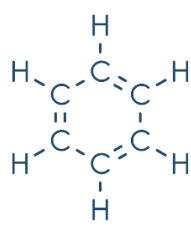
Estima-se que cerca de 40% dos casos de câncer são evitáveis, ou seja, passíveis de prevenção. Dessa forma, o câncer relacionado ao trabalho é o tipo de câncer com um alto potencial de prevenção, uma vez que se conhece o local e processo de trabalho, os possíveis agentes cancerígenos e o momento da exposição, podendo ser reduzido em 30 a 50% dos casos (INCA, 2013; INCA, 2019).

Devido à associação entre exposição a agentes químicos carcinogênicos no ambiente de trabalho e o desenvolvimento do câncer ocupacional, é de extrema importância conhecer diferentes aspectos desta relação, não só as questões relacionadas à exposição (como o processo e ambiente de trabalho), mas também o agente em si, conhecendo seus efeitos, sua cinética e suas consequências no organismo, para que práticas de vigilância epidemiológicas e de promoção a saúde sejam realizadas (EATON & GILBERT, 2008; INCA, 2013; MS, 2018).

1.2 Benzeno

O benzeno é hidrocarboneto policíclico aromático (HPA) e se apresenta na forma líquida, incolor, com odor doce característico, lipossolúvel e altamente volátil e inflamável (Quadro 1.1) (O'NEIL *et al.*, 2006; OGA, 2008; ATSDR, 2019). Ele é amplamente encontrado no meio ambiente e local de trabalho, por meio dos processos petroquímicos, como na cadeia de extração/refino do petróleo, nas indústrias siderúrgicas (gás de coqueria), nas emissões industriais, na queima/evaporação de combustíveis, como a gasolina, e também na fumaça de cigarro (Figura 1.5) (ATSDR, 2007; MS, 2018).

Quadro 1.1 – Características físico-químicas do benzeno.

	Propriedades	Notação
 <p>Benzeno</p>	Nome químico e sinônimos	Benzeno, Ciclo-hexatrieno, Benzol, Pirobenzol
	Fórmula Molecular	C ₆ H ₆
	Estado Físico	Líquido, incolor e volátil
	Peso Molecular	78,11 (92,25% carbono e 7,75% hidrogênio)
	Densidade	876 kg/m ³
	Ponto de Ebulição	80,1°C
	Ponto de Fusão	5°C
	Massa específica	0,8 g/cm ³
	Pressão de vapor	10 kPa
	Inflamabilidade	Extrema (excelente combustão)
	Solubilidade em água	0,8 g/L
	Toxicidade	Alta

Fonte: Adaptado de OGA, 2008 e ATSDR, 2019.

Além disso, o benzeno é largamente utilizado nas reações de síntese orgânica da indústria química, por ser considerado um excelente solvente orgânico, devido à sua capacidade de dissolver outras substâncias químicas. Assim, está envolvido na cadeia produtiva de diversos materiais, como plásticos, resinas, corantes, fibras sintéticas, agrotóxicos, medicamentos, colas, tintas, vernizes, borracha, sabão, detergente entre outros (Figura 1.5) (FUNDACENTRO, 2011; ABIQUIM,2020;MS,2018)

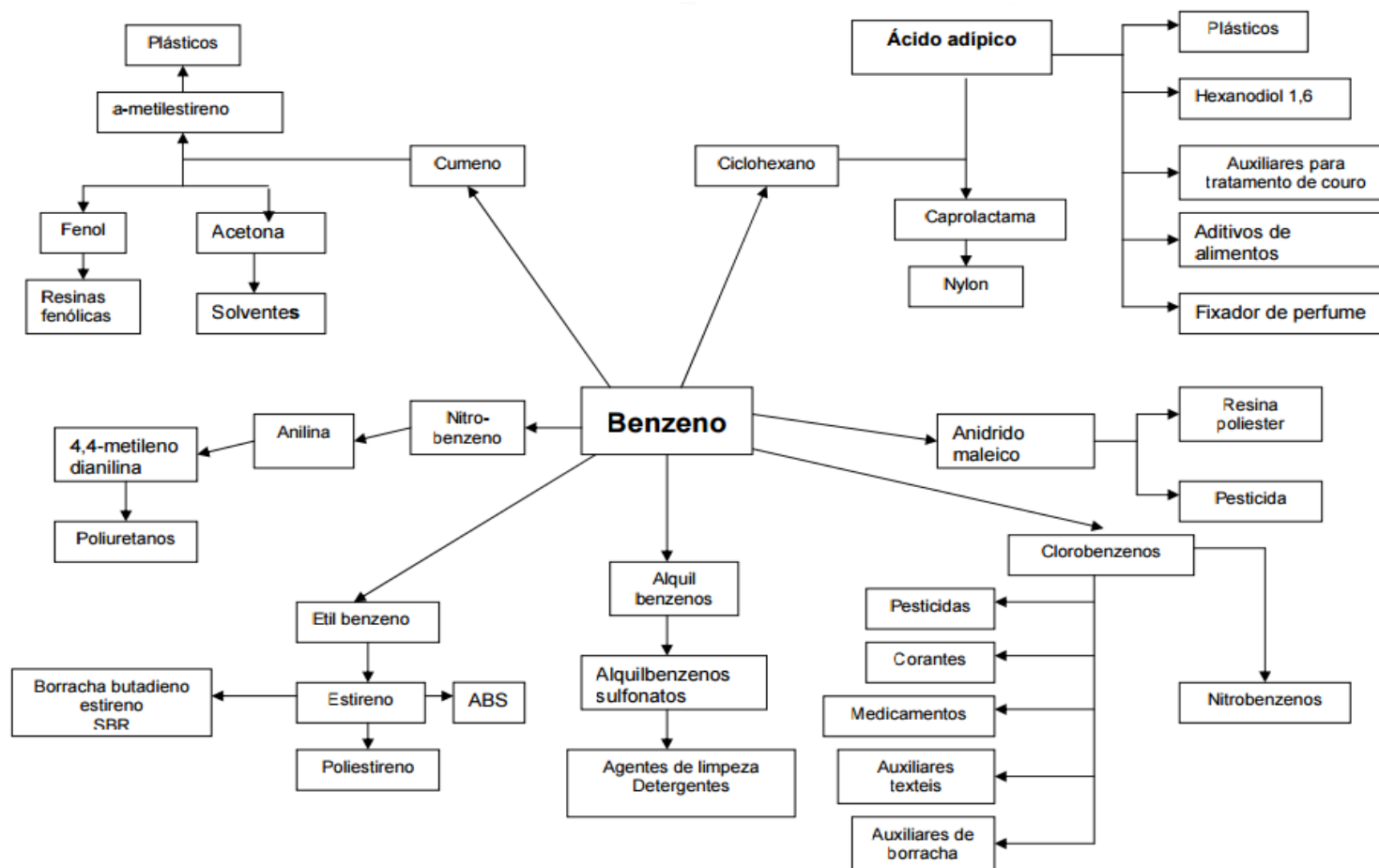


Figura 1.5 Cadeia produtiva do benzeno. A figura mostra os produtos gerados a partir do benzeno em escala industrial Fonte: FUNDACENTRO, 2011

Desde 1982, o benzeno é reconhecido e classificado como agente carcinogênico para humanos (Grupo 1), devido a seus efeitos hematotóxicos, pela *International Agency for Research on Cancer* (IARC), órgão responsável em avaliar e classificar o risco carcinogênico de substâncias químicas (Tabela 1.1) (IARC, 1982; IARC, 2020).

Tabela 1.1 – Quantidade de agentes classificados pela monografia (v 1-125) da IARC.

Grupos	Classificação	Nº de agentes
Grupo 1	Carcinogênico para humanos	120
Grupo 2A	Provavelmente carcinogênico para humanos	82
Grupo 2B	Possivelmente carcinogênico para humanos	314
Grupo 3	Não é classificado como carcinogênico para humanos	500

Fonte: IARC, 2020.

Segundo a *Agency for Toxic Substances and Disease Registry* (ATSDR), o benzeno está entre as dez substâncias químicas de maior importância toxicológica (ATSDR, 2019; MS, 2018).

No Brasil, o benzeno é reconhecido desde 1999 pelo Ministério da Saúde (MS) e pelo Ministério do Trabalho e Emprego (MTE) como um fator de risco à saúde humana, estando presente na lista nacional de agentes cancerígenos para humanos (LINACH). Esta lista leva em consideração os estudos científicos existentes e a lista de agentes cancerígenos da IARC e da OMS (MTE, 2014).

1.3 Benzeno e postos de revenda de combustíveis

O benzeno é um derivado do petróleo e componente presente na gasolina (1-2% v/v) (ATSDR, 2007). No entanto, essa porcentagem pode variar de acordo com a refinaria e o tempo que foi extraído (FUNDACENTRO, 2011; ANP, 2018). No Brasil, a Agência Nacional de Petróleo (ANP) estabelece o valor máximo de concentração de benzeno entre 1% e 1,9% v/v na gasolina (BRASIL, 2013).

O benzeno é adicionado à gasolina na intenção de promover o aumento da octanagem, que é a propriedade de resistir à compressão sem entrar em autoignição. Deste modo, uma octanagem alta significa que a gasolina suporta altas pressões e temperaturas, resultando num melhor desempenho dos veículos (CHANG, 2007).

No Brasil, existem 40.544 postos de revenda de combustíveis, com 15.545 localizados na região sudeste. Destes, 2.107 postos estão presentes no estado do Rio de Janeiro, com cerca de 180.000 trabalhadores (ANP, 2018).

No intuito de prevenir danos causados por substâncias químicas no ambiente de trabalho foram criados limites de exposição ocupacional (LEO) que variam de instituição para instituição e de país para país (FUNDACENTRO, 2012). A *American Conference of Governmental Industrial Hygienists* (ACGIH) publica seus LEO como *Threshold Limit Values* (TLV) que considera as concentrações de substâncias químicas no ar. Outro limite dado pela ACGIH é o *Time-Weighted Average* (TWA), que é a concentração média do agente químico no ar após a jornada de trabalho (8 horas diárias e 40 horas semanais). Já a OSHA divulga seus LEO como *Permissible Exposure Limit* (PEL) e *Time-Weighted Average - Permissible Exposure Limit* (TWA-PEL) que é o nível mais alto de exposição que um trabalhador possa estar submetido por oito horas sem apresentar o risco de efeitos adversos para saúde (OSHA 1997; ACGIH, 2014). No Brasil, adota-se o valor de referência tecnológico (VRT), pois se entende que não existe um limite seguro para exposição (BRASIL, 1978).

Em relação ao benzeno, a ACGIH e OSHA definem o TLV em 0,5 e 1 parte por milhão (ppm), respectivamente. O Brasil utiliza o VRT ponderado pelo tempo da concentração de benzeno no ar numa jornada de trabalho de oito horas diárias de 2,5 ppm para siderúrgicas e 1 ppm para indústria (BRASIL, 1994; BRASIL 1995; OSHA 1997; ACGIH, 2014)

Apesar de o benzeno estar em concentrações mais baixas na gasolina do que nas indústrias petroquímicas, o descontrole do seu uso neste tipo de combustível acarreta na exposição de moradores em torno dos postos e nas pessoas que circulam por eles. Porém, o principal grupo exposto é composto por trabalhadores de postos de revenda de combustível, como frentistas e gerentes ou encarregados de pista, expostos ocupacionalmente ao benzeno.

1.4 Monitoramento biológico do benzeno

Devido ao potencial carcinogênico do benzeno, é necessário realizar um monitoramento biológico, que consiste na avaliação de agentes químicos e seus metabólitos em tecidos, fluídos biológicos, ar exalado ou qualquer combinação destes a fim de avaliar o risco à saúde quando comparado com um valor de referência estabelecido (FUNDACENTRO, 2014).

O monitoramento biológico auxilia a prevenção da exposição excessiva a substâncias tóxicas, evitando assim seu efeito nocivo (IARC, 1982; INDULSKI & LUTZ, 1997). Para isso, utiliza-se um biomarcador ou indicador biológico, que é toda substância, estrutura ou processo que pode ser quantificado no organismo ou em seus meios biológicos que influencia ou prediz a incidência de um acontecimento ou uma doença (WHO, 1996; INDULSKI & LUTZ, 1997; PANEV *et al.*, 2002; WEISEL, 2010).

Existem três tipos de biomarcadores (WHO, 1996; INDULSKI & LUTZ, 1997; PANEV *et al.*, 2002; WEISEL, 2010):

- Biomarcador de Exposição – Indicam a dose interna através da detecção da própria substância ou dos seus produtos de metabolismo em fluidos biológicos, como sangue, urina e ar exalado, refletindo a concentração de exposição ambiental à qual o indivíduo está exposto.
- Biomarcadores de Efeitos – É um parâmetro biológico que é medido no corpo, refletindo a interação do composto com o organismo. São os efeitos biológicos precoces que aparecem em decorrência da exposição ao agente químico.
- Biomarcadores de Susceptibilidade - É um indicador que verifica a capacidade do organismo em responder a um contato com o agente químico, representando a variabilidade interindividual de resposta, frente à exposição prévia.

O monitoramento biológico da exposição ao benzeno é realizado por meio de seus produtos de metabolismo, dentre eles o ácido trans,trans-mucônico urinário (AttM). A legislação brasileira utiliza o AttM para determinar a exposição ocupacional ao benzeno (0,5 mg AttM/g de creatinina), devido à sua aplicabilidade e sensibilidade analítica mesmo em baixas concentrações no ambiente de trabalho (MTE, 2001; AMORIM, 2003; FUNDACENTRO, 2012).

Entretanto, este metabólito apresenta como desvantagem o fato de sua concentração ser influenciada por alguns fatores. Estes incluem o tabagismo, devido à presença do benzeno no cigarro (PEZZAGNO *et al.*, 1999); o consumo de alimentos industrializados, devido à utilização de conservantes como benzoato de sódio e do ácido ascórbico (DE PAULA *et al.*, 2003; MENEZES *et al.*, 2008); e a exposição concomitante ao tolueno, componente também presente na gasolina, que é um competidor inibitório da biotransformação do benzeno (MARRUBINI *et al.*, 2002).

Vale lembrar que apesar do valor estabelecido como limite biológico de exposição, que é o nível de exposição aceitável e encontrado na população não exposta ocupacionalmente, não é possível excluir o indivíduo do risco, visto que não existe limite seguro de exposição a substâncias carcinogênicas, como o benzeno (BRASIL, 1978).

1.5 Biotransformação do benzeno

As principais vias de exposição de organismos a agentes tóxicos são respiratória, dérmica e oral (OGA *et al.*, 2008). Porém, para que ocorra um efeito tóxico, o agente ou seu metabólito deve chegar ao seu sítio de ação, numa concentração e intervalo de tempo suficiente para produzir danos ao organismo. Para isso, algumas características são importantes, como as propriedades físico-químicas, a concentração, tempo, a suscetibilidade do organismo e a via de metabolização (EATON & GILBERT, 2008).

A principal via de absorção do benzeno é a via respiratória, por ser um composto altamente volátil (OGA *et al.*, 2008). Cerca de 12% do benzeno é exalado de forma inalterada pelos pulmões e somente 0,1 a 0,2% é excretado na urina; sendo a maior parte absorvida e metabolizada pelo fígado e, em menor parte, pela medula óssea (PEQUESRO, 2001; MACHADO, 2003; OGA *et al.*, 2008; FUNDACENTRO, 2011).

Após ser inalado, o benzeno é transportado para a corrente sanguínea e assim se distribui para todo corpo, chegando até o fígado onde será metabolizado (Figura 1.6). No fígado, o benzeno sofrerá uma série de reações enzimáticas sendo primeiramente transformado pelo citocromo P450 2E1 (CYP2E1) em um intermediário reativo, o benzeno epóxido. Este pode ser transformado em benzeno oxepina e, em seguida, trans,trans-muconaldeído. No final do processo, é gerado o ácido trans,trans-mucônico pela ação das enzimas álcool desidrogenase (ADH) e aldeído desidrogenase (ALDH), que é atualmente usado como indicador biológico de exposição ao benzeno (SCHERER *et al.*, 1998).

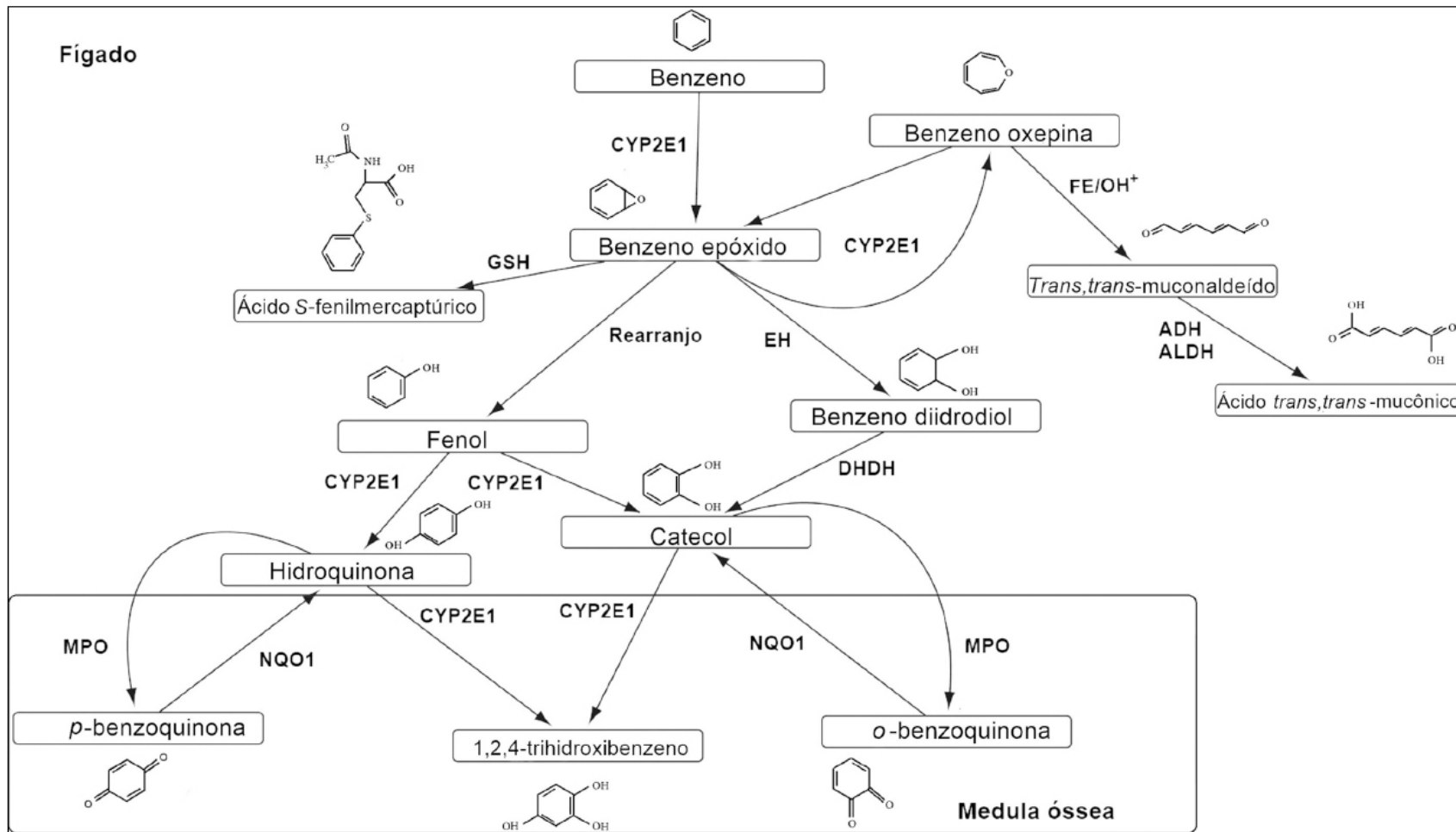


Figura 1.6. Biotransformação do benzeno. A figura mostra o metabolismo do benzeno, primeiro sendo biotransformado em benzeno epóxido e a partir dele seguindo três caminhos: formando o ácido feil-mercaptúrico, ácido *trans,trans*-mucônico, hidroquinona e catecol, estes irão formar os metabólitos tóxicos a medula óssea. Fonte: SANTOS *et al.*, 2017.

O benzeno epóxido também pode ser conjugado à glutatona, gerando assim outro metabólito urinário, o ácido fenilmercaptúrico (AFM) (SNYDER, 2000; DE PAULA *et al.*, 2003; OGA *et al.*, 2008).

Além disso, por um rearranjo não enzimático, o benzeno epóxido pode ser convertido em fenol que, ao ser metabolizado por enzimas citocromo P450 (CYP450), será transformado em hidroquinona e catecol. Ambos serão metabolizados na medula óssea. A hidroquinona, ao ser oxidada, é transformada em para-benzoquinona, molécula tóxica ao organismo, pois, pode se ligar aos intermediários da hematopoiese e às bases do DNA, induzindo quebras. O catecol, por sua vez, é transformado a 1,2,4-trihidroxibenzeno e orto-benzoquina, que também irão exercer seus efeitos tóxicos na medula (SMITH *et al.*, 1989; SMITH *et al.*, 1996).

Nas exposições ocupacionais, a proporção desses metabólitos na urina, em média, é de 50 a 85% de fenol urinário, 5% de hidroquinona, 1,3 a 1,6% de catecol, 0,1 a 0,5% de AFM e 3,9 a 25% de AttM (DE PAULA *et al.*, 2003; KIM. *et al.*, 2006; OGA *et al.*, 2008).

1.6 Benzenismo

A exposição ao benzeno gera sinais e sintomas característicos chamados de benzenismo. Estes variam conforme a exposição, que pode ser aguda, altas doses em um curto período; ou crônica, pequenas doses a longo prazo. A exposição crônica é a forma mais comum de toxicidade do benzeno no ambiente ocupacional (MICHEL, 2000; FUNDACENTRO, 2012).

A intoxicação aguda afeta principalmente o sistema nervoso central (SNC), provocando tonturas, tremores, fraqueza, cefaleia, náuseas, vômitos, ataxia, arritmia, hipotensão, bradicardia, dificuldade respiratória, confusão mental, coma e morte. Já a intoxicação crônica, além de afetar o SNC e o trato gastrointestinal, tem seu principal efeito na medula óssea, promovendo alterações hematológicas.

Além das alterações características do benzenismo, de acordo com a IARC (2018), a exposição ao benzeno pode causar estresse oxidativo e dano oxidativo associado ao DNA; instabilidade genômica; imunossupressão; alteração da proliferação celular, morte celular ou suprimento de nutrientes; modulação dos efeitos mediados por receptores; alteração no reparo do DNA; genotoxicidade; linfoma não-Hodgkin; mieloma múltiplo; leucemia não linfocítica – incluindo leucemia mieloide aguda – em adultos, bem como leucemia linfocítica crônica, (MIRANDA *et al.*, 1998; DUARTE-DAVIDSON *et al.*, 2001; MACHADO, 2003; BRASIL, 2006; BUCZYNSKA *et al.*, 2009; IARC, 2012).

1.7 Neoplasias Hematológicas (Leucemia) e Benzeno

A leucemia é uma doença maligna que afeta células progenitoras do sistema hematopoiético, podendo ser de dois tipos: linfoide e mieloide (BONNET & DICK 1997; INCA, 2020). As leucemias linfoides implicam no aumento das células brancas (linfócitos) na medula óssea e sangue. Já as leucemias mieloides apresentam os aumentos dos precursores mieloides. Ambas podem apresentar um estado agudo ou crônico, constituindo em conjunto 5% de todos os tipos de câncer (INCA, 2020).

Estima-se que em 2040 o número de casos no mundo seja de 656.345, com 491.261 mortes ocorridas pela doença (Quadro 1.2) (GLOBOCAN, 2018). No Brasil, em 2020 estima-se 5.940 novos casos em homens e 4.860 em mulheres, sendo o nono e décimo mais incidente no país, respectivamente (INCA, 2020).

Quadro 1.2 Estimativa de incidência e mortalidade de câncer em 2018 e 2040 no mundo e no Brasil

No mundo	Número estimado de casos incidentes		Número estimado de mortes	
	2018	2040	2018	2040
Todos os cânceres*	18.078.957	29.532.994	9.555.027	16.388.459
Leucemia	437.033	656.345	309.006	491.261
No Brasil	Número estimado de casos incidentes em 2020			
Sexo	Homens		Mulheres	
Todos os cânceres**	215.186		145.00	
Leucemia	5.940		10.800	

Fonte: Adaptado de GLOBOCAN, 2018; INCA, 2020.

Números arredondados para múltiplos de 10.

*Considerou-se todas as idades (faixa etária de 0-70+anos) e ambos os sexos (masculino e feminino).

*Câncer de: ânus, bexiga, cérebro (sistema nervoso), mama, colo uterino, cólon, corpo uterino, vesícula biliar, linfoma de Hodgkin, hipofaringe, sarcoma de karposi, rim, laringe, leucemia, lábio, cavidade oral, fígado, pulmão, melanoma de pele, mesotelioma, mieloma múltiplo, nasofaringe, linfoma não-Hodgkin, de pele não melanoma, esôfago, orofaringe, ovário, pâncreas, pênis, próstata, reto, glândulas salivares, estômago, testículo, tireoide, vagina e vulva.

**Câncer de: próstata, mama feminina, colo do útero, traqueia, brônquio, pulmão, cólon, reto, estômago, cavidade oral, laringe, bexiga, esôfago, ovário, linfoma de Hodgkin, linfoma de não Hodgkin, glândula tireoide, sistema nervoso central, leucemias, corpo do útero, colo do útero, pele melanoma, pele não melanoma e outras localizações.

O benzeno é considerado um agente mielotóxico e leucemogênico, além de cancerígeno em doses inferiores a 1 ppm (OGA *et al.*, 2008). De acordo com a OMS, o risco estimado de desenvolver leucemia é de 1 a cada 100.000 indivíduos que são expostos ao longo da vida a uma concentração de 1,7 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ de benzeno (LAGORIO, 1994; MACHADO, 2003; WHO, 2000).

A sua ação tóxica na medula óssea é causada pela ligação de um ou mais metabólitos formados em sua biotransformação a moléculas como DNA e proteínas, dando ao benzeno a capacidade de ação radiomimética. Uma vez afetando células progenitoras da medula óssea, são geradas lesões medulares e, conseqüentemente, alterações hematológicas (SUBRAHMANYAM *et al.*, 1991; RUIZ *et al.*, 1993; KHALADE *et al.*, 2010; MCHALE *et al.*, 2011; SYNDER, 2012).

A leucemia mieloide aguda (LMA) e a síndrome mielodisplásica (SMD) decorrentes da exposição ocupacional ao benzeno e seus derivados caracterizam-se pela exposição compulsória direta ou indireta aos fatores desencadeantes, o que demanda especial atenção das políticas de saúde pública (BRASIL, 2006).

Por isso, devem-se investigar os pacientes expostos ao benzeno e/ou seus derivados com risco comprovado e que apresentem no hemograma anemia e/ou leucopenia, e/ou trombocitopenia, sem outra causa aparente, com ou sem a presença de macrocitose (glóbulo vermelho aumentado) (BRASIL, 2006). Isto porque, a presença de células imaturas no sangue periférico indica a possibilidade de desenvolvimento de um quadro leucêmico (MIRANDA *et al.*, 1998; MCHALE *et al.*, 2012).

1.8 Ação genotóxica e Benzeno

Os carcinógenos químicos podem ser divididos em genotóxicos e não genotóxicos (OLIVEIRA *et al.*, 2007; ALBERTS *et al.*, 2010). Os genotóxicos são aqueles que têm a capacidade de gerar danos ao DNA, uma vez que interagem quimicamente com o material genético. Estes podem levar à formação de adutos de DNA, alteração oxidativa, erros de inserção de bases durante a replicação, quebras nas fitas de DNA, dano ao fuso mitótico, anormalidades cromossômicas (translocações, inversões e deleções) e inibição da atividade de enzimas, como as topoisomerasas II e enzimas de reparo do DNA (FRANTZ *et al.*, 1996; DA SILVA, 2003; LINDSEY *et al.*, 2004; FERREIRA & ROCHA, 2005; LINDSEY *et al.*, 2005; SMITH, 2010).

A ação genotóxica e carcinogênica do benzeno está relacionada à atividade conjunta de seus metabólitos (para-benzoquinona, hidroquinona e catecol), que são extremamente eletrofílicos, podendo interagir com centros nucleofílicos das células, principalmente com DNA, RNA e proteínas, ocasionando assim os danos. (TARDIFF *et al.*, 1994; SMITH, 1996; PEDERSEN-BJERGAARD *et al.*, 1998; SMITH, 2001; HENGSTLER *et al.*, 2002; RIBEIRO *et al.*, 2003; ROMA –TORRES *et al.*, 2006; REKHADEVI *et al.*, 2010; SMITH, 2010).

Como a maioria dos compostos químicos, o benzeno é considerado um agente alquilante, uma vez que a ação de seus metabólitos resulta na adição de radicais ao DNA, como por exemplo o grupamento metil (CH₃). Estes podem induzir quebras e pareamento incorreto de uma ou mais bases do DNA.

No entanto, para cada tipo de dano gerado genes específicos são ativados para sinalizar e promover o devido reparo (FERREIRA & ROCHA, 2005; ALBERT *et al.*, 2010; SAITO *et al.*, 2015).

Assim, a atividade do sistema de reparo de DNA da célula exerce um papel fundamental na reversão dos danos causados pela exposição ao benzeno. Entre os genes envolvidos, podemos destacar O⁶-Metilguanina-DNA-Metiltransferase (MGMT), poli (ADP-ribose) polimerase (PARP) e genes envolvidos no reparo de mau pareamento (do inglês *mismatch repair* - MMR), como os das famílias Muts MutL. Estes sistemas são extremamente importantes para a manutenção da estabilidade genômica, evitando assim o surgimento de mutações e sua propagação ao longo das divisões celulares. Além disso, já foram observadas alterações desses genes associadas à exposição ao benzeno ou aos seus metabólitos (JIAO *et al.*, 2012; SHA *et al.*, 2014; LOVREGLIO *et al.*, 2016; SALEM *et al.*, 2018; COSTA-AMARAL *et al.*, 2019; ZHANG *et al.*, 2019).

1.8.1 Gene de reparo - MGMT

Gene que codifica a proteína de reparo O⁶-metilguanina-DNA-metiltransferase (MGMT) e possui um papel fundamental na fisiologia celular e na manutenção do genoma, removendo lesões no oxigênio seis da guanina geradas por agentes químicos. Esta enzima promove um rearranjo unimolecular na presença do oxigênio (O₂), transferindo o grupamento metil (CH₃) para si mesma. Essa reação de transferência é chamada de reação suicida, isso porque MGMT se torna irreversivelmente inativada (GERSON, 2004; LIU & GERSON, 2006; KAINA *et al.*, 2007).

Após a alquilação, MGMT se desassocia do DNA, o que inicia sua ubiquitinação e posterior degradação (Figura 1.7). Sendo assim, uma molécula de MGMT pode reparar apenas um aduto, ou seja, a capacidade das células em remover adutos depende do número total de moléculas de MGMT por célula e da taxa na qual a célula pode re-sintetizar MGMT (GERSON, 2004; LIU & GERSON, 2006; KAINA *et al.*, 2007).

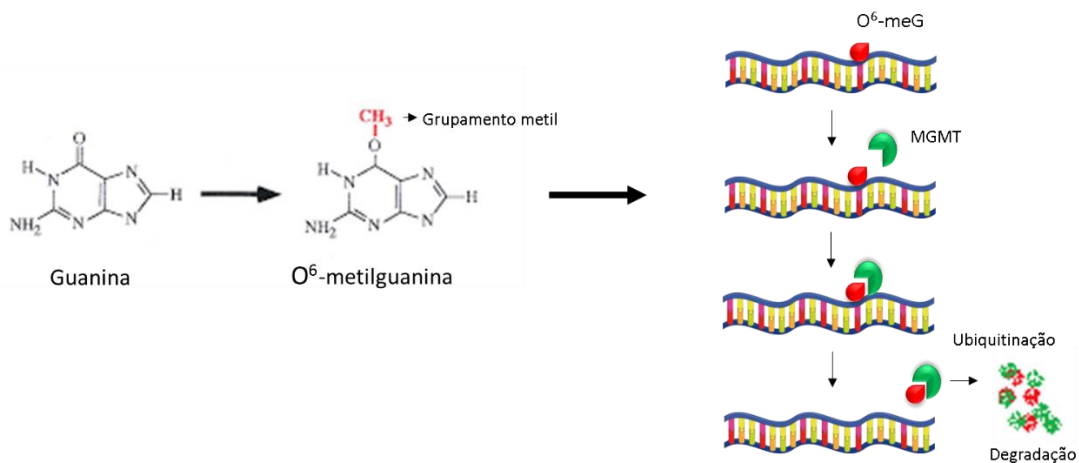


Figura 1.7. Mecanismo de ação de MGMT. A figura mostra a atuação de MGMT na remoção do aduto (O⁶-metilguanina, O⁶-meG), em que a enzima reconhece e se liga ao aduto, transferindo o grupamento metil para si. Isto leva à ubiquitinação da enzima alquilada e posterior degradação. Fonte: Adaptado de LIU & GERSON, 2006.

1.8.2 Gene de reparo - *PARP-1*

PARP (do inglês *Poly (ADP-Ribose) Polymerase*) compreende uma família de 18 membros, sendo PARP-1 a mais abundante das isoformas e responsável por mais de 90% da atividade catalítica de PARP no núcleo (HENNING *et al.*, 2018). A ADP-ribosilação catalisada por PARP-1 se dá pela transferência de várias unidades de ADP-ribose a partir do dinucleotídeo de nicotinamida e adenosina (NAD⁺) para as proteínas alvo e está envolvida na sinalização de dano ao DNA (CHAUDHURI & NUSSENZWEIG, 2017).

Após as quebras de fita simples ou duplas do DNA, PARP-1 catalisa sua própria ADP-ribosilação, assim como de outras proteínas associadas ao dano, o que funciona como um sinal para o recrutamento de outras proteínas (Figura 1.8). Dentre elas, temos a DNA ligase III, polimerase β e XRCC1, ativando assim o reparo por excisão de bases (MASSON *et al.*, 1998; OKANO *et al.*, 2003;). Além disso, modificadores de cromatina podem ser recrutados, como CHD4, que faz parte de um complexo com função desacetilase, levando ao silenciamento da transcrição no sítio de quebra de modo a facilitar o reparo (CHOU *et al.*, 2010). A poli ADP-ribosilação é capaz de recrutar ainda proteínas associadas com a recombinação homóloga, como MRE11 e ATM.

Por fim, pelo recrutamento do remodelador de cromatina CHD2, proteínas da recombinação não homóloga também podem ser recrutadas para o sítio de dano (GUPTE *et al.*, 2017). Assim, por apresentar um papel variado no reparo do DNA, PARP-1 é visto como um sensor primário de danos e orquestrador de diversos mecanismos de reparo.

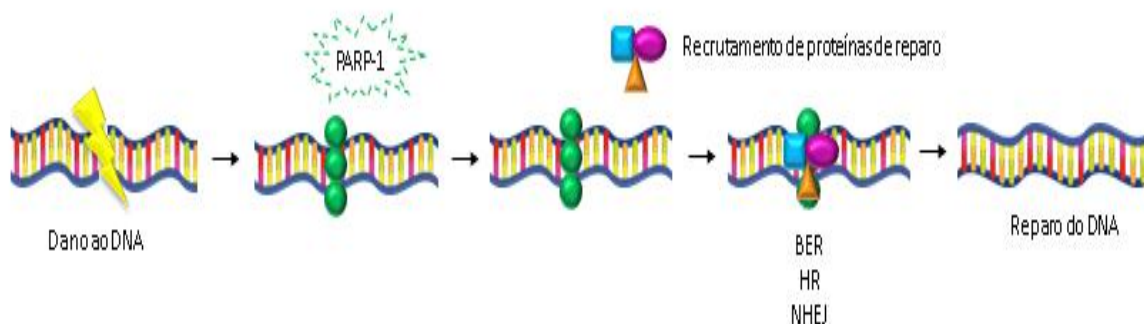


Figura 1.8. Mecanismo de ação de PARP-1. A figura mostra a atuação de PARP-1 após um dano ao DNA levando à sinalização por ADP ribosilação. O recrutamento de complexos proteicos que levará então ao reparo do dano por excisão de bases (BER), recombinação homóloga (HR) ou recombinação não homóloga (NHEJ) e promovendo assim o reparo do DNA. Fonte: Autor, 2020.

1.8.3 Gene de reparo de mau pareamento- *Mismatch repair* (homólogos humanos de MutS e MutL)

A via de reparo de mau pareamento (do inglês *mismatch repair* - MMR) é responsável pelo reconhecimento e reparo de inserções, deleções incorretas de bases que podem surgir durante a replicação e recombinação do DNA. A MMR é uma via biológica altamente conservada, com fortes semelhanças entre a MMR humana e a bacteriana (*Escherichia coli*).

Assim, diversas proteínas humanas foram identificadas com base em sua homologia com as proteínas bacterianas, como: MutS, MutL, exonuclease 1 (EXO1), proteína de ligação ao DNA de fita única (RPA), proliferação de antígeno nuclear celular (PCNA), DNA polimerase δ (pol δ) e DNA ligase I. Estas proteínas acessórias ajudam as principais proteínas do MMR a reconhecer, ligar ou extrair o mau pareamento do DNA (LI, 2008; HSIEH & YAMANE, 2008; FUKUI, 2010; SAMEER *et al.*, 2014).

O homólogo humano 2 de MutS (MSH2) heterodimeriza com o homólogo humano 6 de MutS (MSH6) ou com o homólogo humano 3 de MutS (MSH3) para formar os complexos MutS α ou MutS β , respectivamente. O complexo proteico MutS α reconhece preferencialmente mau pareamento de base-base e com desvios no *loop* de inserção/exclusão (IDL) de um ou dois nucleotídeos, enquanto MutS β preferencialmente reconhece o mau pareamento com mais de quatro nucleotídeos e ambas são ATPases. Já os homólogos humanos de MutL são: homólogo humano 1 de MutL (MLH1), homólogo humano 3 (MLH3), proteína homóloga humana 1 (PMS1) e proteína homóloga humana 2 (hPMS2). MLH1 heterodimeriza com PMS2, PMS1 ou com MLH3 para formar os complexos MutL α , MutL β ou MutL γ , respectivamente (LI, 2008; HSIEH & YAMANE, 2008; FUKUI, 2010; SAMEER *et al.*, 2014).

Para o reparo do dano, primeiro há o reconhecimento de incompatibilidade no DNA de fita dupla pelo complexo proteico MutS α . Após a ligação de MutS α ao DNA danificado ocorre o recrutamento do complexo MutL α e em seguida é feita a remoção da base mal inserida pela EXO1. A lacuna resultante é então preenchida pela DNA polimerase III e a DNA ligase I usando a outra fita como molde (Figura 1.9). Após a excisão e substituição das bases, a atividade de EXO1 é inibida pelos complexos MutS α e MutL α (LI, 2008; HSIEH & YAMANE, 2008; FUKUI, 2010; SAMEER *et al.*, 2014; SAITO *et al.*, 2015).

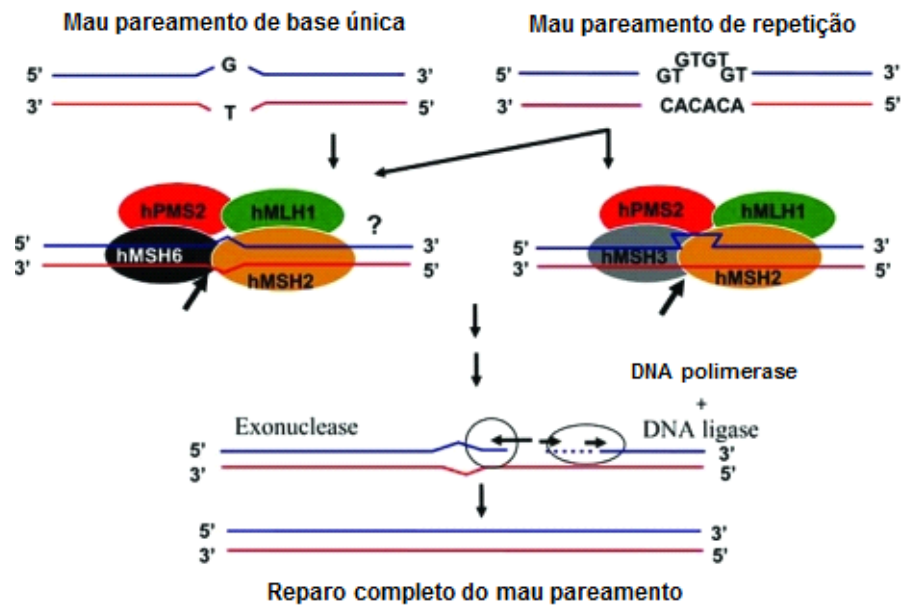


Figura 1.9. Mecanismo de reparo por mau pareamento em humanos. A figura mostra duas vertentes desta via de reparo. Do lado esquerdo, temos o reparo de mau pareamento de base única, mediado pelo complexo proteico com MSH6. Já do lado direito, temos reparo de mau pareamento de repetição, em que as bases formam um grampo ativando o complexo com MSH3, promovendo a ativação das enzimas específicas e o reparo completo da fita. Fonte: BANNO *et al.*, 2009.

Tais vias e proteínas envolvidas no reparo do DNA (MGMT, PARP-1 e MSH3), quando ativas, atuam combatendo as consequências da ação genotóxica causada por agentes químicos, como o benzeno, no organismo humano. Porém, os efeitos não genotóxicos derivados do benzeno também podem afetar esses mesmos genes, afetando a via e conseqüentemente o reparo do dano (GAO *et al.*, 2010; LI *et al.*, 2017; SALEM *et al.*, 2018; REN *et al.*, 2019; COSTA-AMARAL *et al.*, 2019; ZHANG *et al.*, 2019).

1.9 Ação não genotóxica (Epigenética) e Benzeno

Os agentes não genotóxicos são aqueles capazes de apresentar ações nocivas no organismo sem que haja alterações na sequência do DNA, atuando em muitos casos via alterações epigenéticas (INCA, 2013). O termo epigenética refere-se a modificações moleculares herdáveis, reversíveis que alteram a expressão gênica sem modificar a sequência de bases do DNA e são influenciadas por fatores ambientais.

Os mecanismos epigenéticos incluem as modificações de histonas, os RNAs não codificantes (como os microRNAs) e a metilação do DNA, sendo esta última a mais bem estudada e compreendida atualmente (FEINBERG & TYCKO, 2004; HOLLIDAY, 2006; FEINBERG, 2008). Tais mecanismos são essenciais para a homeostase celular e sua desregulação pode promover o desenvolvimento de doenças como o câncer.

1.9.1 Metilação do DNA

A metilação do DNA consiste na adição do grupamento metil (CH_3) pelas enzimas DNA metiltransferases (DNMTs) ao carbono 5 de citosinas (C) ligadas a guaninas (G) por uma ligação fosfodiéster, os chamados dinucleotídeos CpG (Figura 1.10). E regiões ricas em dinucleotídeos CpG formam as ilhas CpG, encontradas em aproximadamente 50% das regiões promotoras dos genes e principalmente em sequências repetitivas como elementos nucleares curtos intercalados (SINEs, do inglês *short interspersed nuclear elements*) e elementos nucleares longos intercalados (LINEs, do inglês *long interspersed nuclear elements*) (FEINBERG; TYCKO, 2004; LOPEZ *et al.*, 2009; MARSIT & CHRISTENSEN, 2011; BAYLIN; TABERLAY & JONES, 2011; FENGA *et al.*, 2016).

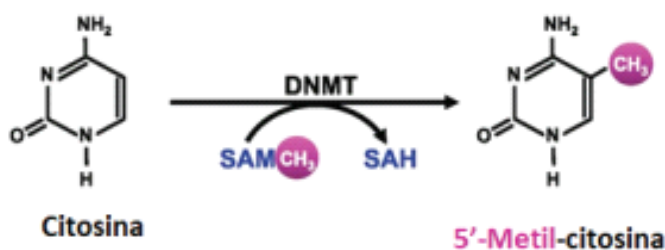


Figura 1.10 Representação esquemática da metilação do DNA. A figura mostra o processo de metilação da citosina realizado pela enzima DNA metiltransferase. (DNMT). Esta enzima adiciona um grupamento metil (CH_3), doado pela S-adenosilmetionina (SAM), ao carbono cinco da citosina, gerando a 5-metil-citosina. Fonte: Adaptado de BRANDÃO, 2017.

Em condições fisiológicas, há uma hipermetilação das sequências repetitivas, que se encontram silenciadas e conseqüentemente inativas. Já em tumores, o que se observa é uma desmetilação em todo genoma (hipometilação global), incluindo as sequências repetitivas, tornando-as ativas. Além disso, também é observada em tumores uma hipermetilação de regiões promotoras de genes específicos, como genes supressores de tumor e de reparo (Figura 1.11). (HINSHELWOOD & CLARK, 2008; LOPEZ *et al.*, 2009)

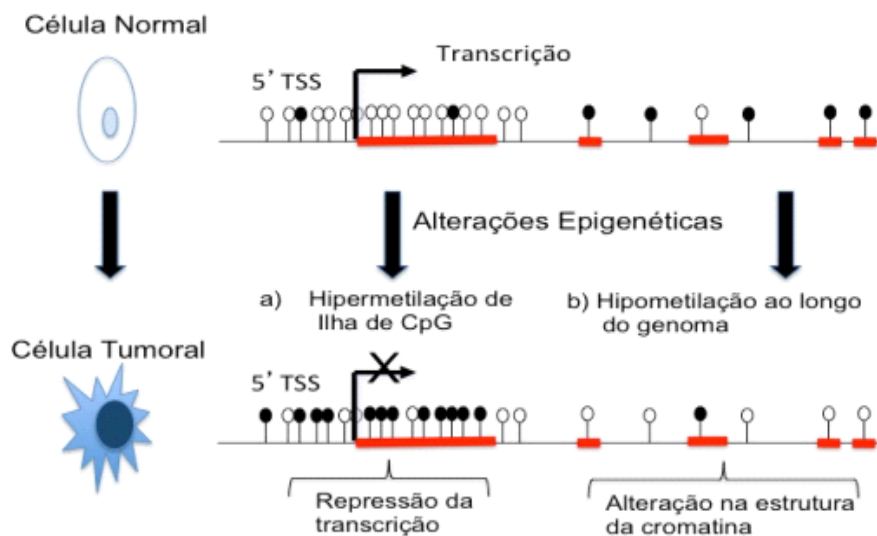


Figura 1.11. Metilação do DNA em células normais e tumorais. A figura mostra o padrão de metilação observado em células normais (parte superior da imagem), com a hipometilação de regiões promotoras e conseqüente transcrição de genes supressores de tumor (à esquerda), enquanto os elementos repetitivos encontram-se hipermetilados e silenciados (à direita). Já em células tumorais (parte inferior da imagem), observamos a hipermetilação e repressão da transcrição de genes supressores de tumor (à esquerda) e hipometilação global, que afeta elementos repetitivos (à direita). Fonte: Adaptado de KLASSEN, 2013.

Conforme mencionado, a metilação está geralmente associada ao silenciamento gênico, ou seja, à repressão da transcrição (WEBER *et al.*, 2007; DENIS *et al.*, 2011). Isto se dá por dois mecanismos: pelo bloqueio da ligação dos fatores de transcrição pelos grupamentos metil, o que impede o acesso da RNA polimerase ao gene (MOLLOY & WATT, 1990) ou pelo recrutamento de proteínas que possuem domínio de ligação aos sítios CpG metilados (MBDs) e histonas desacetilases (HDACs), tornando a cromatina menos acessível para a transcrição gênica (NAN, *et al.*, 1998).

A exposição ambiental pode alterar a expressão gênica e afetar o fenótipo das células, não apenas modificando as regiões promotoras de genes importantes como também modificando a metilação de regiões epigeneticamente lábeis e críticas como as sequências repetitivas ao longo do genoma (WATERLAND & JIRTLE, 2004; DOLINOY & JIRTLE, 2008). Por sofrer influência de fatores ambientais, como as substâncias químicas, e por estar relacionado com diversas doenças entre elas o câncer, as modificações epigenéticas tem ganhado destaque como possíveis biomarcadores (HOU *et al.*, 2011; KIM *et al.*, 2012). Assim, estudos epigenéticos fornecem uma ótima oportunidade de compreender o papel da regulação gênica no câncer e desenvolver estratégias para avaliação de risco, detecção precoce e prevenção desta e de outras doenças humanas (VERMA *et al.*, 2003).

1.9.2 Elementos Transponíveis

Elementos transponíveis são sequências repetidas de DNA ao longo do genoma que possuem a capacidade de se inserir ou serem inseridas em novas regiões no genoma, podendo aumentar o número de cópias no processo (KAZAZIAN, 2004; JURKA *et al.*, 2007). Estes elementos representam aproximadamente 40% do nosso genoma (SANMIGUEL *et al.*, 1996; FESCHOTTE & PRITHAM, 2007; PRAY, 2008)

Esses elementos são divididos em duas classes, conforme o intermediário de transposição. Os de classe 1 têm como intermediário de transposição o RNA, sua inserção é realizada pelo processo de transcrição reversa, sendo chamados retrotransposons. Os de classe 2 têm como intermediário o DNA, esses apresentam a capacidade de se deslocar no genoma pelo processo de excisão e reinserção e são conhecidos como transposons (FESCHOTTE *et al.*, 2002; LEVIN, 2011).

Os elementos transponíveis são ainda classificados como elementos autônomos, capazes de se deslocar independentemente por apresentarem sequências que codificam a enzima transposase; e não autônomos, elementos que dependem da atividade de outro elemento (autônomo) (FESCHOTTE *et al.*, 2002; PRAY, 2008; LEVIN, 2011).

Por fim, os retrotransposons também são agrupados de acordo com a presença de sequências que flanqueiam a região interna codificante, ou seja, longas sequências terminais repetidas (LTRs, do inglês *long terminal repeats*). E assim são divididos em retrotransposons LTRs e não LTRs, ou seja, com a presença ou ausência das regiões flanqueadoras (Figura 1.12).

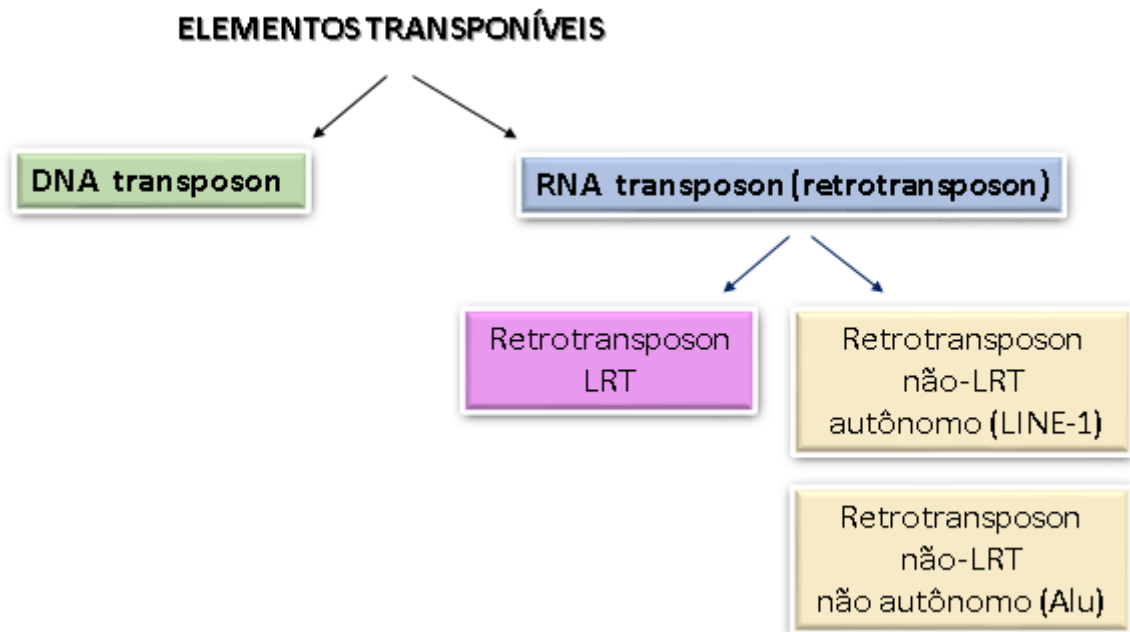


Figura 1.12. Classes de elementos transponíveis. A figura mostra as diferentes classes dos elementos transponíveis, sendo elas DNA transposons, retrotransposons em LTR e não-LTR que podem ser autônomo ou não. Fonte: Autor, 2020.

Os retrotransposons representam uma grande porção do genoma (KAZAZIAN & MORAN, 1998). Dentre eles, encontramos os LINEs e SINEs (JURKA *et al.*, 2007; BECK *et al.*, 2010). LINEs são retrotransposons (não LTR) autônomos, sendo LINE-1 o mais comum. São os mais ativos (40 a 60%) no genoma humano atual, representando cerca de aproximadamente 17% de todo o genoma humano (LANDER, 2001; BECK *et al.*, 2010). Estes elementos possuem duas ORFs (do inglês *open reading frames*), além de uma região promotora na região 5' que controla sua expressão. Sua transposição ocorre com a transcrição do RNAm, que é exportado para o citoplasma para a tradução das proteínas necessárias, formando assim as riboproteínas. Estas serão transportadas para o núcleo onde ocorre o mecanismo de transcrição reversa, denominado de *target-primed transcription reverse* (TPRT). Este é iniciado pela endonuclease codificada durante o processo, que cliva o DNA alvo deixando o grupamento hidroxil 3' livre.

O fragmento de DNA será utilizado como sequência iniciadora para a transcrição reversa do RNA intermediário gerando o cDNA que será inserido, seguido de uma integração completa da cópia via mecanismo de reparo do DNA (Figura 1.13) (PRAK & KAZAZIAN, 2000, BEAUREGARD *et al.*, 2008; LEVIN & MORAN, 2011).

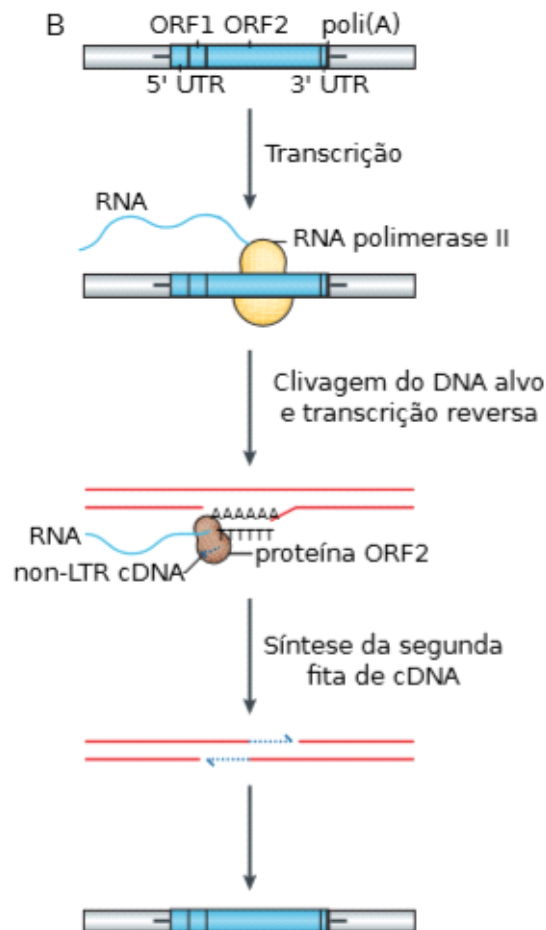


Figura 1.13. Processo de transposição de retrotransposons não LTRs A figura mostra a reação de transcrição do RNAm que no núcleo sofre a reação de transcriptase reversa que gerará um cDNA que se integrará ao DNA. Fonte: LEVIN & MORAN, 2011.

SINEs são retrotransposons (não LTR) não autônomos, ou seja, são dependentes da maquinaria enzimática ativa de outros retrotransposons (não LTR) autônomos, como os LINEs. Os SINEs mais estudados são as sequências Alu, formadas por 300 nucleotídeos sem íntrons e com uma estrutura dimérica. São as mais conhecidas e bastante abundantes com 1.000.000 de cópias, totalizando cerca de 13% de todo o genoma humano.

São elementos que possuem promotor para RNA polimerase III na região 5' e uma cauda poli A na extremidade 3'. (Figura 1.14) (BATZER & DEININGER, 2002; CORDAUX & BATZER, 2009; DEININGER, 2011; KIM *et al.*, 2016).

Por serem elementos não autônomos, usurpam a maquinaria enzimática de LINE-1, que fornece as enzimas endonuclease e transcriptase reversa responsáveis. A endonuclease de LINE-1 reconhece o oligômero (5'-TTTT / AA-3') e cliva a região genômica. Assim, O RNA de Alu se liga ao local clivado e é convertido em cDNA pela transcriptase reversa de LINE-1. A segunda fita do elemento Alu é sintetizada pela DNA polimerase do próprio organismo usando a o cDNA de Alu como um molde de DNA. O elemento Alu recém-inserido apresenta repetições diretas de 7 a 20 pares de base em ambos os lados do elemento, denominado sítios de duplicação de destino (TSDs) do inglês *termed target site duplications* (BATZER & DEININGER, 2002.CORDAUX & BATZER, 2009; DEININGER, 2011; KIM *et al.*, 2016).

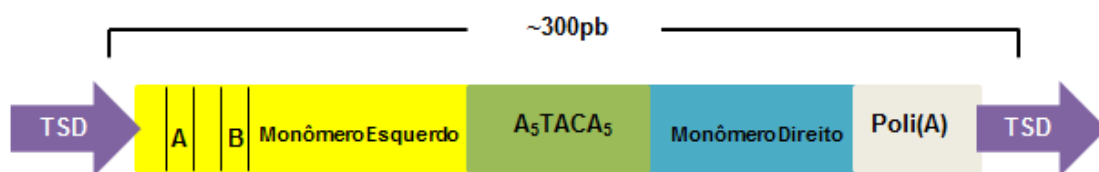


Figura 1.14. Estrutura do elemento Alu. A figura mostra a estrutura do elemento Alu com 300pb que é formado por sequências de repetição (TSD) em sua região flanqueadora, monômero esquerdo e direito, entre eles o local de ligação ao promotor da RNA polimerase III e cauda poli A. Fonte: KIN *et al.*, 2016.

Sendo assim, a atividade desses elementos, visto que LINE-1 e Alu são as únicas classes ativas no genoma humano representando cerca de 30% do mesmo, pode promover uma série de consequências ao organismo. Por conseguirem se copiar e se mover ao longo do genoma, podem levar ao silenciamento gênico, por inserção na região promotora ou corpo de genes ativos; aberrações cromossômicas por indução de rearranjos cromossômicos como duplicações e deleções, gerando assim uma instabilidade genômica; e mutações que fixadas podem desencadear diversas doenças, entre elas o câncer (KAZAZIN & MORAN, 1998; SOREK, 2002; PRAY, 2008; LEVIN & MORAN, 2011; AYARPADIKANNAN *et al.*, 2015).

Normalmente, esses elementos transponíveis (LINE-1 e Alu) encontram-se silenciados por metilação, uma vez que apresentam regiões promotora ricas em dinucleotídeos CpG, garantindo assim uma estabilidade do genoma (PRAY, 2008; KIN *et al.*, 2016). No entanto, fatores ambientais, como a exposição a agentes químicos, podem alterar o padrão de metilação do genoma induzindo a perda de metilação desses elementos e conseqüentemente sua ativação (BOLATTI *et al.*, 2007; PRAY, 2008; LEVIN & MORAN, 2011; SEOW *et al.*, 2012; FUSTINONI *et al.*, 2012; FUSTINONI *et al.*, 2013; SWAGATIKA & TOMAR, 2016).

Estudos têm mostrado associações entre exposição ao benzeno e alterações no padrão de metilação em indivíduos expostos ocupacionalmente ao benzeno, levando à hipometilação global (LINE-1 e Alu) como visto por FUSTINONI e colaboradores (2012). Neste estudo, os autores avaliaram o perfil de metilação de 78 atendentes de postos de combustíveis e observaram uma diminuição de 1,6% na metilação global no sangue desses trabalhadores (BOLLATI, 2007).

2. JUSTIFICATIVA DO ESTUDO

A incidência e mortalidade por câncer vêm aumentando em escala mundial e cerca de um terço das mortes pela doença é atribuído a fatores ambientais, geralmente modificáveis, como tabagismo, etilismo, obesidade, poluição urbana, exposição ocupacional, entre outros (OPAS, 2018; INCA, 2019).

Neste contexto, a associação entre a exposição a agentes químicos carcinogênicos, como o benzeno (presente na gasolina), durante a atividade profissional é bastante relevante para a saúde pública. Isto porque o câncer relacionado ao trabalho possui um elevado potencial de prevenção, pois, se conhece o local, o processo de trabalho e as quais agentes os indivíduos são expostos. Uma vez prevenida a exposição, podem ser observadas reduções de 30 a 50% do número de casos de câncer (OPAS, 2018; INCA, 2019).

Cabe ressaltar que no Brasil, onde os postos de gasolina contam com trabalhadores que realizam o abastecimento dos veículos, encontramos uma situação diferente da maioria dos países desenvolvidos, onde este tipo de trabalhador não é mais encontrado. Dessa forma, temos uma oportunidade única não só de caracterizar alterações moleculares induzidas pelo benzeno que podem estar relacionadas ao desenvolvimento de tumores neste grupo de indivíduos, como também para acumular evidências dos malefícios de tal exposição à saúde destes trabalhadores.

Faz-se então necessário conhecer não só a exposição, o processo e ambiente de trabalho, mas também o agente em si, conhecendo seus efeitos, sua cinética e suas consequências no organismo, para que práticas de vigilância epidemiológicas e de promoção à saúde sejam realizadas (INCA, 2013; EATON & GILBERT, 2008).

3. OBJETIVOS:

3.1 Geral: Avaliar alterações de metilação do DNA no sangue periférico de trabalhadores de postos de combustíveis do Rio de Janeiro expostos ao benzeno presente na gasolina.

3.2 Específicos:

(a) Investigar se a exposição ao benzeno pode alterar o perfil global de metilação do DNA no sangue periférico de indivíduos expostos, pela utilização dos marcadores LINE-1 e Alu;

(b) Avaliar o perfil de metilação de genes da maquinaria de reparo do DNA (*PARP-1*, *MSH3* e *MGMT*) no sangue periférico de indivíduos expostos ao benzeno;

(c) Correlacionar os padrões de metilação encontrados com os níveis de exposição dos trabalhadores;

(d) Correlacionar os padrões de metilação encontrados com a presença e quantidade de lesões genotóxicas em células do sangue periférico dos trabalhadores;

(e) Associar os padrões de metilação encontrados com a presença de alterações hematológicas no sangue periférico dos trabalhadores.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Delineamento do estudo

O presente projeto de pesquisa é um adendo do projeto maior intitulado “*Avaliação dos efeitos mutagênicos e imunotóxicos do benzeno na saúde dos trabalhadores dos postos de combustíveis do Rio de Janeiro*”. Trata-se de um estudo epidemiológico do tipo transversal com análises toxicológicas realizado entre 2014 e 2016 com trabalhadores de postos de revenda de combustíveis (PRC) do município do Rio de Janeiro, tendo sido incluídos no estudo 12 PRC localizados na Zona Sul e 9 PRC localizados na região central do município do Rio de Janeiro. De maneira geral fizeram parte do estudo 325 trabalhadores de postos de revenda de combustíveis, compondo o grupo exposto ocupacionalmente ao benzeno, e 224 trabalhadores de escritório do Instituto Nacional do Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA), Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro (UNIRIO) e do jornal “O Globo” não expostos ocupacionalmente ao benzeno, para compor o grupo de comparação toxicológica.

4.2 População do estudo

Os critérios de inclusão do grupo exposto foram: indivíduos com idade maior ou igual a 18 anos; trabalhadores de postos de combustíveis independente da função com tempo mínimo de seis meses de trabalho; concordância em responder os questionários; realizar exames clínicos e laboratoriais, incluindo coleta de sangue e urina; e residir no município do Rio de Janeiro.

Os critérios de inclusão do grupo de comparação, não exposto foram: indivíduos com idade maior ou igual a 18 anos, não expostos ocupacionalmente ao benzeno; concordância em responder os questionários; realizar exames clínicos e laboratoriais, incluindo coleta de sangue e urina; e residir no município do Rio de Janeiro.

Os critérios de exclusão para ambos os grupos foram: indivíduos com problemas comportamentais como alcoolismo, agressividade e problemas mentais que impedissem a entrevista ou aqueles com dificuldade de locomoção; indivíduos que tenham passado por tratamento quimioterápico/radioterápico ou aqueles que tenham sido expostos a raios X nos últimos 3 meses.

4.3 Cálculo amostral do estudo

Foi realizado um cálculo amostral para estabelecer o número de indivíduos a ser incluído no presente estudo. Para isso, foi feito o teste de hipótese bicaudal, no qual foi estipulado um tamanho amostral de 74 indivíduos para cada grupo, com desvio padrão de 6,5 e nível de significância de 0,05, tais valores foram definidos baseados em trabalhos anteriores que possuíam uma população com tipo de exposição e trabalhador e agente químico similar ao presente estudo (BOLLATI *et al.*, 2007; FUSTINONI *et al.*, 2012; SEOW *et al.*, 2012; FUSTINONI *et al.*, 2013; REN *et al.*, 2019). O teste de amostragem foi feito no site do laboratório de epidemiologia estatística da Universidade Federal de São Paulo (USP).

4.4 Critérios éticos

Este projeto foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa do Instituto Nacional de Câncer, sob o número de registro 121/09 (Anexo 1). Antes de qualquer intervenção, todos os indivíduos convidados a participar do estudo foram apresentados ao Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Anexo 2) e somente os participantes que assinaram o TCLE foram incluídos no estudo.

4.5 Coleta dos dados

Os dados foram obtidos por meio de dois questionários (Anexo 3). Um individual contendo informações sobre as características sociodemográficas, sobre a exposição ocupacional (ocupação atual, tempo de trabalho e atividades) e sobre exposição a substâncias químicas.

É um questionário clínico que contemplava informações sobre os principais sinais e sintomas característicos da exposição ao benzeno, anamnese clínica com história patológica pregressa, história patológica atual, história reprodutiva, história familiar e estilos de vida (etilismo, tabagismo, consumo de alimentos industrializados e substâncias psicoativas). A aplicação dos questionários e a coleta do material biológico (sangue e urina) ocorreram no próprio local de trabalho dos voluntários.

4.6 Coleta das amostras biológicas

As amostras de sangue dos voluntários foram coletadas em tubos vacutainer® contendo heparina sódica e EDTA por um profissional devidamente capacitado e transportado em caixa de isopor contendo gelo reciclável. As amostras foram então para o Laboratório de Patologia Clínica do Hospital do Câncer I do INCA (HCI/INCA), Departamento de Farmacologia e Toxicologia (DFT) do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS/FIOCRUZ) e para o Programa de Carcinogênese Molecular (PCM) no Centro de Pesquisa do Instituto Nacional do Câncer José Alencar Gomes da Silva (CPQ/INCA), para serem realizadas análises bioquímicas e hematológicas, de genotoxicidade e alterações epigenéticas, respectivamente.

As amostras de urina foram coletadas para o biomonitoramento da exposição ao benzeno, por meio da análise do ácido trans,trans-mucônico (AttM). Para a coleta de urina, os trabalhadores foram orientados a esvaziar a bexiga, beber três a quatro copos de água e reter a próxima urina por duas horas, momento em que deveriam coletar aproximadamente 50 mL.

No caso dos voluntários expostos, havia a recomendação para que estes procedimentos fossem realizados ao final da jornada de trabalho, permitindo uma exposição mínima de quatro horas ao benzeno, no dia da coleta.

Tais amostras foram encaminhadas para o Laboratório de Análises Clínicas, Ambientais e Toxicológicas (LACAT) da UNIRIO para análise do AttM, atual indicador biológico de exposição ao benzeno, de acordo com a legislação brasileira (Portaria 34/2001 - MTE).

4.7 Avaliação do biomarcador de exposição - (AttM)

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) ou *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC) é uma técnica de separação de misturas, pela qual as substâncias são separadas em duas fases, fase estacionária e móvel, e depois são quantificadas. Tal análise é altamente seletiva e por isso tem sido amplamente utilizada na análise de separação, identificação e quantificação de compostos ativos (BONATO, 2006). Sua detecção é individualizada, sendo possível ter a relação entre a substância química de concentração conhecida (padrão) e a amostra de concentração desconhecida (de interesse) (BULCÃO, 2008).

Já a sua separação e identificação são estabelecidas pelo tempo de retenção, que varia de acordo com as interações das substâncias presentes na amostra na fase estacionária e móvel. Cada composto ou substância é eliminado da coluna e identificado pelo detector em um tempo diferente, gerando assim picos cromatográficos diferentes, que nos permite identificar e quantificar as substâncias presentes na amostra. Sua quantificação é dada a partir da seguinte equação:

$$CA = CP \times (RA / RP)$$

Onde:

CA = concentração da solução amostra

CP = concentração da solução padrão

RA = resposta (área ou altura) do pico da solução amostra

RP = resposta (área ou altura) do pico da solução padrão

A CLAE é formada por cinco componentes principais (Figura 4.1), que são:

- Reservatório de fase móvel, que são garrafas com solventes utilizados para "transportar/mover" a amostra.
- Injetor, que é um dispositivo que permite a introdução da amostra ao sistema cromatográfico.
- Bomba que é responsável por movimentar/impulsionar a fase móvel e a amostra por todo o sistema.
- Coluna cromatográfica, que é um dispositivo preenchido com fase estacionária.

- Detector, dispositivo que identifica os tempos de retenção das substâncias analisadas. Os detectores por ultravioleta (UV) são os mais utilizados em CLAE, pois consistem de um fotômetro que mede a absorção de luz dos compostos, em comprimento de onda pré-programado, compreendido entre as regiões visível e ultravioleta.

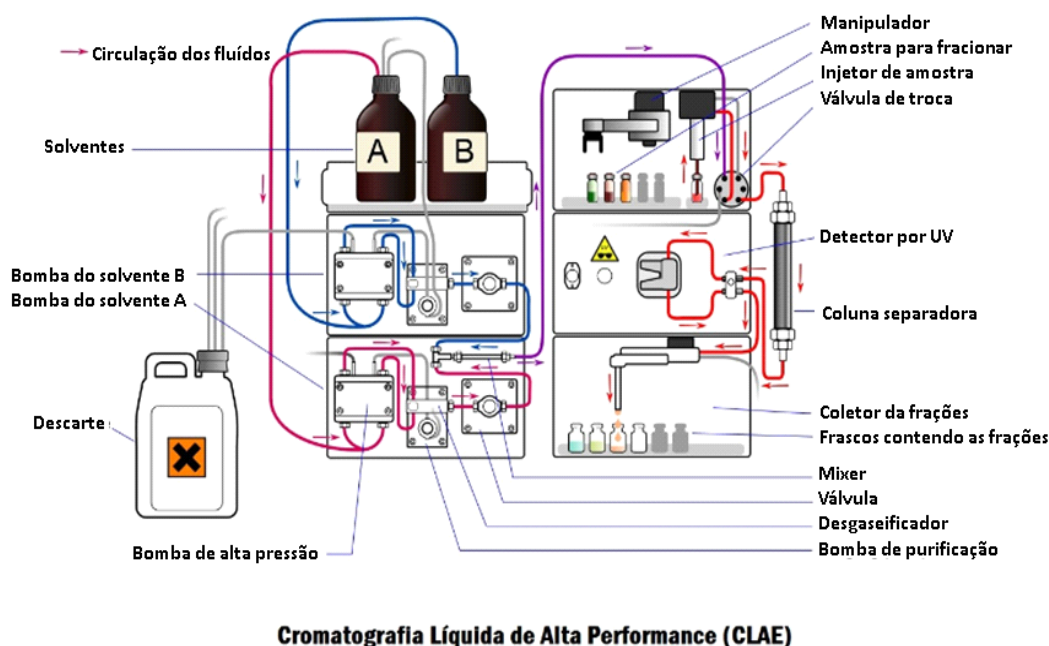


Figura 4.1. Ilustração dos principais componentes da cromatografia líquida de alta performance (CLAE). Fonte: <https://a3analitica.com.br/bloga3pharma/2019/01/08/principios-de-cromatografia-a-liquido-hplc/>.

As análises cromatográficas foram realizadas em cromatógrafo líquido de alta eficiência da Shimadzu, equipado com bomba isocrática, termostato, coluna cromatográfica (250 x 4,2 mm) Lichrosorb RP 18, 5 μm (Merck®), detector de ultravioleta e ChemStation software. A fase móvel utilizada foi uma solução aquosa de ácido acético 1% - metanol (90/10, v/v), pH 2,72 em fluxo de 1,0 mL/min (pressão de 80 bar).

Esta metodologia foi baseada no trabalho de Ducos e colaboradores (1990). A partir de uma solução padrão estoque de AttM em metanol (100 $\mu\text{g/mL}$) foram preparadas soluções intermediárias em fase móvel (ácido acético 1% - metanol (90/10, v/v) em pH de 2,7) nas concentrações 100,00; 50,00; 25,00; 12,50; e 3,12

µg/mL, que foram utilizadas no preparo das soluções de trabalho. Também foram preparadas em fase móvel nas concentrações 4,00; 2,00; 1,00; 0,50; 0,06; 0,03 e 0,01 µg/mL.

Algumas modificações foram realizadas no método original durante a etapa de validação analítica. A primeira foi a substituição da coluna cromatográfica por semelhante disponível no laboratório, a LiChrosorb RP18 (250 x 4,2 mm), 5 µm da Merck®, lidas pela espectroscopia por detector radiação ultravioleta no comprimento de onda de 264 nm e o forno foi mantido à temperatura de 40 °C. O tempo total da corrida foi de 12 minutos.

Para a etapa de extração em fase sólida foi necessário o condicionamento prévio do cartucho para ativação dos sítios disponíveis que são os responsáveis por reterem o composto de interesse. Os cartuchos (Applied Separations, N+ Quaternary Amino (SAX), 500 mg/3 mL) foram acondicionados da seguinte forma: 3 mL de metanol, 3 mL de água ultrapura. Foi adicionado 1 mL de urina, seguida de pré-lavagem de 3 mL de ácido acético 1%. Por fim a eluição foi em ácido acético 10% (pH 2,7), injetou-se uma alíquota de 20 µL no HPLC, por meio de injeção manual.

Foram estudados e estabelecidos os seguintes parâmetros analíticos: linearidade, limite de detecção do equipamento e limite de quantificação, interferência da matriz biológica, precisão e recuperação. Após a validação analítica, o método otimizado foi aplicado nas amostras de urina dos trabalhadores expostos ao benzeno, objetivando confirmar a validade de seu uso no monitoramento da exposição ocupacional ao solvente. Essas análises foram realizadas pela Dr^a Bárbara Geraldino no LACAT/UNIRIO em 2016.

4.8 Teste de genotoxicidade (ENSAIO COMETA)

A análise do potencial genotóxico da exposição ocupacional ao benzeno foi avaliada com auxílio do teste Cometa, também chamado de eletroforese em gel de célula única. Esta técnica é considerada padrão-ouro para avaliar quebras de cadeias de DNA em células eucarióticas e lesões em sítios álcali sensíveis, sendo um teste rápido, prático, sensível, simples, reprodutível e de baixo custo (MALUF *et al.*, 2001).

Porém, antes de iniciar o ensaio cometa, foi realizado um teste que avalia a viabilidade celular, uma vez que células em processo de morte também apresentam quebras nas fitas do DNA, justamente o defeito observado no ensaio cometa. Deste modo, em um primeiro momento, foi realizado o teste com fluoresceína descrito por Speit & Hartmann (2006) que avalia a viabilidade celular por exclusão de corantes e, deste modo, a integridade das células a serem utilizadas no ensaio cometa. Tal teste consiste na adição de 50 μL de sangue total periférico a uma mistura de corantes representados por diacetato de fluoresceína (30 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e brometo de etídio (8 $\mu\text{g}/\text{mL}$), na proporção 1:1 e logo após preparar lâminas com 50 μL desta mistura e cobri-las com lamínulas. As amostras foram lidas imediatamente no microscópio de fluorescência (200X), contabilizando 200 células por indivíduo. As células viáveis apresentavam fluorescência na cor verde, enquanto células não viáveis/mortas apresentavam cor alaranjada, sendo o resultado expresso como percentual de células viáveis e não viáveis, respectivamente (Figura 4.2). Somente as amostras que apresentaram viabilidade celular de 90% tiveram o ensaio cometa realizado (SPEIT & HARTMANN, 2006; TICE *et al.*, 2000).

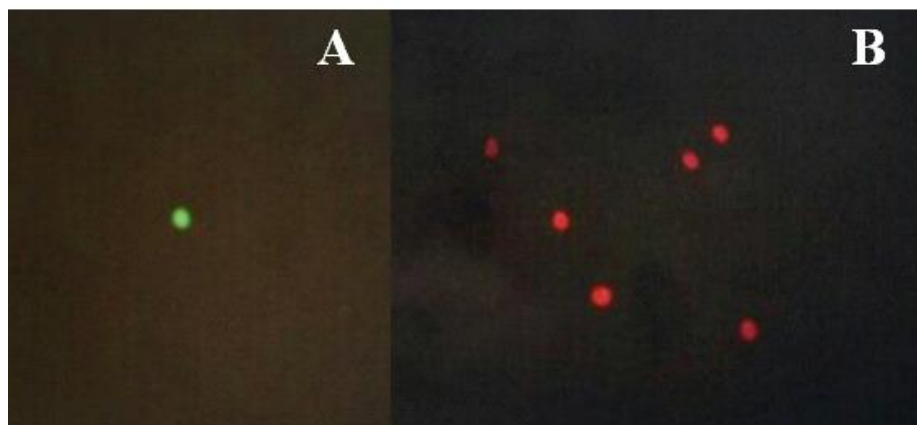


Figura 4.2. Fotomicrografia do teste de fluoresceína. (A) Células viáveis e (B) células não viáveis/mortas. Fonte: Laboratório de Toxicologia - INCQS/FIOCRUZ.

O teste Cometa foi realizado em condições alcalinas ($\text{pH}=13$) e em triplicata seguindo as recomendações de Tice e colaboradores (2000) e de Speit & Hartmann (2006) (Figura 4.3).

As amostras coletadas foram homogeneizadas e 5 μL do sangue total (células individualizadas) foram misturados a 120 μL de agarose de baixo ponto de fusão (BPF) 0,5% m/v e adicionados em uma lâmina de microscopia pré-revestida com agarose de ponto de fusão normal (PFN) 1,5% m/v. Em seguida, as células em agarose foram submersas em uma solução de lise celular (lauroil sarcosinato de sódio 1%, NaCl 2,5 M, EDTA dissódico 100 mM, Tris 10 mM, pH 10 e Triton X-100 1%) overnight a 4°C. Depois, foi realizado o tratamento alcalino com solução tampão (EDTA dissódico 1 mM e NaOH 300 mM) por 20 minutos, para permitir o desenovelamento do DNA. A eletroforese foi realizada em banho de gelo a 4°C durante 20 minutos, na solução tampão alcalina, aplicando corrente elétrica de 25 V (0,8 a 1,5 V/cm) ajustada a 300 mA. Após a corrida da eletroforese, foi realizada a neutralização com a solução de neutralização (Tris 0,4 M, pH 7,5), a fixação em etanol absoluto por 10 minutos, coloração com brometo de etídio (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$), e leitura no microscópio de fluorescência (400X) para avaliação da extensão de migração do DNA em 150 células por indivíduo.

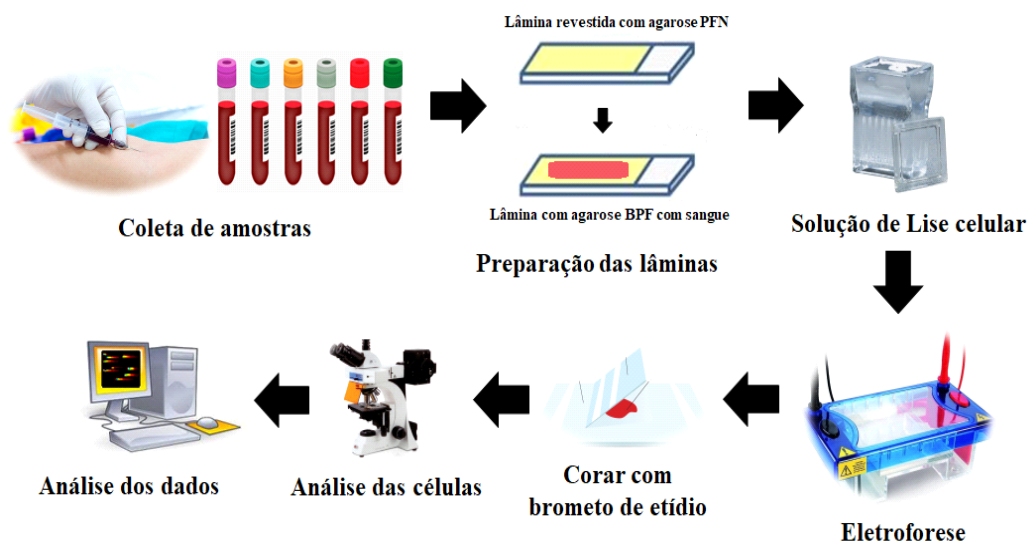


Figura 4.3. Fluxograma da metodologia do ensaio Cometa. A figura mostra as etapas do ensaio cometa, onde após a coleta do sangue ele é misturado à agarose de baixo ponto de fusão (BPF) e a mistura é adicionada à lâmina com agarose ponto de fusão normal (PFN). Em seguida, passa pela solução de lise celular, eletroforese, são coradas com brometo de etídio e analisadas com microscópio de fluorescência para análise dos dados. Fonte: Autor, 2020.

A análise das lâminas para interpretação dos dados foi feita em duas etapas, a primeira foi a identificação e leitura da “cabeça” e “cauda”. As células que apresentam danos no DNA mostram migração aumentada de DNA cromossômico do núcleo em direção ao anôdo (+), se assemelhando à forma de um cometa. A extensão de migração do DNA é, portanto, um indicador da quantidade de quebras de DNA na célula (TICE *et al.*, 2000) (Figura 4.4).

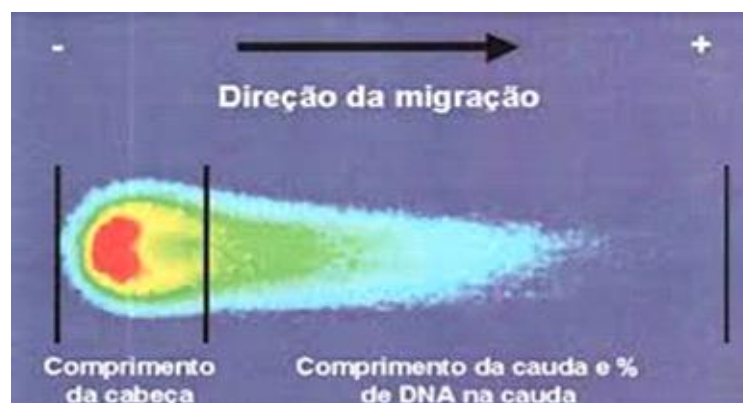


Figura 4.4 - Representação esquemática do “cometa” com faixas pretas mostrando a divisão entre a “cauda” e a “cabeça”. Fonte: Gontijo & Tice, 2003.

A segunda etapa consistiu da avaliação dos danos por meio de uma escala arbitrária de danos que classifica a lesão em classes que variam de “0” a “3”, em que a classe “0” significa que a célula não sofreu nenhum tipo de quebra/dano, apresenta-se íntegra e dentro da normalidade. Já as classes “1”, “2” e “3” representam danos ao DNA, podendo ser na fita simples, dupla ou em ambas e refletindo assim a exposição ao agente genotóxico (Figura 4.5) (CAMPOS, 2013).

A avaliação o tamanho da cauda dos cometas nas quatro diferentes classes é representado por:

- “Classe 0” – Ausência de cauda (sem danos)
- “Classe 1” – Pequena cauda (dano leve)
- “Classe 2” – Grande cauda (dano moderado/intenso)
- “Classe 3” – Totalmente danificado (cabeça muito pequena com praticamente todo o DNA na cauda).

O dano ao DNA foi expresso em porcentagem de células nas quatro diferentes classes e em número de unidades arbitrárias totais (UAT), de acordo com a seguinte fórmula:

$$UAT = [(M0 \times 0) + (M1 \times 1) + (M2 \times 2) + (M3 \times 3)]$$

Onde:

M0 - Representa o número de células com classe de dano "0";

M1 - Representa o número de células com classe de dano "1";

M2 - Representa o número de células com classe de dano "2";

M3 - Representa o número de células com classe de dano "3"

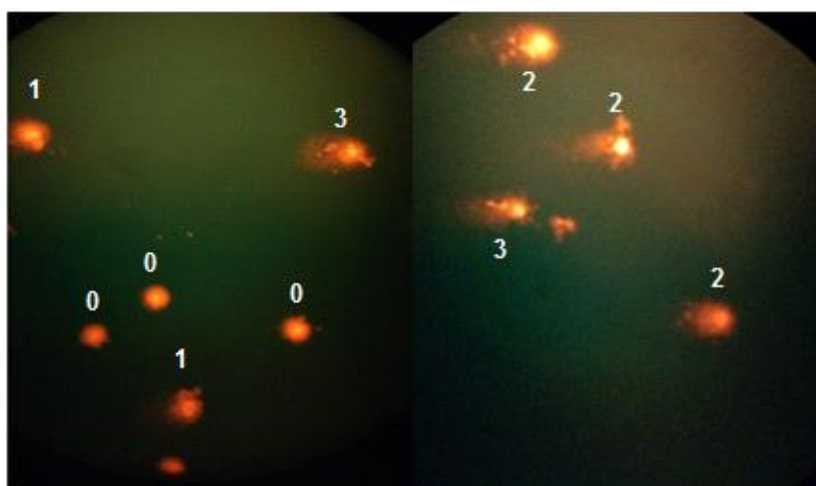


Figura 4.5. Fotomicrografia do ensaio cometa com diferentes classes de dano (0, 1, 2 e 3). Fonte: Autor, 2016.

Esse ensaio e posteriores análises foram realizados pela aluna durante sua iniciação científica, projeto pelo qual colou grau para obtenção do título em Bacharel em Biomedicina pela universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro em 2016 com o trabalho intitulado *"INVESTIGAÇÃO DOS EFEITOS CITOTÓXICOS E GENOTÓXICOS POR MEIO DO ENSAIO COMETA EM FRENTISTAS EXPOSTOS A GASOLINA EM POSTOS DE REVENDA DE COMBUSTÍVEIS DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO"*.

4.9 Análise epigenética (METILAÇÃO DO DNA)

4.9.1 Extração do DNA

Antes de iniciar as análises moleculares para avaliar o perfil de metilação global e dos genes específicos, foi necessário extrair a molécula de interesse (DNA). Para isso, algumas etapas são fundamentais. A primeira delas é a lise celular, ou seja, lise das membranas lipídicas utilizando uma solução detergente para promover o rompimento das membranas e organelas.

Segue-se a purificação, promovendo remoção dos componentes celulares como proteínas, organelas e restos celulares. Nesta etapa, é feita a desnaturação das proteínas com auxílio da enzima proteinase K; fenol, que ajuda na remoção das proteínas; e clorofórmio que desnatura as proteínas e remove o fenol residual.

Em seguida, temos a precipitação do DNA. Uma vez que o DNA é muito solúvel em água e insolúvel em álcool, usa-se etanol absoluto para precipitar o DNA formando um “*pellet*”/precipitado de DNA. O precipitado é então lavado com etanol a 70%. Por fim, é feita a remoção do álcool (etanol) e a ressuspensão com água ultrapura ou com uma solução tampão de eluição, para preservação do material. A partir deste momento, o material extraído pode ser armazenado a -20°C.

A extração do DNA foi realizada a partir do sangue total com auxílio do Kit Qiagen (QIAamp DNA Blood Mini Kit Qiagen), seguindo as recomendações do fabricante. As amostras foram homogeneizadas e centrifugadas por 10 minutos a 1.500 rpm para separação do sangue nas três camadas: plasma, glóbulos brancos e glóbulos vermelhos. Foi removido todo o plasma e adicionado o tampão fosfato salino (PBS) (Sigma Aldrich®) ao tubo de coleta. Em seguida, foram adicionados 40 µL da enzima Protease (Qiagen) em um tubo de 2 mL e 400 µL do Buffer AL a cada amostra, que ficaram sob incubação a 56°C por 10 minutos no termobloco. Após a incubação, as amostras foram centrifugadas por um minuto a 8.000 rpm. Foram adicionados então 400 µL de etanol 100% em cada amostra e estas foram centrifugadas por um minuto a 8.000 rpm. Após, todo o volume foi transferido para coluna correspondente e centrifugado por um minuto a 12.000 rpm. O líquido presente no tubo coletor foi descartado e 500 µL do Buffer AW1 foram adicionados à

coluna, centrifugados por um minuto a 8.000 rpm e descartados novamente. Foram adicionados 500 µL do Buffer AW2 às amostras que foram centrifugadas por três minutos a 14.000 rpm. Após essa centrifugação, as colunas foram transferidas para um novo tubo coletor de 2 mL e 50 µL do Buffer AE (tampão de eluição) foram adicionados e deixado à temperatura ambiente por cinco minutos. Por fim, as amostras foram centrifugadas por um minuto a 8.000 rpm e armazenadas a -20°C.

O DNA extraído foi quantificado utilizando o equipamento *Spectrophotometer NanoDrop* ND-100 (Uniscience, USA), aparelho capaz de mensurar a concentração de ácidos nucleicos e proteínas presentes em uma solução. Sua quantificação é baseada na absorvância em comprimento de onda de 260 nm, uma vez que o cálculo para concentração de DNA é dado no pressuposto que uma unidade de absorvância equivale a uma concentração de 50 µg/mL de DNA. Para qualidade do material extraído, foram considerados valores iguais ou superiores a 1,7 na razão 260/280 (para avaliar contaminação com proteínas).

4.9.2 Tratamento com bissulfito de sódio (NaHSO₃)

O tratamento com bissulfito de sódio consiste na desaminação das citosinas (C) não metiladas, convertendo-as em uracilas (U). Na amplificação por PCR, esses nucleotídeos serão lidos como timinas (T). Já as citosinas metiladas não sofrem desaminação e permanecem inalteradas (Figura 4.6) (LIU *et al.*, 2004; PATTERSON *et al.*, 2011).

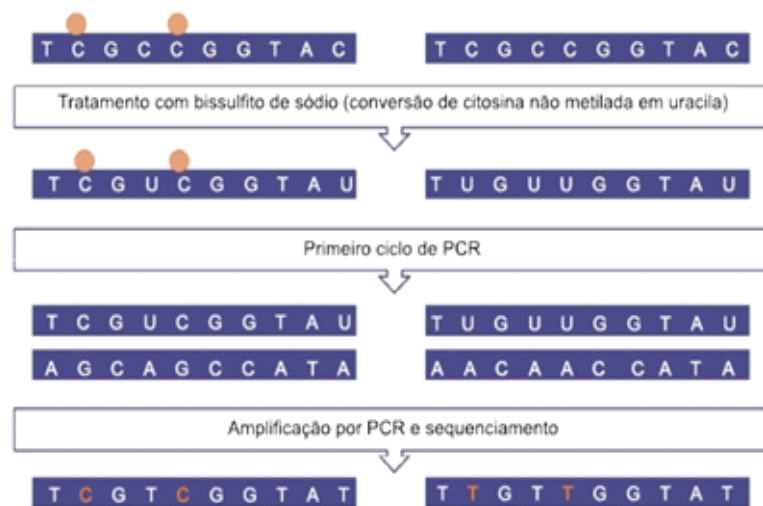


Figura 4.6. DNA tratado com bissulfito de sódio. A figura mostra o tratamento com bissulfito de sódio promovendo a conversão do DNA não metilado em uracila e posteriormente em timina, já a citosina metilada continua sendo citosina. Fonte: NICIURA, Simone Cristina Méo; SARAIVA, Naiara Zoccal. Epigenética: bases moleculares, efeitos na fisiologia e na patologia, e implicações para a produção animal e vegetal. Embrapa, 2014. Pág 109.

O processo de conversão pode ser dividido em três etapas fundamentais (Figura 4.7), sendo elas:

- Sulfonação de citosinas (C);
- Desaminação hidrolítica gerando uma uracila sulfonada;
- Dessulfonação gerando assim a uracila (U);

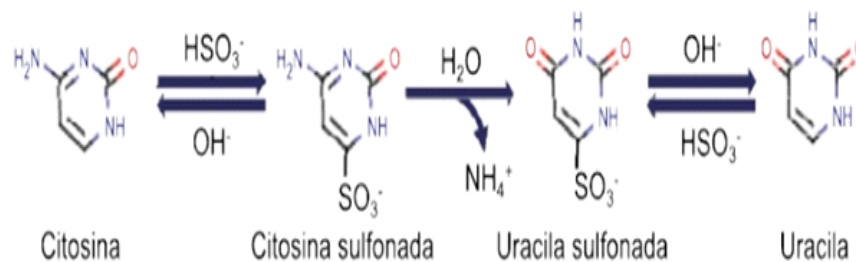


Figura 4.7. Conversão da citosina em uracila. A figura mostra as etapas de transformação da citosina em uracila por bissulfito de sódio. No primeiro passo, a citosina é convertida em citosina sulfonada, depois em uracila sulfonada e por fim em uracila. Fonte: NICIURA, Simone Cristina Méo; SARAIVA, Naiara Zoccal. Epigenética: bases moleculares, efeitos na fisiologia e na patologia, e implicações para a produção animal e vegetal. Embrapa, 2014. Pág 109.

Um total de 500 ng do DNA genômico extraído foi modificado utilizando o EZ DNA Methylation Kit (ZymoResearch) seguindo as recomendações do fabricante. Antes de tudo, foi preparado o reagente de conversão (CT). Este reagente é fornecido na forma liofilizada, sendo necessário adicionar 750 µL de água ultrapura e 210 µL do tampão M-Dilution no tubo de reagente de conversão (CT) e vortexar durante 10 a 30 minutos, para completa dissolução. Depois, foi preparado o tampão de lavagem (M-Wash) pela adição de 24 mL de etanol 100% aos 6 mL do tampão M-Wash.

Feito isso, foram adicionados 5 µL de M-Dilution à amostra de DNA e seu volume ajustado para 50 µL com água ultrapura. Seguiu-se uma incubação a 37 °C durante 15 minutos. Após a incubação, foram adicionados 100 µL do preparado do reagente de conversão (CT) à cada amostra para uma posterior incubação.

Nesta etapa, foi utilizada a condição alternativa de incubação (Illumina Infinium Methylation Assay) do protocolo que consistiu em incubar as amostras no termociclador Veriti (Applied Biosystems) a 95 °C por 30 segundos, 50 °C por 60 minutos repetindo isso 16 vezes (16 ciclos). Após essa ciclagem, as amostras foram mantidas a 4 °C por pelo menos 10 minutos.

Uma vez finalizada a incubação, foram adicionados 400 µL de tampão de ligação M-Binding à coluna fornecida pelo fabricante do kit que foi inserida em um tubo coletor de 2,0 mL. Centrifugadas por 30 segundos a $>10.000 \times g$ e seu sobrenadante descartado. Foram adicionados 100 µL de tampão de lavagem M-Wash à coluna e centrifugados por 30 segundos a $> 10.000 \times g$, seguido da adição de 200 µL do tampão de dessulfonação M-Desulphonation que foi incubado à temperatura ambiente (20-30°C) durante 15-20 minutos.

Ao terminar a incubação, as amostras foram centrifugadas por 30 segundos a $> 10.000 \times g$ e lavadas com 200 µL de M-Wash, centrifugadas por 30 segundos a $> 10.000 \times g$, processo repetido duas vezes.

Por fim, a coluna foi colocada em um tubo de 1,5 mL, e foram adicionados 10 µL do tampão de eluição (M-Elution) diretamente na matriz da coluna. Esta foi centrifugada por 30 segundos a $> 10.000 \times g$ para eluir o DNA, estando pronto para análise imediata ou para uso posterior se armazenado a -20°C.

O DNA modificado foi eluído em tampão de eluição fornecido no kit, sendo sua concentração final de 25 ng/ μ L para todas as amostras. As amostras que apresentaram quantidade inferior a 250 ng não foram submetidas ao tratamento/conversão.

4.9.3 Reação em cadeia da polimerase (PCR) e Eletroforese

A reação em cadeia da enzima DNA polimerase (PCR, do inglês *Polymerase Chain Reaction*) é uma técnica de biologia molecular que consiste na amplificação *in vitro* de trechos específicos do genoma de um organismo, no intuito de obter uma maior quantidade de DNA de uma região específica (WATSON, 2012).

Para a reação de PCR ocorrer são necessários alguns componentes, entre eles os desoxirribonucleotídeos (dATP, dCTP, dGTP e dTTP), que são monômeros das moléculas de DNA; a enzima DNA polimerase, que é responsável pela síntese de novas fitas de DNA a partir de um molde; os oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) específicos do gene ou do elemento de interesse sendo um primer senso e um antissenso, que são pequenas moléculas de DNA de fita simples cerca de 20 nucleotídeos que são complementares à região específica do DNA molde e que irá ajudar na iniciação da síntese da nova fita; e o DNA genômico que contém a região de interesse a ser amplificada (ALBERTS *et al.*, 2010; SAITO *et al.*, 2015)

Todos esses componentes adicionados juntos formam uma mistura para a reação de PCR, que é incubada em um termociclador e submetida a ciclos de diferentes de temperaturas. Inicialmente, a mistura é aquecida a 94C^o para que ocorra a desnaturação/separação das fitas de DNA.

Depois, há uma diminuição da temperatura para 50-65C^o para que ocorra o anelamento dos *primers* à região de interesse. Em seguida, há um aumento da temperatura para 72C^o, que é a temperatura ótima de catálise da enzima Taq DNA polimerase, promovendo assim a síntese do DNA. Esta sequência de ciclos é repetida algumas vezes. A cada ciclo de repetição a região de interesse é duplicada, havendo um aumento exponencial (2^n) do material (Figura 4.8).

Podemos então resumir a reação de PCR em três etapas principais:

- Desnaturação: Abertura das fitas de DNA;
- Anelamento: Ligação dos primers à região de interesse do DNA;
- Extensão: Ação da enzima DNA polimerase, estendendo a nova fita de DNA;

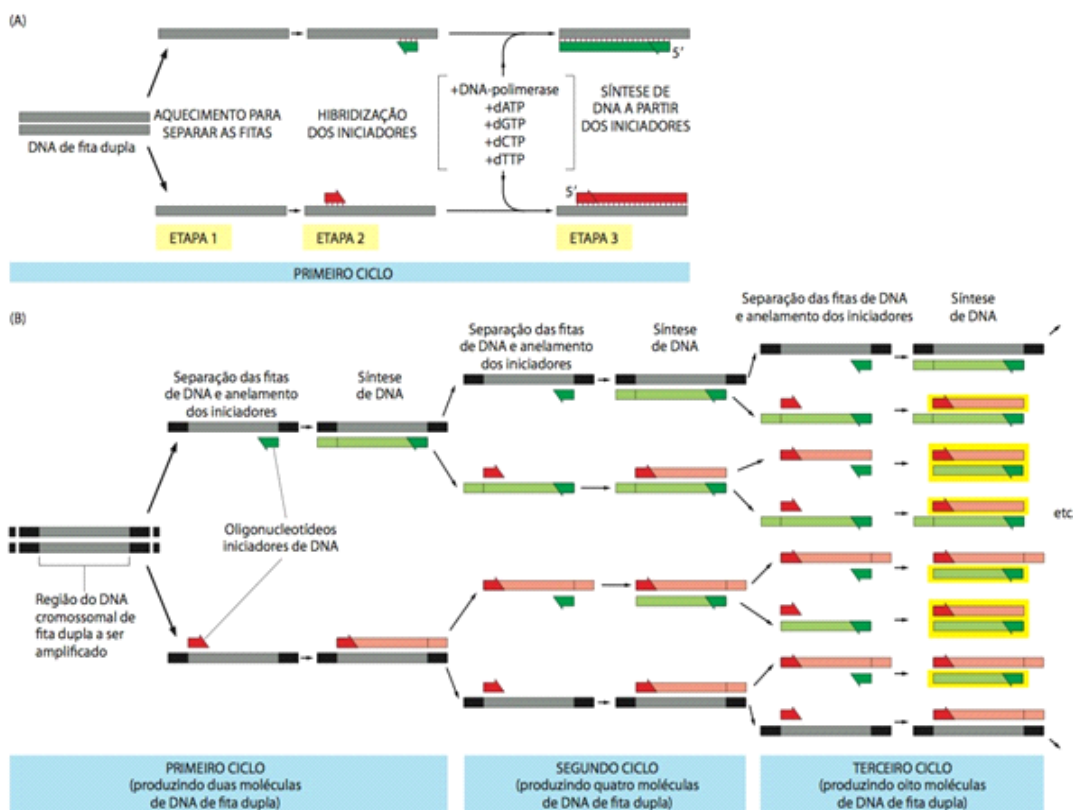


Figura 4.8. Metodologia da técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR). A figura mostra as etapas da reação de PCR, em que primeiro há a desnaturação das fitas de DNA, seguido do anelamento das sequências iniciadoras e extensão da fita promovendo a amplificação do material. Fonte: Bruces, ALBERTS, JOHSON, Alexander, LEWIS, Julian, ROBERTS, Keith, WALTER, Peter, and RAFF, Martin. *Biologia Molecular da Célula*, 5ª edição. ArtMed, 2011. pág 545.

Após, o tratamento com bissulfito de sódio, 25 ng de DNA modificado foram amplificados utilizando primers específicos para cada elemento transponível/gene de interesse (Quadro 4.1). Para a reação de PCR foram utilizados reagentes Platinum Taq DNA Polymerase (Invitrogen) e Go Taq® G2 Hot Start Polymerase (Promega), ambos possuem os componentes necessários para a reação, que são: Tampão/Buffer, a enzima polimerase e $MgCl_2$ (cofator da enzima).

Quadro 4.1 - Sequências dos primers utilizados nas análises do pirosequenciamento.

Elementos/ Genes	Primers	(T°C)	Amplicon (pb)	Sequência analisada
LINE-1	Senso biot: 5'TAGGGAGTGTAGATAGTG G Antissenso : 5' AACTCCCTAACCCCTTAC Sequenciamento: 5'CAAATAAAACAATACCTC	56	120	G/ACCTACTTCG/AACTCG/ACG/ACACG/AATACG/ACAC
ALU	Senso:5' AGATTATTTTGGTTAATAAG Antissenso biot: 5'AACTACAACACTACAATAAC Sequenciamento: 5' GTTGTAGTTTTAGTTATT	49	254	C/TGGGAGGTTGAGGTAGGAGAATGGC/TGTGAATTC/TGG GAAGC/TGGAGTTTGTAGTGAGT
PARP-1	Senso: 5' GTTATTTAGAAAGGAGAAGAG AAGAGG Antissenso biot: 5' AGTTTTTGGGGATGTTTT Sequenciamento: 5' GGTTTTATAGGTTTTAAGTG	56	331	TC/TGTTTC/TGAGGGTTC/TGGGTC/TGTTTC/TGTTTTTGG GTTC/TGTTTT
MSH3	Senso: 5' TGGGATTGGGTAGGGTTAT Antissenso biot :5' AGAAGGGGAAGGTGGGAA Sequenciamento: 5' GGGGTTTGTGGGTAA	58	129	GGC/TGGGC/TGGAGGC/TGGGGATTTTC/TGTTTC/TGATG ATAGGGTT
MGMT	Senso biot: 5' GGTATTAGGAGGGGAGAGAT T Antissenso: 5'TATTTGGTAAATTAAGGTATA GAGTTTTAG Sequenciamento: 5' ACCTTTTCTATCACAA	58	208	AAATAATCCG/ACG/AAACG/ATACAACG/AACCTACCAG/ ATACCCG/AAATAAT

Primeiramente, foi realizada a preparação do fluxo laminar, que foi higienizado com álcool 70%, assim como todo material utilizado na manipulação para o procedimento, como estantes, pipetas, ponteiras, tubos, água ultrapura e caneta permanente. A luz ultravioleta (UV) foi ligada por 15 a 20 minutos, para esterilização de todo material e depois deste tempo, a UV foi desligada para iniciar o procedimento. Dentro do fluxo laminar devidamente esterilizado, foi realizada a preparação da mistura para a reação de PCR, onde foram adicionados todos os reagentes de acordo com a padronização para cada gene. Após a preparação da mistura, já na bancada, foi adicionado 1 µL da amostra (25 ng de DNA genômico modificado) completando os 50 µL finais da reação.

Para cada reação foram incluídos dois controles negativos que consistiam de toda a mistura de PCR, exceto o DNA genômico, e água ultrapura para completar o volume final de reação. Em seguida, a amplificação de cada região de interesse se deu de acordo com as condições apresentadas no Quadro 4.2.

Quadro 4.2- Componentes da reação e condições no termociclador da PCR de cada elemento transponível e gene específico estudado.

Elementos/Genes	Componentes da reação de PCR	Condições da PCR
LINE-1	H₂O – completar até o volume final de 50 µL Tampão - 1X PCR Buffer MgCl₂ - 1,5 mM dNTPs - 0,2 mM de cada Primers - 0,2 µM de cada Enzima - Platinum™ Taq DNA Polimerase 2 U DNA convertido – 25 ng	95°C por 15 minutos 95°C por 40 segundos 56°C por 40 segundos 72°C por 40 segundos 72°C por 10 minutos
Alu	H₂O – completar até o volume final de 50 µL Tampão - 1X PCR Buffer MgCl₂ - 1,5 mM dNTP - 0,2 mM de cada Primers - 0,2 µM de cada Enzima - Platinum™ Taq DNA Polimerase 2 U DNA convertido – 25 ng	95°C por 15 minutos 95°C por 40 segundos 49°C por 40 segundos 72°C por 1 minuto 72°C por 10 minutos
PARP-1	H₂O - completar até o volume final de 50 µL Tampão - Colorless GoTaq® 1 X MgCl₂ . 2 mM dNTP - 0,2 mM cada Primers - 0,2 µM de cada Enzima - Go Taq® DNA Polimerase 1,25 U DNA convertido – 25 ng	95°C por 15 minutos 95°C por 40 segundos 56°C por 40 segundos 72°C por 40 segundos 72°C por 10 minutos
MSH3	H₂O - completar até o volume final de 50 µL Tampão - Colorless GoTaq® 1 X MgCl₂ . 2 mM dNTP - 0,2 mM cada Primers - 0,2 µM de cada Enzima - Go Taq® DNA Polimerase 1,25 U DNA convertido – 25 ng	95°C por 15 minutos 95°C por 40 segundos 58°C por 40 segundos 72°C por 40 segundos 72°C por 10 minutos

Continuação do **Quadro 4.2**

MGMT	H₂O - completar até o volume final de 50 µL	95°C por 15 minutos
	Tampão - Colorless GoTaq® 1 X	95°C por 40 segundos
	MgCl₂ - 2 mM	58°C por 40 segundos
	dNTP - 0,2 mM cada	72°C por 40 segundos
	Primers - 0,2 µM de cada	72°C por 10 minutos
	Enzima - Go Taq® DNA Polimerase 1,25 U	
	DNA convertido – 25 ng	

Após a reação de PCR, foi feito um gel de agarose concentrado a 2,0% para confirmar a amplificação, visto que a eletroforese promove a separação do produto da reação de PCR por peso molecular, onde os fragmentos de menor peso molecular movimentam-se mais rapidamente do que os fragmentos de maior peso molecular, promovendo assim a separação das amostras. Para identificar o peso molecular do elemento/gene de interesse utilizamos um padrão de peso molecular já conhecido que é adicionado ao gel junto com o produto da PCR e assim, por comparação, identificamos se houve amplificação do produto ou não. Após a corrida, o gel foi revelado no aparelho de detecção de quimioluminescência de luz visível, ChemiDoc (Bio Rad®), para visualização das bandas (Figura 4.9).

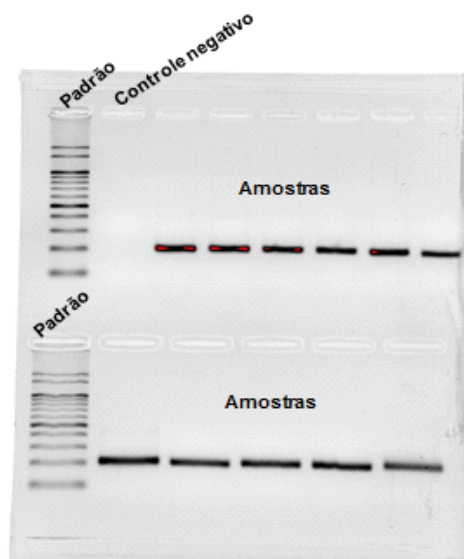


Figura 4.9. Gel de agarose revelado no aparelho ChemiDoc (Bio Rad®). A figura mostra o gel de agarose contendo produtos de amplificação do gene *MGMT*. No primeiro poço das partes superior e inferior do gel, temos o padrão de peso molecular de 100 pb. No segundo poço da parte superior do gel, podemos observar o controle negativo das reações, enquanto nos demais poços são visualizadas amostras. Fonte: Autor, 2020.

4.9.4 Análise de metilação de sítios CpG (PIROSSEQUENCIAMENTO)

Após a etapa de amplificação, o produto pode ser sequenciado diretamente por pirosequenciamento. O pirosequenciamento é um sequenciamento de nova geração por síntese baseado na adição sequencial de nucleotídeos à fita nascente de DNA que é complementar ao DNA molde, utilizando um *primer* para essa sequência. Essa incorporação do nucleotídeo é visualizada e monitorada em tempo real (RONAGHI *et al.*, 2001; DEJEUX *et al.*, 2009). Essa técnica depende da atuação de quatro enzimas: DNA polimerase I, ATP sulfurilase, luciferase e apirase, além de seus substratos: adenosina fosfossulfato (APS), luciferina e o DNA molde.

Após a amplificação, os produtos de PCR foram coletados utilizando “*beads*” revestidas com estreptavidina diluídas em tampão de ligação (10 mM Tris-HCl; 2 mM NaCl; 1 mM EDTA; 0,1% Tween 20 – pH 7,6) para promover a ligação apenas das fitas biotinizadas. Em seguida, foram submetidas à agitação por 10 minutos. Após esse período, as “*beads*” foram aspiradas utilizando a “Vacuum Prep Workstation”, lavadas com etanol 70%, desnaturadas com NaOH 0,2 M e lavadas com o tampão de lavagem (10 mM Tris-Acetato – pH 7,6). Depois, foram adicionados 40 µL da solução de *primer* de sequenciamento 0,4 mM diluído em tampão de anelamento (20 mM Tris-Acetato; 2 mM MgAc₂ – pH 7,6). A mistura (“*beads*” ligadas a uma das fitas do produto de PCR e *primers*) foi desnaturada por dois minutos a 80°C no termobloco e então resfriada por 20 minutos à temperatura ambiente para atingir a temperatura de anelamento dos *primers*.

Por último, foram adicionados dNTPs, enzimas e substratos, definidos de acordo com a sequência a ser injetada na placa. O *primer* desenhado especialmente para o sequenciamento se anela à fita simples do produto gerado na reação de PCR, que servirá de molde para a síntese. Então, as enzimas são adicionadas e o primeiro desoxirribonucleotídeo trifosfato (dNTP) injetado é pareado. Caso seja complementar, será incorporado à fita nascente pela DNA polimerase I.

Essa incorporação libera o pirofosfato (PPi), utilizado pela enzima ATP sulfurilase para converter o PPi em ATP na presença de APS. O ATP produzido é utilizado pela enzima luciferase na conversão de luciferina em oxiluciferina e luz em uma intensidade proporcional à quantidade de ATP.

A luz produzida é captada pelo sistema e visualizada como um pico no gráfico Luz X Tempo, sendo que a altura de cada pico é proporcional à quantidade de nucleotídeos adicionados. Ao mesmo tempo, a enzima apirase está degradando os nucleotídeos não incorporados e o ATP. E assim, a etapa é terminada e um novo nucleotídeo é adicionado dando continuidade a todo o processo de sequenciamento (Figura 4.10).

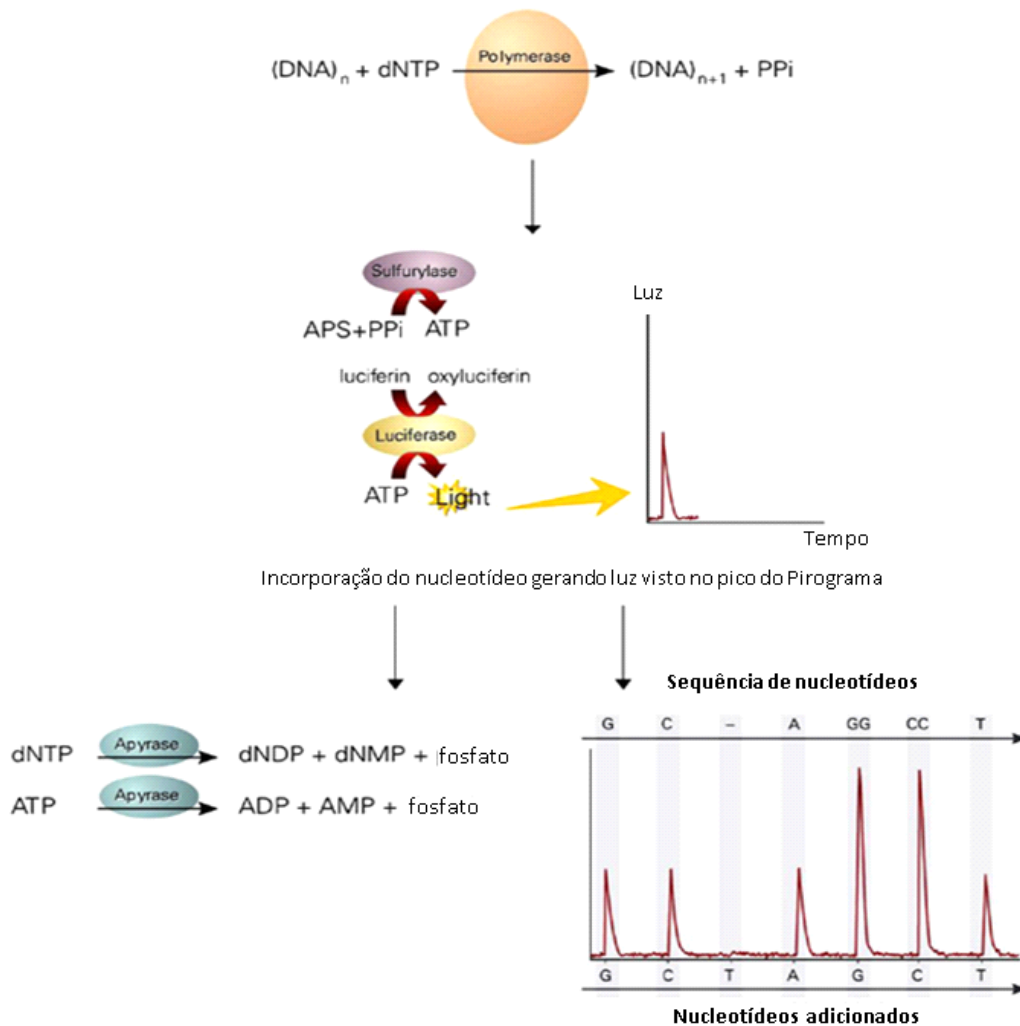


Figura 4.10. Princípio do Pirosequenciamento. Durante o sequenciamento da fita simples do produto gerado na reação de PCR, há incorporação do desoxiribonucleotídeo trifosfato (dNTP) à fita que está sendo sintetizada com consequente liberação de pirofosfato (PPi). A enzima ATP sulfurilase converte então adenosina 5' fosfosulfato (APS) e PPi em ATP, que em seguida é utilizado na conversão de luciferina em oxiluciferina, liberando luz. A luz é captada e representada como um pico no gráfico luz versus tempo. Caso não haja a incorporação do desoxiribonucleotídeo a enzima apirase promove sua degradação, assim como do ATP não utilizado. Fonte: Adaptado de: <http://thepix.info/pyrosequencing>.

Desta forma, a fita biotinilada (molde) foi sequenciada utilizando o sistema *PyroMark Q96* (Qiagen), que trata cada sítio CpG como um polimorfismo C/T gerando um dado quantitativo da proporção relativa do alelo metilado versus o alelo não metilado. Os níveis de metilação dos sítios CpG de interesse foram avaliados convertendo os pirogramas (Figura 4.11) em valores numéricos correspondentes às alturas dos picos obtidos e calculando a média de todos os sítios CpG analisados para cada gene ou região de interesse.

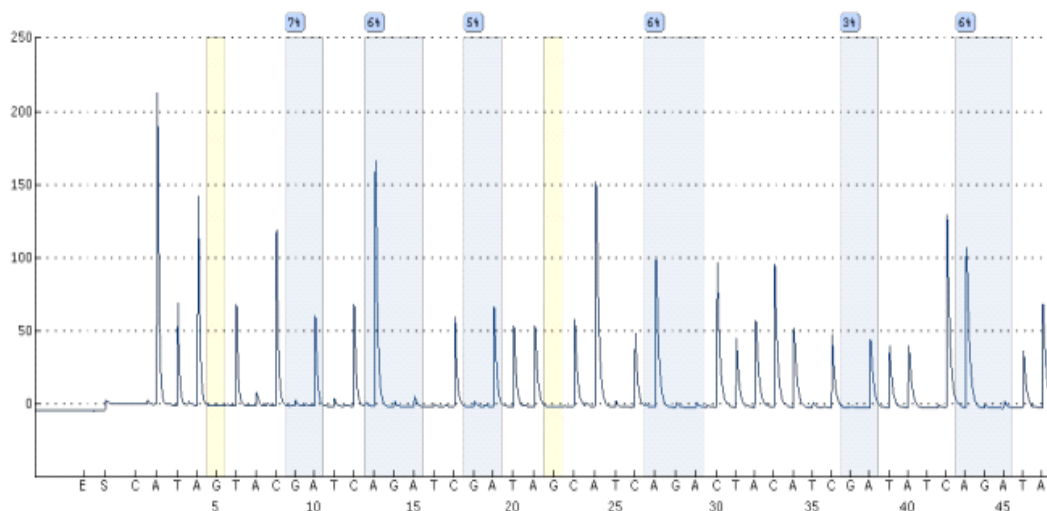


Figura 4.11 Pirograma do gene *MGMT* obtido durante o pirosequenciamento. A figura mostra o resultado do sequenciamento por síntese (pirosequenciamento), em que o eixo X representa a sequência de nucleotídeos injetados pelo aparelho e o eixo Y representa a intensidade da luz captada. Fonte: Autor, 2020.

4.10 Análises estatísticas

Primeiramente, foi realizado o teste *Kolmogorov-Smirnov* (KS) para avaliar se os dados obedeciam à distribuição normal. Em seguida, foram realizados os testes de *Mann Whitney* e *Kruskal Wallis* com pós teste de Dunn para dados não paramétricos e o teste T não pareado para dados paramétricos. Também foram feitas análises de correlação de *Spearman*. A curva ROC (do inglês *Receiver Operating Characteristic*) foi utilizada para avaliar a sensibilidade e especificidade do biomarcador de exposição (AttM) em distinguir casos com e sem danos genotóxicos, além de casos com e sem alterações hematológicas entre os indivíduos expostos ocupacionalmente ao benzeno.

Os resultados foram considerados estatisticamente significativos quando apresentavam um valor de $p < 0,05$. Para isso, foi utilizado o pacote estatístico *Statistical Package for the Social Science* (SPSS), versão 19 (IBM Corp) e o *software GraphPadPrism*, versão 4.02.

5. RESULTADOS

5.1 Dados descritivos – Caracterização da população de estudo

O estudo contou com a participação voluntária de 69 indivíduos não expostos ocupacionalmente ao benzeno (grupo de comparação), 74 indivíduos expostos apenas por via inalatória ao benzeno (Grupo 1) e 74 expostos por via inalatória e dérmica (Grupo 2) (Tabela 5.1.1). A mediana de idade foi de 38 anos (25-62), 29 anos (20-61) e 38 (21-70) em cada grupo, respectivamente. No grupo não exposto e no grupo 1, a maioria eram mulheres (52,2% e 68,9%, respectivamente); enquanto no grupo 2 a maioria eram homens 90,5% ($p < 0,001$). Em todos os grupos, a maioria dos indivíduos era não branco, porém essa proporção foi maior nos grupos expostos ($p = 0,006$). O estado civil também diferiu entre os grupos ($p = 0,003$), sendo que no grupo não exposto e no grupo 2 a maioria apresentava companheiro (52,2% e 60,8%, respectivamente), já no grupo 1 a maioria não tinha companheiro (66,2%). Em relação à escolaridade e renda familiar, os grupos expostos apresentaram uma maior frequência de baixo nível de escolaridade e baixa renda, diferindo significativamente dos indivíduos do grupo não exposto ($p < 0,001$ para ambas as análises). Quanto aos hábitos/estilo de vida, em todos os grupos, os indivíduos eram em sua maioria não fumantes, etilistas e consumiam produtos industrializados/processados pelo menos uma a duas vezes por semana ($p = 0,286$, $p = 0,680$ e $p = 0,479$, respectivamente).

Tabela 5.1 - Características sociodemográficas de trabalhadores não expostos ocupacionalmente ao benzeno (grupo de comparação) e dos trabalhadores de postos de revenda de combustíveis expostos ocupacionalmente ao benzeno no município do Rio de Janeiro no período de 2014 a 2016 (n = 217).

Características sociodemográficas	Não Exposto N (%)	Grupo 1 N (%)	Grupo 2 N (%)	p-valor
Mediana de idade/anos (min-máx)	38 anos (25-62)	29 anos (20-61)	38 anos (21-70)	
Sexo				
Mulher	36 (52,2)	51 (68,9)	7 (9,5)	<0,001
Homem	33 (47,8)	23 (31,1)	67 (90,5)	
Cor da pele				
Branco	32 (46,4)	17 (23)	20 (27)	0,006
Não Branco	37 (53,6)	57 (77)	54 (73)	
Estado Civil				
Com companheiro	36 (52,2)	25 (33,8)	45 (60,8)	0,003
Sem companheiro	32 (46,4)	49 (66,2)	29 (39,2)	
Escolaridade				
Baixa escolaridade (< 8 anos)	7 (10,1)	33 (44,6)	40 (54)	<0,001
Alta escolaridade (≥ 8 anos)	62 (89,9)	41 (55,4)	34 (46)	
Renda Familiar*				
Até 3 salários mínimos (R\$2.811,00)	15 (21,7)	44 (59,5)	49 (66,2)	<0,001
Mais de 3 salários mínimos (>R\$2.811,00)	52 (75,4)	29 (39,2)	25 (33,8)	
Naturalidade				
Município do Rio de Janeiro	62 (89,9)	51 (68,9)	54 (73)	0,007
Outros municípios	7 (10,1)	23 (31,1)	20 (27)	
Hábitos/Estilo de vida				
Tabagismo				
Não fumante	61 (88,4)	69 (93,2)	63 (85,1)	0,286
Fumante/Ex fumante	8 (11,6)	5 (6,8)	11 (14,9)	
Etilismo				
Sim	45 (65,2)	43 (58,1)	45 (60,8)	0,680
Não	24 (34,8)	31 (41,9)	29 (39,2)	
Alimentos processados				
Não	10 (14,5)	7 (9,5)	9 (12,2)	0,641
1 a 2 vezes por semana	35 (50,7)	38 (51,4)	32 (43,2)	
Mais de 2 vezes por semana	20 (29,0)	28 (37,8)	29 (39,2)	

Em todas as comparações foi utilizado o teste de Qui-Quadrado.

Os números de indivíduos podem variar devido à perda de informação.

Dados coletados entre os anos de 2014 -2016.

*Salário mínimo utilizado como referência foi do ano de 2017, com valor igual a R\$937,00 (BRASIL, 2016).

5.2 Características ocupacionais dos trabalhadores expostos ao benzeno

No grupo 1, 73% dos indivíduos eram trabalhadores de lojas de conveniência, enquanto no grupo 2 a maioria era de frentistas (77%), com mediana de tempo de trabalho de 18 meses (12,3-240) para o grupo 1 e de 60 meses (8-504) para o grupo 2 (Tabela 5.2). Quando o tempo de trabalho foi estratificado em três categorias (até nove anos, 10 a 20 anos e mais de 20 anos), apesar de ambos os grupos (1 e 2) apresentarem em sua maioria indivíduos que trabalharam até nove anos nos postos de reabastecimento (87,8% no grupo 1 e 71,6% no grupo 2), as diferenças de distribuição foram estatisticamente significativas ($p=0,008$).

Os dois grupos de exposição eram de trabalhadores de postos de postos de combustíveis localizados na zona sul e no Centro do município do Rio de Janeiro ($p=0,702$). Quanto à adesão a sindicatos, apesar da maioria não ser sindicalizada no grupo 1 e ser sindicalizada no grupo 2, as diferenças não foram estatisticamente significativas ($p=0,309$).

Tabela 5.2 – Frequência do tipo de ocupação dos trabalhadores de postos de revenda de combustíveis expostos ocupacionalmente ao benzeno em postos de combustíveis no município do Rio de Janeiro ($n = 148$).

Tipo de Ocupação	Grupo 1 N (%)	Grupo 2 N (%)	p-valor
Frentista	0 (0)	57 (77)	
Gerente	4 (5,4)	11 (14,9)	
Lubrificador	0 (0)	4 (5,4)	
Lavador de carros	2 (2,7)	1 (1,4)	<0,001
Loja de conveniência	54 (73)	0 (0)	
Escritório	7 (9,5)	0 (0)	
Outros	7 (9,5)	1 (1,4)	
Tempo de trabalho			
Mediana (meses) - (min-máx)	18 (12,3 – 240)	60 (8 – 504)	0,100
Tempo de trabalho em anos trabalhados			
Até 9 anos	65 (87,8)	53 (71,6)	
10 a 20 anos	7 (9,5)	16 (21,6)	0,008
Mais de 20 anos	0(0)	5(6,8)	
Local de trabalho			
Centro do município do Rio de Janeiro	19 (25,7)	17 (23)	
Zona Sul do município do Rio de Janeiro	55 (74,3)	57 (77)	0,702
Folga durante a semana			
Sim	74 (100)	74 (100)	
Não	0(0)	0 (0)	-
Sindicalizado			
Sim	31 (46,3)	39 (54,9)	
Não	36 (53,7)	32 (45,1)	0,309

Em todas as comparações foi utilizado o teste de Qui-Quadrado.
Os números de indivíduos podem variar devido à perda de informação.
Dados coletados entre os anos de 2014 -2016.

Dentre as atividades praticadas pelo grupo de exposição por via inalatória e dérmica ao benzeno (Grupo 2) as mais frequentes foram: abastecimento de veículos (94,6%); recebimento do dinheiro, como caixa (66,2%); calibrar pneus (87,8%); lavar carros e vidros (86,5%); verificar água no motor do carro e/ou troca o óleo do motor (91,9% e 73%, respectivamente) (Tabela 5.3). Os combustíveis mais utilizados por eles para abastecer os veículos foram: gasolina comum, gasolina aditivada, diesel e etanol, todos reportados por todos os indivíduos com informação (Tabela 5.4).

Já em relação aos hábitos/procedimentos realizados pelos trabalhadores, o uso da flanela durante suas atividades foi o hábito mais relatado por eles com 79,7% (Tabela 5.5).

Tabela 5.3– Frequência das atividades ocupacionais realizadas pelos trabalhadores de postos de revenda de combustíveis expostos por via inalatória e dérmica ao benzeno (n = 74).

Atividades Ocupacionais	N (%)	
	Sim	Não
Abastece	70 (94,6)	4 (5,4)
Caixa	49 (66,2)	25 (33,8)
Calibra pneus	65 (87,8)	9 (12,2)
Lava carros/vidros	64 (86,5)	10 (13,5)
Verifica água do motor	68 (91,9)	6 (8,1)
Verifica/Troca óleo do motor	54 (73)	20 (27)
Realiza leitura dos tanques do subsolo	22 (29,7)	52 (70,3)
Recebe o combustível do caminhão-tanque	16 (21,6)	61 (82,4)
Outros	2 (2,8)	72 (97,2)

Os números de indivíduos podem variar devido à perda de informação. Dados coletados entre os anos de 2014 -2016.

Tabela 5.4 – Tipos de combustíveis manipulados pelos trabalhadores de postos de revenda de combustíveis expostos por via inalatória e dérmica ao benzeno (n = 74).

Tipo de Combustível	Exposto (Grupo 2) N (%)
Gasolina comum	73 (98,6)
Gasolina aditivada	73 (98,6)
Diesel	73 (98,6)
Etanol	73 (98,6)
GNV	16 (21,6)

Os números de indivíduos podem variar devido à perda de informação. Dados coletados entre os anos de 2014 -2016.

Tabela 5.5 – Frequência dos procedimentos e hábitos ocupacionais realizados durante o expediente pelos trabalhadores de postos de revenda de combustíveis expostos por via inalatória e dérmica ao benzeno (Grupo 2) (n = 74).

Procedimentos/Hábitos realizados durante o trabalho	N (%)	
	Sim	59 (79,7)
Utilização do pano para abastecer (flanela)	Não	15 (20,3)
	Sim	25 (33,8)
Aproxima o rosto quando abastece até a boca	Não	48 (64,9)
	Sim	15 (20,3)
Cheira a tampa do carro antes de abastecer	Não	58 (78,4)
	Sim	51 (68,9)
Confia no bico automático	Não	22 (29,7)
	Sim	11 (14,9)
Aspira combustível com a mangueira	Não	62 (83,8)
	Sim	22 (29,7)
Permanece com roupa molhada de combustível	Não	51 (68,9)
	Sim	35 (47,3)
Lava carros	Não	38 (51,4)
	Sim	4 (5,4)
Utiliza querosene para dar brilho no carro	Não	69 (93,2)
	Sim	1 (1,4)
Outros	Não	72 (97,3)

Os números de indivíduos podem variar devido à perda de informação.
Dados coletados entre os anos de 2014 -2016.

5.3 Dados clínicos e laboratoriais da população de estudo

Após a coleta de sangue, foram avaliados os parâmetros bioquímicos e hematológicos dos participantes do estudo que foram comparados ao valor de referência. Foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos em relação à bilirrubina indireta ($p = 0,020$), proteína C reativa ($p = 0,019$) e contagem de reticulócitos ($p < 0,001$) (Tabela 5.6).

Tabela 5.6 – Dados bioquímicos e hematológicos de trabalhadores não expostos ocupacionalmente ao benzeno (grupo de comparação) e dos trabalhadores de postos de revenda de combustíveis expostos ocupacionalmente ao benzeno no município do Rio de Janeiro no período de 2014 a 2016 (n = 217).

Parâmetros	Não Exposto Mediana (min-máx)	Grupo 1 Mediana (min-máx)	Grupo 2 Mediana (min-máx)	p-valor
Parâmetros Bioquímicos				
TGO (U/L)				
Mulheres até 32 e Homens até 40 Mulheres > 32 e Homens > 40	20 (11-45)	18 (11-44)	23 (12-88)	0,255
TGP (U/L)				
Mulheres até 33 e Homens até 41 Mulheres > 33 e Homens > 41	18 (7-83)	16 (6-65)	22 (6-122)	0,656
Gama GT (U/L)				
Mulheres entre 6 e 42 e Homens 10 a 71 Mulheres < 6 > 42 e Homens <10 >71	25 (5-121)	25 (0,8-164)	25,5 (10-780)	0,564
LDH (U/L)				
Entre 240 a 480 < 240 e > 480	337 (228-557)	371 (19-692)	372 (228-635)	0,196
Bilirrubina total (mg/dl)				
< 1,2 > 1,2	0,34 (0,10-0,90)	0,33 (0,07-1,21)	0,43 (0,20-1,43)	0,080
Bilirrubina direta (mg/dl)				
< 0,2 > 0,2	0,14(0,06-0,30)	0,14 (0,06-0,42)	0,17 (0,08-0,44)	0,079
Bilirrubina indireta (mg/dl)				
< 0,8 > 0,8	0,21 (0,03-0,64)	0,19 (0,01-0,79)	0,27 (0,09-1,15)	0,020
Proteína C reativa (PCR) (mg/dl)				
< 0,5 > 0,5	0,13 (0,02-1,11)	0,19 (0,03-1,91)	0,16 (0,03-18,3)	0,019
Fator Reumatoide (UI/ml)				
< 14 > 14	6,25 (0,20-28,50)	8,9 (8-18,9)	8,2 (8-73,7)	0,910
Creatinina (mg/dl)				
Entre 0,3 a 1,3 < 0,3 e > 1,3	0,90 (0,60-1,40)	0,80 (0,50-1,40)	1 (0,7-2,7)	0,470
Parâmetros Hematológicos				
Hemácias (milhões/uL)				
Mulheres 3,9 a 5,6 e Homens 4,5 a 6,5 Mulheres < 3,9 > 5,6 e Homens < 4,5 > 6,5	4,78 (3,82-5,75)	4,63 (3,71-5,63)	4,94 (3,46-5,99)	0,255
Hemoglobina (g/d L)				
Mulheres 11,5 a 16,4 e Homens 13,5 a 18,0 Mulheres < 11,5 > 16,4 3 Homens < 13,5 > 18,0	13,8 (10-17,5)	13,3 (10,8-17,2)	14,6 (9,3-16,8)	0,325
Hematócrito (%)				
Mulheres 36 a 47 e Homens 40 a 54 Mulheres < 36 > 47 e Homens < 40 > 54	42 (33,7-49,9)	40,7 (32,9-51,9)	45,35 (30,2-51,3)	0,462
VGM (fL)				
76 a 96 < 76 e > 96	91,3 (74,6-99,3)	88,7 (75,9-101,5)	91,7 (78,1-101,8)	0,083
HGM (fL)				
27 a 32 < 27 e > 32	30,1 (23-33,3)	29,5 (23,9-32,8)	29,85 (15,3-33,9)	0,642
CHGM (g/dL)				
32 a 36 < 32 e > 36	33,3 (29,7-35,8)	33 (30,7-37,2)	32,6 (30,1-34,5)	0,335
Leucócitos (mm³)				

Continuação da **Tabela 5.6**

4000 a 10000 < 4000 e > 10000	7220 (2780-12030)	7465 (4060-13600)	6650 (3840-11650)	0,732
Neutrófilos (uL)				
40 a 75 < 40 e > 75	58,8 (28-83,2)	54,8 (29,6-75,2)	57,1 (28,8-78,1)	0,551
Eosinófilos (uL)				
1 a 6 < 1 e > 6	1,7 (0,3-11,2)	1,8 (0-26,2)	2,15 (0-13,2)	0,463
Basófilos (uL)				
0 a 1 > 1	0,30 (0,10-1,14)	0,40 (0-1,0)	0,30 (0-1,20)	0,592
Linfócitos (uL)				
20 a 45 < 20 e > 45	31,1 (10,10-57,90)	34,5 (15,2-53,5)	32,3 (12,9-57,9)	0,505
Monócitos (uL)				
2 a 10 < 2 e > 10	6,8 (1,6-19,3)	7 (3,4-11,8)	6,9 (1-15,5)	0,424
Plaquetas (mil/uL)				
150 a 400 < 150 e > 400	251 (148-534)	268,5 (160-573)	255,5 (122-367)	0,882
Reticulócitos (%)				
0,5 a 2,0 < 0,5 e > 2,0	1,08 (0,07-2,37)	0,47 (0,09-2,48)	1,15 (0,48-2,31)	<0,001

Em todas as comparações foi utilizado o teste de Qui-Quadrado.
Os números de indivíduos podem variar devido à perda de informação.
Dados coletados entre o ano de 2014 -2016.

Quando questionados sobre doenças pregressas, a maioria dos indivíduos de ambos os grupos de exposição relataram não possuir as doenças listadas na Tabela 5.3.2. Porém, as doenças hematológicas (p -valor=0,001) foram mais comuns no grupo 2. No que se refere aos sinais e sintomas relatados por eles durante o trabalho, fraqueza (p =0,008), tontura (p <0,001), alteração do humor/depressão (p =0,001) e formigamentos (p =0,014) foram mais comuns no grupo 2 (Tabela 5.8).

Tabela 5.7 – Frequência de doenças pregressas dos trabalhadores de postos de revenda de combustíveis expostos ocupacionalmente ao benzeno (n = 148).

Doenças		Grupo 1 N(%)	Grupo 2 N(%)	p-valor
Doenças Cardiovasculares	Sim	8 (10,8)	7 (9,5)	0,764
	Não	65 (87,8)	67 (90,5)	
Doenças Infecciosas	Sim	5 (6,8)	3 (4,1)	0,467
	Não	69 (93,2)	71 (95,9)	
Doenças Neurológicas	Sim	2 (2,7)	2 (2,7)	1,000
	Não	72 (97,3)	71 (95,9)	
Doenças Respiratórias	Sim	16 (21,6)	11 (14,9)	0,287
	Não	58 (78,4)	63 (85,1)	
Doenças Gastrointestinais	Sim	16 (21,6)	11 (14,9)	0,287
	Não	58 (78,4)	63 (85,1)	
Doenças Hepáticas	Sim	2 (2,7)	4 (5,4)	0,405
	Não	72 (97,3)	70 (94,6)	
Doenças Renais	Sim	5 (6,8)	11 (14,9)	0,112
	Não	69 (93,2)	63 (85,1)	
Doenças Hematológicas	Sim	14 (18,9)	2 (2,7)	0,001
	Não	60 (81,1)	72 (93,7)	
Doenças Endócrinas	Sim	5 (6,8)	2 (2,7)	0,245
	Não	69 (93,2)	72 (93,7)	
Doenças Psíquicas	Sim	3 (4,1)	3 (4,1)	1,000
	Não	71 (95,9)	71 (95,9)	
Doenças Osteoarticulares	Sim	13 (17,6)	15 (20,3)	0,704
	Não	60 (81,1)	59 (79,7)	
Doenças Uro/ginecológicas	Sim	9 (12,2)	4 (5,4)	0,147
	Não	65 (87,8)	70 (94,6)	
Doenças Otorrinolaringológicas	Sim	11 (14,9)	11 (14,9)	1,000
	Não	63 (85,1)	63 (85,1)	
Doenças Oftalmológicas	Sim	19 (25,7)	27 (36,5)	0,189
	Não	53 (71,6)	47 (63,5)	
Doenças de pele	Sim	9 (12,2)	6 (8,1)	0,414
	Não	65 (87,8)	68 (91,9)	

Em todas as comparações foi utilizado o teste de Qui-Quadrado.
Os números de indivíduos podem variar devido à perda de informação.

Dados coletados entre os anos de 2014-2016.

Tabela 5.8 – Principais sinais e sintomas relatados pelos trabalhadores de postos de revenda de combustíveis expostos ocupacionalmente ao benzeno (n=148).

Sinais e sintomas		Grupo 1 N(%)	Grupo 2 N(%)	p-valor
Emagrecimento	Sim	20 (27,4)	8 (10,8)	0,010
	Não	53 (72,6)	66 (89,2)	
Fraqueza	Sim	22 (29,7)	9 (12,2)	0,008
	Não	51 (68,9)	65 (87,8)	
Tontura	Sim	30 (40,5)	8 (10,8)	<0,001
	Não	43 (58,1)	66 (89,2)	
Sonolência	Sim	35 (47,3)	28 (37,8)	0,245
	Não	39 (52,7)	46 (62,2)	
Dificuldade em enxergar	Sim	14 (18,9)	22 (29,7)	0,125
	Não	60 (81,1)	52 (70,3)	
Cefaléia/Dor de cabeça	Sim	38 (48,6)	24 (32,4)	0,045
	Não	38 (51,4)	50 (67,6)	
Irritabilidade/Nervosismo	Sim	28 (37,8)	32 (43,2)	0,503
	Não	46 (62,2)	42 (56,8)	
Ansiedade	Sim	40 (54,1)	36 (48,6)	0,511
	Não	34 (45,9)	38 (51,4)	
Insônia	Sim	18 (24,3)	16 (21,6)	0,696
	Não	56 (75,7)	58 (78,4)	
Alteração de humor/Depressão	Sim	29 (39,2)	11 (14,9)	0,001
	Não	45 (60,8)	63 (85,1)	

Continuação da Tabela 5.8

Alteração de atenção	Sim	24 (32,4)	16 (21,6)	0,139
	Não	50 (67,6)	58 (78,4)	
Alteração da memória	Sim	20 (27)	18(24,3)	0,707
	Não	54 (73)	56(75,7)	
Sudorese noturna	Sim	11 (14,9)	13 (17,6)	0,656
	Não	63 (85,1)	61 (82,4)	
Formigamentos	Sim	25 (33,8)	12 (16,2)	0,014
	Não	49 (66,2)	62 (83,8)	
Movimentos involuntários	Sim	24 (32,4)	14 (18,9)	0,060
	Não	50 (67,6)	60(81,1)	
Tremores	Sim	9 (12,2)	9 (12,2)	1,000
	Não	65 (87,8)	65 (87,8)	
Cãibras	Sim	36 (48,6)	25(33,8)	0,056
	Não	37 (50,0)	49(66,2)	
Diminuição da força muscular	Sim	11 (14,9)	12 (16,2)	0,821
	Não	63 (85,1)	62 (83,8)	
Convulsões	Sim	1 (1,4)	0 (0,0)	0,316
	Não	73 (98,6)	74 (100,0)	
Petéquiias	Sim	5 (6,8)	1 (1,4)	0,095
	Não	69 (93,2)	73 (98,6)	
Hematomas	Sim	11 (14,9)	5 (6,8)	0,112
	Não	63 (85,1)	69 (93,2)	
Epistaxe	Sim	6 (8,1)	3 (4,1)	0,302
	Não	68 (91,9)	71(95,9)	

Em todas as comparações foi utilizado o teste de Qui-Quadrado.

Os números de indivíduos podem variar devido à perda de informação.

Dados coletados entre os anos de 2014 -2016.

A maioria das mulheres pertencia ao grupo 1 de exposição, isto é, expostas apenas por via inalatória (Tabela 5.9). Quanto aos dados reprodutivos, nesse grupo de exposição, a maioria possuía pelo menos um filho (54,9%), enquanto no grupo 2 a maioria das mulheres não possuía filhos (57,1%), porém a diferença não foi significativa ($p=0,513$). Uma frequência de cerca de 14% de abortos espontâneos foi observada nos grupos de exposição, com quase a totalidade ocorrendo no primeiro trimestre de gestação.

Tabela 5.9 – Dados Reprodutivos das trabalhadoras de postos de revenda de combustíveis expostas ocupacionalmente ao benzeno (n=58).

Eventos Reprodutivos	Grupo 1 N (%)	Grupo 2 N (%)	p-valor
Possui filhos			
Sim	28 (54,9)	3 (42,9)	0,513
Não	22 (43,1)	4 (57,1)	
Filhos: Mediana (min-máx)	1 (0-7)	2 (1- 4)	
Aborto espontâneo			
Sim	7 (13,7)	1 (14,3)	0,984
Não	43 (84,3)	6 (85,7)	
1º trimestre	5 (9,8)	1 (14,3)	
2º trimestre	1 (2,0)	0 (0)	
3º trimestre	1 (2,0)	0 (0)	
Aborto induzido			
Sim	2 (3,9)	0 (0)	0,590
Não	48 (94,1)	7 (100)	

Em todas as comparações foi utilizado o teste de Qui-Quadrado.
Os números de indivíduos podem variar devido à perda de informação.
Dados coletados entre os anos de 2014 -2016.

5.4 Dados de exposição avaliada pelo biomarcador (AttM)

Entre os indivíduos não expostos ocupacionalmente ao benzeno, não foi encontrado nenhum valor de AttM acima de 0,5 mg/g de creatina. No grupo 1 e 2, 16,9% e 17,6% dos trabalhadores apresentaram um nível de AttM na urina maior que 0,5 mg/g creatinina, respectivamente (Tabela 5.10). Quando os níveis de AttM foram avaliados de acordo com a localização do posto de revenda de combustível (Tabela 5.11), 25,0% dos indivíduos provenientes de postos do centro e 14,7% dos indivíduos que trabalhavam em postos da zona sul apresentavam níveis acima do limite estabelecido pela legislação.

Tabela 5.10 – Níveis do ácido trans,trans-mucônico nos trabalhadores de postos de revenda de combustíveis expostos ao benzeno (n = 148).

Biomarcador de exposição AttM (mg/g creatinina)	Grupo 1 N(%)	Grupo 2 N(%)	p-valor
Até 0,5	59 (83,1)	61 (82,4)	0,915
> 0,5	12 (16,9)	13 (17,6)	
Média±Desvio-padrão)	0,41±0,98	0,25±0,44	

Em todas as comparações foi utilizado o teste de Qui-Quadrado.
Os números de indivíduos podem variar devido à perda de informação.

Tabela 5.11 – Níveis do ácido trans,trans-mucônico no trabalhadores expostos ao benzeno de acordo com a localização geográfica do posto de revenda de combustíveis (n = 148).

Local de Posto de Combustível	Centro	Zona Sul	p-valor
AttM (mg/g creatinina)*	N(%)	N(%)	
Até 0,5	27 (75,0)	93 (85,3)	0,155
> 0,5	9 (25,0)	16 (14,7)	
Média±Desvio-padrão)	0,40±0,62	0,30±0,79	

Em todas as comparações foi utilizado o teste de Qui-Quadrado. Os números de indivíduos podem variar devido à perda de informação.

Em seguida, os níveis de AttM foram comparados entre os grupos. Um aumento estatisticamente significativo foi observado no grupo exposto (1 e 2, mediana = 0,1000) quando comparado ao grupo não exposto (mediana = 0,0380) (Figura 5.1A). Quando o grupo de indivíduos expostos foi dividido por via de exposição, tanto a exposição apenas por via inalatória quanto a exposição por via inalatória e dérmica (mediana = 0,1000) levou a um aumento significativo dos níveis de AttM na urina quando esses valores foram comparados a indivíduos não expostos ocupacionalmente ao benzeno (mediana = 0,0380) (Figura 5.1B).

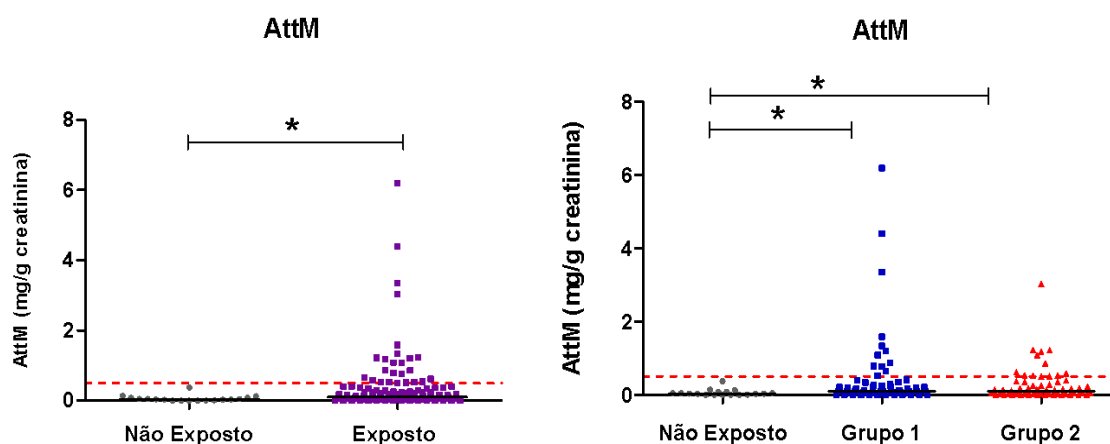


Figura 5.1 Avaliação do ácido trans,trans-mucônico na urina dos grupos não-exposto e exposto ocupacionalmente ao benzeno. (A) Gráfico de pontos mostrando os níveis de ácido trans,trans-mucônico (AttM) de cada indivíduo dos grupos não exposto e exposto ocupacionalmente ao benzeno. Teste de Mann Whitney, p-valor = 0,0009. (B) Gráfico de pontos mostrando os níveis de AttM de cada indivíduo dos grupos não exposto, grupo 1 e grupo 2. Teste de Kruskal Wallis, p-valor = 0,0053; e pós teste de Dunn, *p-valor < 0,05. A linha tracejada em vermelho representa o valor biológico do biomarcador de exposição preconizado por lei (0,5 AttM mg/g de creatinina).

Por fim, foi analisada a associação entre tabagismo, etilismo e consumo de alimentos processados e a concentração de AttM na urina desses trabalhadores. Não houve diferença estatisticamente significativa de acordo com as variáveis testadas (Tabela 5.12).

Tabela 5.12 - Análise de associação entre os hábitos/estilo de vida dos trabalhadores expostos ocupacionalmente ao benzeno e o biomarcador de exposição (n=148).

Hábitos/Estilo de vida		AttM (mg/g creatinina)		p-valor
		Até 0,5 N(%)	> 0,5 N(%)	
Tabagismo	Não fumante	109 (90,8)	20 (80,0)	0,116
	Fumante/Exfumante	11 (9,2)	5 (20,0)	
Etilismo	Sim	71 (59,2)	14 (56,0)	0,770
	Não	49 (40,8)	11 (44,0)	
Alimentos processados	Não consome	14 (12,0)	2 (8,7)	0,893
	1 a 2 vezes	57 (48,7)	12 (52,2)	
	> 2 vezes	46 (39,3)	9 (39,1)	

Em todas as comparações foi utilizado o teste de Qui-Quadrado.

Os números de indivíduos podem variar devido à perda de informação.

5.5 Dados de genotoxicidade (CITOTOXICIDADE E ENSAIO COMETA)

Todos os grupos apresentaram uma citotoxicidade inferior a 10%. No grupo não exposto, 76,8% apresentaram 100% de células viáveis no teste de citotoxicidade (Teste de Fluoresceína). Os demais indivíduos do grupo apresentaram letalidade celular entre 0,5% a 2,0%, tendo sido 0,5% o grau de citotoxicidade observado em 14,4% deste grupo. No grupo exposto, 61,4% apresentaram 100% das células viáveis. A letalidade celular variou entre 0,5% a 7,5%, sendo que 21,6% dos indivíduos expostos apresentaram grau de letalidade de 0,5%.

De acordo com os resultados obtidos no ensaio cometa, o dano genotóxico (UAT) foi maior no grupo exposto ocupacionalmente ao benzeno (mediana = 8,0) do que o grupo não exposto (mediana = 6,0) ($p=0,0019$) (Figura 5.2A).

Ao estratificar o grupo de exposição por vias de exposição, o grupo 1 apresentou uma mediana maior (9,5) comparado ao grupo não exposto ($p=0,0045$) (Figura 5.2B). Não foram observadas diferenças entre os grupos não exposto e grupo 2 e entre os expostos ocupacionalmente ao benzeno.

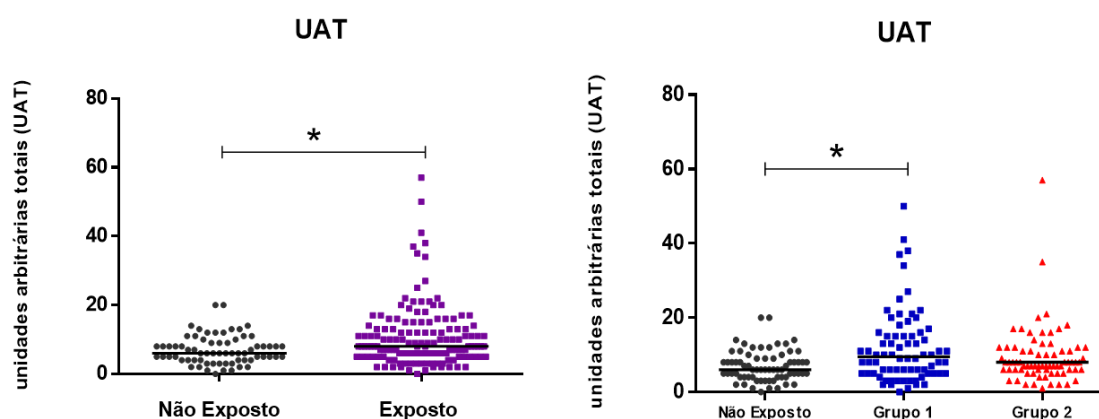


Figura 5.2. Avaliação de genotoxicidade em células do sangue periférico de indivíduos não-expostos e expostos ocupacionalmente ao benzeno. (A) Gráfico de pontos mostrando os valores de unidades arbitrárias totais (UAT) de cada indivíduo dos grupos não exposto e exposto ocupacionalmente ao benzeno. Teste de Mann Whitney, p-valor = 0,0019. (B) Gráfico de pontos mostrando os valores de UAT de cada indivíduo dos grupos não exposto, grupo 1 e grupo 2. Teste de Kruskal Wallis, p-valor = 0,0045; e pós Teste de Dunn, *p-valor < 0,05.

Quanto às classes de danos observadas pelo ensaio, a “Classe 0”, correspondente à ausência de dano ao DNA, foi mais frequentemente observada no grupo não exposto (mediana de 96,0) do que no grupo exposto (mediana de 94,67) ($p=0,0011$) (Tabela 5.13). Já a “Classe 1”, foi significativamente mais frequente entre os indivíduos expostos, quando comparados aos indivíduos do grupo não exposto (mediana de 3,33) ($p=0,0006$). As “classes 2 e 3” não diferiram entre os grupos (Tabela 5.13).

Tabela 5.13 Distribuição da classe de danos ao DNA nos trabalhadores do grupo não exposto e exposto ao benzeno.

Classe de dano ao DNA	Não-exposto	Grupo 1	Grupo 2	p-valor
	(n =69)	(n =74)	(n = 74)	
	Mediana±Desvio-Padrão			
Classe 0	96,0±2,34	94,67±6,34	95,3±5,13	<0,001
Classe 1	3,33±2,25	5,33±6,22	4,66±5,13	
Classe 2	0,0±0,50	0,0±0,42	0,0±0,29	
Classe 3	0,0±0,21	0,0±0,33	0,0±0,13	

Teste Kruskal Wallis e pós teste de Dunn, p-valor<0, 05.

Os números de indivíduos podem variar devido à perda de informação.

No intuito de observar uma possível relação entre o biomarcador de exposição com os danos genotóxicos avaliados pelo teste cometa, foram realizadas as análises de correlação entre os níveis de AttM e os valores de UAT em todos os grupos investigados. Porém, não foi observada nenhuma correlação linear significativa entre eles ($p > 0,05$) (Figura 5.3).

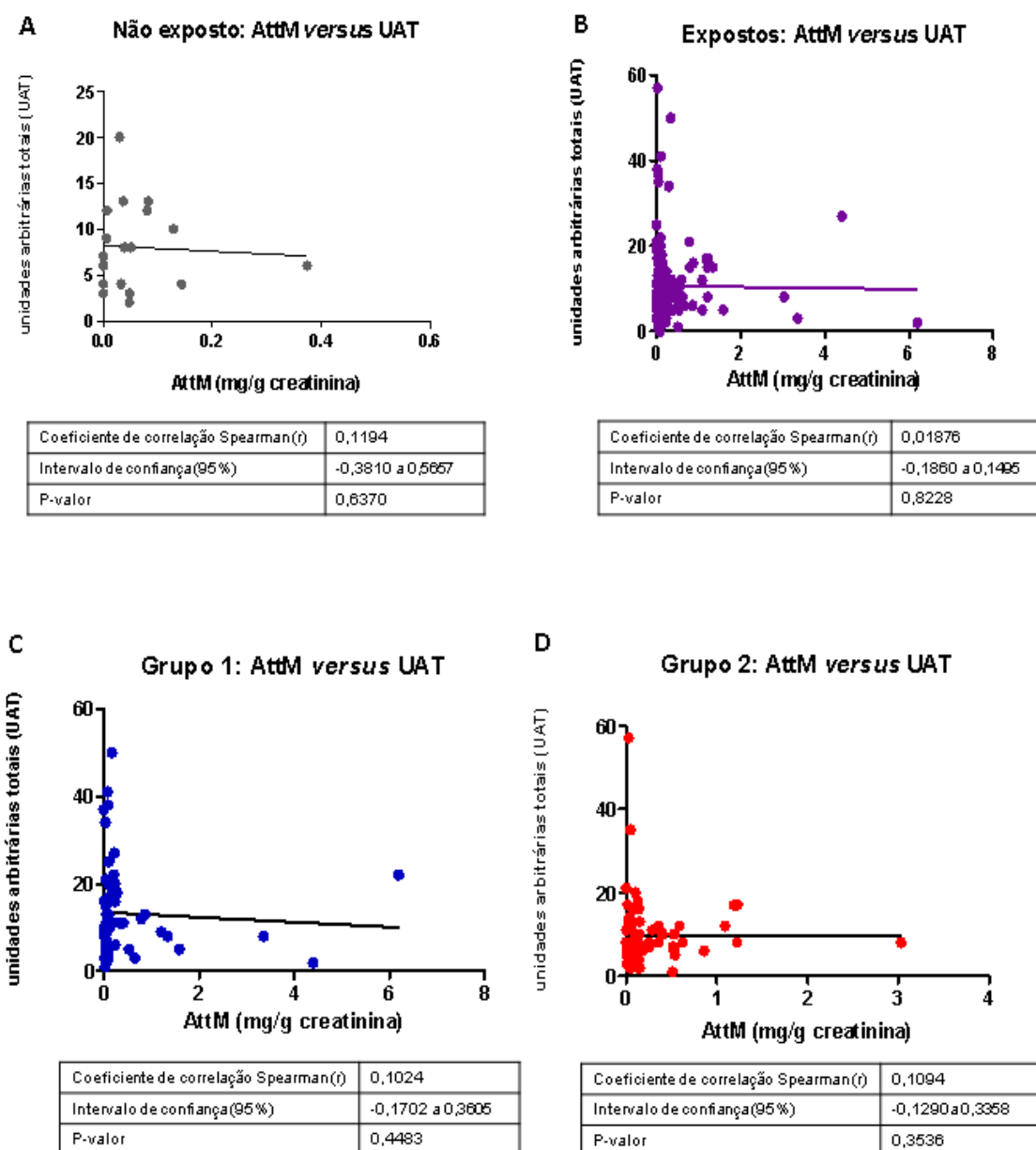


Figura 5.3. Análises de correlação entre os níveis do biomarcador de exposição ao benzeno e os níveis de genotoxicidade. Gráficos de correlação entre os níveis de ácido trans,trans-mucônico (AttM) e unidades arbitrárias totais (UAT) em indivíduos não expostos ocupacionalmente ao benzeno (A); indivíduos expostos ocupacionalmente ao benzeno (B); indivíduos expostos ocupacionalmente ao benzeno por via inalatória – grupo 1 (C); indivíduos expostos ocupacionalmente ao benzeno por via inalatória e dérmica – grupo 2 (D). Teste de Spearman.

Com o intuito de avaliar se o atual biomarcador de exposição ao benzeno (AttM) é capaz de indicar a ocorrência de danos genotóxicos em células do sangue periférico de indivíduos expostos ocupacionalmente ao agente carcinogênico, inicialmente classificamos os indivíduos de acordo com a presença de danos. Para isso, foi considerado um valor de nível basal de danos genotóxicos com um UAT menor ou igual a 6, valor baseado na mediana de UAT do grupo não exposto. Já os valores acima do nível basal estipulado foram considerados como danos ao material genético. Os níveis urinários de AttM não diferiram significativamente entre os grupos (Figura 5.4A). Em seguida, foi feita a análise por curva ROC (do inglês *Receiver Operating Characteristic*) para avaliar se seria possível estabelecer um nível de AttM capaz de distinguir os grupos sem e com alterações genotóxicas. Porém, novamente, a análise não mostrou resultados estatisticamente significativos (Figura 5.4B).

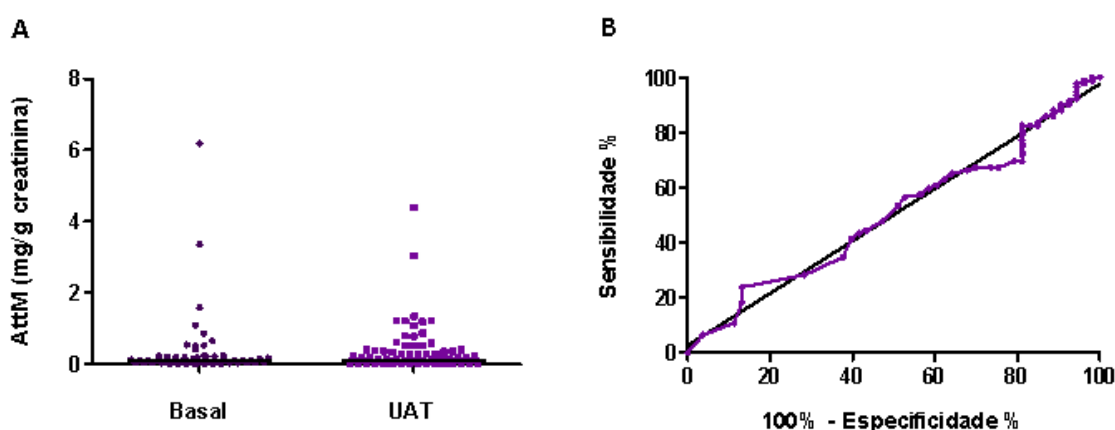


Figura 5.4. Avaliação dos níveis do ácido trans,trans-mucônico em indivíduos expostos ocupacionalmente ao benzeno de acordo com a presença de danos genotóxicos no sangue periférico. (A) Gráfico de pontos mostrando os níveis de ácido trans,trans-mucônico (AttM) em indivíduos sem danos genotóxicos (Basal) e com danos genotóxicos (UAT). Os grupos foram definidos de acordo com a mediana de UAT do grupo não exposto, sendo que os valores acima deste nível estipulado como basal foram considerados como danos ao material genético (UAT), p-valor = 0,9574. (B) Curva ROC para a discriminação de indivíduos expostos ocupacionalmente ao benzeno sem danos genotóxicos ao DNA em células do sangue periférico e com danos, de acordo com os níveis de AttM. p-valor = 0,9256.

5.5.1 Dados de alterações hematológicas dos trabalhadores expostos ocupacionalmente ao benzeno

As alterações hematológicas consideradas para o estudo foram aumento de leucócitos no sangue (leucocitose) e a diminuição dos mesmos (leucopenia) (Tabela 5.14). O grupo 1 apresentou oito indivíduos (10,81%) com leucocitose e nenhum apresentou leucopenia. Já esses números foram de seis (8,10%) e três (4,05%) para o grupo 2, respectivamente.

Tabela 5.14. Trabalhadores de postos de revenda de combustíveis expostos ocupacionalmente ao benzeno que apresentaram alterações hematológicas (N=17).

Alterações hematológicas	Grupo 1 N (%)	Grupo 2 N (%)	p-valor
Leucocitose	8 (10,81)	6 (8,10)	0,5743
Leucopenia	0 (100)	3 (4,05)	0,0801

Teste do Qui quadrado, $p < 0,05$.

Coleta realizada nos anos de 2014 a 2016.

Os níveis urinários de AttM não diferiram significativamente entre os indivíduos com e sem alteração hematológica (Figura 5.5A). Em seguida, foi feita a análise por curva ROC (do inglês *Receiver Operating Characteristic*) para avaliar se seria possível estabelecer um nível de AttM capaz de distinguir os grupos. Porém, novamente, a análise não mostrou resultados estatisticamente significativos (Figura 5.5B).

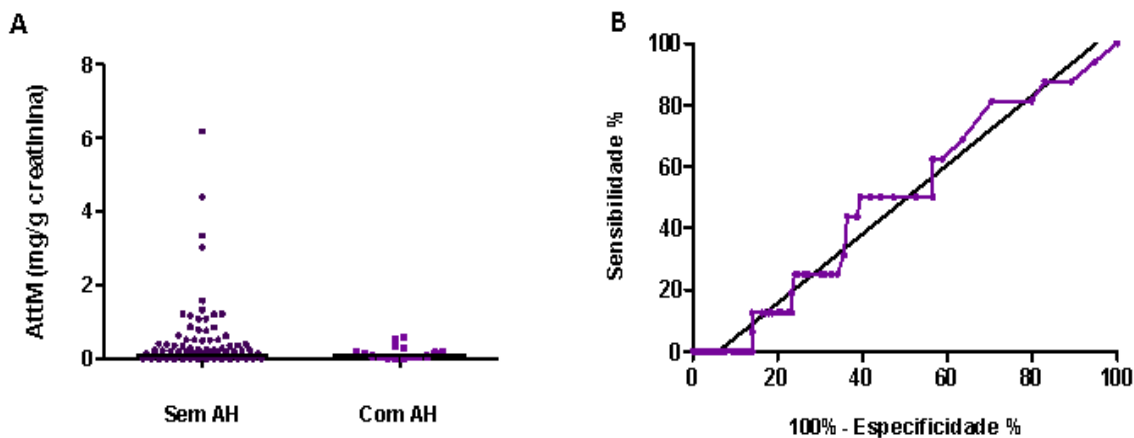


Figura 5.5. Avaliação dos níveis de ácido trans,trans-mucônico em indivíduos expostos ocupacionalmente ao benzeno de acordo com a presença alterações hematológicas. (A) Gráfico de pontos mostrando os níveis de ácido trans,trans-mucônico (AttM) em indivíduos sem alterações hematológicas (Sem AH) e com alterações hematológicas (Com AH). p-valor = 1,000. (B) Curva ROC para a discriminação de indivíduos expostos ocupacionalmente ao benzeno sem e com alterações hematológicas, de acordo com os níveis de AttM. p-valor = 1,000.

5.6 Dados não genotóxicos (EPIGENÉTICOS)

5.6.1 Perfil global de metilação

Com o objetivo de avaliar se os níveis globais de metilação eram afetados pela exposição ocupacional ao benzeno, avaliamos os níveis de metilação dos dois elementos repetitivos mais abundantes no genoma humano, LINE-1 e Alu, em células do sangue periférico dos indivíduos incluídos no estudo. Os níveis de metilação do elemento transponível LINE-1 diferiram significativamente entre os grupos de indivíduos não expostos (mediana de 67,12%) e expostos ocupacionalmente ao benzeno (mediana de 67,49%) (Figura 5.6A). Em seguida, estratificamos o grupo de exposição ocupacional ao benzeno em grupo 1 (expostos apenas por via inalatória) e grupo 2 (expostos por via inalatória e por via dérmica). Esta análise mostrou um aumento significativo dos níveis de metilação de LINE-1 no grupo 2 (mediana de 69,45%) em comparação aos indivíduos não expostos (mediana de 67,12%) e ao grupo 1 (mediana de 66,93%) (Figura 5.6B).

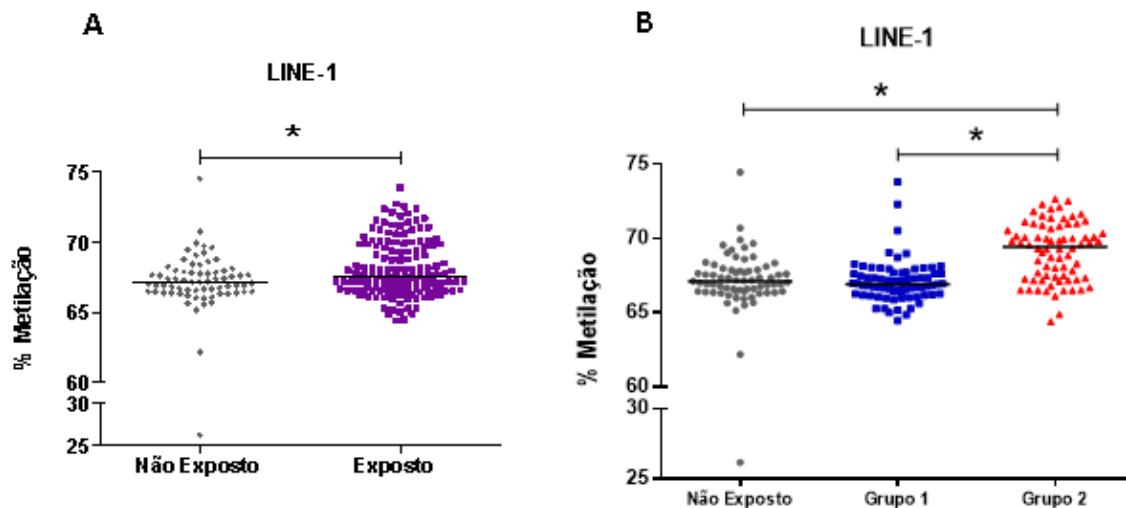


Figura 5.6. Perfil de metilação de LINE-1 de acordo com a exposição ocupacional ao benzeno. (A) Gráfico de pontos mostrando os níveis de metilação de LINE-1 em indivíduos não expostos (Não Exposto) e expostos ocupacionalmente ao benzeno (Exposto). Teste de Mann Whitney, p-valor = 0,0113. (B) Gráfico de pontos mostrando os níveis de metilação de LINE-1 em indivíduos não expostos ocupacionalmente (Não Exposto), expostos ocupacionalmente por via inalatória (Grupo 1) e expostos ocupacionalmente por via inalatória e dérmica (Grupo 2). Teste de Kruskal Wallis, p-valor < 0,0001; e pós teste de Dunn, *p-valor < 0,05.

Avaliamos ainda o perfil de metilação de LINE-1 nos indivíduos expostos, de acordo com a presença de danos genotóxicos e de alterações hematológicas. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os indivíduos com danos genotóxicos e sem danos (Figura 5.7A), ou entre os indivíduos com alterações hematológicas e sem alterações (Figura 5.7B).

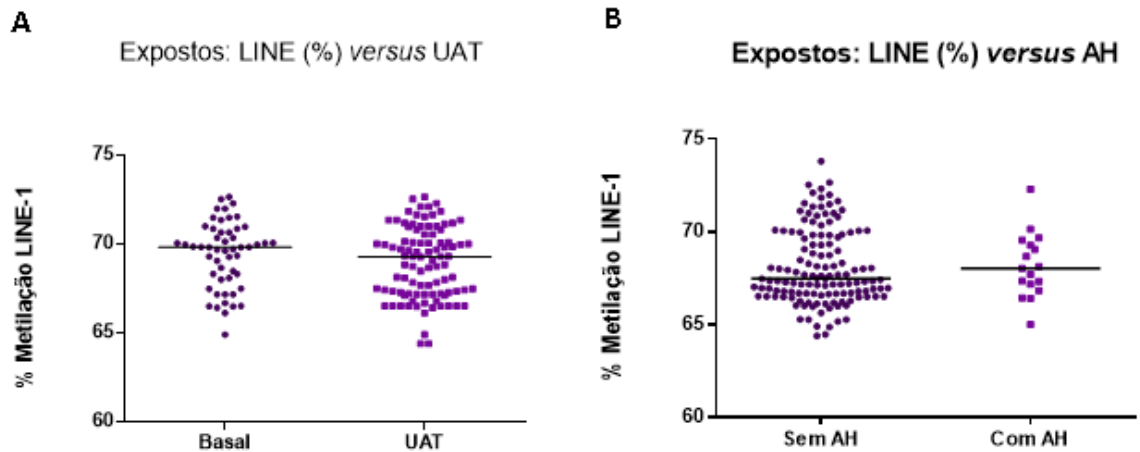


Figura 5.7. Perfil de metilação de LINE-1 de acordo com a presença de danos genotóxicos e de alterações hematológicas em indivíduos expostos ocupacionalmente ao benzeno. (A) Gráfico de pontos mostrando a porcentagem de metilação de LINE-1 em indivíduos expostos ocupacionalmente ao benzeno que apresentaram danos genotóxicos no sangue periférico (UAT) em comparação àqueles que não apresentaram (Basal). Os grupos foram definidos de acordo com a mediana de UAT do grupo não exposto, sendo que os valores acima deste nível estipulado como basal foram considerados como danos ao material genético (UAT). Teste de Mann Whitney, p-valor = 0,2113. (B) Gráfico de pontos mostrando a porcentagem de metilação de LINE-1 em indivíduos expostos ocupacionalmente ao benzeno que apresentaram alterações hematológicas (Com AH) em comparação àqueles que não apresentaram (Sem AH). As alterações hematológicas consideradas foram leucocitose e leucopenia. Teste de Mann Whitney, p-valor = 0,5967.

Ainda entre os indivíduos expostos ocupacionalmente ao benzeno, avaliamos uma possível correlação entre os níveis de AttM e metilação de LINE-1 (Figura 5.8A), e entre os valores de UAT e metilação de LINE-1 (Figura 5.8B). Porém, nenhuma correlação estatisticamente significativa foi observada.

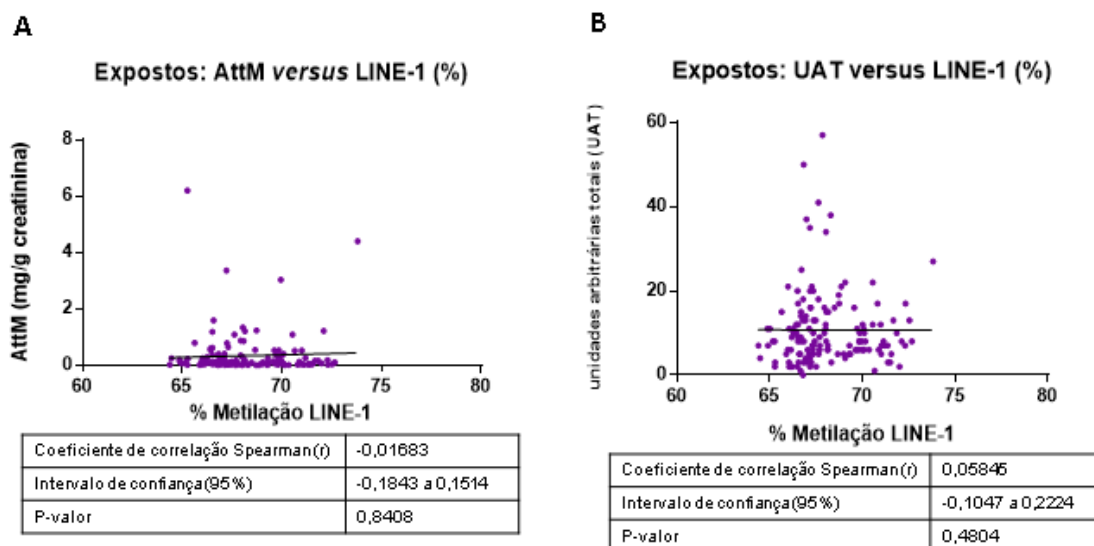


Figura 5.8. Correlação entre o nível de metilação de LINE-1 e o biomarcador de exposição ao benzeno e a quantidade de danos genotóxicos em indivíduos expostos ocupacionalmente ao benzeno. (A) Gráfico de correlação entre a porcentagem de metilação de LINE-1 e os valores do ácido trans,trans-mucônico (AttM) em indivíduos expostos ocupacionalmente ao benzeno. (B) Gráfico de correlação entre a porcentagem de metilação de LINE-1 e as unidades arbitrárias totais (UAT) definidas para avaliação de dano genotóxico. Teste de Spearman.

Já o elemento Alu apresentou uma hipometilação no grupo exposto (mediana de 80,37%) em comparação ao grupo não exposto (mediana de 84,87%) (Figura 5.9A). Ao estratificarmos o grupo exposto de acordo com a via de exposição, observamos uma queda de metilação nos grupos 1 (mediana de 82,17%) e 2 (mediana de 75,23%) em relação ao grupo não exposto (mediana de 84,87%), sendo mais proeminente no grupo 2 (Figura 5.9B).

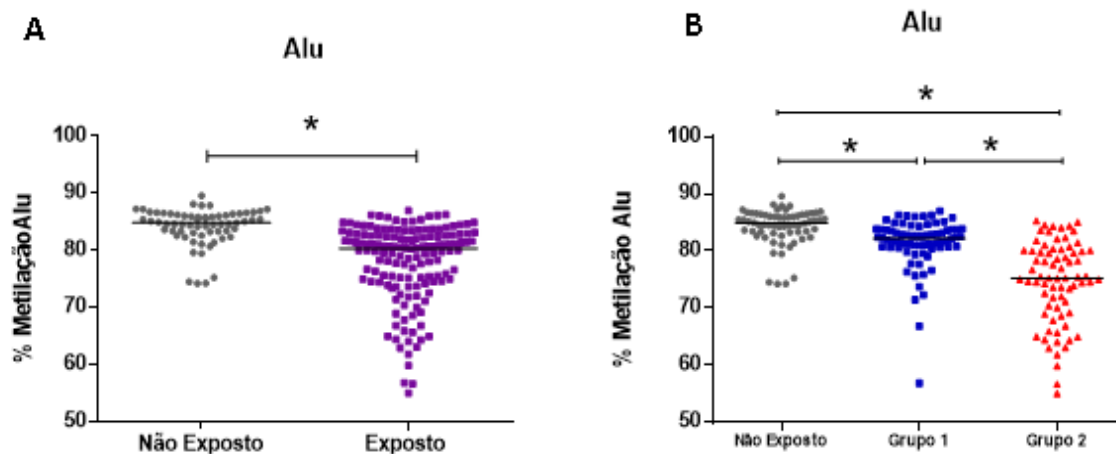


Figura 5.9. Perfil de metilação de Alu de acordo com a exposição ocupacional ao benzeno. (A) Gráfico de pontos mostrando os níveis de metilação de Alu em indivíduos não expostos e expostos ocupacionalmente ao benzeno. Teste de Mann Whitney, p-valor < 0,0001. (B) Gráfico de pontos mostrando os níveis de metilação de Alu em indivíduos não expostos ocupacionalmente, indivíduos expostos ocupacionalmente por via inalatória (Grupo 1) e indivíduos expostos ocupacionalmente por via inalatória e dérmica (Grupo 2). Teste de Kruskal Wallis, p-valor < 0,0001; e pós teste de Dunn, *p-valor < 0,05.

Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas quando avaliamos o perfil de metilação de Alu de acordo com a presença de danos genotóxicos (Figura 5.10A) ou de acordo com a presença de alterações hematológicas (Figura 5.10B).

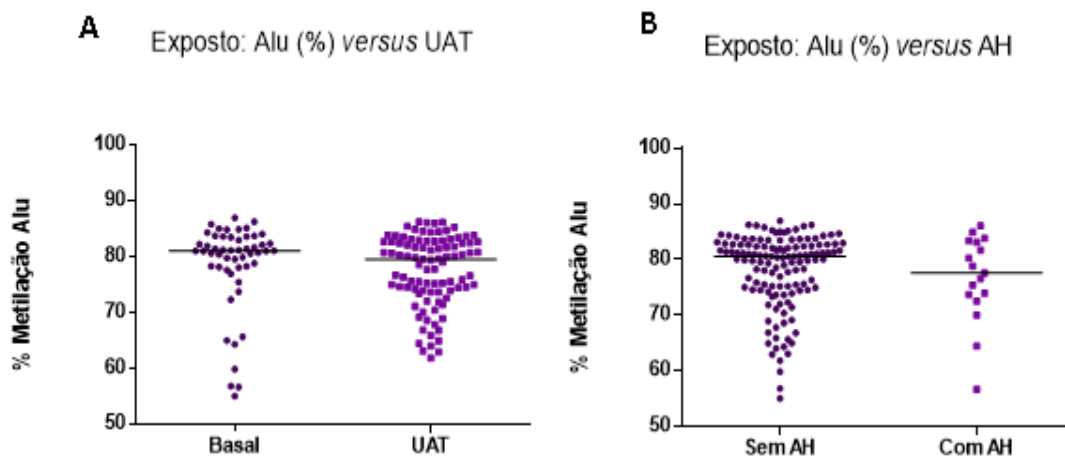


Figura 5.10. Perfil de metilação de Alu de acordo com a presença de danos genotóxicos e de alterações hematológicas em indivíduos expostos ocupacionalmente ao benzeno. (A) Gráfico de pontos mostrando a porcentagem de metilação de Alu em indivíduos expostos ocupacionalmente ao benzeno que apresentaram danos genotóxicos no sangue periférico (UAT) em comparação àqueles que não apresentaram (Basal). Os grupos foram definidos de acordo com a mediana de UAT do grupo não exposto, sendo que os valores acima deste nível estipulado como basal foram considerados como danos ao material genético (UAT). Teste de Mann Whitney, p-valor = 0,1198. (B) Gráfico de pontos mostrando a porcentagem de metilação de Alu em indivíduos expostos ocupacionalmente ao benzeno que apresentaram alterações hematológicas (Com AH) em comparação àqueles que não apresentaram (Sem AH). As alterações hematológicas consideradas foram leucocitose e leucopenia. Teste de Mann Whitney, p-valor = 0,4949.

Nossas análises mostraram ainda que a porcentagem de metilação de Alu em células do sangue periférico de indivíduos expostos ao benzeno não está correlacionada com os níveis urinários do biomarcador de exposição (AttM) (Figura 5.11A) ou com os níveis de danos genotóxicos no sangue dos mesmos indivíduos (Figura 5.11B).

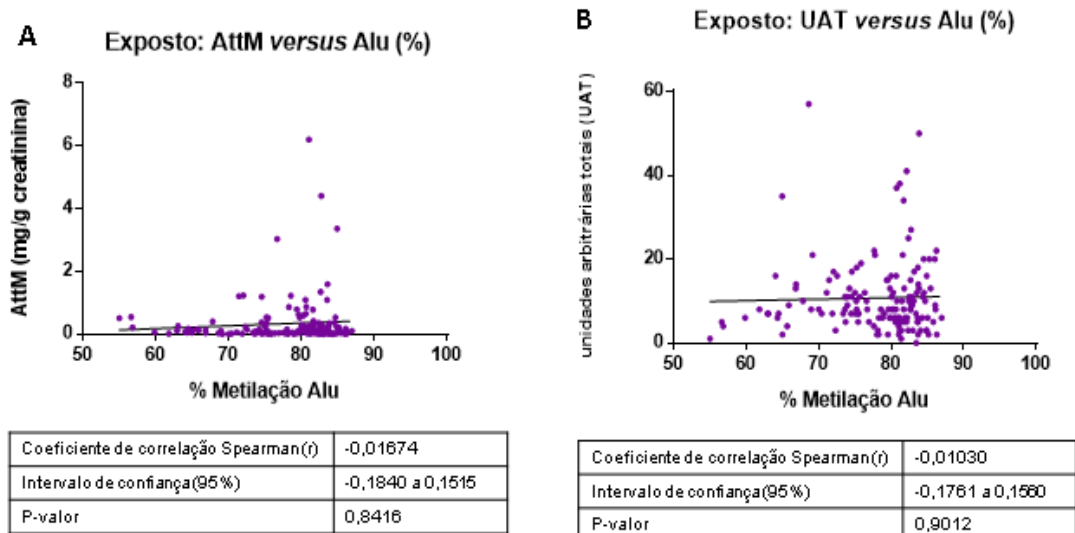


Figura 5.11. Correlação entre o perfil de metilação de Alu e o biomarcador de exposição ao benzeno e a quantidade de danos genotóxicos em indivíduos expostos ocupacionalmente ao benzeno. (A) Gráfico de correlação entre a porcentagem de metilação de Alu e os valores do ácido trans,trans-mucônico (AttM) em indivíduos expostos ocupacionalmente ao benzeno. (B) Gráfico de correlação entre a porcentagem de metilação de Alu e as unidades arbitrárias totais (UAT) definidas para avaliação de dano genotóxico. Teste de Spearman.

5.6.2 Perfil de metilação dos genes de reparo

Além dos níveis globais de metilação, avaliamos também se genes envolvidos em vias de reparo distintas poderiam ter o perfil de metilação de suas regiões promotoras afetado pela exposição ocupacional ao benzeno. Entre os genes de reparo avaliados nesse estudo, o gene *MGMT*, envolvido no reparo direto de guaninas metiladas, não apresentou níveis de metilação estatisticamente diferentes entre o grupo não exposto e exposto ocupacionalmente ao benzeno (Figura 5.12A). Já ao estratificarmos os grupos de exposição, o grupo 2 apresentou uma menor metilação (mediana 2,55%) em relação aos outros grupos (Figura 5.12B).

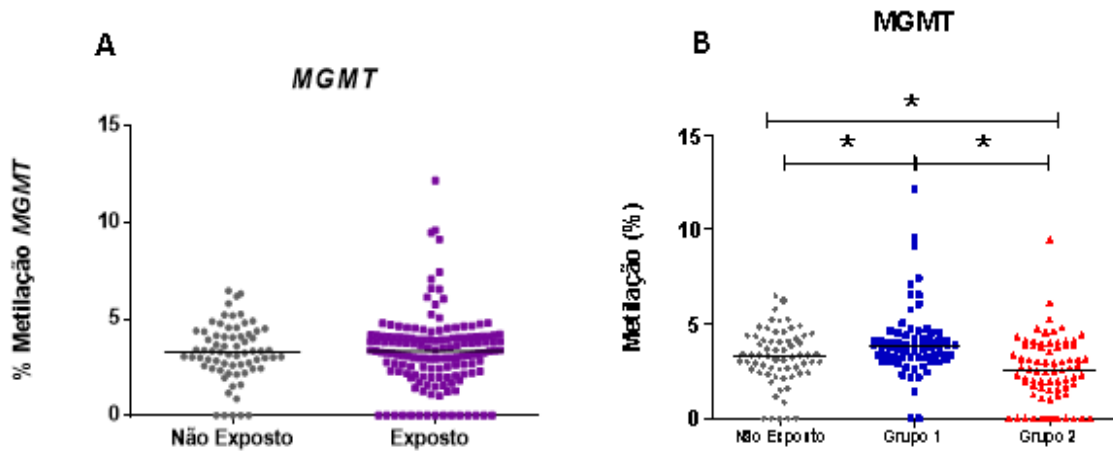


Figura 5.12. Perfil de metilação de *MGMT* de acordo com a exposição ocupacional ao benzeno. (A) Gráfico de pontos mostrando os níveis de metilação de *MGMT* em indivíduos não expostos (Não Exposto) e expostos ocupacionalmente ao benzeno (Exposto). Teste de Mann Whitney, p-valor = 0,6968. (B) Gráfico de pontos mostrando os níveis de metilação de *MGMT* em indivíduos não expostos ocupacionalmente, indivíduos expostos ocupacionalmente por via inalatória (Grupo 1) e indivíduos expostos ocupacionalmente por via inalatória e dérmica (Grupo 2). Teste de Kruskal Wallis, p-valor < 0,0001; e pós teste de Dunn, *p-valor < 0,05.

Os níveis de metilação de *MGMT* também foram comparados de acordo com a presença de danos genotóxicos e de alterações hematológicas no grupo exposto. Indivíduos com danos genotóxicos apresentaram uma menor metilação de *MGMT* (mediana de 3,64%) em comparação ao grupo sem danos (mediana de 4,07%) (Figura 5.13A). Por outro lado, os níveis de metilação de *MGMT* não variaram significativamente de acordo com a presença de alterações hematológicas (Figura 5.13B).

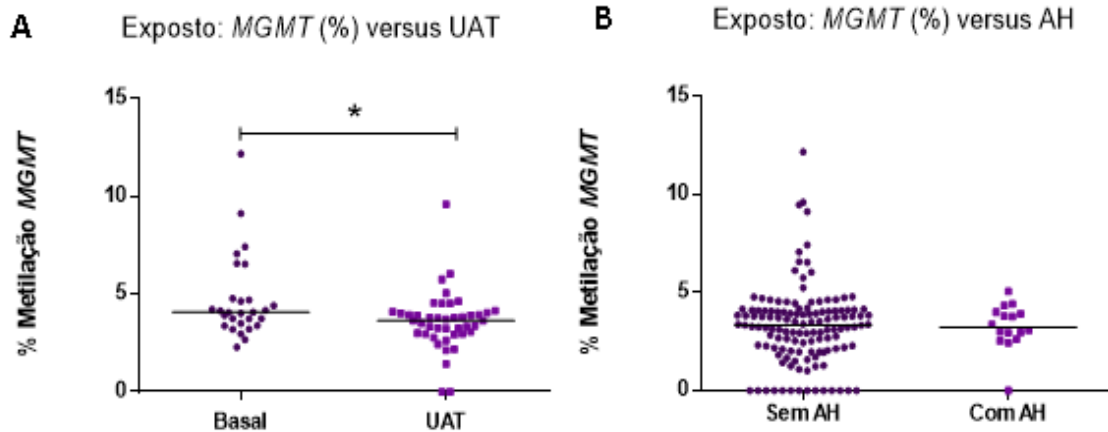


Figura 5.13. Perfil de metilação de *MGMT* de acordo com a presença de danos genotóxicos e de alterações hematológicas em indivíduos expostos ocupacionalmente ao benzeno. (A) Gráfico de pontos mostrando a porcentagem de metilação de *MGMT* em indivíduos expostos ocupacionalmente ao benzeno que apresentaram danos genotóxicos no sangue periférico (UAT) em comparação àqueles que não apresentaram (Basal). Os grupos foram definidos de acordo com a mediana de UAT do grupo não exposto, sendo que os valores acima deste nível estipulado como basal foram considerados como danos ao material genético (UAT). Teste de Mann Whitney, p-valor = 0,0154. (B) Gráfico de pontos mostrando a porcentagem de metilação de *MGMT* em indivíduos expostos ocupacionalmente ao benzeno que apresentaram alterações hematológicas (Com AH) em comparação àqueles que não apresentaram (Sem AH). As alterações hematológicas consideradas foram leucocitose e leucopenia. Teste de Mann Whitney, p-valor = 0,8870. *p < 0,05.

Avaliamos em seguida se os níveis de metilação de *MGMT* poderiam estar correlacionados com os níveis urinários de AttM (Figura 5.14A) ou com os valores de UAT (Figura 5.14B), porém nenhuma correlação estatisticamente significativa foi encontrada.

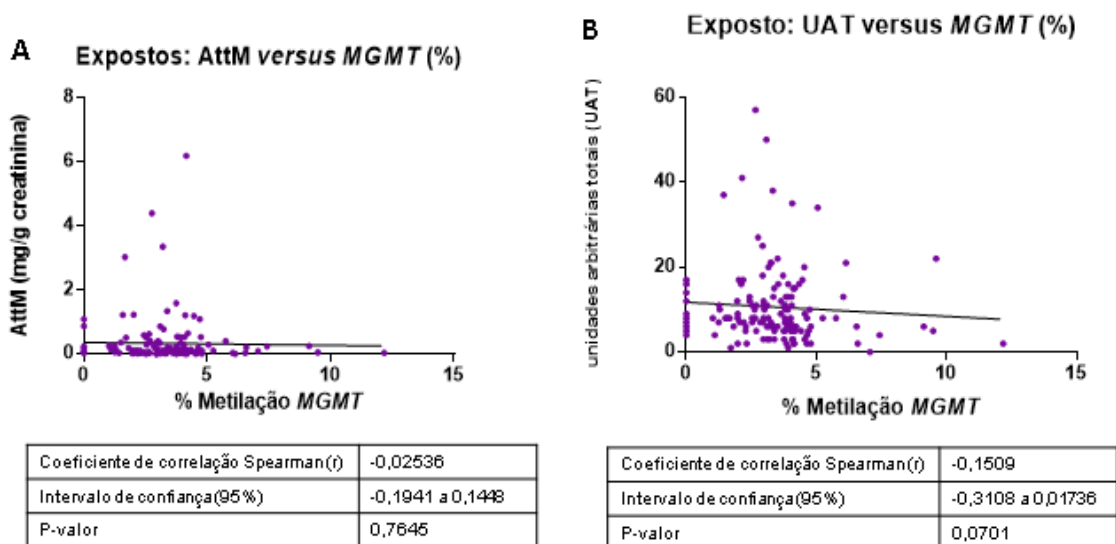


Figura 5.14. Correlação entre o nível de metilação de *MGMT* e o biomarcador de exposição ao benzeno e a quantidade de danos genotóxicos em indivíduos expostos ocupacionalmente ao benzeno. (A) Gráfico de correlação entre a porcentagem de metilação de *MGMT* e os valores do ácido trans,trans-mucônico (AttM) em indivíduos expostos ocupacionalmente ao benzeno. (B) Gráfico de correlação entre a porcentagem de metilação de *MGMT* e as unidades arbitrárias totais (UAT) definidas para avaliação de dano genotóxico. Teste de *Spearman*.

Em seguida, avaliamos o perfil de metilação do gene *PARP-1*, envolvido na sinalização de diferentes tipos de danos, como quebras de fita simples e dupla. A região promotora de *PARP-1* não foi encontrada diferencialmente metilada entre o grupo exposto ocupacionalmente ao benzeno e o grupo não exposto (Figura 5.15A). Por outro lado, o grupo 1 apresentou maiores níveis de metilação de *PARP-1* (mediana de 2,80%) em comparação ao grupo 2 (mediana de 1,76%) (Figura 5.15B).

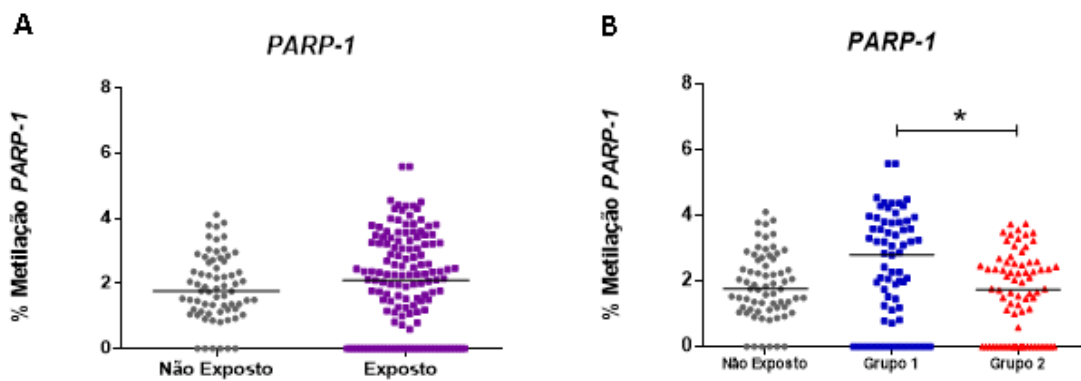


Figura 5.15. Perfil de metilação de *PARP-1* de acordo com a exposição ocupacional ao benzeno. (A) Gráfico de pontos mostrando os níveis de metilação de *PARP-1* em indivíduos não expostos e expostos ocupacionalmente ao benzeno. Teste de Mann Whitney, p-valor = 0,4128. (B) Gráfico de pontos mostrando os níveis de metilação de *PARP-1* em indivíduos não expostos, indivíduos expostos ocupacionalmente por via inalatória (Grupo 1) e indivíduos expostos ocupacionalmente por via inalatória e dérmica (Grupo 2). Teste de Kruskal Wallis, p-valor = 0,0059; e pós teste de Dunn, *p-valor < 0,05.

Os níveis de metilação de *PARP-1* não diferiram nos indivíduos expostos ocupacionalmente ao benzeno de acordo com a presença de danos genotóxicos (Figura 5.16A) ou de acordo com a presença de alterações hematológicas (Figura 5.16B).

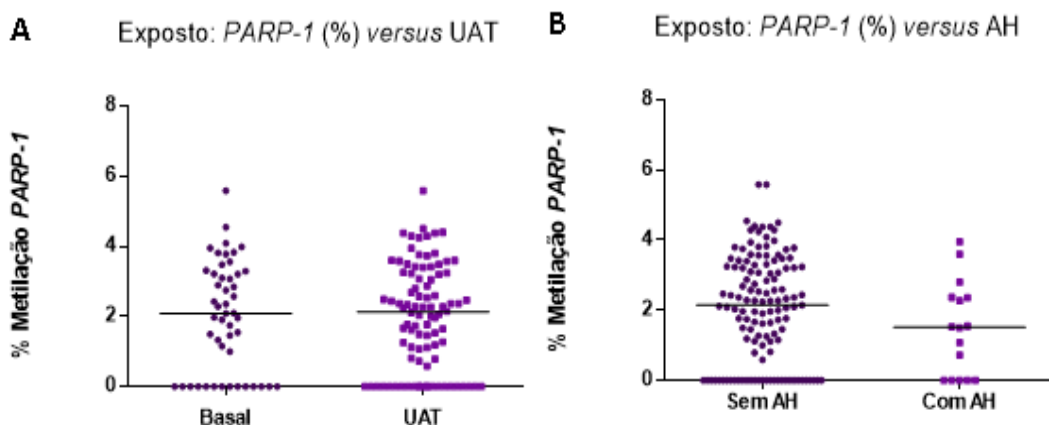


Figura 5.16 Perfil de metilação de *PARP-1* de acordo com a presença de danos genotóxicos e de alterações hematológicas em indivíduos expostos ocupacionalmente ao benzeno. (A) Gráfico de pontos mostrando a porcentagem de metilação de *PARP-1* em indivíduos expostos ocupacionalmente ao benzeno que apresentaram danos genotóxicos no sangue periférico (UAT) em comparação àqueles que não apresentaram (Basal). Os grupos foram definidos de acordo com a mediana de UAT do grupo não exposto, sendo que os valores acima deste nível estipulado como basal foram considerados como danos ao material genético (UAT). Teste de Mann Whitney, p-valor = 0,9956. (B) Gráfico de pontos mostrando a porcentagem de metilação de *PARP-1* em indivíduos expostos ocupacionalmente ao benzeno que apresentaram alterações hematológicas (Com AH) em comparação àqueles que não apresentaram (Sem AH). As alterações hematológicas consideradas foram leucocitose e leucopenia. Teste de Mann Whitney, p-valor = 0,1549.

Finalmente, não foram observadas correlações estatisticamente significativas entre os níveis de metilação a região promotora de *PARP-1* e os níveis de AttM (Figura 5.17A) ou de UAT (Figura 5.17B).

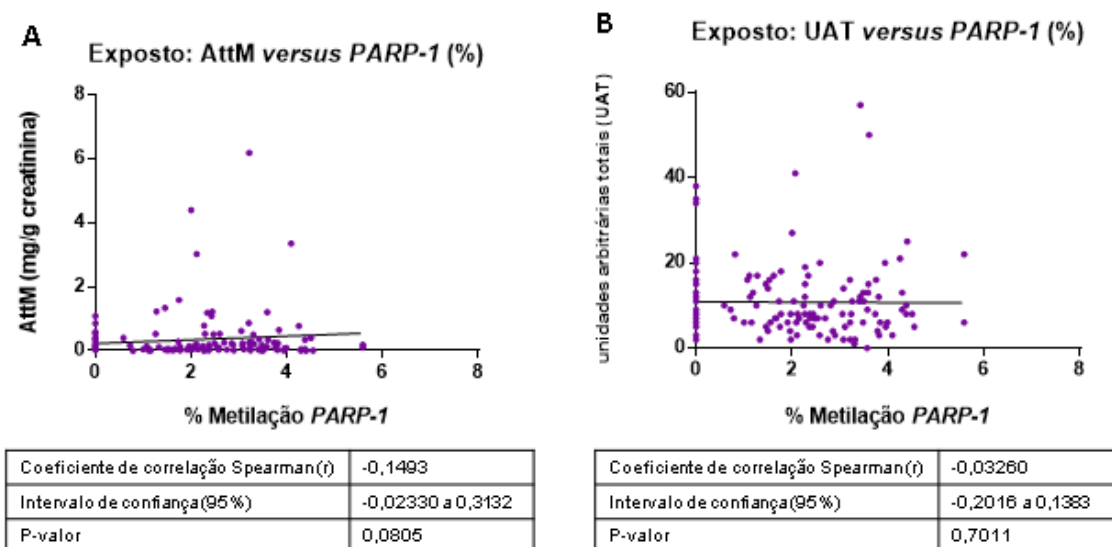


Figura 5.17. Correlação entre o perfil de metilação de *PARP-1* e o biomarcador de exposição ao benzeno e a quantidade de danos genotóxicos em indivíduos expostos ocupacionalmente ao benzeno. (A) Gráfico de correlação entre a porcentagem de metilação de *PARP-1* e os valores do ácido trans,trans-mucônico (AttM) em indivíduos expostos ocupacionalmente ao benzeno. (B) Gráfico de correlação entre a porcentagem de metilação de *PARP-1* e as unidades arbitrárias totais (UAT) definidas para avaliação de dano genotóxico. Teste de *Spearman*.

Por último, avaliamos os níveis de metilação da região promotora de *MSH3*, gene envolvido no reparo de mau pareamento. Uma hipermetilação de *MSH3* foi observada no grupo exposto (mediana de 1,33%) em comparação ao grupo não exposto ocupacionalmente ao benzeno (mediana de 0,0%) (Figura 5.18A). Ao estratificarmos por grupo de exposição (Figura 5.18B), pudemos observar que o grupo não exposto apresentou os menores níveis de metilação (mediana de 0,0%), o grupo 2 apresentou níveis de metilação mais elevados (mediana de 0,70%), enquanto o grupo 1 apresentou os maiores níveis de metilação (mediana de 2,60%).

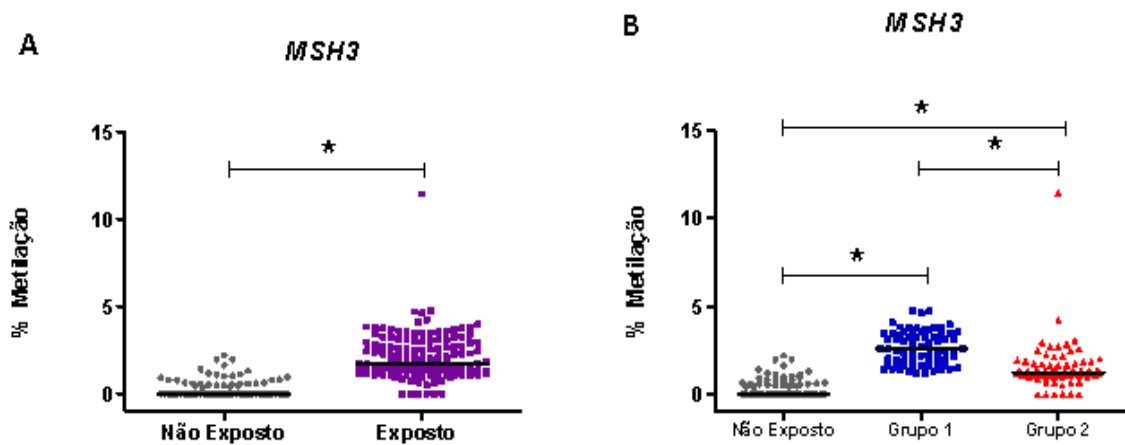


Figura 5.18. Perfil de metilação de *MSH3* de acordo com a exposição ocupacional ao benzeno. (A) Gráfico de pontos mostrando os níveis de metilação de *MSH3* em indivíduos não expostos (Não Exposto) e expostos ocupacionalmente ao benzeno (Exposto). Teste de Mann Whitney, p-valor < 0,001. (B) Gráfico de pontos mostrando os níveis de metilação de *MSH3* em indivíduos não expostos ocupacionalmente, indivíduos expostos ocupacionalmente por via inalatória (Grupo 1) e indivíduos expostos ocupacionalmente por via inalatória e dérmica (Grupo 2). Teste de Kruskal Wallis, p-valor < 0,0001; e pós teste de Dunn, *p-valor < 0,05.

Entre os indivíduos expostos, os níveis de metilação de *MSH3* não variaram significativamente de acordo com os níveis de danos genotóxicos ou de acordo com a presença de alterações hematológicas (Figura 5.19).

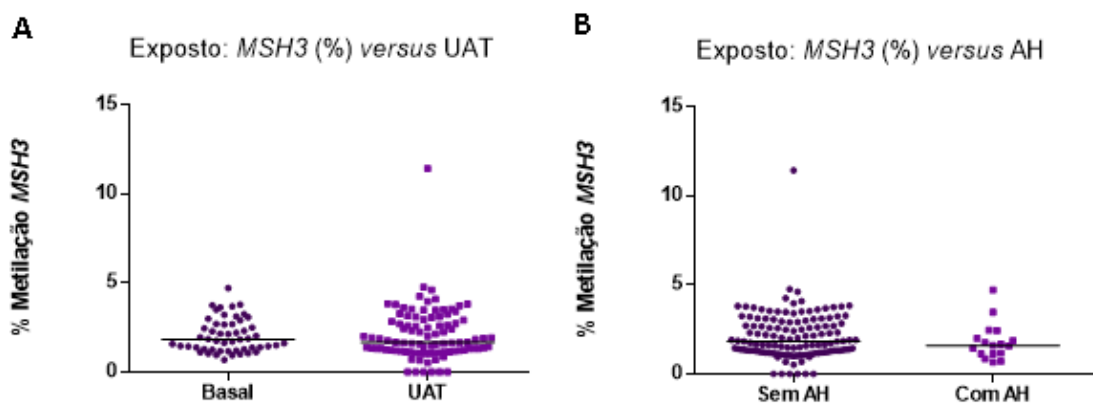


Figura 5.19. Perfil de metilação de *MSH3* de acordo com a presença de danos genotóxicos e de alterações hematológicas em indivíduos expostos ocupacionalmente ao benzeno. (A) Gráfico de pontos mostrando a porcentagem de metilação de *MSH3* em indivíduos expostos ocupacionalmente ao benzeno que apresentaram danos genotóxicos no sangue periférico (UAT) em comparação àqueles que não apresentaram (Basal). Os grupos foram definidos de acordo com a mediana de UAT do grupo não exposto, sendo que os valores acima deste nível estipulado como basal foram considerados como danos ao material genético (UAT). Teste de Mann Whitney, p-valor = 0,8026. (B) Gráfico de pontos mostrando a porcentagem de metilação de *MSH3* em indivíduos expostos ocupacionalmente ao benzeno que apresentaram alterações hematológicas (Com AH) em comparação àqueles que não apresentaram (Sem AH). As alterações hematológicas consideradas foram leucocitose e leucopenia. Teste de Mann Whitney, p-valor = 0,2595.

Uma correlação inversa, porém, fraca ($r=-0,1777$) foi observada entre os níveis de metilação da região promotora de *MSH3* no sangue periférico e os níveis urinários de AttM de indivíduos expostos ocupacionalmente ao benzeno (Figura 5.20A). Por outro lado, não foi observada uma correlação significativa entre a metilação de *MSH3* e os níveis de UAT (Figura 5.20B).

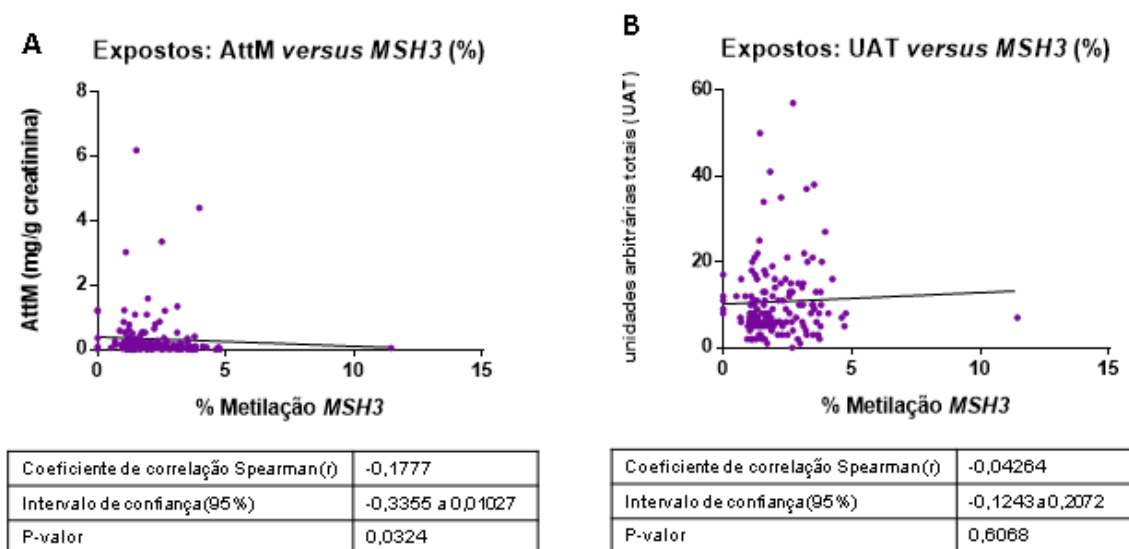


Figura 5.20. Correlação entre o perfil de metilação de *MSH3* e o biomarcador de exposição ao benzeno e a quantidade de danos genotóxicos em indivíduos expostos ocupacionalmente ao benzeno. (A) Gráfico de correlação entre a porcentagem de metilação de *MSH3* e os valores do ácido trans,trans-mucônico (AttM) em indivíduos expostos ocupacionalmente ao benzeno. (B) Gráfico de correlação entre a porcentagem de metilação de *MSH3* e as unidades arbitrárias totais (UAT) definidas para avaliação de dano genotóxico. Teste de *Spearman*.

As tabelas a seguir trazem um resumo de todas as análises realizadas quanto ao perfil de metilação dos elementos repetitivos e dos genes avaliados no presente trabalho. Na Tabela 5.15 estão apresentados os dados de acordo com a via de exposição ocupacional ao benzeno. Na Tabela 5.16, estão apresentadas as análises incluindo apenas os indivíduos expostos separados de acordo com a presença de danos genotóxicos. E, na Tabela 5.17 os indivíduos expostos de acordo com a presença de alterações hematológicas.

Tabela 5.15. Perfil de metilação dos elementos transponíveis e genes de reparo dos trabalhadores de postos de revenda de combustíveis participantes do estudo (N=217), de acordo com a via de exposição ocupacional ao benzeno.

Metilação (%)	Não exposto N=69	Grupo 1 N=74	Grupo 2 N=74	p-valor*
LINE-1 (mediana ± min-máx)	67,12±26,16-74,46	66,93±64,47-73,81	69,45±64,39-72,66	<0,0001
Alu (mediana ± min-máx)	84,87±74,22-89,62	82,17±56,82-86,97	75,23±55,01-85,26	<0,0001
MGMT (mediana ± min-máx)	3,30±0,0-6,46	3,79±0,0-12,18	2,55±0,0-9,48	<0,0001
PARP-1 (mediana ± min-máx)	1,76±0,0-4,12	2,80±0,0-5,59	1,75±0,0-3,75	0,0059
MSH3 (mediana ± min-máx)	0,0±0,0-2,20	2,60±1,17-4,77	0,70±0,0-4,25	<0,0001

Teste de Kruskal Wallis, pós teste Dunn, p<0,05.

Tabela 5.16 – Perfil de metilação dos elementos transponíveis e genes de reparo em indivíduos expostos ocupacionalmente ao benzeno (n = 148) estratificados de acordo com a presença de danos genotóxicos.

Danos genotóxicos	Basal*	UAT*	p-valor
LINE-1 (mediana ± min-máx)	69,68±66,12-72,00	69,29±64,34-72,66	0,2113
Alu (mediana ± min-máx)	78,10±55,01-84,05	74,53±61,83-85,26	0,1198
MGMT (mediana ± min-máx)	4,07±2,29-12,18	3,64±0,0-9,60	0,0154
PARP-1 (mediana ± min-máx)	2,09±0,0-5,59	2,13±0,0-5,59	0,9956
MSH3 (mediana ± min-máx)	1,83±0,70-4,72	1,67±0,0-11,45	0,8026

Teste Mann Whitney. * Os grupos foram definidos de acordo com a mediana de UAT do grupo não exposto, sendo que os valores acima deste nível estipulado como basal foram considerados como danos ao material genético (UAT).

Tabela 5.17 – Perfil de metilação dos elementos transponíveis e genes de reparo em indivíduos expostos ocupacionalmente ao benzeno (n = 148) estratificados de acordo com a presença de alterações hematológicas.

Alterações Hematológicas	*Sem AH	**Com AH	p-valor
LINE-1 (mediana ± min-máx)	69,63±64,39-72,66	69,28±66,42-72,30	0,5967
Alu (mediana ± min-máx)	75,23±55,0185,26	75,42±56,63-83,40	0,4949
MGMT (mediana ± min-máx)	3,35±0,0-12,18	3,22±0,0-5,05	0,8870
PARP-1 (mediana ± min-máx)	2,15±0,0-5,59	1,51±0,0-5,59	0,1549
MSH3 (mediana ± min-máx)	1,83±0,0-11,45	1,59±0,67-4,72	0,2595

Teste Mann Whitney *Sem alteração hematológica, **Com alteração hematológica.

6. DISCUSSÃO

A partir de 1980, o Brasil começou a produzir benzeno em território nacional devido ao crescimento econômico do país, com a construção de grandes polos petroquímicos e siderúrgicos, como na cidade de Cubatão (SP), Camaçari (BA), Volta Redonda (RJ) e Serra (ES) (MORIYAMA *et al.*, 2017). Com isso, doenças causadas pela exposição ocupacional ao benzeno e a chamada “epidemia do benzenismo” começaram a surgir, acometendo principalmente trabalhadores metalúrgicos e siderúrgicos (MIRANDA *et al.*, 1998; AUGUSTO & NOVAES, 1999). Isto levou os sindicatos e trabalhadores a discutirem tais eventos com seus empregadores e órgãos do governo. Esse movimento resultou na assinatura do Acordo do Benzeno e da inclusão do Anexo 13 (Benzeno) na Norma Regulamentadora 15 (NR15 – “Atividades e operações insalubres”) em 1995, além de levar à criação da Comissão Nacional Permanente do Benzeno (CNPBz), cuja composição tripartite é formada por instituições do Governo Federal (MTE, MS, Fundacentro entre outros), pelos representantes dos trabalhadores (sindicatos) e pelos representantes dos empregadores (indústrias) (MORIYAMA *et al.*, 2017).

A CNPBz é um órgão tripartite de discussão, negociação e acompanhamento do acordo e tem como principais objetivos complementar o “Acordo do Benzeno” nas questões dos trabalhadores com alterações de saúde, propor e acompanhar estudos, pesquisas, eventos científicos e inclusões de alterações nos dispositivos legais (ARCURI & CARDOSO, 2005).

No que tange a inclusões de alterações na legislação, pactuadas dentro da CNPBz, no ano de 2016, foi aprovado e publicado o Anexo 2 da Norma Regulamentadora 9 (NR9) – “*Exposição Ocupacional ao Benzeno em Postos Revendedores de Combustíveis*” – que estabelece os requisitos mínimos de segurança e saúde no trabalho para as atividades com exposição ocupacional ao benzeno em Postos Revendedores de Combustíveis (PRC). A importância da publicação do Anexo 2 da NR9 se deve ao fato de que as atividades desenvolvidas por trabalhadores nos PRC não tinham sido incluídas anteriormente no Acordo do Benzeno e no Anexo 13 da NR 15 e esses trabalhadores não tinham assistência legal de saúde e segurança no trabalho.

Nos PRC, as funções (ocupações) com maior risco de exposição ao benzeno (ANEXO 2 da NR-9) são as de frentista, caixa de pista, chefe de pista, gerente de posto, trabalhadores de manutenção e auxiliares de serviços gerais responsáveis pela limpeza da ilha de abastecimento (MTE, 2004; MORIYAMA *et al.*, 2017). No presente estudo, os trabalhadores que exercem essas funções foram incluídos no Grupo 2. Destaca-se que o Brasil é um dos poucos países que ainda apresenta esse tipo de ocupação (trabalhadores de PRC) e que, além disso, as atividades realizadas nos postos de revenda de combustíveis não ficaram restritas apenas as atividades relacionadas ao abastecimento de veículos. Os PRC também oferecem outros serviços, tais como, loja de conveniência, lanchonetes, padarias, farmácia, entre outros, o que contribuiu para o aumento do número de trabalhadores expostos aos agentes químicos presentes na gasolina, em especial ao benzeno. O Grupo 1 do presente estudo foi formado por trabalhadores desses “outros serviços” dos PRC.

Tendo em vista a não inclusão dos trabalhadores dos PRC no Acordo do Benzeno, reconhecendo a exposição ocupacional ao benzeno como um risco à saúde desses trabalhadores e devido à escassez de estudos relacionados ao tema, principalmente no que se refere ao mecanismo de ação e dos seus efeitos no organismo, o presente trabalho avaliou os danos genotóxicos e as alterações epigenéticas ocorridos em trabalhadores de PRC após a exposição ocupacional ao benzeno presente na gasolina e pretende discutir o tema a fim de compreender essas alterações moleculares e até mesmo propor um novo biomarcador de efeito.

Nossos achados mostraram que a maioria dos trabalhadores expostos ocupacionalmente por via inalatória e dérmica (Grupo 2) ao benzeno eram homens (90,5%), enquanto os expostos somente por via inalatória (Grupo 1) eram mulheres (68,9%). Isto provavelmente ocorre devido à função exercida por eles e a certos paradigmas e preconceitos ainda existentes, além da mulher ter sido inserida há menos tempo no mercado de trabalho. O trabalho de NUNES e colaboradores (2018), relacionado à qualidade de vida no trabalho das colaboradoras frentistas da rede de postos Espigão de Santana do Livramento, mostrou que frentistas mulheres sofrem preconceito em relação aos clientes. Estes preferem ser atendidos por homens, por não acreditarem que uma mulher seja capaz de realizar a mesma função que um homem.

De forma semelhante, o estudo desenvolvido por SANTOS (2011) aponta que a entrada das mulheres no mercado de trabalho, principalmente em profissões vistas com estritamente masculinas, geraria estranhamento e preconceito por parte de alguns indivíduos.

As outras características analisadas, como cor da pele, estado civil, e escolaridade podem estar associadas no grupo de exposição (Grupo 1 e Grupo 2). Trabalhadores não brancos teriam menos acesso à educação, se sujeitando assim a empregos de menor remuneração devido à falta de exigência de escolaridade. Devido à baixa renda, esses trabalhadores são forçados a procurarem moradia em lugares de risco (comunidades) ou em lugares distantes do local de trabalho (fora do município do Rio) para terem condições de manter uma vida com qualidade aos seus familiares, pois, a maioria são casados e provedores do sustento nos seus lares.

Tais achados são condizentes com o que já foi reportado na literatura, como no estudo de DE SOUZA & DE MEDEIROS (2007) realizado com 221 trabalhadores frentistas da cidade do Rio Grande/RS. Os autores mostraram que 90,5% eram do sexo masculino, casados (43,9%) e com o ensino médio (50,2%). Um perfil semelhante foi observado no estudo conduzido por DA SILVA MORAES (2019) com 62 trabalhadores frentistas em 10 municípios do recôncavo na Bahia. Neste estudo, foi mostrada uma frequência de 75,8% de trabalhadores do sexo masculino e 24,2% do sexo feminino, com baixa escolaridade (fundamental incompleto ou médio completo). Quanto ao estado civil, a maioria das mulheres eram solteiras (46,67%), enquanto os homens apresentaram um equilíbrio na proporção de solteiros e casados (40,35 e 42,48%, respectivamente). No entanto, o autor comenta que se a união estável fosse inserida na categoria casados, este grupo representaria a maioria por aumentar a porcentagem em até 15%.

No entanto, essas características diferem no grupo caracterizado para o estudo como não exposto ocupacionalmente ao benzeno (grupo de comparação). Neste, a maioria apresenta alta escolaridade tendo em vista que a maior parte dos trabalhadores são funcionários públicos (institucionais) e, por isso, apresentam uma renda familiar maior que três salários mínimos. Esta é uma limitação importante do presente estudo, visto que a caracterização de um grupo de comparação ideal deve conter todos os critérios apresentados pelo grupo de exposição, diferindo somente pela exposição propriamente dita.

Porém, o estabelecimento desse grupo ideal torna-se um fator limitante para a realização de pesquisas científicas, principalmente com o desenho do presente estudo (transversal) que retrata um momento específico da exposição. Este ponto será discutido novamente mais adiante nesta seção.

O benzeno, por ser extremamente volátil e cancerígeno, torna-se um risco à saúde aos trabalhadores, principalmente aqueles que apresentam atividades que promovem exposições constantes, como: frentista, caixa de pista, chefe de pista, gerente de posto, motorista de caminhão tanque e trabalhadores de manutenção (MTE, 2004). Em nosso estudo, a maioria dos trabalhadores do grupo 2 eram frentistas (77%) e gerentes/encarregados de pista (14,9%), que desempenham uma ou mais atividades como abastecer (94,6%), caixa (66,2%), calibrar pneus (87,8%) e outros. Perfil esse similar ao descrito por CAMPOS e colaboradores (2017) em estudo realizado com trabalhadores expostos ocupacionalmente ao benzeno presente na gasolina na região metropolitana de Belo Horizonte/MG. Neste trabalho, a maioria dos trabalhadores eram frentistas (58%), entre 25 e 35 anos (54,8%) e trabalhavam há mais de dois anos na profissão (38,7%). Além dessas atividades exercidas por eles serem consideradas perigosas à saúde, alguns trabalhadores apresentam hábitos ocupacionais tão prejudiciais quanto às atividades propriamente ditas. Dentre eles, o uso da flanela durante o trabalho (79,7%) se destacou no presente estudo, como observado por D'ALASCIO e colaboradores (2014) que mostraram que 94% dos trabalhadores faziam o uso do “paninho” durante o abastecimento e 7,1% relataram reutilizar o mesmo “paninho”. Dessa forma, frentistas e gerentes/encarregados de pista que realizam o abastecimento de veículos acabam aumentando o contato com o benzeno, uma vez que colocam a flanela sobre os ombros ou no bolso da calça, regiões de alta absorção, promovendo o contato com a pele.

Entre os parâmetros bioquímicos e hematológicos analisados, a taxa de reticulócitos mostrou diferença entre os grupos avaliados. Este resultado pode ser explicado pela atuação do benzeno na inibição da maturação dos reticulócitos para eritrócitos pela diminuição da absorção de ferro como consequência da disfunção medular, de acordo com SYNDER e colaboradores (1989).

No presente estudo, observamos ainda diferenças nas taxas de bilirrubina indireta e proteína C reativa. A bilirrubina é dosada com a finalidade de indicar problemas no fígado (principal órgão metabolizador), vias biliares ou anemia hemolítica, já que é produto da destruição das hemácias. Assim, nossos achados podem ser indicativos de alguma anormalidade das hemácias, sendo condizente com as alterações hematológicas causadas pela exposição ao benzeno.

Já a proteína C reativa produzida no fígado é analisada para avaliar uma possível infecção, processos inflamatórios e até problemas cardíacos. Dessa forma, nossas observações são suportadas pela literatura, já que os metabólitos do benzeno (hidroquinona e fenol) podem estar envolvidos na resposta inflamatória.

MAKSOU D e colaboradores (2019) avaliaram 40 trabalhadores de postos de combustíveis de diferentes províncias egípcias e 10 voluntários saudáveis como controle e observaram uma redução das imunoglobulinas (A e G) e um aumento das IgM e IgE. Além disso, outras alterações de parâmetros bioquímicos foram observadas, como a redução de cobre, zinco e ferro, apontando que a inalação prolongada ao benzeno pode levar a distúrbios bioquímicos e imunológicos.

De acordo com AKSOY e colaboradores (1971), as alterações hematológicas são os sinais e sintomas mais frequentes observados em trabalhadores expostos ao benzeno, com destaque para leucopenia, que é utilizada como referência, indicando um possível adoecimento por intoxicação (benzenismo). O diagnóstico de benzenismo por meio de exames laboratoriais (hemograma e bioquímico) é realizado com frequência para acompanhamento da saúde do trabalhador. Tal conduta é chamada de série histórica. Em caso de suspeita de intoxicação por benzeno, são realizados pelo menos três hemogramas com intervalos de 15 dias entre eles. Caso o trabalhador apresente alterações hematológicas persistentes, deverá ser afastado do trabalho até total recuperação. Mas, se depois de retornar as atividades voltar a apresentar alterações hematológicas, deverá entrar em licença ou ser remanejado para outra função para preservação da saúde do indivíduo, afastando-o da fonte de exposição (BRASIL, 2004; FUNDACENTRO, 2012).

AUGUSTO e colaboradores (1991) mostraram que a neutropenia (presente em 100% dos casos estudados) e leucopenia (50,8%) foram as alterações hematológicas mais frequentes em trabalhadores de siderúrgicas, expostos a substâncias químicas, dentre elas o benzeno, em Cubatão/SP. Desde então, a leucopenia tem sido considerada sinônimo de benzenismo.

Assim, podemos dizer que 11,4% dos trabalhadores expostos ocupacionalmente ao benzeno incluídos em nosso estudo apresentaram benzenismo, uma vez que foram observadas alterações hematológicas persistentes (leucocitose ou leucopenia) na série histórica. Vale ressaltar que os trabalhadores que apresentaram as alterações hematológicas foram acompanhados e encaminhados para um serviço médico, conforme recomendado pelo Ministério do Trabalho (ANEXO 2 da NR9).

Quanto aos dados reprodutivos das mulheres expostas ao benzeno, foi observada uma frequência de 14% de aborto espontâneo no grupo exposto, corroborando os resultados de SANTOS (2012). Os autores avaliaram a exposição ao benzeno em trabalhadores de siderúrgicas e refinarias de petróleo, encontrando uma taxa de aborto de 20%. Outro estudo revelou que mulheres que trabalham em indústrias petroquímicas chinesas, expostas ao benzeno, têm um aumento de chance de 2,5 vezes de sofrer um aborto espontâneo (XU *et al.*, 1998).

Com o intuito de tentar evitar exposição excessiva a agentes químicos e danos à saúde do trabalhador, foi definido o índice biológico máximo permitido (IBMP), que é “o valor máximo do indicador biológico para o qual se supõe que a maioria das pessoas ocupacionalmente expostas não corre risco de dano à saúde” para os agentes químicos preconizados na Norma Regulamentadora 7. A exposição acima desse valor é considerada excessiva. Este valor (IBMP) deve ter correlação com a concentração do agente químico no ambiente de trabalho, definida como limite de tolerância ou limite de exposição ocupacional.

No entanto, no caso da exposição ao benzeno, o estabelecimento do Valor de Referência Tecnológico (VRT) trouxe a necessidade de reavaliar o conceito de IBMP para Indicador Biológico de Exposição. O VRT é baseado principalmente na exequibilidade tecnológica e foram estabelecidos valores distintos para diferentes ramos industriais. O cumprimento do VRT é obrigatório, mas não exclui o risco à saúde. Portanto, como o benzeno é um agente cancerígeno, não é prudente estabelecimento de um índice biológico máximo permitido (ARCURI & CARDOSO, 2005). Nesse sentido, no presente estudo, a utilização do valor de limite biológico de exposição de 0,5 mg AttM/g creatinina como ponto de corte, de acordo com o estabelecido na Portaria 34 do Ministério do Trabalho e Emprego em 2001 (MTE, 2001), não significa que abaixo desse “limite” o trabalhador não esteja exposto a riscos à saúde.

O AttM é utilizado como biomarcador de exposição ao benzeno por sua detecção ser de fácil desenvolvimento técnico, sensível analiticamente na determinação urinária e apresentar correlações positivas com os níveis atmosféricos do solvente. Porém, estudos têm demonstrado uma baixa especificidade, apontando o AttM como um metabólito não exclusivo do metabolismo do benzeno, por sofrer influências de outros fatores que modificam sua concentração urinária.

Dentre eles, já foi mostrado que o consumo de álcool aumenta a concentração média de AttM urinário em mais de cinco vezes (JAVELAUD *et al.*, 1998).

Outro fator importante que interfere na concentração urinária de AttM é a dieta, principalmente o consumo de alimentos e produtos industrializados que possuem ácido sórbico e benzoato de sódio (conservantes alimentares) em sua composição. De acordo com OLIVEIRA e colaboradores (2011), a descarboxilação de benzoato de sódio e ácido sórbico leva à produção de benzeno. O mesmo foi observado por SANCHEZ (2008), que analisou as concentrações de benzeno em bebidas comerciais apontando que a combinação de ácido ascórbico (vitamina C) e ácido benzoico, dois aditivos alimentares, levam à formação de benzeno. O mesmo fenômeno foi observado por FABIETTI e colaboradores (2001), que encontraram níveis de benzeno em sucos e refrigerantes em concentrações na faixa de 1,1 a 2,6 µg/L em refrigerantes de cola e na faixa de 2,4 a 3,6 µg/L em sucos.

Além disso, a exposição conjunta a outras substâncias químicas durante a exposição ocupacional ao benzeno também pode ser um fator de confusão para a análise do AttM. A gasolina é uma mistura complexa onde encontramos outras substâncias químicas além do benzeno, como o tolueno, xileno e etilbenzeno, fazendo com que haja interação entre elas. Segundo ANDREWS e colaboradores (1977), o tolueno interage com o benzeno, mostrando ser um inibidor competitivo da sua biotransformação.

A exposição ao benzeno por outras fontes que não a gasolina foi avaliada no presente trabalho e não foram observadas diferenças entre os grupos estudados. Isto sugere que as diferenças observadas nos níveis de AttM sejam de fato decorrentes da exposição ocupacional dos indivíduos.

Ao todo, 17,2% dos trabalhadores expostos ao benzeno apresentaram níveis de AttM acima 0,5 mg/g creatinina. Portanto, isto indica uma exposição intensa desses trabalhadores que, conseqüentemente, estarão mais suscetíveis aos danos gerados pelo composto. No entanto, os trabalhadores que apresentaram um valor de AttM abaixo de 0,5 mg/g creatinina não estão isentos dos riscos ocasionados pela exposição ao benzeno, uma vez que não existe limite seguro de exposição a substâncias cancerígenas.

Isto fica claro ao não observarmos uma correlação direta entre os níveis de AttM e a quantidade de danos genotóxicos em nosso estudo. De forma semelhante, a presença de alterações hematológicas também não foi associada a aumentos dos níveis de AttM.

Reforçando essa observação, ao compararmos os grupos de exposição (Grupo 1 e Grupo 2) não foi observada diferença dos níveis de AttM, assim como não foram observadas diferenças quanto à presença de danos genotóxicos. Assim, nossos dados sugerem que os trabalhadores de lojas de conveniência sejam tão expostos quanto os frentistas que lidam diretamente com a gasolina. A alta volatilidade do benzeno pode fazer com que ele chegue às lojas de conveniência e escritórios presentes no posto, os quais são ambientes fechados, sem ventilação adequada para a dispersão do composto.

Não foram encontrados dados na literatura para fins de comparação e discussão dos resultados encontrados no Grupo 1, isto é, trabalhadores das lojas de conveniência expostos apenas por via inalatória. Porém, CAMPOS e colaboradores (2017) mostraram um elevado nível de AttM ($1,13 \pm 0,45$ mg/g de creatinina) e índice de dano (expresso em unidades arbitrárias, $28,4 \pm 10,1$) em frentistas da região metropolitana de Belo Horizonte/MG, em relação ao grupo não exposto ($0,44 \pm 0,33$ e $18,4 \pm 10,1$, respectivamente), que consistia de trabalhadores do setor de administração pública.

A fragilidade do AttM pode ser explicada, ao menos em parte, pela própria via de metabolismo do benzeno. Este, ao ser metabolizado e transformado em benzeno epóxido, pode seguir diferentes vias. Podemos resumir esse processo em basicamente três caminhos, sendo que dois deles irão gerar os biomarcadores AttM e Ácido Fenil Mercaptúrico (AFM), enquanto o terceiro irá gerar os metabólitos ativos, estes responsáveis pela ação genotóxica do benzeno. As proporções dos metabólitos do benzeno na urina são em média de 50 a 85% de fenol urinário, 5% de hidroquinona, 1,3 a 1,6% de catecol, 3,9 a 25% de AttM e 0,1 a 0,5% de AFM (VAN SITTE *et al.*, 1993; DE PAULA *et al.*, 2003; KIM. *et al.*, 2006; OGA *et al.*, 2008). Assim, uma vez que a maior parte do benzeno metabolizado segue para a via do fenol e catecol e estes irão gerar os metabólitos tóxicos que atuarão na medula óssea levando a danos genotóxicos e hematológicos, a falta de associação entre esses desfechos e os níveis de AttM não é surpreendente.

Neste contexto, o fenol foi o primeiro biomarcador de exposição ao benzeno utilizado por estar em maiores concentrações, porém, mostrou não ser eficiente pois se limitava a exposições superiores a 5 ppm em oito horas trabalhadas. No estudo de FERNÍCOLA e colaboradores (1976), não foi observada diferença nos valores médios de fenol urinário na população de expostos de São Paulo (4,2 mg/g de creatinina) comparado ao valor normal (4,1 mg/g de creatinina). Além disso, seus níveis sofrem influência de fatores como a alimentação, assim como o AttM.

Na intenção de substituir a mensuração do fenol, INOUE e colaboradores (1988) avaliaram a utilização de catecol e hidroquinona urinários como biomarcadores da exposição ao benzeno. Os resultados encontrados foram superiores ao fenol urinário, porém estes biomarcadores não são mais utilizados devido à exposição conjunta ao tolueno que interfere nas concentrações desses metabólitos.

Conforme discutido no presente trabalho, o biomarcador AttM parece não ser o mais indicado para sugerir a exposição ocupacional ao benzeno. Isto pode ser reforçado pelo fato de outros países já terem adotado e estabelecido o AFM como biomarcador, como os Estados Unidos que adotaram o limite biológico de 25 µg/g de creatinina com o valor atmosférico de benzeno de 0,5 ppm conforme recomendado pela ACGIH (ACGIH, 2014).

Porém, apesar do AFM mostrar uma alta especificidade, como os outros biomarcadores ele também apresenta limitações como a influência do hábito de fumar como um fator de confusão.

Além disso, as características interindividuais podem influenciar significativamente a mensuração de todos os possíveis biomarcadores de exposição aqui apresentados. A presença de polimorfismos genéticos, principalmente em genes que codificam enzimas que participam do processo de biotransformação do benzeno, pode afetar diretamente a taxa em que os metabólitos são produzidos.

O citocromo P450 2E1 (CYP2E1) e as glutathione S-transferases (GSTs), codificados por genes altamente polimórficos, já foram relacionados à exposição e efeitos tóxicos do benzeno.

Como no trabalho de LIN e colaboradores (2008) que avaliou a influência dos polimorfismos genético das GSTs (*GSTT1*, *GSTP1* e *GSTM1*) na excreção dos níveis urinários de AttM e AFM em 70 trabalhadores de fábricas de produtos químicos, onde os níveis médios de AttM e AFM foram $5,300 \pm 12,00$ $\mu\text{g/g}$ de creatinina e 16 ± 32 $\mu\text{g/g}$ de creatinina, respectivamente, sendo os níveis de AttM e AFM maiores no grupo de alta exposição ($>1\text{ppm}$) em relação ao de baixa exposição ($<1\text{ppm}$). Entre os genótipos analisados somente o *GSTT1* nulo apresentou ter relação com o nível e produção de AFM, uma vez que este polimorfismo leva à ausência da atividade enzimática interferindo assim com a formação do AFM.

A influência dos polimorfismos dos genes *GSTT1*, *GSTM1*, *GSTP1* e *CYP2E1* na suscetibilidade aos efeitos adversos ao benzeno foi avaliada em trabalhadores petroquímicos. Indivíduos que possuíam o genótipo nulo dos genes *GSTT1* e *GSTM1* apresentaram um risco maior de ter distúrbios hematológicos em comparação aos indivíduos selvagens para estes polimorfismos (NOUROZI *et al.*, 2018).

De modo geral, há vantagens e desvantagens na escolha entre os diferentes biomarcadores de exposição ao benzeno, afinal nenhum biomarcador deixará de sofrer influências sejam elas externas ou internas, não existindo um biomarcador perfeito.

Assim, levando todos esses pontos em consideração, o metabólito que apresenta maior potencial para ser usado como biomarcador de exposição ao benzeno seria o AFM, por ser mais específico, por ter uma via específica e por sofrer uma menor influência dos fatores de confundimento apontados, comparado aos outros biomarcadores. No entanto, estudos ainda são necessários principalmente em relação à via de metabolização do benzeno para conhecer e identificar possíveis alvos.

Devido à falta de um biomarcador de efeito característico e uma vez que as alterações epigenéticas são mais estáveis e responsivas ao meio externo, estas têm sido apontadas como um possível biomarcador. Dessa forma, avaliamos o perfil de metilação de genes envolvidos em diferentes vias de reparo que podem sofrer alterações devido à exposição ocupacional ao benzeno.

Dentre os genes de reparo avaliados nesse estudo, o gene *MGMT* apresentou uma hipometilação no Grupo 2, expostos por via inalatória e via dérmica, comparado aos outros grupos. Além disso, uma hipometilação do gene também foi observada em indivíduos expostos que apresentaram danos genotóxicos. Estes dados são compreensíveis visto que o Grupo 2 apresentou maiores taxas de dano ao DNA, e uma menor metilação de *MGMT* poderia significar uma maior ativação e atuação desse gene frente aos danos causados. No entanto, já que não avaliamos a expressão do gene, esta é uma hipótese a ser comprovada. Por outro lado, o estudo de LI e colaboradores (2017) corrobora nossos achados. Neste trabalho foram avaliados os efeitos do benzeno em baixas doses sobre o dano ao DNA e o perfil de metilação de *MGMT* em 96 trabalhadores de indústrias petroquímicas e 100 controles. Os trabalhadores expostos ao benzeno apresentaram níveis significativamente mais altos de AFM urinário, maior grau de dano ao DNA e uma diminuição da metilação do gene *MGMT* em relação aos controles. Além disso, foi observada uma associação negativa entre AFM urinário, o grau de dano ao DNA e a metilação de *MGMT*. Frente a estes dados, podemos sugerir o *status* de metilação de *MGMT* como um possível candidato a biomarcador associado aos danos causados pela exposição ao benzeno, porém, mais estudos devem ser realizados para seu estabelecimento.

Quanto ao gene *PARP-1*, envolvido na sinalização de diferentes tipos de danos, como quebras de fita simples e duplas, foi observada uma maior metilação no Grupo 1, expostos apenas por via inalatória, comparado aos demais grupos. Dados acerca dos efeitos da exposição ao benzeno sobre a metilação de *PARP-1* são escassos na literatura. Em trabalhadores expostos cronicamente ao benzeno na China, foi mostrado que a expressão e atividade de *PARP-1* estão diminuídas, porém, os autores não avaliaram o nível de metilação do gene (SHA *et al.*, 2014).

Já o tratamento da linhagem de linfócitos B murinos F32 com benzeno levou à redução de expressão gênica de *Parp-1* e ao aumento de seus níveis de metilação, o que foi revertido pelo tratamento com um agente desmetilante e um inibidor de histona desacetilases (GAO *et al.*, 2010). Porém, cabe ressaltar que os resultados foram obtidos em modelo *in vitro*, em condições controladas, não representando a realidade onde há exposição a múltiplas substâncias ambientais, sendo essa exposição ainda maior em ambientes ocupacionais.

Neste contexto, o presente estudo foi o primeiro a avaliar o impacto da exposição ocupacional ao benzeno sobre os níveis de metilação de *PARP-1*.

Apesar dos resultados serem de certa forma semelhantes ao que já foi reportado na literatura, mais estudos em condições experimentais semelhantes às nossas são necessários para corroborar nossos achados.

Por outro lado, alterações nos níveis de *PARP-1* também podem influenciar o padrão de metilação. Segundo CAIAFA e colaboradores (2009) níveis diminuídos ou aumentados de *PARP-1* ADP ribosilado são associados à hipermetilação ou hipometilação do DNA, respectivamente. Isso ocorre devido à interação não covalente dos polímeros presentes em *PARP-1* com a DNA metiltransferase 1 (DNMT1), impedindo sua atividade enzimática. Na ausência de *PARP-1* ADP ribosilado, a DNMT1 não tem mais nenhum empecilho, estando livre para realização da metilação do DNA; se, por outro lado, persistirem altos níveis de *PARP-1* ADP ribosilado, a DNMT1 será inibida de forma estável, impedindo a metilação do DNA e perturbando todo genoma. Assim, outro nível de complexidade pode existir entre a metilação de *PARP-1* e a regulação da metilação do DNA, o qual não foi contemplado no presente estudo.

MSH3, envolvido no reparo de mau pareamento de bases do DNA, foi encontrado hipermetilado no grupo exposto em comparação ao grupo não exposto, sendo a hipermetilação mais acentuada no Grupo 1. Isto poderia indicar um silenciamento de sua expressão gênica por metilação e consequente diminuição desse tipo de reparo, podendo levar, assim, à instabilidade genômica.

A instabilidade de microssatélites (MSI) já associada a defeitos no sistema de reparo de mau pareamento do DNA (MMR), seja ela por mutação ou alteração epigenética (hipermetilação da sua região promotora), já foi avaliada em neoplasias hematológicas. Porém, apesar da MSI ter sido detectada em 29,4% dos pacientes com LMA e 21,4% dos pacientes com SMD, a hipermetilação de *MLH1* e *MSH2* não se mostrou frequente (MOHAMMAD SHEIKHHA *et al.*, 2002). Por outro lado, em um estudo piloto realizado com seis indivíduos expostos ocupacionalmente ao benzeno e quatro indivíduos não expostos, foi observada uma hipermetilação de *MSH3* no grupo exposto, corroborando nossos achados (ZHANG *et al.*, 2010).

Ao considerarmos nossos resultados referentes ao perfil de metilação dos genes de reparo como um todo, podemos observar que, apesar de diferenças significativas terem sido observadas, a magnitude das diferenças foi pequena. Assim, apesar das variações exatas de metilação com impacto sobre a expressão do gene não serem conhecidas, talvez as diferenças observadas não tenham um impacto fenotípico. Portanto, seria fundamental avaliar a expressão dos genes estudados.

Por outro lado, as diferenças de metilação observadas também poderiam ser decorrentes de variações das frequências das diferentes populações celulares sanguíneas, uma vez que cada tipo celular apresenta um perfil epigenético único, responsável pela regulação de programas de transcrição específicos. ADALSTEINSSON e colaboradores (2012) avaliaram o perfil de metilação de quatro genes (*HHEX*, *KCNJ11*, *KCNQ1* e *PM20D1*) em sangue total e em duas frações de leucócitos e viram que a heterogeneidade celular explicava até 40% das variações observadas na metilação de *HHEX*, mas não dos outros genes, no sangue total. Porém, cabe ressaltar que o gene *HHEX* codifica um fator de transcrição da família homeobox expresso em células hematopoiéticas (CROMPTON *et al.*, 1992; JACKSON *et al.*, 2018), o que pode explicar a variação dos seus níveis de metilação em células de diferentes linhagens e de diferentes graus de maturação no sangue total.

Apesar de uma regulação tecido-específica não ser esperada para genes de reparo, assim como é observado para fatores de transcrição, análises de associação entre os níveis de metilação encontrados e a proporção dos diferentes tipos celulares no sangue periférico dos indivíduos analisados pode nos auxiliar a preencher essa lacuna.

E por fim, foi investigado se o perfil global de metilação, baseado na análise das duas principais classes de elementos repetitivos encontradas no genoma humano LINE-1 e Alu, seria afetado pela exposição ocupacional ao benzeno.

Os níveis de metilação de LINE-1 foram maiores no Grupo 2 comparados ao Grupo 1 e ao grupo de trabalhadores não expostos. Já Alu foi encontrado hipometilado nos grupos expostos em comparação ao grupo não exposto, sendo essa redução mais pronunciada no Grupo 2.

Dados esses diferem um pouco da literatura quanto a LINE-1, que em geral tem sido descrito hipometilado frente à exposição ocupacional. REN e colaboradores (2019), avaliando os padrões de metilação do DNA em 141 trabalhadores expostos ao benzeno (83 trabalhadores de fábricas de calçados e 58 trabalhadores de uma oficina de pintura) e 48 controles, mostraram uma diminuição de metilação de LINE-1 por sequenciamento nos trabalhadores expostos ao benzeno em comparação aos controles. De forma semelhante, em estudo conduzido com 78 atendentes de postos de gasolina e 58 controles, foi observada uma menor metilação de LINE-1 em atendentes (FUSTINONI *et al.*, 2012). Por outro lado, os autores também observaram uma associação significativa entre o perfil de metilação e o sexo dos indivíduos analisados, sendo a metilação global do DNA mais elevada em homens do que em mulheres. Tais achados poderiam explicar o aumento de metilação observado em nosso trabalho, visto que o maior nível de metilação foi no Grupo 2, que é composto por 90,5% de trabalhadores do sexo masculino.

Já a hipometilação de Alu é condizente com o estudo de coorte (2004 a 2005) realizado em Taiwan por LIU e colaboradores (2018), que avaliou o perfil de metilação de LINE-1 e Alu no sangue de cordão umbilical de indivíduos cujas mães foram expostas às substâncias perfluoroalquil e polifluoroalquil (PFAS). Os autores observaram uma menor metilação de Alu, que foi associada à exposição pré-natal a PFAS.

Ainda a metilação de Alu já foi associada a uma menor frequência de danos endógenos ao DNA. Além disso, a transfecção de células HEK293 (células embrionárias renais humanas) ou PDL (fibroblastos de ligamento periodontal) com um siRNA (*short interfering RNA*) contra Alu levou a um aumento dos níveis de metilação de Alu, aumento da proliferação, e maior resistência a agentes danosos ao DNA, como peróxido de hidrogênio e metil metanossulfonato (PATCHSUNG *et al.*, 2018).

Por fim, é importante considerar que Alu é um retrotransposon não-LRT não autônomo, ou seja, dependente da maquinaria enzimática ativa de outro retrotransposon (não LTR) como LINE-1.

Neste contexto, mesmo LINE-1 apresentando um maior nível de metilação como visto em nosso trabalho, não significa que todo ele esteja inativo. Assim, mesmo a baixa atividade de LINE-1, uma vez combinada à hipometilação mais pronunciada de elementos Alu, pode levar à ativação desses últimos. Portanto, nossos resultados sugerem que a hipometilação de Alu possa ser um indicativo de danos não genotóxicos precoces, com potencial de gerar alterações genéticas, e um possível indicador biológico de efeito a exposição ao benzeno, podendo impactar assim no estabelecimento de medidas de controle, prevenção e vigilância à saúde desses trabalhadores.

Dentre as limitações do estudo, podemos citar primeiramente o tamanho amostral. Apesar de ter sido feito um cálculo do número de amostras necessário baseado na literatura científica relacionado à área, as perdas durante as análises moleculares podem ter sido um fator limitante para as análises estatísticas realizadas. Isto porque, em nossas análises, não foi possível avaliar os efeitos da exposição ocupacional ao benzeno isoladamente, visto que potenciais fatores de confusão estavam presentes. Estes incluem tabagismo, etilismo, ingestão de aditivos alimentares e exposição a outras substâncias químicas. Porém, a semelhança de nossos achados com dados previamente reportados na literatura mostra a reprodutibilidade dos mesmos.

O estabelecimento do grupo de comparação foi outro desafio. Sabe-se que o grupo de comparação ideal deve apresentar os mesmos critérios que o grupo de exposição, como: idade, sexo, cor da pele, renda familiar, escolaridades entre outros, que são fatores já conhecidos como influenciadores com exceção da exposição, no caso ocupacional ao benzeno. Contudo, estabelecer grupos com todos os critérios pareados não foi possível no presente estudo. A escolha do nosso grupo de comparação foi feita por conveniência, pensando somente no critério de não apresentar a exposição ocupacional ao benzeno. Porém, para tentar minimizar esta limitação, acrescentamos um grupo de trabalhadores de PRC até então não avaliado na literatura, que foi composto por indivíduos expostos ao benzeno apenas por via inalatória (Grupo 1). Este grupo foi incluído, pois os indivíduos teoricamente apresentariam uma exposição menor ao benzeno, mostrando assim os efeitos da exposição pela via de absorção do composto e por tipo de trabalho. No entanto, o Grupo 1 não diferiu do Grupo 2 em alguns aspectos importantes, como níveis de AttM e de danos genotóxicos. Sendo assim, sua inclusão reforçou a recomendação da OMS de que não há níveis seguros de exposição a carcinógenos. Além disso, de acordo com nossos resultados, novas políticas de prevenção de danos à saúde destes trabalhadores poderão ser aplicadas.

7. CONCLUSÃO

A exposição ocupacional ao benzeno presente na gasolina levou a alterações dos padrões globais de metilação no sangue periférico de trabalhadores de postos de combustíveis do Rio de Janeiro, com a hipermetilação de LINE-1 e hipometilação de Alu.

- A exposição ocupacional ao benzeno levou a alterações no perfil de metilação dos genes envolvidos na maquinaria de reparo do DNA (*PARP-1*, *MSH3* e *MGMT*) no sangue periférico de trabalhadores de postos de revenda de combustíveis do Rio de Janeiro, com a hipometilação de *MGMT* nos trabalhadores expostos ocupacionalmente ao benzeno por via inalatória e dérmica, aumento de metilação de *PARP-1* no grupo de exposição apenas por via inalatória (loja de conveniência) e uma hipermetilação de *MSH3* no trabalhadores de postos de combustíveis, sendo mais evidente no grupo de exposição por via inalatória e dérmica (frentistas).

- Não foram encontradas correlações significativas entre os níveis de metilação de LINE-1, Alu, *MGMT* e *PARP-1* e os níveis do biomarcador de exposição entre os trabalhadores expostos ocupacionalmente ao benzeno. Por outro lado, uma correlação inversa fraca foi encontrada entre os níveis de metilação de *MSH3* e os níveis de AttM.

- Os níveis de metilação de LINE-1, Alu, *PARP-1* e *MSH3* não variaram de acordo com a presença de danos genotóxicos. Porém, maiores níveis de metilação de *MGMT* foram observados em indivíduos expostos ao benzeno que apresentaram danos genotóxicos em comparação àqueles com níveis basais de danos.

- Não houve associação entre os níveis de metilação dos genes de reparo e elementos transponíveis avaliados e a presença de alterações hematológicas no sangue periférico dos trabalhadores expostos ocupacionalmente ao benzeno no município do Rio de Janeiro.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACURI, A. S. A.; CARDOSO, L. M. N. Acordo e legislação sobre o benzeno 10 anos. São Paulo: Fundacentro, 2005.

ADALSTEINSSON, B. T. et al. Heterogeneity in white blood cells has potential to confound DNA methylation measurements. **PloS one**, v. 7, n. 10, 2012.

AGENCIA NACIONAL DO PETROLEO, GAS NATURAL E BIOCOMBUSTIVEIS (ANP). **Anuário estatístico brasileiro do petróleo, gás natural e biocombustíveis. Rio de Janeiro, 2018.** Disponível em: < http://www.anp.gov.br/images/publicacoes/anuarioestatistico/2018/anuario_2018.pdf > Acesso em: 06 jan. 2020.

AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY (ATSDR), Centers for Disease Control, 2007. Toxicological profile for benzene. Agency for Toxic Substances and Disease Registry, Centers for Disease Control, 2007. Disponível em: < <https://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp3.pdf> > Acesso em: 09 jan. 2020.

AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY (ATSDR).2019. Substance priority list. Disponível em: < <https://www.atsdr.cdc.gov/spl/index.html#2019spl> > Acessado em: 05 fev. 2020.

AKSOY, M. et al. Haematological effects of chronic benzene poisoning in 217 workers. **Occupational and Environmental Medicine**, v. 28, n. 3, p. 296-302, 1971.

ALBERTS, B. et al. **Biologia molecular da célula**. Artmed Editora, 2010.

AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH (AACR), 2019. Disponível em: <<https://www.aacr.org/>> Acessado em: 09 jan 2020.

AMERICAN CONFERENCE OF GOVERNMENTAL INDUSTRIAL HYGIENISTS (ACGIH). TLVs and BEIs: Threshold Limit Values for Chemical Substances and Physical Agents and Biological Exposure Indices. Cincinnati, Ohio, p. 254, 2014.

AMORIM, L. C. A. O uso dos biomarcadores na avaliação da exposição ocupacional a substâncias químicas. 2003.

ANDREWS, L. S. et al. Effects of toluene on the metabolism, disposition and hemopoietic toxicity of [3H] benzene. **Biochemical pharmacology**, v. 26, n. 4, p. 293-300, 1977.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA QUÍMICA (ABIQUIM), 2020. Disponível em: <<http://abiquim.org.br/industriaQuimica>> Acessado em 06 jan 2020.

AUGUSTO, L. G. S. & NOVAES, T. C. P. Ação médico-social no caso do benzenismo em Cubatão, São Paulo: uma abordagem interdisciplinar. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 15, p. 729-738, 1999.

- AUGUSTO, L. G. S. et al. Estudo longitudinal e morfológico (medula óssea) em pacientes com neutropenia secundária à exposição ocupacional crônica ao benzeno. 1991.
- AYARPADIKANNAN, S. et al. Transposable element-driven transcript diversification and its relevance to genetic disorders. **Gene**, v. 558, n. 2, p. 187-194, 2015.
- BAILEY, J. A. et al. Molecular evidence for a relationship between LINE-1 elements and X chromosome inactivation: the Lyon repeat hypothesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 97, n. 12, p. 6634-6639, 2000.
- BANNO, K. et al. Endometrial cancer as a familial tumor: pathology and molecular carcinogenesis. **Current genomics**, v. 10, n. 2, p. 127-132, 2009.
- BATZER, M. A. & DEININGER, P. L. Alu repeats and human genomic diversity. **Nature reviews genetics**, v. 3, n. 5, p. 370, 2002.
- BECK, C. R. et al. LINE-1 retrotransposition activity in human genomes. **Cell**, v. 141, n. 7, p. 1159-1170, 2010.
- BOLLATI, V. et al. Changes in DNA methylation patterns in subjects exposed to low-dose benzene. **Cancer research**, v. 67, n. 3, p. 876-880, 2007.
- BONATO, P. S. et al. Fundamentos de Cromatografia. **Campinas, SP: Editora da Unicamp**, 2006.
- BONNET, D. & DICK, J. E. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. **Nature medicine**, v. 3, n. 7, p. 730-737, 1997.
- BRANDÃO, Y. O. Perfil de metilação do gene ESR1 em tumores de mama caninos (*canis familiaris*), 2017.
- BRASIL. Câncer relacionado ao trabalho: leucemia mielóide aguda–síndrome mielodisplásica decorrente da exposição ao benzeno. 2006.
- BRASIL. Ministério do Trabalho e Emprego. Acordo e legislação sobre o benzeno. São Paulo: Fundacentro; 1995.
- BRASIL. Ministério do Trabalho e Emprego. Portaria nº 10, de 8 de Setembro de 1994. Diário Oficial da União 1994; 12 set. 45.
- BRASIL. Normal Regulamentadora Nº 6, de 08 de Junho de 1978. Dispõe sobre o Equipamento de Proteção Individual – EPI. Disponível em: <<http://portal.mte.gov.br/data/files/8A7C812D36A2800001388130953C1EFB/NR-06%20%28atualizada%29%202011.pdf>> Acesso em: 13 jan. 2020.
- BRASIL. Portaria ANP nº 40, de 25 de outubro de 2013. Agência Nacional do Petróleo. Estabelece as especificações para a comercialização de gasolinas automotivas em todo o território nacional e obrigações dos agentes econômicos. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF.
- BUCZYNSKA, A. J. et al. Atmospheric BTEX-concentrations in an area with intensive street traffic. **Atmospheric Environment**, v. 43, n. 2, p. 311-318, 2009.

BULCÃO, R. et al. Quantificação simultânea de indicadores biológicos de exposição a solventes orgânicos por cromatografia líquida de alta eficiência. **Química Nova**, v. 31, n. 6, p. 1343-1348, 2008.

CAIAFA, P. et al. Epigenetics: poly (ADP-ribose) ation of PARP-1 regulates genomic methylation patterns. **The FASEB Journal**, v. 23, n. 3, p. 672-678, 2009.

CAMPOS, M. A. A. et al. Avaliação da exposição ocupacional ao benzeno em trabalhadores frentistas e analistas de combustíveis utilizando o Teste Cometa como biomarcador de genotoxicidade. **Revista Brasileira de Saúde Ocupacional**, v. 42, 2017.

CAMPOS, M. A. A. Teste cometa: validação do método e avaliação da exposição ocupacional ao benzeno presente na gasolina através dos biomarcadores de exposição e genotoxicidade. 2013.

CASARETT, L. J. et al. **Casarett and Doull's toxicology: the basic science of poisons**. Pergamon Press, 1991.

CHANG, R. **Introdução a Química Orgânica. Química Geral**. 11^a ed. Cap. 11 p. 374, 2007.

CHAUDHURI, A. R. & NUSSENZWEIG, A. The multifaceted roles of PARP1 in DNA repair and chromatin remodelling. **Nature reviews Molecular cell biology**, v. 18, n. 10, p. 610, 2017.

CHOU, D. M. et al. A chromatin localization screen reveals poly (ADP ribose)-regulated recruitment of the repressive polycomb and NuRD complexes to sites of DNA damage. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 107, n. 43, p. 18475-18480, 2010.

COGLIANO, V. J. et al. Preventable exposures associated with human cancers. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 103, n. 24, p. 1827-1839, 2011.

CORDAUX, R. & BATZER, M. A. The impact of retrotransposons on human genome evolution. **Nature Reviews Genetics**, v. 10, n. 10, p. 691, 2009.

COSTA-AMARAL, I. C. et al. Environmental Assessment and Evaluation of Oxidative Stress and Genotoxicity Biomarkers Related to Chronic Occupational Exposure to Benzene. **International journal of environmental research and public health**, v. 16, n. 12, p. 2240, 2019.

CROMPTON, M. R. et al. Identification of a novel vertebrate homeobox gene expressed in haematopoietic cells. **Nucleic acids research**, v. 20, n. 21, p. 5661-5667, 1992.

D'ALASCIO, R. G. et al. Sintomas relacionados à exposição ocupacional ao benzeno e hábitos ocupacionais em trabalhadores de postos de revenda de combustíveis a varejo na região sul de Santa Catarina. **Rev Bras Med Trab**, v. 12, n. 1, p. 21-9, 2014.

DA SILVA M., L. G. PERCEPÇÃO DOS FRENTISTAS DE POSTOS DE COMBUSTÍVEIS DE MUNICÍPIOS DO RECÔNCAVO DA BAHIA SOBRE SUAS CONDIÇÕES DE TRABALHO. **Textura**, v. 13, n. 21, p. 83-92, 2019.

- DE PAULA, F. C. S. et al. Avaliação do ácido trans, trans-mucônico urinário como biomarcador de exposição ao benzeno. **Revista de Saúde Pública**, v. 37, n. 6, p. 780-785, 2003.
- DE SOUZA, W. J & DE MEDEIROS, J. P. Diagnóstico da qualidade de vida no trabalho (qvt) de frentistas de postos de combustíveis e suas interfaces com a qualidade dos serviços prestados. **REGE Revista de Gestão**, v. 14, n. 3, p. 71-89, 2007.
- DEININGER, P. Alu elements: know the SINEs. **Genome biology**, v. 12, n. 12, p. 236, 2011.
- DEJEUX, E. et al. Identification and quantification of differentially methylated loci by the Pyrosequencing™ technology. In: **DNA Methylation**. Humana Press, 2009. p. 189-205.
- DENIS, H. et al. François. Regulation of mammalian DNA methyltransferases: a route to new mechanisms. **EMBO reports**, v. 12, n. 7, p. 647-656, 2011.
- DOLINOY, D. C. & JIRTLE, R. L. Environmental epigenomics in human health and disease. **Environmental and molecular mutagenesis**, v. 49, n. 1, p. 4-8, 2008.
- DUARTE-DAVIDSON, R. et al. Benzene in the environment: an assessment of the potential risks to the health of the population. **Occupational and environmental medicine**, v. 58, n. 1, p. 2-13, 2001.
- DUCOS, P. et al. Improvement in HPLC analysis of urinary trans, trans-muconic acid, a promising substitute for phenol in the assessment of benzene exposure. **International archives of occupational and environmental health**, v. 62, n. 7, p. 529-534, 1990.
- EATON, D. L. & GILBERT, S. G. Principles of toxicology. **Casarett & Doull's Toxicology. The Basic Science of Poisons**. CD Klaassen (ed), p. 11-34, 2008.
- EUROPEAN AGENCY FOR SAFETY AND HEALTH AT WORK (EU-OSHA). 2020. Disponível em: < <https://visualisation.osha.europa.eu/osh-costs#!/>>Acessado em: 06 jan 2020.
- FABIETTI, F. et al. Piccioli. Investigation into the benzene and toluene content of soft drinks. **Food Control**, v. 12, n. 8, p. 505-509, 2001.
- FEINBERG, A. P. & TYCKO, B. The history of cancer epigenetics. **Nature Reviews Cancer**, v. 4, n. 2, p. 143-153, 2004.
- FEINBERG, A. P. Epigenetics at the epicenter of modern medicine. **Jama**, v. 299, n. 11, p. 1345-1350, 2008.
- FENGA, C. et al. Benzene exposure is associated with epigenetic changes. **Molecular medicine reports**, v. 13, n. 4, p. 3401-3405, 2016.
- FERNÍCOLA, N. G. G. et al. Excreção urinária de fenol em trabalhadores de indústrias de calçados expostos ao benzeno. **Revista de Saúde Pública**, v. 10, p. 327-333, 1976.
- FERREIRA, C. G. & ROCHA, J. C. C. **Oncologia Molecular**. 2ªedição.Atheneu. 2005.

- FESCHOTTE, C. & PRITHAM, E. J. DNA transposons and the evolution of eukaryotic genomes. **Annu. Rev. Genet.**, v. 41, p. 331-368, 2007.
- FESCHOTTE, C. et al. Miniature inverted-repeat transposable elements and their relationship to established DNA transposons. In: **Mobile DNA II**. American Society of Microbiology, 2002.
- FRANTZ, C. E. et al. Inhibition of human topoisomerase II in vitro by bioactive benzene metabolites. **Environmental health perspectives**, v. 104, n. suppl 6, p. 1319-1323, 1996.
- FRITSCHI, L. & DRISCOLL, T. Cancer due to occupation in Australia. **Australian and New Zealand journal of public health**, v. 30, n. 3, p. 213-219, 2006.
- FUKUI, K. DNA mismatch repair in eukaryotes and bacteria. **Journal of nucleic acids**, v. 2010, 2010.
- FUNDACENTRO. Efeitos da Exposição ao Benzeno para a Saúde. Série Benzeno, n. 1. São Paulo, 2012.
- FUNDACENTRO. Fundação Jorge Duprat Figueiredo de Segurança e Medicina do Trabalho. 2011. Benzeno não é flor que se cheire, 2011.
- FUNDACENTRO. Manual de orientação sobre controle médico ocupacional da exposição a substâncias químicas. São Paulo, 2014.
- FUSTINONI, S. et al. Epigenetic modifications associated with low benzene exposure. **Giornale italiano di medicina del lavoro ed ergonomia**, v. 35, n. 4, p. 263-267, 2013.
- FUSTINONI, S. et al. Global DNA methylation and low-level exposure to benzene. **La Medicina del lavoro**, v. 103, n. 2, p. 84-95, 2012.
- GAO, A. et al. Methylation of PARP-1 promoter involved in the regulation of benzene-induced decrease of PARP-1 mRNA expression. **Toxicology letters**, v. 195, n. 2-3, p. 114-118, 2010.
- GERSON, S. L. MGMT: its role in cancer aetiology and cancer therapeutics. **Nature Reviews Cancer**, v. 4, n. 4, p. 296, 2004.
- GLOBOCAN. 2018. Disponível em: <https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-map?v=2018&mode=population&mode_population=continents&population=900&populations=900&key=asr&sex=0&cancer=39&type=0&statistic=5&prevalence=0&population_group=0&ages_group%5B%5D=0&ages_group%5B%5D=17&nb_items=5&group_cancer=1&include_nmsc=1&include_nmsc_other=1&projection=globe&color_palette=default&map_scale=quantile&map_nb_colors=5&continent=0&rotate=%255B10%252C0%252D> Acessado em: 06 jan 2020.
- GONTIJO, A. M. M. C. & TICE, R. Teste cometa para a detecção de dano no DNA e reparo em células individualizadas. **Mutagênese ambiental. Canoas: Ulbra**, p 173-200, 2003.
- GUPTE, R. et al. PARPs and ADP-ribosylation: recent advances linking molecular functions to biological outcomes. **Genes & Development**, v. 31, n. 2, p. 101-126, 2017.
- HENGSTLER, J. G. et al. Dietary topoisomerase II-poisons: contribution of soy products to infant leukemia? **EXCLI Journal**, v. 1, p. 8-14, 2002.

HENNING, R. J. et al. Poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) and PARP inhibitors: mechanisms of action and role in cardiovascular disorders. **Cardiovascular toxicology**, v. 18, n. 6, p. 493-506, 2018.

HINSHELWOOD, R. A. & CLARK, S. J. Breast cancer epigenetics: normal human mammary epithelial cells as a model system. **Journal of molecular medicine**, v. 86, n. 12, p. 1315-1328, 2008.

HOLLIDAY, R. Epigenetics: a historical overview. **Epigenetics**, v. 1, n. 2, p. 76-80, 2006.

HOU, L. et al. Environmental chemical exposures and human epigenetics. **International journal of epidemiology**, v. 41, n. 1, p. 79-105, 2011.

HSIEH, P. & YAMANE, K. DNA mismatch repair: molecular mechanism, cancer, and ageing. **Mechanisms of ageing and development**, v. 129, n. 7-8, p. 391-407, 2008.

INDULSKI, J. A. & LUTZ, W. Molecular epidemiology: cancer risk assessment using biomarkers for detecting early health effects in individuals exposed to occupational and environmental carcinogens. **Reviews on environmental health**, v. 12, n. 3, p. 179-190, 1997.

INOUE, O. et al. Determination of catechol and quinol in the urine of workers exposed to benzene. **Occupational and Environmental Medicine**, v. 45, n. 7, p. 487-492, 1988.

INSTITUTO NACIONAL DO CANCER (Brasil). ABC do câncer. Abordagens básicas para o controle do câncer. 5ª edição. Revista atual e ampliada. Rio de Janeiro: INCA, 2019.

INSTITUTO NACIONAL DO CANCER (Brasil). Diretrizes para vigilância do câncer relacionado ao trabalho. 2ª edição revista e atualizada. 2013.

INSTITUTO NACIONAL DO CANCER (Brasil). Estimativas 2020. Incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA, 2020. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files//media/document//estimativa-2020-incidencia-de-cancer-no-brasil.pdf>> Acessado em: 08 fev 2020.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER (IARC). Chemical Agents and Related Occupations. In: (Ed.). IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer, v.100F, 2012.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER (IARC). Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans: Some industrial chemicals and dyestuffs, v. 29, 1982. Disponível em: < <https://monographs.iarc.fr/wp-content/uploads/2018/06/mono29.pdf>> Acesso em: 06 jan. 2020.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER (IARC). Monographs on the identification of carcinogenic hazards to humans. Disponível em: <https://monographs.iarc.fr/list-of-classifications/>. Acessado em 06 jan. 2020.

JACKSON, J. T. et al. Hhex induces promyelocyte self-renewal and cooperates with growth factor independence to cause myeloid leukemia in mice. **Blood advances**, v. 2, n. 4, p. 347-360, 2018.

- JAVELAUD, B. et al. Benzene exposure in car mechanics and road tanker drivers. **International archives of occupational and environmental health**, v. 71, n. 4, p. 277-283, 1998.
- JIAO, J. et al. Occupational Solvent Exposure, Genetic Variation of DNA Repair Genes, and Risk of Non-Hodgkin Lymphoma. **European journal of cancer prevention: the official journal of the European Cancer Prevention Organisation (ECP)**, v. 21, n. 6, p. 580, 2012.
- JURKA, J. et al. Repetitive sequences in complex genomes: structure and evolution. **Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.**, v. 8, p. 241-259, 2007.
- KAINA, B. et al. MGMT: key node in the battle against genotoxicity, carcinogenicity and apoptosis induced by alkylating agents. **DNA repair**, v. 6, n. 8, p. 1079-1099, 2007.
- KAZAZIAN, H. H. Mobile elements: drivers of genome evolution. **science**, v. 303, n. 5664, p. 1626-1632, 2004.
- KAZAZIAN, H. H. & MORAN, J. V. The impact of L1 retrotransposons on the human genome. **Nature genetics**, v. 19, n. 1, p. 19, 1998.
- KHALADE, A. et al. Exposure to benzene at work and the risk of leukemia: a systematic review and meta-analysis. **Environmental Health**, v. 9, n. 1, p. 31, 2010.
- KIM, M. et al. Environmental toxicants— Induced epigenetic alterations and their reversers. **Journal of Environmental Science and Health, Part C**, v. 30, n. 4, p. 323-367, 2012.
- KIM, S. et al. Modeling human metabolism of benzene following occupational and environmental exposures. **Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers**, v. 15, n. 11, p. 2246-2252, 2006.
- KIM, S. et al. Structural variation of Alu element and human disease. **Genomics & informatics**, v. 14, n. 3, p. 70, 2016.
- KLAASSEN, C. D. et al. (Ed.). **Casarett and Doull's toxicology: the basic science of poisons**. New York: McGraw-Hill, 2013.
- KLAUNING J. E. & KAMENDDULIS L.M. Chemical carcinogenesis. In: Klaassen CD, editor. **Casarett and Doull's toxicology: the basic science of poisons**. 7th ed. New York: McGraw-Hill; c2008. p. 329-79.
- LAGORIO, S. et al. Exposure to benzene of service station employees and composition of benzene. **La Medicina del lavoro**, v. 85, n. 5, p. 412-421, 1994.
- LANDER, E. S. Initial sequencing and analysis of the human genome. International Human Genome Sequencing Consortium. **Nature**, v. 409, p. 860-921, 2001.
- LAUWERYS R. R. Occupational Toxicology. In: Casarett and Doull's Toxicology. The basic Science of poisons. Amdur MO, Doull J, Klassen CD, orgs. USA: Pergamon Press; 1991.
- LEVIN, H. L. & MORAN, J. V. Dynamic interactions between transposable elements and their hosts. **Nature Reviews Genetics**, v. 12, n. 9, p. 615, 2011.

- LI, G-M. Mechanisms and functions of DNA mismatch repair. **Cell research**, v. 18, n. 1, p. 85, 2008.
- LI, J. et al. MGMT hypomethylation is associated with DNA damage in workers exposed to low-dose benzene. **Biomarkers**, v. 22, n. 5, p. 470-475, 2017.
- LIN, LC. et al. Association between GST genetic polymorphism and dose-related production of urinary benzene metabolite markers, trans, trans-muconic acid and S-phenylmercapturic acid. **Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers**, v. 17, n. 6, p. 1460-1469, 2008.
- LINDSEY, R. H. et al. 1, 4-Benzoquinone is a topoisomerase II poison. **Biochemistry**, v. 43, n. 23, p. 7563-7574, 2004.
- LINDSEY, R. H. et al. Stimulation of topoisomerase II-mediated DNA cleavage by benzene metabolites. **Chemico-biological interactions**, v. 153, p. 197-205, 2005.
- LIU, CY. et al. Prenatal perfluorooctyl sulfonate exposure and Alu DNA hypomethylation in cord blood. **International journal of environmental research and public health**, v. 15, n. 6, p. 1066, 2018.
- LIU, L. & GERSON, S. L. Targeted modulation of MGMT: clinical implications. **Clinical cancer research**, v. 12, n. 2, p. 328-331, 2006.
- LOPEZ, J. et al. The context and potential of epigenetics in oncology. **British journal of cancer**, v. 100, n. 4, p. 571-577, 2009.
- LOVREGLIO, P. et al. DNA damage and repair capacity in workers exposed to low concentrations of benzene. **Environmental and molecular mutagenesis**, v. 57, n. 2, p. 151-158, 2016.
- MACHADO, J. M. H. et al. Alternativas e processos de vigilância em saúde do trabalhador relacionados à exposição ao benzeno no Brasil. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 8, n. 4, p. 913-921, 2003.
- MAKSOU, HÁ. A. et al. Biochemical study on occupational inhalation of benzene vapours in petrol station. **Respiratory medicine case reports**, v. 27, p. 100836, 2019.
- MALUF, S. W. et al. Assessment of DNA damage in lymphocytes of workers exposed to X-radiation using the micronucleus test and the comet assay. **Environmental and molecular mutagenesis**, v. 38, n. 4, p. 311-315, 2001.
- MARRUBINI, G. et al. Effect of sorbic acid administration on urinary trans, trans-muconic acid excretion in rats exposed to low levels of benzene. **Food and chemical toxicology**, v. 40, n. 12, p. 1799-1806, 2002.
- MARSIT, C. J. & CHRISTENSEN, B. C. Epigenomics in environmental health. **Frontiers in genetics**, v. 2, p. 84, 2011.
- MASSON, M. et al. XRCC1 is specifically associated with poly (ADP-ribose) polymerase and negatively regulates its activity following DNA damage. **Molecular and cellular biology**, v. 18, n. 6, p. 3563-3571, 1998.

- MCHALE, C. M. et al. Current understanding of the mechanism of benzene-induced leukemia in humans: implications for risk assessment. **Carcinogenesis**, v. 33, n. 2, p. 240-252, 2012.
- MENEZES, M. et al. Influência do hábito de fumar na excreção urinária do ácido trans, trans-mucônico. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 44, n. 3, p. 459-464, 2008.
- MICHEL, O. R. Toxicologia ocupacional. **Revinter**, Rio de Janeiro: p. 86-90.2000.
- MILLER, E. C.; MILLER, J. A. Mechanisms of chemical carcinogenesis. **Cancer**, v. 47, n. S5, p. 1055-1064, 1981.
- MINISTERIO DA SAÚDE (MS). 2018. Atlas relacionado ao trabalho no Brasil. Brasília-DF, 2018.
- MINISTERIO DO TRABALHO E DO EMPREGO (Brasil). Norma Regulamentadora 9. Brasília: Diário Oficial da União 2004; Seção 1.
- MINISTERIO DO TRABALHO E DO EMPREGO (MTE). Portaria 3.214 de jul. 2001. Normas regulamentadoras de segurança e saúde no trabalho (NR-15): atividades e operações insalubres. Brasília, 2001. Disponível em: <<http://www.mte.gov.br/temas/segsau/legislacao/normas/conteudo/nr15>>. Acesso em: 07 jan. 2020.
- MINISTÉRIO DO TRABALHO E EMPREGO (TEM); PORTARIA INTERMINISTERIAL N.º 9, DE 07 DE OUTUBRO DE 2014. Disponível em: <https://enit.trabalho.gov.br/portal/images/Arquivos_SST/SST_Legislacao/SST_Legislacao_Portarias_2014/Portaria-Inter-n.-09-LINACH.pdf> Acessado em: 07 jan. 2020.
- MIRANDA, C. R. et al. Exposição ocupacional ao benzeno em trabalhadores do complexo petroquímico de Camaçari, Bahia. **Bol. Soc. Bras. Hematol. Hemoter**, p. 59-63, 1998.
- MOHAMMAD SHEIKHHA, H. et al. High level of microsatellite instability but not hypermethylation of mismatch repair genes in therapy-related and secondary acute myeloid leukaemia and myelodysplastic syndrome. **British journal of haematology**, v. 117, n. 2, p. 359-365, 2002.
- MOLLOY, P. L.; WATT, F. DNA methylation and specific protein—DNA interactions. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London. B, Biological Sciences**, v. 326, n. 1235, p. 267-275, 1990.
- MORIYAMA, I. N. H. et al. Prevenção da exposição ocupacional ao benzeno em trabalhadores de postos de revenda de combustíveis: a experiência do estado do Espírito Santo. **Revista Brasileira de Saúde Ocupacional**, v. 42, 2017.
- MURHERJEE, S. O imperador de todos os males. *Companhia das Letras, São Paulo*, 2010.
- NAN, X. et al. Transcriptional repression by the methyl-CpG-binding protein MeCP2 involves a histone deacetylase complex. **Nature**, v. 393, n. 6683, p. 386, 1998.
- NICIURA, S. C. M.; SARAIVA, Naiara Zoccal (Ed.). **Epigenética: bases moleculares, efeitos na fisiologia e na patologia, e implicacoes para a producao animal ea vegetal**. Embrapa, 2014.

NOUROZI, M.A. et al. Association between polymorphism of GSTP1, GSTT1, GSTM1 and CYP2E1 genes and susceptibility to benzene-induced hematotoxicity. **Archives of toxicology**, v. 92, n. 6, p. 1983-1990, 2018.

NUNES, A. G. M. et al. QUALIDADE DE VIDA NO TRABALHO DE MULHERES FRENTISTAS NOS POSTOS ESPIGÃO DE SANTANA DO LIVRAMENTO. **Anais do Salão Internacional de Ensino, Pesquisa e Extensão**, v. 9, n. 3, 2018.

O'NEIL, M. J. et al. The merck index: An encyclopedia of Chemicals. **Drugs, and Biologicals**, v. 13, 2006.

OCCUPATIONAL SAFETY AND HEALTH ADMINISTRATION (OSHA). 1981. Department of Labor. US Regulation: identification, classification, and regulation of potential occupational carcinogens. Title 29: Labor, Chapter XVII. 1981. Disponível em: <<http://law.justia.com/cfr/title29/29-9.1.1.1.16.html>>. Acessado em: 06 jan 2020.

OCCUPATIONAL SAFETY AND HEALTH ADMINISTRATION (OSHA). Council Directive 97/42/EC of 27 June 1997 amending for the first time Directive 90/394/EEC on protecting workers from risks related to exposure to carcinogens at work [Sixth Individual Directive according to Art. 16(1) of Directive 78 89/391/EEC]. Official Journal of the European Communities No. L179, 08.07.1997. Brussels, Belgium: European Commission; 1997.

OGA, S. et al. Introdução à toxicologia. **Fundamentos de Toxicologia**, 2008.

OKANO, S. et al. Spatial and temporal cellular responses to single-strand breaks in human cells. **Molecular and cellular biology**, v. 23, n. 11, p. 3974-3981, 2008.

OLIVEIRA, A. C. S. et al. O impacto do consumo de refrigerantes na saúde de escolares do Colégio Gissoni. **Rev Eletrônica Novo Enfoque**, v. 12, n. 12, p. 68-79, 2011.

OLIVEIRA, P. A. et al. Chemical carcinogenesis. **Anais da academia brasileira de ciências**, v. 79, n. 4, p. 593-616, 2007.

Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS). Folha informativa – câncer [internet]. 2018. Acessado no dia de setembro de 2019. Disponível em: <https://www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article&id=5588:folha-informativa-cancer&Itemid=1094> Acessado em: 06 jan 2020.

PANEV, T. et al. Assessment of the correlation between exposure to benzene and urinary excretion of t, t-muconic acid in workers from a petrochemical plant. **International archives of occupational and environmental health**, v. 75, n. 1, p. 97-100, 2002.

PATCHSUNG, M. et al. Alu siRNA to increase Alu element methylation and prevent DNA damage. **Epigenomics**, v. 10, n. 2, p. 175-185, 2018.

PATTERSON, K. et al. DNA methylation: bisulphite modification and analysis. **JoVE (Journal of Visualized Experiments)**, n. 56, p. e3170, 2011.

PEDERSEN-BJERGOARD, J. et al. Balanced chromosome aberrations in leukemias following chemotherapy with DNA-topoisomerase II inhibitors. **Journal of clinical oncology**, v. 16, n. 5, p. 1897-1898, 1998.

- PESQUERO, C. R. Avaliação ambiental dos compostos orgânicos aromáticos presentes em atmosferas industriais [Tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo; 2001.
- PEZZAGNO, G. et al. Trans, Trans-muconic acid, a biological indicator to low levels of environmental benzene: Some aspects of its specificity. **American journal of industrial medicine**, v. 35, n. 5, p. 511-518, 1999.
- PRAY, L. Transposons, or jumping genes: Not junk DNA. **Nature Education**, v. 1, n. 1, p. 32, 2008.
- PURDUE, M. P. et al. The proportion of cancer attributable to occupational exposures. **Annals of epidemiology**, v. 25, n. 3, p. 188-192, 2015.
- REKHADEVI, P. V. et al. Genotoxicity in filling station attendants exposed to petroleum hydrocarbons. **Annals of Occupational Hygiene**, v. 54, n. 8, p. 944-954, 2010.
- REN, J. et al. The prevalence and persistence of aberrant promoter DNA methylation in benzene-exposed Chinese workers. **PloS one**, v. 14, n. 8, 2019.
- RIBEIRO, L. R. *et al.* **Mutagênese Ambiental**. 1ª edição, Canoas: Ed. ULBRA, 2003.
- ROMA-TORRES, J. et al. Evaluation of genotoxicity in a group of workers from a petroleum refinery aromatics plant. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 604, n. 1-2, p. 19-27, 2006.
- RONAGHI, M. Pyrosequencing sheds light on DNA sequencing. **Genome research**, v. 11, n. 1, p. 3-11, 2001.
- RUIZ, M. A. *et al.* Alterações hematológicas em pacientes expostos cronicamente ao benzeno. **Revista de saúde pública**, v. 27, n. 2, p. 145-151, 1993.
- SAITO, R. F. et al. **Fundamentos de oncologia molecular**. 2015.
- SALEM, E. et al. Genotoxic effects of occupational exposure to benzene in gasoline station workers. **Industrial health**, v. 56, n. 2, p. 132-140, 2018.
- SAMEER, A. S. et al. Mismatch repair pathway: molecules, functions, and role in colorectal carcinogenesis. **European Journal of Cancer Prevention**, v. 23, n. 4, p. 246-257, 2014.
- SANCHEZ, André Brunelli et al. Determinação de benzeno em bebidas comerciais. 2008.
- SANMIGUEL, P. et al. Nested retrotransposons in the intergenic regions of the maize genome. **Science**, v. 274, n. 5288, p. 765-768, 1996.
- SANTOS, D. N. C. **Avaliação citogenética e molecular de trabalhadores intoxicados pelo benzeno**. 2012. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.
- SANTOS, G. N. Escolha profissional e gênero. **Psicologia-Pedra Branca**, 2011.
- SANTOS, M. V. C. et al. Aspectos toxicológicos do benzeno, biomarcadores de exposição e conflitos de interesses. **Revista Brasileira de Saúde Ocupacional**, v. 42, 2017.

- SCHERER, G. et al. Analysis and evaluation of trans, trans-muconic acid as a biomarker for benzene exposure. **Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications**, v. 717, n. 1-2, p. 179-199, 1998.
- SCHILLING, R. S. F. More effective prevention in occupational health practice?. **Occupational Medicine**, v. 34, n. 3, p. 71-79, 1984.
- SEOW, W. J. et al. Urinary benzene biomarkers and DNA methylation in Bulgarian petrochemical workers: study findings and comparison of linear and beta regression models. **PLoS One**, v. 7, n. 12, 2012.
- SHA, Y. et al. Changes in poly (ADP-ribosyl) ation patterns in workers exposed to BTX. **PloS one**, v. 9, n. 9, p. e106146, 2014.
- SIMONATO, L, SARACCI R. Cancer occupational. In: Parmeggiani L, technical editor. **Encyclopaedia of Occupational Health and Safety**. 3rd ed. Geneva: International Labour Office; 1983.
- SMITH, M. T. Advances in understanding benzene health effects and susceptibility. **Annual review of public health**, v. 31, p. 133-148, 2010.
- SMITH, M. T. et al. Low NAD (P) H: quinone oxidoreductase 1 activity is associated with increased risk of acute leukemia in adults. **Blood, The Journal of the American Society of Hematology**, v. 97, n. 5, p. 1422-1426, 2001.
- SMITH, M. T. et al. Peroxidase-dependent metabolism of benzene's phenolic metabolites and its potential role in benzene toxicity and carcinogenicity. **Environmental Health Perspectives**, v. 82, p. 23-29, 1989.
- SMITH, M. T. The mechanism of benzene-induced leukemia: a hypothesis and speculations on the causes of leukemia. **Environmental health perspectives**, v. 104, n. suppl 6, p. 1219-1225, 1996.
- SNYDER, R. et al. Studies on the mechanism of benzene toxicity. **Environmental health perspectives**, v. 82, p. 31-35, 1989.
- SNYDER, R. Leukemia and benzene. **International journal of environmental research and public health**, v. 9, n. 8, p. 2875-2893, 2012.
- SNYDER, R. Overview of the toxicology of benzene. **Journal of toxicology and environmental health Part A**, v. 61, n. 5-6, p. 339-346, 2000.
- SOREK, R. et al. Alu-containing exons are alternatively spliced. **Genome research**, v. 12, n. 7, p. 1060-1067, 2002.
- SPEIT, G; HARTMANN, A. The comet assay. In: **DNA Repair Protocols**. Humana Press, 2006. p. 275-286.
- SUBRAHMANYAM, V. V. et al. Potential role of free radicals in benzene-induced myelotoxicity and leukemia. **Free radical biology and medicine**, v. 11, n. 5, p. 495-515, 1991.
- SWAGATIKA, S. & TOMAR, R. S. Modulation of Epigenetics by Environmental Toxic Molecules. In: **Advances in Molecular Toxicology**. Elsevier, 2016. p. 361-389.
- TABERLAY, P. C. & JONES, P. A. DNA methylation and cancer. In: **Epigenetics and Disease**. Springer, Basel, 2011. p. 1-23.

- TARDIFF, R. G. et al. Methods to assess DNA damage and repair: interspecies comparisons. 1994.
- TICE, R R. et al. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. **Environmental and molecular mutagenesis**, v. 35, n. 3, p. 206-221, 2000.
- VAN MIDDENDORP, J. J. et al. The Edwin Smith papyrus: a clinical reappraisal of the oldest known document on spinal injuries. **European Spine Journal**, v. 19, n. 11, p. 1815-1823, 2010.
- VAN SITTEERT, N. J. et al. Application of the urinary S-phenylmercapturic acid test as a biomarker for low levels of exposure to benzene in industry. **Occupational and Environmental Medicine**, v. 50, n. 5, p. 460-469, 1993.
- VERMA, M. et al. Early detection and risk assessment proceedings and recommendations from the workshop on epigenetics in cancer prevention. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 983, n. 1, p. 298-319, 2003.
- WATERLAND, R. A. & JIRTLE, R. L. Early nutrition, epigenetic changes at transposons and imprinted genes, and enhanced susceptibility to adult chronic diseases. **Nutrition**, v. 20, n. 1, p. 63, 2004.
- WATSON, J. D. **The polymerase chain reaction**. Springer Science & Business Media, 2012.
- WEBER, M. et al. Distribution, silencing potential and evolutionary impact of promoter DNA methylation in the human genome. **Nature genetics**, v. 39, n. 4, p. 457, 2007.
- WEBER, M. et al. Genomic patterns of DNA methylation: targets and function of an epigenetic mark. **Current opinion in cell biology**, v. 19, n. 3, p. 273-280, 2007.
- WEINBERG, Robert A. **A biologia do câncer**. Artmed Editora, 2016.
- WEISEL, C. P. Benzene exposure: an overview of monitoring methods and their findings. **Chemico-biological interactions**, v. 184, n. 1-2, p. 58-66, 2010.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO), 2019. Disponível em: <https://www.who.int/health-topics/cancer#tab=tab_1> Acessado em: 06 jan 2020.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Air Quality Guidelines for Europe. WHO Regional Publications, v. 2, n. 91, p. 62-66, 2000.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Biological Monitoring of Chemical Exposure in the Workplace. v.1-2, Geneva; 1996.
- World Health Organization (WHO). Statistic about cancer. 2018. Disponível em <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>> Acessado em: 07 jun.2020.
- WU, S. et al. Evaluating intrinsic and non-intrinsic cancer risk factors. **Nature communications**, v. 9, n. 1, p. 1-12, 2018.

XU, X. et al. Association of petrochemical exposure with spontaneous abortion. **Occupational and Environmental Medicine**, v. 55, n. 1, p. 31-36, 1998.

ZHANG, G-H. et al. Association of BER and NER pathway polymorphism haplotypes and micronucleus frequencies with global DNA methylation in benzene-exposed workers of China: Effects of DNA repair genes polymorphisms on genetic damage. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 839, p. 13-20, 2019.

ZHANG, L. et al. Systems biology of human benzene exposure. **Chemico-biological interactions**, v. 184, n. 1-2, p. 86-93, 2010.

9. ANEXOS

9.1 ANEXO 1 – Registro do comitê de ética



A(o): Ubirani Barros Otero
Pesquisador(a) Principal



Rio de Janeiro, 23 de julho de 2014.

Registro CEP nº 121/09 (Este nº. deve ser citado nas correspondências referentes a este estudo)
Título do Estudo: Projeto Piloto para o desenvolvimento de metodologia para avaliar os efeitos da exposição a BTX na saúde de trabalhadores de postos de combustíveis

Prezado(a) Pesquisador(a),

Informo que o Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Nacional de Câncer **analisou e aprovou o Adendo datado de 14/5/14**, relacionado ao estudo acima, em sua reunião de 14 de julho de 2014.

Atenciosamente,

Dr. Carlos Roberto D. Silva
Representante
Comitê de Ética em Pesquisa
CEP INCA

9.2 ANEXO 2 – Termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE)

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA (INCA)
COORDENAÇÃO GERAL DE PREVENÇÃO E VIGILÂNCIA
UNIDADE TÉCNICA DE EXPOSIÇÃO OCUPACIONAL, AMBIENTAL E CÂNCER

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA VOLUNTÁRIO NÃO EXPOSTO OCUPACIONALMENTE A GASOLINA

PROJETO DE PESQUISA: "MONITORAMENTO BIOLÓGICO E AVALIAÇÃO DOS EFEITOS MUTAGÊNICOS E IMUNOTÓXICOS DO BENZENO NA SAÚDE DOS TRABALHADORES DOS POSTOS DE COMBUSTÍVEIS DO RIO DE JANEIRO"

Nome do Voluntário:

Você está sendo convidado a participar de um projeto que busca identificar os efeitos da exposição ao benzeno em trabalhadores de postos de combustíveis. O Projeto visa implementar medidas de prevenção de doenças relacionadas a exposição ocupacional a substâncias químicas. No entanto, para que você possa decidir se quer participar ou não deste estudo, precisa conhecer seus benefícios, riscos e implicações.

OBJETIVO DO ESTUDO

O objetivo do presente projeto é caracterizar os riscos relacionados à exposição ocupacional ao benzeno entre trabalhadores de postos de gasolina do município do Rio de Janeiro.

PROCEDIMENTOS DA PESQUISA:

O sr(a) foi escolhido(a) para participar deste projeto por **não exercer** nenhuma atividade ocupacional que o exponha a produtos derivados da gasolina. Se o(a) sr(a) concordar em participar deste estudo serão aplicados 2 questionários por entrevistadores treinados. As perguntas abrangem suas condições sócio-demográficas e seu histórico de saúde.

Se o senhor concordar em participar do estudo, responderá a algumas perguntas; fará exame clínico e doará em torno de 10ml de sangue e 5ml urina para realização das seguintes análises:

- Hemograma completo e bioquímica
- Análise genética e Imunofenotipagem

- Avaliação dos indicadores de exposição na urina através da análise dos níveis de ácido trans-trans-mucônico.

Essas análises são importantes, pois permitirão avaliar os níveis de exposição ao benzeno e os efeitos das substâncias presentes nos combustíveis sobre as suas células e a sua saúde.

TODOS OS RESULTADOS SERÃO MANTIDOS EM SIGILO E DEVOLVIDOS APENAS A VOCÊ.

O exame clínico será realizado por um profissional de saúde capacitado que aplicará um questionário com perguntas sobre seu histórico de saúde, estilo de vida e seu histórico de saúde familiar.

MÉTODOS ALTERNATIVOS

Não haverá outro método alternativo de coleta de informações.

-
- **RISCOS**

Não existe risco associado com a participação neste estudo. Cabe destacar que apenas você vai receber os resultados dos exames clínicos e laboratoriais.

ACOMPANHAMENTO, ASSISTÊNCIA E RESPONSÁVEIS

Estão previstos 3 encontros. No primeiro, os questionários sócio demográfico e clínico serão aplicados por entrevistadores, no segundo encontro serão coletadas as amostras de sangue e urina e no terceiro o resultado do seu exame será entregue.

Os profissionais que atuam nesse projeto pertencem a Unidade Técnica de Exposição Ocupacional, Ambiental e Câncer, Coordenação Geral de Prevenção e Vigilância do Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva - INCA / MS e ao Departamento de Farmacologia e Toxicologia do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz.

CARÁTER CONFIDENCIAL DOS REGISTROS

Além da equipe da pesquisa, seus dados poderão ser consultados pelo Comitê de Ética do Hospital do Câncer I –INCA. No entanto, os seus dados individuais serão mantidos em sigilo e os resultados serão divulgados em forma de relatórios estatísticos.

- **CUSTOS**

A participação neste estudo será voluntária e não haverá qualquer forma de pagamento ao voluntário pela sua participação.

- **BASES DA PARTICIPAÇÃO**

É importante que você saiba que pode se recusar a participar deste estudo sem penalidades ou perda de benefícios aos quais você tem direito.

-

- **GARANTIA DE ESCLARECIMENTOS**

Nós estimulamos você a fazer perguntas a qualquer momento do estudo. Neste caso, por favor, ligue para a Dra Ubirani Barros Otero ou para a Dra Marcia Sarpa de Campos Mello da Unidade Técnica de Exposição Ocupacional, Ambiental e Câncer, Coordenação Geral de Prevenção e Vigilância do Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva/MS, nos telefones (21) 3207-5967 ou 3207-5969 ou para a Dra Karen Friedrich do Departamento de Farmacologia e Toxicologia do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz, nos telefones (21) 3865-5157 ou 3865-5235. Se você tiver perguntas com relação a seus direitos como participante do estudo, também pode contar com o Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa Dr Carlos Henrique Debenedito Silva - Rua do Resende, nº128 no telefone (021) 3207-4450 ou 3207-4556.

DECLARAÇÃO DE CONSENTIMENTO E ASSINATURA

Li as informações acima e entendi o propósito deste estudo assim como os benefícios e riscos potenciais da participação no mesmo. Tive a oportunidade de fazer perguntas e todas foram respondidas. Eu, por intermédio deste, dou livremente meu consentimento para participar neste estudo.

Entendo que não receberei compensação monetária por minha participação neste estudo.

Eu recebi uma cópia assinada deste formulário de consentimento.

_____ / ____ / ____
(Assinatura do Participante) dia mês ano

(Nome do Participante – letra de forma)

_____ / ____ / ____
(Assinatura de Testemunha, se necessário) dia mês ano

Eu, abaixo assinado, expliquei completamente os detalhes relevantes deste estudo ao voluntário indicado acima.

_____ / ____ / ____
(Assinatura da pessoa que obteve o consentimento) dia mêsano

• Módulo 2: Informações sobre Exposição Ocupacional

(16) Qual sua situação atual no mercado de trabalho?

- 1-Empregado registrado CLT/ carteira assinada 5-Cooperativado 9- NS/NR
 2-Empregado não registrado 6-Aposentado
 3-Autônomo / conta própria 7-Empregador
 4-Trabalho temporário 8- Outros: _____

(17) Você é sindicalizado? 1-Sim 0- Não 9- NS/NR

(17a) Se sim, qual o sindicato? _____

(18) Com que idade começou a trabalhar em postos de combustíveis? _____ anos 9- NS/NR

(19) Antes de trabalhar neste posto de abastecimento, quais trabalhos que o sr (a) permaneceu por mais tempo?

ONDE (local / estabelecimento)?(CNAE)	O QUE FAZIA(nessa ocupação)? (CBO)	POR QUANTO TEMPO?	
		Nº.	Meses/Ano

(20) Qual sua ocupação atual?

- 1-Frentista
 2-Gerente / Encarregado de pista
 3-Lubrificador
 4- Lavador de carro
 5-Loja de conveniência
 6- Segurança
 7- Escritório
 8-Outros: _____
 9- NS/NR

(21) Qual ou quais atividade(s) que o sr (a) desempenha nessa ocupação?

- A- Abastece 1- Sim 0- Não 9- NS/NR
 B- Caixa 1- Sim 0- Não 9- NS/NR
 C- Calibra pneus 1- Sim 0- Não 9- NS/NR
 D- Lava carros /vidros 1- Sim 0- Não 9- NS/NR

E- Verifica água	1- Sim 0- Não 9- NS/NR
F- Verifica / troca óleo	1- Sim 0- Não 9- NS/NR
G- Realiza leitura dos tanques dos subsolo do posto	1- Sim 0- Não 9- NS/NR
H- Recebe combustível	1- Sim 0- Não 9- NS/NR
I- Coleta amostras do caminhão tanque	1- Sim 0- Não 9- NS/NR
J- Outros : _____	
(22) Há quanto tempo o sr (a) trabalha nesta ocupação? _____ 9- NS/NR	
(23) Qual seu horário de trabalho predominante?	
1- __ __ ás __ __ 9- NS/NR	
(24) O sr(a) tem folga?	
0- 1x /semana	
1- 2x / semana	
2- 3x ou mais por semana	
3- Não	
9- NS/NR	
(25) Quais desses procedimentos o sr (a) realiza durante o seu trabalho? Entrevistador leia todas as opções	
A- Uso do paninho / flanela	1- Sim 0- Não 9- NS/NR
B- Aproxima o rosto quando abastece até a boca	1- Sim 0- Não 9- NS/NR
C- Cheira a tampa do carro antes de abastecer	1- Sim 0- Não 9- NS/NR
D- Confia no bico automático	1- Sim 0- Não 9- NS/NR
E- Aspira combustíveis com a mangueira	1- Sim 0- Não 9- NS/NR
F- Roupa molhada de combustível	1- Sim 0- Não 9- NS/NR
G- Lava carros	1- Sim 0- Não 9- NS/NR
H- Uso do querosene ou outra substância para dar brilho no carro	1- Sim 0- Não 9- NS/NR
I- Outro? 1-Sim Qual: _____	
0- Não	9- NS/NR

(26) Quais combustíveis o sr(a) abastece? Entrevistador leia todas as opções

A - Gasolina Comum 1- Sim 0- Não 9- NS/NR

B - Gasolina Aditivada 1- Sim 0- Não 9- NS/NR

C - Diesel 1- Sim 0- Não 9- NS/NR

D - Etanol 1- Sim 0- Não 9- NS/NR

E- GNV 1- Sim 0- Não 9- NS/NR

F-Outros: _____

(27) O sr(a) realiza (ou) coleta de amostras do caminhão tanque?

1- Sim, realiza atualmente 2- Não realiza atualmente, mas já realizou

0- Nunca fez 9- NS/NR

(28) Por quanto tempo o sr(a) realiza (ou) coleta das amostras do caminhão tanque?

Tempo: |__| |__| meses / anos 9- NS/NR

(29) O sr(a) usa (va) equipamentos diferentes do uniforme durante as coletas do caminhão tanque?

1- Sim Quais: _____

0- Não 9- NS/NR

(30) Onde são armazenadas as amostras de combustíveis?

1- Escritório

2- Sala de refeição / refeitório

3- Loja de conveniência

4- Banheiro

5- Sala exclusiva para armazenar combustível

6- Outro local fora do posto

7- Outros: Quais: _____

9- NS/NR

(31) O sr(a) realiza ou já realizou medição dos níveis dos tanques do subsolo?

1- Eletrônica

2- Manual com régua

0- Não realiza

9- NS/NR

(32) Por quanto tempo o sr(a) realiza(ou) este tipo de medição dos níveis dos tanques do subsolo?

Tempo:| __ || __ | meses / anos

8-NA

9-NS/NR

(33) O sr(a) usa (ou) algum equipamento de proteção, além do uniforme, durante a medição dos níveis dos tanques do subsolo?

1- SimQuais: _____

0- Não

9- NS/NR

8-NA

(34) O sr(a) realiza(ou) limpeza da caixa separadora de água e óleo?

• **1-Sim - Por quanto tempo?**| __ || __ | meses / anos

0- Não

9- NS/NR

•

(35) O sr(a) realiza (ou) troca de óleo de carro?

1- Sim – Por quanto tempo?| __ || __ | meses / anos

• **0-Não9- NS/NR**

(36) O sr(a) realiza (ou) aferição da bomba de combustível?

1- Sim – Por quanto tempo?| __ || __ | meses / anos

0- Não

9- NS/NR

(37) Alguns dos eventos a seguir foram sofridos pelo sr(a) nesta função?

- A- Assaltos 1- Sim 0- Não 9- NS/NR
B- Atropelamentos 1- Sim 0- Não 9- NS/NR
C- Incêndio / explosão 1- Sim 0- Não 9- NS/NR
D- Vazamento de combustível no posto 1- Sim 0- Não 9- NS/NR
E- Exposição ao combustível (banho/intoxicação) 1- Sim 0- Não 9- NS/NR
F- Vazamento de gás (GNV) 1- Sim 0- Não 9- NS/NR
G- Queimadura 1- Sim 0- Não 9- NS/NR
H- Vazamento de combustível no carro do cliente 1- Sim 0- Não 9- NS/NR
I- Discussão com cliente 1- Sim 0- Não 9- NS/NR
J- Assédio (moral / sexual) 1- Sim 0- Não 9- NS/NR
H- Outro: 1- Sim Quais: _____
0- Não 9- NS/NR

(38) Nos últimos 12 meses o sr(a) realizou algum exame de imagem? (raio x, tomografia, ressonância?)

- 0- Não
1- Sim Especifique abaixo o(s) local(is) do corpo, tipo de exame e mês que realizou o último exame
Cabeça: tipo: _____ mês: _____
Tórax: tipo: _____ mês: _____
Braço: tipo: _____ mês: _____
Perna: tipo: _____ mês: _____
Outra parte do corpo: Especifique: _____ tipo: _____ mês: _____
9- NS/NR

(39)O Sr (a) realizou algum tipo de tratamento com radioterapia ou quimioterapia?

0- Não

1- SimQual:_____

Local do corpo:_____

9- NS/NR

**EXPOSIÇÃO ATUAL:
POR FAVOR, INFORME TODAS AS SUBSTÂNCIAS QUÍMICAS AS
QUAIS O(A) SR.(A) É EXPOSTO NESTE TRABALHO ATUAL.**

• SUBSTÂNCIAS E PRODUTOS QUÍMICOS

40- O (a) sr(a) algum tipo de contato (dérmico, olfativo, etc)?	40- Com que frequência o (a)sr(a) tem contato ? <u>Entrevistador: Leia as alternativas</u>
<ul style="list-style-type: none"> • <u>A. Gasolina</u> 1-Sim 0- Não 9-NS/NR	1-Diariamente 2-Semanalmente vezes da semana 3-Raramente/Nunca 4-Não tem contato 9-NS/NR
B. Etanol (Álcool) 1-Sim 0- Não 9-NS/NR	1-Diariamente 2-Semanalmente vezes da semana 3-Raramente/Nunca 4-Não tem contato 9-NS/NR
<ul style="list-style-type: none"> • <u>C. Diesel</u> 1-Sim 0- Não 9-NS/NR	1-Diariamente 2-Semanalmente vezes da semana 3-Raramente/Nunca 4-Não tem contato 9-NS/NR
<ul style="list-style-type: none"> • <u>D. GNV</u> 1-Sim 0- Não 9-NS/NR	1-Diariamente 2-Semanalmente vezes da semana 3-Raramente/Nunca 4-Não tem contato 9-NS/NR
E. Fumaças de carro, caminhão e motos 1-Sim 0- Não 9-NS/NR	1-Diariamente 2-Semanalmente vezes da semana 3-Raramente/Nunca 4-Não tem contato 9-NS/NR
F. Querosene 1-Sim 0- Não 9-NS/NR	1-Diariamente 2-Semanalmente vezes da semana 3-Raramente/Nunca 4-Não tem contato 9-NS/NR
G. Óleo lubrificante 1-Sim 0- Não 9-NS/NR	1-Diariamente 2-Semanalmente vezes da semana 3-Raramente/Nunca 4-Não tem contato 9-NS/NR
H. Produtos de Limpeza Especificar: _____ 1-Sim 0- Não 9-NS/NR	1-Diariamente 2-Semanalmente vezes da semana 3-Raramente/Nunca 4-Não tem contato 9-NS/NR

<ul style="list-style-type: none"> I. <u>Graxa e cera</u> 1-Sim 0- Não 9-NS/NR	1-Diariamente 2-Semanalmente vezes da semana 3-Raramente/Nunca 4-Não tem contato 9-NS/NR
<ul style="list-style-type: none"> J. <u>Solventes, removedores, aguarrás, thinner</u> 1-Sim 0- Não 9-NS/NR	1-Diariamente 2-Semanalmente vezes da semana 3-Raramente/Nunca 4-Não tem contato 9-NS/NR
<ul style="list-style-type: none"> L. <u>Outros, Especificar:</u> 	1-Diariamente 2-Semanalmente vezes da semana 3-Raramente/Nunca 4-Não tem contato 9-NS/NR
<ul style="list-style-type: none"> M. <u>Outros, Especificar:</u> 	1-Diariamente 2-Semanalmente vezes da semana 3-Raramente/Nunca 4-Não tem contato 9-NS/NR
<ul style="list-style-type: none"> N. <u>Outros, Especificar:</u> 	1-Diariamente 2-Semanalmente vezes da semana 3-Raramente/Nunca 4-Não tem contato 9-NS/NR

PERCEPÇÃO DO ENTREVISTADOR:

A - Confiança nas respostas:

Confio totalmente

Confio Parcialmente

Não Confio

OBSERVAÇÕES: _____

•

•

(10) Doenças Psíquicas:	1-Sim0- Não 9- NS/NR
(10.1)Qual(is): _____	
(11) Doenças Osteoarticulares:	1-Sim0- Não 9- NS/NR
(11.1)Qual(is): _____	
(12) Doenças Uro/ginecológicas:	1-Sim0- Não 9- NS/NR
(12.1)Qual(is): _____	
(13) Doenças Otorrinolaringológicas:	1-Sim 0- Não 9- NS/NR
(13.1)Qual(is): _____	
(14) Doenças da Visão:	1-Sim0- Não 9- NS/NR
(14.1)Qual(is): _____	
(15) Doenças da Pele:	1-Sim0- Não 9- NS/NR
(15.1)Qual(is): _____	
(16) Neoplasias:	1-Sim0- Não 9- NS/NR
(16.1)Qual(is): _____	
(17) Internações:	1-Sim0- Não 9- NS/NR
(17.1)Motivo(s): _____	
(18) Cirurgias:	1-Sim0- Não 9- NS/NR
(18.1)Motivo(s): _____	
(19) Transfusão de sangue ou derivados:	1-Sim 0- Não 9- NS/NR
(19.1)Motivo(s): _____	

• História Patológica Atual	
(20) Diagnóstico de Hipertensão Arterial:	1-Sim0- Não 9- NS/NR
(20.1) Faz uso de remédios para controle da pressão arterial?	
1-Sim,de forma regular 2- Sim, de forma irregular 0- Não 9- NS/NR	
(21) Diagnóstico de Diabete Mellitus:	Tipo1- Tipo 2 - 0- Não9- NS/NR
(21.1) Faz uso de remédios para controle DB?	1-Sim,de forma regular 2- Sim, de forma irregular 0- Não9- NS/NR

(22) Tem outro(s) problema(s) de saúde diagnosticado(s) por médico? 1- Sim 0- Não 9- NS/NR

(22.1) Qual: _____

(22.2) Usa alguma medicação? 1-Sim, de forma regular 2- Sim, de forma irregular 0- Não 9- NS/NR

História Reprodutiva

• Mulheres

(23) Possui filhos:

1- Sim 0- Não 9- NS/NR

(24) Número de filhos: |__|__|

(24.1) Número de Partos: |__|__|

(25) Sra já sofreu algum aborto? (Espontâneo)

0- não 1-sim 9- NS/NR

(25.2) Qual período gestacional?

1- 1.º Trimestre Quantos: _____

2- 2.º Trimestre Quantos: _____

3- 3.º Trimestre Quantos: _____

(26) A sra já provocou algum aborto?

0- Não 1- Sim Quantos? _____ 9- NS/NR

(27) Número de Natimortos: |__|__|

(28) Nascidos Vivos Sadios: |__|__|

(29) Nascidos Vivos Não Sadios: |__|__|

Qual doença (inclusive má formação)?

(30) Idade em que ocorreu a primeira menstruação: |__|__| Anos

(31) Idade em que parou de menstruar: |__|__| Anos NA

(31.1) Há quanto tempo parou de menstruar? _____

(31.2) Por que sr(a) não menstrua mais? 1-Menopausa natural 2-Cirurgia para retirada de útero ou ovários 3-Outros tratamentos (hormônios, quimioterapia ou radiação);

4-Outra razão – especificar: _____

• Homens

(32) Possui filhos: 1- Sim

9- NS/NR

0- Não

(32.1) Caso afirmativo, quantos? _____

(32.2) Todos são saudáveis? 1-Sim 0- Não 9- NS/NR

(32.3) Caso negativo, qual ou quais doenças?

MÓDULO 2: Estilos de Vida

- Tabagismo**

(33) Sr(a) é:
2- Tabagista 1- Ex-tabagista 0- Nunca fumou

(34) Quantos cigarros sr(a) fuma por dia?
0- menos de 10 1- de 11 a 20 2- 21 a 30 3- mais de 30 88-NA 9-NS/NR

- consumo de alcool**

(35) Sr(a) costuma ingerir bebidas alcoólicas? 1 Sim 0 Não 9-NS/NR

(36) Que tipo de bebida alcoólica o sr (a) bebe com maior frequência?

A- Cerveja 1-Sim 0- Não 9-NS/NR 88-NA

B- Cachaça 1-Sim 0- Não 9-NS/NR 88-NA

C- Vodka 1-Sim 0- Não 9-NS/NR 88-NA

D- Vinho 1-Sim 0- Não 9-NS/NR 88-NA

D- Energético 1-Sim 0- Não 9-NS/NR 88-NA

E- Outras: Quais: _____

(37) Qual frequência do seu consumo de bebidas alcoólicas?

0- 1 a 2 x semana 1- 3 a 4x semana 2- 5 a 6 x por semana

3- Diariamente 4- Outra: _____ 9-NS/NR 88- NA

(38) Em média, quantas doses o sr (a) consome?

0- 1 dose por dia

1- 2 - 3 doses por dia

2- 4 - 5 doses por dia

3- Mais de 6 doses por dia

4- Outra: especifique: _____ 9- NS/NR 88- NA

Outras Substâncias Psicoativas			
(39) O sr(a) usa algum tipo de medicamento?			
A- Analgésicos	1-Sim	0- Não	9- NS/NR 88-NA
B- Anti-inflamatórios	1-Sim	0- Não	9- NS/NR 88-NA
C- Antibióticos	1-Sim	0- Não	9- NS/NR 88-NA
D- Controlados	1-Sim	0- Não	9- NS/NR 88-NA
E- Outros? Quais? _____			
(40) O sr(a) usa algum tipo de droga:			
1-Sim 0- Não 9- NS/NR			
(41) Quais drogas o sr(a) usa?			
A- Maconha	1-Sim	0- Não	9- NS/NR 88-NA
B- Cocaína	1-Sim	0- Não	9- NS/NR 88-NA
C- Remédios sem prescrição médica	1-Sim	0- Não	9- NS/NR 88-NA
D- Colas / solventes	1-Sim	0- Não	9- NS/NR 88-NA
E- Crack	1-Sim	0- Não	9- NS/NR 88-NA
F- Ecstasy	1-Sim	0- Não	9- NS/NR 88-NA
G- Outras? Quais? _____			
(42) Frequência do uso de drogas:			
1- 1 a 2 vezes por semana		2- 3 a 4 vezes por semana	
3- 5 a 6 vezes por semana		4- Diariamente 5- Outra: _____	
MÓDULO 3: História Familiar			
(43) Alguém da sua família já teve câncer: 1- Sim 0- Não 9- NS/NR			
(43.1) Quem da sua família ou do seu convívio teve / tem câncer:			
A- Pai	0-Não	1- Sim	Qual(is) tipo(s)? _____ 9- NS/NR
B- Mãe	0-Não	1- Sim	Qual(is) tipo(s)? _____ 9- NS/NR
C- Avô	0-Não	1- Sim	Qual(is) tipo(s)? _____ 9- NS/NR
D- Avó	0-Não	1- Sim	Qual(is) tipo(s)? _____ 9- NS/NR
E- Irmão(ã)	0- Não	1- Sim	Qual(is) tipo(s)? _____ 9- NS/NR
F- Filho(a)	0- Não	1- Sim	Qual(is) tipo(s)? _____ 9- NS/NR
G- Esposo(a)	0- Não	1- Sim	Qual(is) tipo(s)? _____ 9- NS/NR

H- Outro	0- Não	1- Sim	Qual(is) tipo(s)? _____	9- NS/NR
(43.2) Outras doenças familiares : _____				

s e Sintomas				
(44) Emagrecimento	1- Sim	Quantos kg: _____	0- Não	9- NS/NR
(45) Fraqueza	1- Sim		0- Não	9- NS/NR
(46) Tontura	1- Sim		0- Não	9- NS/NR
(47) Sonolência	1- Sim		0- Não	9- NS/NR
• <i>Sistema Nervoso Central e Periférico</i>				
(48) Dificuldade para enxergar	1- Sim	Qual motivo: _____		
	0- Não			9- NS/NR
(49) Cefaléia / dor de cabeça			1- Sim	0- Não
				9- NS/NR
(50) Irritabilidade / Nervosismo			1- Sim	0- Não
				9- NS/NR
(51) Ansiedade	1- Sim		0- Não	9- NS/NR
(52) Insônia			1- Sim	0- Não
				9- NS/NR
(53) Alteração da Humor / Depressão			1- Sim	0- Não
				9- NS/NR
(54) Alteração da atenção			1- Sim	0- Não
				9- NS/NR
(55) Alteração da memória			1- Sim	0- Não
				9- NS/NR
(56) Sudorese Noturno			1- Sim	0- Não
				9- NS/NR
(57) Formigamentos			1- Sim	0- Não
				9- NS/NR
(58) Movimentos Involuntários			1- Sim	0- Não
				9- NS/NR
(59) Tremores			1- Sim	0- Não
				9- NS/NR
(60) Câibras			1- Sim	0- Não
				9- NS/NR
(61) Diminuição da força muscular			1- Sim	0- Não
				9- NS/NR
• (62) Convulsões				
			1- Sim	0- Não
				9- NS/NR
ógico e sistema Imunológico				
(63) Petéquias:			1- Sim	0- Não
				9- NS/NR
(64) Hematomas			1- Sim	0- Não
				9- NS/NR
(65) Epistaxe			1- Sim	0- Não
				9- NS/NR

• Ectoscopia				
(66) Irritação Ocular			1- Sim	0- Não
(67) Orientado:			1- Sim	0- Não
(68) Lúcido:			1- Sim	0- Não

(69) Fácies: 1-Atípico 2- Inexpressivo 3- Indiferente 4- Tristeza 5-Euforia 6- Ansiedade 7- Outra: _____	
(70) Marcha: 0- Normal 1- Alterada	
(71) Deformidades: 1- Sim 0- Não → Qual: _____	
(72) Equilíbrio:	A- Dinâmico: 0- Normal 1- Alterado
	B- Estático: 0- Normal 1- Alterado
(73) Tremores: 1-Sim 0- Não → Onde: 0- Facial 1- Membro superior 2- Membro inferior 3-Outro(s): _____	
(74) Pupilas isocóricas:	1- Sim 0- Não
(75) Nistagmus:	1- Sim 0- Não
(76) Diplopia:	1- Sim 0- Não
(77) Acomodação: 1- Sim 0- Não	(78) Disfonia: 1- Sim 0- Não
(79) Mucosas: 0- coradas 1- descoradas	(80) Icterícia: 1-Sim 0- Não
(81) Gânglios palpáveis: 1-Sim 0- Não → Quais: 1- Submandibular 2- Pescoço 3-outro(s): _____	
(82) Lesões de pele: 0-Não 1- Sim → Quais: 1- Manchas 2- Furúnculos 3- Pruridos 4- Dermatite irritativa 5- Eritema 6-Outra(s): _____ (82.1) Localização: _____ (82.2) Descrição: _____	
(83) Acne: 1- Sim 0- Não	
(84) Edemas: 1- Sim → Onde: _____ 0- Não	
(85) Fâneros: 0- Normal 1- Alterado Qual: _____	
(86) Tireóide: 0- Normal 1- Alterado	
Aparelho Cardiovascular (ACV)	
(87) Pressão Arterial: __ __ __ x __ __ __ mmHg	
(88) Frequência Cardíaca: __ __ __ bpm	

(89)Ritmo cardíaco 0-Normal 1- Alterado:_____

(90)Bulhas normofonéticas

1- Sim 0- Não

(91)Pulso Radial Esquerdo: 0-Normal 1- Alterado

Aparelho Respiratório (AR)

(92)Deformidade torácica: 1- Sim →Qual:_____ 0- Não

(93) Freqüência Respiratória:0- Eupnéico 1- Taquipnéico 2- Bradipneico

(94)Murmúrio Vesicular bem distribuído: 1- Sim

0- Não →Por que? _____

OBSERVAÇÕES: _____

_____.