

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Avaliação dos danos causados pelo benzeno no ambiente ocupacional e sua inter-relação com diferentes biomarcadores

ANGELA MARIA MORO

PORTO ALEGRE, 2013

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Avaliação dos danos causados pelo benzeno no ambiente ocupacional e sua inter-relação com diferentes biomarcadores

Tese apresentada por **Angela Maria Moro**
para obtenção do TÍTULO DE DOUTOR em
Ciências Farmacêuticas

Orientadora: Profa. Dra. Solange Cristina Garcia

Co-orientadora: Profa. Dra. Sandra Farsky

Porto Alegre, 2013

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Doutorado da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e avaliada em 11.11.2013 pela Banca Examinadora constituída por:

Profa. Dra. Andreia Buffon

Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)

Profa. Dra. Flavia Valladão Thiesen

Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUC-RS)

Profa. Dra. Mirian Salvador

Universidade de Caxias do Sul (UCS)

Prof. Dr. Rafael Noal Moresco

Universidade Federal de Santa Maria (UFSM)

CIP - Catalogação na Publicação

Moro, Angela Maria

Avaliação dos danos causados pelo benzeno no ambiente ocupacional e sua inter-relação com diferentes biomarcadores / Angela Maria Moro. -- 2013.

189 f.

Orientadora: Solange Cristina Garcia.

Coorientadora: Sandra Farsky.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto Alegre, BR-RS, 2013.

1. Benzeno. 2. Toxicologia ocupacional. 3. Biomonitoramento. 4. Biomarcadores de efeito. 5. Estresse oxidativo. I. Garcia, Solange Cristina, orient. II. Farsky, Sandra, coorient. III. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Este trabalho foi desenvolvido sob a orientação da Profa. Dra. Solange Cristina Garcia e co-orientação da Profa. Dra. Sandra Helena Farsky da Universidade de São Paulo, no laboratório de Toxicologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, sendo financiado pelo CNPq (Processos 479613/2009-5 e 484096/2011-7) e pela FAPERGS (Processo 1017503 PqG 06/2010). Angela Maria Moro recebeu bolsa de doutorado da CAPES.

*Dedico este trabalho a aqueles que mais se dedicam a mim:
meus pais Leuzir e Marínêz, e à minha irmã Bianca.*

*Obrigada por estarem sempre ao meu lado,
pelo amor incondicional, por todo apoio,
incentivo e por sempre acreditarem em mim.*

Foram vocês que me trouxeram até aqui.

Amo muito vocês!

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por sempre iluminar o meu caminho, por me dar saúde para alcançar os meus objetivos e por permitir que eu tenha pessoas maravilhosas em minha companhia.

Aos meus queridos pais, Leuzir e Marinêz, que são os meus maiores incentivadores. Obrigada por acreditarem em mim e sempre acalmarem o meu coração nas horas difíceis. Obrigada pelo exemplo de força e coragem, sempre buscando o melhor para mim. Obrigada por todo o amor, carinho, paciência e dedicação e por serem sempre o meu porto seguro.

À minha irmã Bianca, pelo amor e carinho constante, pela amizade verdadeira, por motivar sempre os meus sonhos e por me orgulhar a cada dia pelo seu jeito maravilhoso de ser.

Ao meu namorado Samuel, que foi um dos melhores presentes que ganhei durante o doutorado. Obrigada pelo amor, pelo incentivo, pela paciência e por estar sempre disposto a me ajudar. Obrigada pelos momentos felizes que me proporciona com a sua presença.

À minha família: avó, tias, tios, primas e primos, pelas palavras de carinho e incentivo, sempre motivando e apoiando os meus sonhos.

À minha orientadora, Professora Dra Solange Cristina Garcia, pela confiança e pelas oportunidades oferecidas, pelo apoio e dedicação, pelos conhecimentos e pela amizade cultivada durante esses 10 anos de convivência.

Aos amigos e colegas que fizeram ou ainda fazem parte do LATOX, Mariele, Natália, Marília, Sabrina, Guilherme, Rachel, Fernando, Gabriela, Elisa, Bruna, Juliano, Sarah, Rafael, Anelise, Clóvis, Miguel e Juliana Valentini. Obrigada a todos pelas sugestões, críticas, esforço e apoio no desenvolvimento deste trabalho, pelos finais de semana trabalhados, pelas viagens e coletas, e pelos momentos de alegria e descontração vivenciados em suas companhias.

A todos os meus amigos e irmãos de coração, que mesmo distante sempre torceram e incentivaram os meus objetivos.

À minha co-orientadora, Professora Dra Sandra Farsky, pela orientação e apoio.

Aos Professores Dr./Dra Adriana Gioda, Ana Paula de Souza, Cristina Bonorino, Rafael Linden e Rafael Moresco, por todo auxílio e apoio tecnológico durante o desenvolvimento deste trabalho.

Aos funcionários do Centro Estadual de Vigilância em Saúde do Rio Grande do Sul e aos dos Centros de Referência em Saúde do Trabalhador da Região Centro e Região dos Vales, pela colaboração no desenvolvimento deste trabalho.

Aos voluntários que participaram deste estudo, pela colaboração e disposição.

Aos Professores Dr./Dra Andreia Buffon, Flavia Thiesen, Mirian Salvador e Rafael Moresco, por aceitarem o convite para compor a banca examinadora desta tese. Aos Professores Dr./Dra Maurício Bogo e Renata Limberger, por comporem a banca de qualificação deste trabalho.

À UFRGS e ao Programa da Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, pela oportunidade de realizar o doutorado.

À CAPES, pelo fomento através da concessão da bolsa.

A todos os amigos e demais pessoas que não foram citados, mas que de alguma forma contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.

MEUS SINCEROS AGRADECIMENTOS

"A satisfação está no esforço e não apenas na realização final."

Mahatma Gandhi

APRESENTAÇÃO

De acordo com as Recomendações para Elaboração de Teses e Dissertações vigentes no Regimento do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, a presente tese foi redigida na forma de encarte de publicações, sendo organizada da seguinte maneira:

PARTE I: composta por **INTRODUÇÃO** e **OBJETIVOS**. A seção **INTRODUÇÃO** apresenta o referencial teórico com breve revisão da literatura e justificativa do trabalho. A seção **OBJETIVOS** mostra os principais questionamentos do trabalho que nortearam o desenvolvimento da pesquisa.

PARTE II: subdividida em **CAPÍTULOS I** e **II** correspondem a cada **Manuscrito**. Os **Materiais e Métodos**, **Resultados** e **Referências Bibliográficas** específicos encontram-se nos respectivos **Manuscritos**.

PARTE III: abrange **DISCUSSÃO**, **CONCLUSÕES**, **PERSPECTIVAS**, **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS** e **ANEXOS**. A seção **DISCUSSÃO** reúne as interpretações e os comentários gerais referentes aos resultados obtidos nos dois manuscritos. A seção **CONCLUSÕES** apresenta um resumo dos principais resultados da tese. A seção **PERSPECTIVAS** apresenta os próximos trabalhos a serem realizados. A seção **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS** lista as referências utilizadas na Introdução e Discussão da tese e a seção **ANEXOS** apresenta Aceite do Comitê de Ética em Pesquisa, Termo de Consentimento Livre e Esclarecido assinado pelos participantes do estudo e Questionário de Avaliação utilizado neste estudo.

RESUMO

O benzeno é um solvente orgânico reconhecidamente carcinogênico, ao qual a população encontra-se constantemente exposta através de fontes ambientais e/ou ocupacionais. No Brasil, 718.000 frentistas de postos de gasolina constituem um importante grupo de risco ocupacional a este solvente orgânico, mesmo que atualmente o benzeno seja encontrado em baixas concentrações na gasolina. O monitoramento ambiental aliado ao biomonitoramento dos indivíduos expostos ao benzeno possibilita a avaliação da sua exposição crônica. No presente trabalho foram avaliados os riscos relacionados à exposição ocupacional ao benzeno através do monitoramento ambiental e biomonitoramento de frentistas de postos de gasolina, investigando possíveis biomarcadores de efeito que possibilitem a detecção precoce de alterações causadas pelo benzeno, antes do desenvolvimento de danos aos sistemas hematológico, imunológico, hepático, renal e ao DNA. Adicionalmente, verificou-se o possível envolvimento do estresse oxidativo como mecanismo toxicológico, especialmente através de biomarcadores protéicos e antioxidantes endógenos e exógenos. No Capítulo I demonstramos que mesmo em baixas concentrações, o benzeno contribuiu para alterações significativas em diferentes sistemas biológicos. O ácido trans, trans-mucônico urinário demonstrou ser um biomarcador de exposição aplicável no biomonitoramento ocupacional aos baixos níveis de exposição ao benzeno encontrados, correlacionado-se com diversas alterações observadas. A expressão das moléculas de adesão CD80 e CD86 em monócitos, propostas neste trabalho como possíveis biomarcadores de efeito relacionados à resposta imunológica, foram alteradas em trabalhadores expostos cronicamente a baixas concentrações ao benzeno em comparação com o grupo não exposto. Além disso, as transaminases hepáticas, bem como os biomarcadores de dano renal precoce também se mostraram significativamente aumentadas, podendo ser sugeridos como importantes biomarcadores de efeito na avaliação contínua da saúde ocupacional. Em relação ao uso da enzima δ -aminolevulinato desidratase (ALA-D), como um possível biomarcador de efeito precoce para alterações hematológicas, mais estudos são necessários a fim de elucidar o envolvimento da ALA-D em anemias decorrentes da exposição ao

benzeno. No Capítulo II demonstramos que os danos genéticos causados pela exposição ocupacional ao benzeno foram acompanhados pelo aumento da oxidação e nitrosilação de proteínas, bem como pela depleção de antioxidantes endógenos. Adicionalmente, nossos resultados mostraram que o aumento da frequência de micronúcleos estava associado com a diminuição da concentração de glutathione reduzida e da atividade da enzima glutathione S-transferase, evidenciando o papel fundamental de ambos antioxidantes na proteção dos danos de DNA causados pelo benzeno. A vitamina C foi o único antioxidante exógeno que demonstrou papel protetor sobre o dano oxidativo. O tempo de exposição apresentou influência sobre os biomarcadores de efeito avaliados, bem como sobre o ácido trans, trans-mucônico, destacando a importância do uso destes biomarcadores no biomonitoramento contínuo da saúde dos trabalhadores expostos. Em conjunto, esses resultados podem contribuir para a detecção precoce de possíveis alterações causadas pela exposição ocupacional ao benzeno, bem como para o estabelecimento de medidas preventivas para saúde do trabalhador, melhorando a sua qualidade de vida em médio e longo prazo.

Palavras-Chave: benzeno, toxicologia ocupacional, biomonitoramento, biomarcadores de efeito, estresse oxidativo.

ABSTRACT

Benzene is a known carcinogenic organic solvent to which the population is constantly exposed through environmental and/or occupational sources. In Brasil, 718.000 gasoline station attendants represent an important risk group for occupational exposures to this organic solvent, despite the low concentration of benzene found in gasoline currently. The environmental and biological monitoring of workers exposed to benzene enables the evaluation of its chronic exposure. In the present study, the risks related to the occupational benzene exposure were evaluated through environmental and biological monitoring of gasoline station attendants. We investigated potential biomarkers of effect that may allow the early detection of alterations caused by benzene, before damage development on hematological, immune, hepatic and renal systems, as well as to DNA. Additionally, the possible involvement of oxidative stress as a toxicological mechanism, especially through proteic biomarkers and endogenous and exogenous antioxidants, was evaluated. In Chapter I, we showed that even at low concentrations; benzene contributes to significant alterations in different biological systems. Urinary trans, trans-muconic acid showed to be an applicable biomarker of exposure in the monitoring of occupational exposures to low benzene levels, also correlating with different alterations observed in this study. The expressions of CD80 and CD86 in monocytes, proposed in the present work as potential biomarker of effect related to immune response, were altered in workers exposed chronically to low benzene levels compared to nonexposed group. Furthermore, hepatic transaminases and biomarkers of early renal damage were significantly increased, and may be suggested as important biomarkers of effect for continuous evaluation of occupational health. Regarding the use of δ - aminolevulinate dehydratase enzyme (ALA-D) as a possible biomarker of early effect to hematological alterations, further studies are needed to completely elucidate ALA-D involvement in benzene-induced anemia. In Chapter II, we demonstrated that the genetic damages caused by occupational benzene exposure were accompanied by increased oxidation and nitration of proteins, as well as by the depletion of endogenous antioxidants. Additionally, our results showed that the increased frequency of micronuclei was

associated with reduced glutathione content and glutathione S-transferase enzymatic activity, evidencing the fundamental role of both antioxidants in the protection of DNA damage caused by benzene. Vitamin C was the unique exogenous antioxidant that demonstrated protective role on oxidative damage. The time of exposure influenced the biomarkers of effect evaluated in this study, as well as the trans, trans-muconic acid, highlighting the importance of the use of these biomarkers on continuous health monitoring of the exposed workers. Taken together, these results may contribute to the early detection of benzene-induced alterations after occupational exposures, as well as to the development of preventive measures for the health of the exposed workers, improving their quality of life in the medium and long term.

Keywords: benzene, occupational toxicology, biomonitoring, biomarkers of effect, oxidative stress.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura química do benzeno.	3
Figura 2 - Principais vias de biotransformação do benzeno no organismo	6
Figura 3 - Subdivisão dos biomarcadores	14

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Correlação das concentrações de ácido trans, trans-mucônico urinário com benzeno no ar, obtidas a partir dos valores estabelecidos pelo DFG, corrigidos para grama/grama de creatinina.....	16
---	----

LISTA DE ANEXOS

ANEXO I.....	157
ANEXO II.....	159
ANEXO III.....	161

LISTA DE ABREVIATURAS

ACGIH - American Conference of Governmental Industrial Hygienists / Conferência Americana de Higienistas Industriais Governamentais

ALA-D - δ -Aminolevulinato Desidratase

BTX - Benzeno, Tolueno, Xilenos

CAPES - Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

CAT - Catalase

CD - Cluster of Differentiation / Cluster de Diferenciação

CERESTs - Centros de Referência em Saúde do Trabalhador

CNPq - Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

CYP2E1 - Citocromo P450-2E1

DFG - Deutsche Forschungsgemeinschaft / Fundação Alemã de Pesquisa

DNA - Ácido Desoxirribonucléico

DTT - Dithiothreitol / Ditiotreitól

EPIs - Equipamentos de Proteção Individual

ERO - Espécies Reativas de Oxigênio

FAPERGS - Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul

GSH - Glutathiona Reduzida

GSH-Px - Glutathiona Peroxidase

GST - Glutathiona S-Transferase

IARC - International Agency for Research on Cancer / Agência Internacional para Pesquisa do Câncer

LATOX - Laboratório de Toxicologia

LMA - Leucemia Mielóide Aguda

mEH - Epóxido Hidrolase Microsomal

MPO - Mieloperoxidase

NAG - N-Acetil- β -D-Glicosaminidase

NQO1 - NAD(P)H:Quinona-Oxirredutase1

NR-7 - Norma Regulamentadora nº 7

NR-15 - Norma Regulamentadora nº 15

OMS - Organização Mundial da Saúde

ppm - Partes por Milhão

PUC-RS - Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul

-SH - Grupamentos Sulfidrílicos

SMD - Síndromes Mielodisplásicas

SOD - Superóxido Dismutase

UCS - Universidade de Caxias do Sul

UFRGS - Universidade Federal do Rio Grande do Sul

UFSM - Universidade Federal de Santa Maria

US-EPA - United States Environmental Protection Agency/Agência Norte Americana de Proteção Ambiental

VRT - Valor de Referência Tecnológico

VRT-MPT - Valor de Referência Tecnológico Médio Ponderado pelo Tempo

SUMÁRIO

PARTE I	1
INTRODUÇÃO	3
1. PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DO BENZENO	3
2. FONTES AMBIENTAIS E OCUPACIONAIS DE EXPOSIÇÃO AO BENZENO	3
3. TOXICOCINÉTICA DO BENZENO	5
4. EFEITOS TÓXICOS CAUSADOS PELO BENZENO	7
5. ESTRESSE OXIDATIVO COMO MECANISMO DE TOXICIDADE DO BENZENO	9
6. MONITORAMENTO DA EXPOSIÇÃO OCUPACIONAL AO BENZENO	10
6.1. MONITORAMENTO AMBIENTAL.....	11
6.2. BIOMONITORAMENTO.....	13
6.2.1. Biomarcadores de exposição	14
6.2.2. Biomarcadores de efeito.....	16
6.2.3. Biomarcadores de suscetibilidade	19
OBJETIVOS	23
1. OBJETIVO GERAL	23
2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	23
PARTE II	25
CAPÍTULO I	27
NON-CONVENTIONAL BIOMARKERS OF EFFECT FOR THE BIOLOGICAL MONITORING OF OCCUPATIONAL EXPOSURES TO LOW LEVELS OF BENZENE	27
CAPÍTULO II	77
GENOTOXIC MONITORING AND OXIDATIVE STRESS IN GASOLINE STATION ATTENDANTS	77
PARTE III	131
DISCUSSÃO	133
CONCLUSÕES	143
PERSPECTIVAS	145
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	147
ANEXOS	155

PARTE I

INTRODUÇÃO

1. Propriedades físico-químicas do benzeno

O benzeno, antigamente também denominado benzol, é o hidrocarboneto aromático de fórmula molecular mais simples (C_6H_6) e com peso molecular de 78,11. Este solvente orgânico é obtido a partir da destilação do carvão mineral e do petróleo, e em condições normais de temperatura e pressão encontra-se sob a forma líquida e incolor (Fundacentro, 2005; ASTDR, 2007; INCA, 2010). O benzeno é um composto orgânico volátil, com ponto de ebulição de $80,1^\circ C$, altamente inflamável e de odor aromático característico. Apresenta lipossolubilidade elevada, sendo solúvel na maioria dos solventes orgânicos e praticamente insolúvel em água (ASTDR, 2007; INCA, 2010). A estrutura química do benzeno é representada na Figura 1.

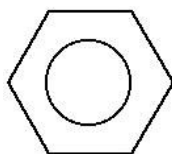


Figura 1 - Estrutura química do benzeno.

2. Fontes ambientais e ocupacionais de exposição ao benzeno

O benzeno pode ser encontrado no ambiente em geral, como contaminante atmosférico, e também em diferentes meios ocupacionais (Dougherty *et al.*, 2008; Badham e Winn, 2010).

Fontes naturais de benzeno, como emissões a partir de vulcões e incêndios florestais, contribuem para a presença desse solvente orgânico no ambiente em geral (ASTDR, 2007). Além disso, concentrações de benzeno também são encontradas em emissões industriais, fumaça do cigarro e de veículos automotivos, composta principalmente pelos derivados petrolíferos (ASTDR, 2007; Weisel, 2010). Os produtos petrolíferos são considerados umas das mais importantes fontes de

benzeno ambiental, principalmente através da combustão e evaporação da gasolina (Dougherty *et al.*, 2008).

Ambientes industriais que utilizam o benzeno como matéria-prima para síntese de diversos produtos químicos ou como subproduto de processos de combustão representam as principais fontes ocupacionais de benzeno (Wiwanitkit, 2006; Weisel, 2010). Como exemplos dessas indústrias provedoras de benzeno em ambientes ocupacionais, destacam-se as refinarias de petróleo, as indústrias químicas, as indústrias de tintas orgânicas e as indústrias calçadistas (Wiwanitkit, 2006; Dougherty *et al.*, 2008; Weisel, 2010). O benzeno está presente na fabricação de borrachas, lubrificantes, corantes, detergentes, medicamentos e pesticidas (ASTDR, 2007). Além disso, atividades ligadas ao transporte, distribuição e abastecimento de gasolina também representam uma importante fonte ocupacional de benzeno (Carrieri *et al.*, 2006).

A gasolina, um dos principais produtos acabados do petróleo, é composta por uma complexa mistura de hidrocarbonetos saturados e insaturados de baixo peso molecular (Keretetse *et al.*, 2008; Keenan *et al.*, 2010). O benzeno é utilizado na gasolina com a função de aditivo e tem sua concentração estritamente controlada (ASTDR, 2007; Keenan *et al.*, 2010). O teor de benzeno na gasolina tem diminuído muito ao longo dos anos (Keenan *et al.*, 2010). No Brasil, atualmente a gasolina apresenta cerca de 1% de benzeno na sua composição final (Fundacentro, 2005). Recentemente a Agência norte-americana de Proteção Ambiental (US-EPA) estabeleceu novas normas que reduzem a concentração de benzeno na gasolina para 0,62% (EPA, 2011).

Além do benzeno, outros hidrocarbonetos aromáticos voláteis também são encontrados na composição da gasolina, entre eles destacam-se o tolueno e o xilenos, que juntamente com o benzeno constituem os compostos chamados BTX (benzeno, tolueno e xilenos) (Macdonald, 2000; Chen *et al.*, 2008). A presença simultânea destas substâncias na composição da gasolina influencia na toxicidade do benzeno, provocando diferentes tipos de danos à saúde de trabalhadores expostos (Keenan *et al.*, 2010). Frentistas de postos de gasolina destacam-se dentre os principais grupos de trabalhadores expostos aos compostos BTX (Dougherty *et al.*, 2008). Dentre estes compostos, o benzeno distingui-se dos demais em

decorrência dos seus potenciais efeitos tóxicos à saúde humana (Keretetse *et al.*, 2008; Rekhadevi *et al.*, 2010; Tunsaringkarn *et al.*, 2011).

3. Toxicocinética do benzeno

O benzeno é um solvente orgânico lipofílico, apolar que atravessa facilmente a bicamada lipídica das membranas celulares (Oga, 2008). As principais formas de absorção deste solvente orgânico ocorrem via pulmonar e cutânea (ASTDR, 2007; Oga, 2008). Após a absorção, o benzeno é rapidamente distribuído para todo o organismo pela corrente sanguínea, acumulando-se principalmente no tecido adiposo (ASTDR, 2007). A biotransformação do benzeno ocorre principalmente via hepática através de reações de fase I e II, e em menor proporção na medula ossea (Oga, 2008; Weisel, 2010).

No fígado, o benzeno sofre um processo de oxidação através da ação da enzima citocromo P450-2E1 (CYP2E1), dando origem ao benzeno epóxido, um composto extremamente instável, que por rearranjo não-enzimático origina o fenol, um dos principais metabólitos do benzeno. O fenol pode ser excretado de forma inalterada na urina ou então ser biotransformado a catecol ou 1,4-benzenodiol (hidroquinona), os quais por ação da enzima mieloperoxidase (MPO) são hidroxilados a benzoquinona e 1,2,4-benzenotriol. Estes metabólitos, apesar de formados em pequenas concentrações, acumulam-se na medula óssea provocando potentes efeitos tóxicos (ASTDR, 2007; Kirkeleit, 2008; Barreto *et al.*, 2009; Fracasso *et al.*, 2010; Weisel, 2010). Através da enzima detoxificante NAD(P)H:quinona-oxirredutase1 (NQO1), as benzoquinonas produzidas pela oxidação dos metabólitos polifenólicos do benzeno são reduzidas (Moran, Siegel e Ross, 1999; Manini *et al.*, 2008; Weisel, 2010).

O restante do benzeno óxido pode sofrer conjugação com a glutathiona através da ação da enzima glutathiona S-transferase (GST), dando origem ao ácido fenilmercaptúrico, metabólito atóxico do benzeno (Fracasso *et al.*, 2010; Weisel, 2010). Além disso, o benzeno óxido pode sofrer abertura do anel dando origem ao muconaldeído, um dos metabólitos tóxicos do benzeno e posteriormente ao ácido

trans, trans-mucônico (Kirkeleit, 2008; Barreto *et al.*, 2009; Fracasso *et al.*, 2010; Weisel, 2010).

Em doses baixas, o benzeno é rapidamente biotransformado e a excreção dos metabólitos ocorre principalmente através de reações de conjugação com glicuronídeos ou sulfatos, no entanto, em doses mais elevadas, essas vias metabólicas sofrem saturação e a exalação do benzeno não metabolizado passa a ser a principal via de eliminação (ASTDR, 2007).

O processo de biotransformação do benzeno é representado na Figura 2.

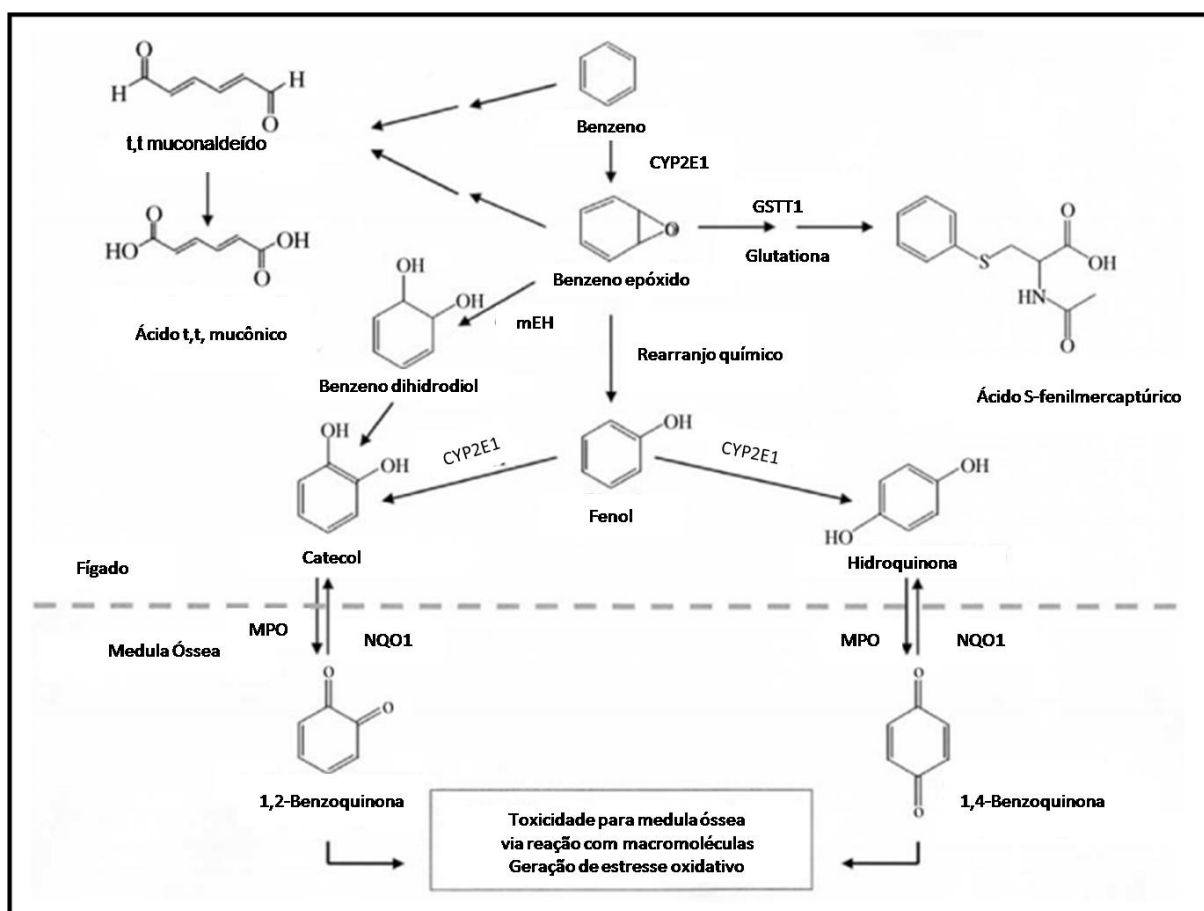


Figura 2 - Principais vias de biotransformação do benzeno no organismo (Adaptado de Qu *et al.*, 2005). CYP2E1: Citocromo P450-2E1; GSTT1: Glutathione S-Transferase1; mEH: Epóxido hidrolase microssomal; MPO: Mieloperoxidase; NQO1: NAD(P)H:quinona-oxirredutase1.

4. Efeitos tóxicos causados pelo benzeno

O benzeno, na sua forma inalterada, não é tido como uma substância tóxica, sendo necessário ser biotransformado para expressar seus efeitos tóxicos (ASTDR, 2007; Weisel, 2010). A toxicidade do benzeno está relacionada às interações biológicas que ocorrem principalmente entre os seus metabólitos e os diferentes alvos celulares, especialmente com a medula óssea (Smith, 2010).

Apesar de extensa pesquisa, nenhum metabólito foi identificado como sendo o único responsável pelos efeitos tóxicos causados pelo benzeno. Acredita-se que a interação entre vários metabólitos seja a causa mais plausível para a toxicidade desenvolvida por este solvente orgânico (ASTDR, 2007). Dentre os principais metabólitos tóxicos do benzeno destacam-se hidroquinona, p-benzoquinona, catecol e muconaldeído, que podem atuar isoladamente ou em conjunto (Barreto *et al.*, 2009; Fracasso *et al.*, 2010; Smith, 2010).

O benzeno é reconhecidamente uma substância carcinogênica e tem sido objeto de controle no âmbito mundial devido à sua característica de contaminante universal e aos seus potenciais efeitos sobre a saúde humana (ASTDR, 2007; IARC, 2012). É classificado no grupo A1 pela Agência Internacional para Pesquisa do Câncer (IARC, 2012) e considerado a quinta substância de maior risco, segundo os critérios do programa das Nações Unidas de segurança química (Keretetse *et al.*, 2008; Uzma, Kumar e Hazari, 2010; Tunsaringkarn *et al.*, 2011; IARC, 2012). Vários estudos têm apontado o benzeno como principal agente causador de leucemia mielóide aguda (LMA) e síndromes mielodisplásicas (SMD), mesmo em doses relativamente baixas de exposição (Glass *et al.*, 2004; Kirkeleit, 2008; Wilbur *et al.*, 2008; Smith, 2010).

Além de carcinogênico, o benzeno ainda apresenta ação genotóxica (Angelini *et al.*, 2011; Angelini *et al.*, 2012). Dentre os principais danos de DNA causados pelo benzeno destacam-se alterações cromossômicas, hipo e hiperdiploidia, exclusões, trocas de cromátides irmãs, quebras e falhas nas duplas fitas (ASTDR, 2007; Dougherty *et al.*, 2008). Os mecanismos através dos quais os metabólitos do benzeno atuam provocando genotoxicidade incluem a geração de espécies reativas de oxigênio (ERO), formação de aductos e dano às proteínas ligadas ao DNA,

contribuindo para a instabilidade genômica (Kirkeleit, 2008; Pandey *et al.*, 2008; Fracasso *et al.*, 2010; Angelini *et al.*, 2011).

Adicionalmente, as células do sistema hematopoiético também são alvos altamente sensíveis aos efeitos tóxicos do benzeno (Kirkeleit, 2008). Os metabólitos tóxicos formados durante a biotransformação do benzeno atuam sobre a medula óssea provocando supressão e danificando diretamente as células progenitoras hematopoéticas, o que pode levar à apoptose ou diminuição de resposta imune do organismo (Uzma, Kumar e Hazari, 2010; Tunsaringkarn *et al.*, 2011). A citopenia é um dos achados clínicos mais característicos da hematotoxicidade causada pela exposição ao benzeno (ASTDR, 2007). Este efeito é decorrente da aplasia medular causada pelo benzeno, que provoca hematopoiese ineficaz, e consequente diminuição de todos os tipos celulares sanguíneos, causando anemia, leucopenia e trombocitopenia (ASTDR, 2007; Sun *et al.*, 2009; Weisel, 2010; Wong *et al.*, 2010).

Dentre outros compostos químicos, o benzeno apresenta capacidade de alterar a funcionalidade do sistema imunológico em humanos e animais, provocando imunossupressão e comprometendo a capacidade do organismo em reconhecer ou neutralizar agentes infecciosos e/ou células neoplásicas (Ferreira *et al.*, 2007; Haro-Garcia *et al.*, 2012). Alterações nos componentes humorais e celulares do sistema imunológico têm sido observadas em indivíduos após exposição ao benzeno (Uzma, Kumar e Hazari, 2010; Haro-Garcia *et al.*, 2012). Os metabólitos formados durante a biotransformação do benzeno atuam interrompendo as respostas imunológicas e contribuindo para o desenvolvimento de anergia (Cho, 2008). Dentre os principais efeitos observados destacam-se a diminuição dos níveis de anticorpos e leucócitos, depleção celular, disfunção de células T e B, redução da expressão de citocinas, entre outros (Vermeulen *et al.*, 2005; ASTDR, 2007). Além disso, os metabólitos do benzeno podem interferir na resposta imune do organismo através da inibição da produção de citocinas e quimiocinas (Pons e Marin-Castano, 2011) e provocando alterações nas funções de diferentes interleucinas e moléculas de adesão (Zhang, Eastmond e Smith, 2002; Lan *et al.*, 2005).

Além disso, o benzeno também pode provocar toxicidade sobre os sistemas hepático e renal, uma vez que a biotransformação e excreção deste solvente orgânico ocorre preferencialmente através destas vias (Ferreira *et al.*, 2007).

5. Estresse oxidativo como mecanismo de toxicidade do benzeno

Apesar de anos de estudos, o mecanismo pelo qual o benzeno exerce sua toxicidade ainda não está totalmente esclarecido (Angelini *et al.*, 2011; Tunsaringkarn *et al.*, 2011). Vários estudos têm apontado uma estreita relação entre os efeitos tóxicos do benzeno e a sua biotransformação (Kirkeleit, 2008; Barreto *et al.*, 2009; Weisel, 2010). Durante a biotransformação do benzeno, alguns metabólitos reativos sofrem processo redox cíclico, contribuindo para o aumento da produção intracelular de espécies reativas de oxigênio (Barreto *et al.*, 2009).

Em condições fisiológicas normais, as ERO podem desempenhar importante papel na regulação da resposta imunológica, participando do processo fagocítico de defesa contra infecções e atuando como fatores de transcrição na sinalização intracelular, induzindo a apoptose (Vasconcelos *et al.*, 2007). Entretanto essas espécies reativas em excesso podem provocar alterações em importantes componentes celulares através de reações de oxidação, nitração e halogenação (Snyder, 2007; Badham *et al.*, 2010; Uzma, Kumar e Hazari, 2010).

Além disso, a exposição crônica ao benzeno também pode comprometer a capacidade antioxidante do organismo, contribuindo para o desenvolvimento de danos oxidativos (Keretetse *et al.*, 2008; Uzma, Kumar e Hazari, 2010). Para se proteger dos danos causados pelo estresse oxidativo, o organismo dispõe de um elaborado sistema de defesa antioxidante constituído por enzimas como superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GSH-Px), glutathione S-transferase (GST) e antioxidantes endógenos não enzimáticos, como a glutathione reduzida (GSH) e albumina, além de antioxidantes exógenos, como as vitaminas A, C, E, carotenóides e flavonóides (Urso e Clarkson, 2003; Vasconcelos *et al.*, 2007). Tais moléculas e proteínas são responsáveis por manter a homeostase entre a formação e a degradação de ERO, restaurando o balanço redox (Vasconcelos *et al.*, 2007).

A exposição ao benzeno contribui para o desequilíbrio entre as espécies oxidantes e antioxidantes no organismo, promovendo processos de estresse oxidativo, representados principalmente pela peroxidação lipídica que colabora para a perda da integralidade de membranas celulares, bem como pela oxidação de

proteínas e/ou enzimas, com perda de função biológica, e pelo dano de DNA, contribuindo para a perturbação da função celular (Rossner *et al.*, 2007; Barreto *et al.*, 2009; Badham e Winn, 2010; Uzma, Kumar e Hazari, 2010). Tal fato contribui para que o estresse oxidativo seja apontado como causa principal ou secundária na etiologia de diversas alterações causadas pela exposição ao benzeno (Barreto *et al.*, 2009; Fracasso *et al.*, 2010).

Além disso, outros fatores importantes também podem influenciar no mecanismo de toxicidade do benzeno, entre eles, fatores biológicos, como sexo, idade, suscetibilidade genética, quantidade de tecido adiposo; bem como casos de co-exposição, tabagismo, consumo de álcool e hábitos alimentares (Smith, 2010).

6. Monitoramento da exposição ocupacional ao benzeno

A presença de agentes tóxicos no ambiente de trabalho vem sendo cada vez mais preocupante, representando significativo risco à saúde do trabalhador. Doenças podem ser desencadeadas ou agravadas pela contaminação ocupacional resultante da exposição à xenobióticos, que podem provocar intoxicações agudas ou crônicas, e desenvolver sinais e sintomas que contribuem em médio e longo prazo para a queda na qualidade de vida dos indivíduos expostos (Schenck, 2008).

Inúmeros são os agentes químicos, potencialmente tóxicos, sob os quais a população encontra-se diariamente exposta no ambiente em geral ou no ambiente de trabalho (Amorim, 2003). A exposição ocupacional é decorrente da atividade profissional, em que o trabalhador encontra-se em contato com agentes químicos de tal forma que estes possam produzir efeitos sistêmicos negativos à sua saúde (Oga, 2008; Schenck, 2008). Tendo em vista que as pessoas passam mais de ¼ de suas vidas no ambiente de trabalho (Fritschi *et al.*, 2009), a exposição ocupacional a xenobióticos torna-se, cada vez mais, um relevante problema de saúde pública (Neves, 1999).

O monitoramento da exposição ocupacional, juntamente com o conhecimento dos efeitos à saúde e dos limites considerados seguros, permitem avaliar os riscos ocupacionais, estabelecer estratégias e formas efetivas de intervenção, bem como

melhorias nas condições de trabalho, com o objetivo de proteger a saúde dos trabalhadores expostos ocupacionalmente (Roma-Torres *et al.*, 2006; Pandey *et al.*, 2008).

O monitoramento ambiental e biológico (biomonitoramento) são ferramentas complementares na caracterização da exposição ocupacional, permitindo uma avaliação integrada da exposição sob a qual o indivíduo encontra-se exposto e facilitando a prática da saúde ocupacional (Manno *et al.*, 2010). Atualmente, o monitoramento de exposição ocupacional ao benzeno está focado principalmente nos riscos que os baixos níveis deste solvente orgânico pode provocar à saúde dos trabalhadores expostos (Fracasso *et al.*, 2010).

6.1. Monitoramento ambiental

As restrições ao uso do benzeno no ambiente ocupacional iniciaram no final do século XIX, com a disseminação dos processos industriais na Europa, mais precisamente no ano de 1897. As primeiras evidências da toxicidade causada pelo benzeno no ambiente ocupacional foram o aparecimento de casos de anemia entre mulheres de uma fábrica de pneus de bicicletas na Suécia e um caso de hemorragia entre trabalhadores de processo de lavagem a seco na França (Machado, 2003). Com a 1ª Guerra Mundial houve um incremento da indústria química e do uso generalizado do benzeno como solvente orgânico em vários processos industriais, resultando em novos relatos sobre os efeitos tóxicos ocasionados por este xenobiótico (Machado, 2003). Em 1928, o primeiro caso de leucemia relacionado com a exposição ocupacional ao benzeno foi descrito no *Journal of Medicine of Lion* (Borgomano, 1928).

Após o término da 1ª Guerra, uma onda para regulamentação de trabalhos envolvendo o benzeno foi iniciada, com objetivo de reduzir os níveis de exposição ocupacional a este solvente orgânico (Machado, 2003). Além disso, os inúmeros efeitos tóxicos observados em estudos com humanos e animais expostos ao benzeno, também contribuíram para a criação de medidas preventivas e normas

trabalhistas em diversos países do mundo, as quais restringiram, ao máximo, as concentrações de benzeno no ambiente ocupacional (Weisel, 2010).

A ACGIH (American Conference of Governmental Industrial Hygienists) publica anualmente uma lista de limites de exposição para determinadas substâncias tóxicas, que servem de diretrizes para promover a saúde e a segurança no ambiente ocupacional (ACGIH, 2011). Esses valores representam condições sob as quais se acredita que todos os trabalhadores possam estar expostos repetidamente sem efeitos adversos à saúde. Atualmente, 0,5 ppm ($1600 \mu\text{g}/\text{m}^3$) é o limite estabelecido pela ACGIH para exposições ocupacionais ao benzeno (ACGIH, 2011).

No Brasil, a primeira iniciativa de redução da exposição ao benzeno ocorreu através da resolução interministerial de 1983, na qual os Ministérios da Saúde e do Trabalho e Emprego, juntamente com representações industriais, estabeleceram a redução da contaminação pelo benzeno dos produtos acabados em até 1% do seu volume (Machado, 2003).

Atualmente, o anexo 13-A da Norma Regulamentadora nº 15 (NR-15), de 20 de dezembro de 1995, da Secretaria de Segurança e Saúde no Trabalho é responsável por regulamentar ações, atribuições e procedimentos de prevenção à exposição ocupacional ao benzeno, visando à proteção da saúde do trabalhador. O presente anexo definiu um Valor de Referência Tecnológico (VRT), para o benzeno e posteriormente uma categoria de VRT, o VRT-MPT, que corresponde à concentração média de benzeno no ar ponderada pelo tempo, para uma jornada de 8 horas de trabalho. Os valores estabelecidos para os VRT-MPT são: a) 1 ppm para as indústrias químicas e petroquímicas; b) 2,5 ppm para as indústrias siderúrgicas (Brasil, 1995). O cumprimento do VRT é obrigatório (Brasil, 1995), entretanto não assegura a proteção à saúde dos indivíduos expostos, uma vez que não existe limite seguro de exposição para substâncias cancerígenas, como o benzeno (Weisel, 2010).

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), estima-se que o risco de desenvolvimento de leucemia é de 6 casos por milhão entre as pessoas que encontram-se cronicamente expostas ao benzeno sob níveis de $1 \mu\text{g}/\text{m}^3$ (0,0003125

ppm) (Sorensen *et al.*, 2003), evidenciando a falta de um limite seguro de exposição ao benzeno (Weisel, 2010).

6.2. Biomonitoramento

O biomonitoramento tem por objetivo detectar de forma precoce e preferencialmente reversível as alterações biológicas, que são indicativas da condição de exposição, e que em longo prazo podem resultar em danos a saúde. O monitoramento biológico consiste no controle repetitivo da quantificação de determinado produto químico e/ou de seus metabólitos em diferentes fluidos biológicos (urina, sangue, ar exalado, tecidos) de indivíduos expostos a agentes de risco químico, físico ou biológico, que se encontram presentes no ambiente de trabalho (Manno *et al.*, 2010). Além disso, o biomonitoramento busca definir a exposição ocupacional, quantificar a dose interna e efetiva da exposição e verificar se os limites de exposição são respeitados (Manini, De Palma e Mutti, 2007).

Como citado anteriormente, o biomonitoramento e o monitoramento ambiental são ferramentas que atuam de maneira complementar na caracterização da exposição ocupacional. Entretanto, o biomonitoramento representa uma avaliação mais completa e ampla, uma vez que avalia as principais vias de contato (respiratória, cutânea e digestiva), levando em conta a variabilidade individual e os casos de co-exposição, em que os indivíduos encontram-se simultaneamente expostos a uma complexa mistura de xenobióticos (Manini, De Palma e Mutti, 2007). Além disso, o biomonitoramento permite estimar a dose interna do xenobiótico que foi absorvida e os efeitos que essa substância pode causar ao indivíduo exposto (Angerer, Ewers e Wilhelm, 2007).

Através do biomonitoramento diferentes biomarcadores são avaliados rotineiramente. Os biomarcadores são definidos como alterações em componentes celulares ou bioquímicos, estruturas ou funções do organismo que podem ser quantificadas em qualquer sistema ou amostra biológica (Manini, De Palma e Mutti, 2007; Manno *et al.*, 2010). São utilizados para verificar a interação entre o xenobiótico e os indivíduos expostos (Manini, De Palma e Mutti, 2007).

Os biomarcadores podem ser subdivididos em: biomarcadores de exposição, biomarcadores de efeito e biomarcadores de susceptibilidade, de acordo com a sua importância toxicológica (Manini, De Palma e Mutti, 2007; Manno *et al.*, 2010). A subdivisão dos biomarcadores é representada na Figura 3. Embora os biomarcadores estejam categoricamente separados, nem sempre é possível classificá-los somente em uma única denominação. A atribuição categórica de um biomarcador depende da sua importância toxicológica e do contexto em que está sendo usado (Manno *et al.*, 2010). Dessa forma, pode-se observar que os biomarcadores de susceptibilidade podem interferir na biotransformação e reparo, enquanto que os biomarcadores de efeito podem ser considerados preditores do desenvolvimento de diferentes patologias, auxiliando no papel preventivo da toxicologia ocupacional (Angerer, Ewers e Wilhelm, 2007).

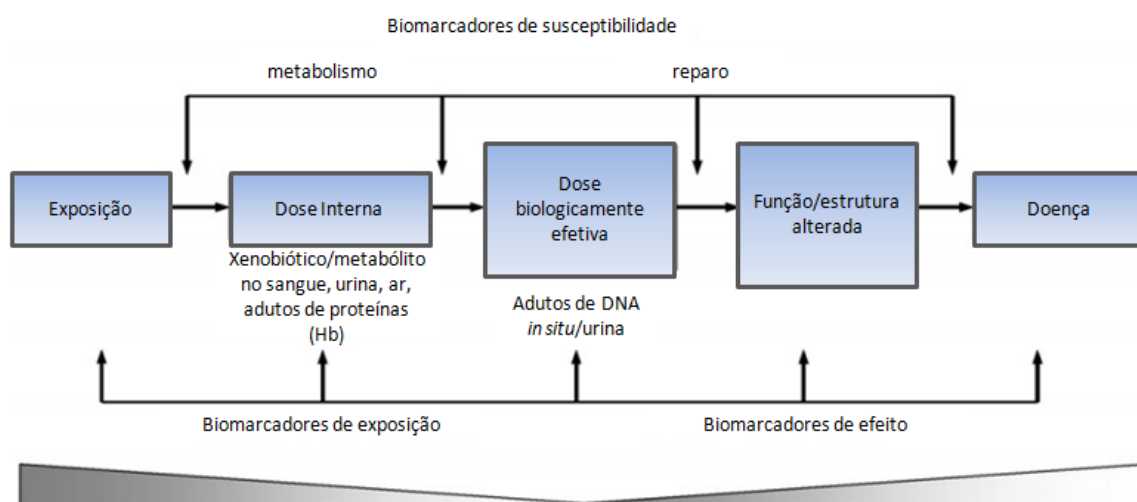


Figura 3 - Subdivisão dos biomarcadores (Adaptado de Manini, De Palma e Mutti, 2007).

6.2.1. Biomarcadores de exposição

Os biomarcadores de exposição são definidos como o xenobiótico propriamente dito e/ou seus metabólitos ou ainda, como produtos de interação entre o xenobiótico e alguma molécula-alvo ou célula do organismo (Manno *et al.*, 2010). Vários trabalhos avaliam a relação de diferentes biomarcadores de exposição ao

benzeno com os efeitos tóxicos causados por este solvente orgânico (Arayasiri *et al.*, 2010; Angelini *et al.*, 2012; Carrieri *et al.*, 2012). Dentre os biomarcadores urinários de exposição, destacam-se o ácido fenilmercaptúrico, ácido trans, trans-mucônico, hidroquinona, fenol e catecol, todos provenientes da biotransformação hepática e medular do benzeno. A exposição ocupacional ao benzeno também pode ser avaliada através das concentrações sanguíneas ou urinárias deste solvente orgânico, e ainda pelos níveis do solvente no ar inalado (Weisel, 2010). Apesar da ampla variedade de biomarcadores utilizados no biomonitoramento do benzeno, ainda objetiva-se encontrar aquele que apresente sensibilidade suficiente para avaliar os baixos níveis de exposição ao benzeno e que permita uma detecção precoce dos danos causados por este xenobiótico (Weisel, 2010).

No Brasil, o ácido trans, trans-mucônico urinário é o biomarcador de exposição preconizado pela portaria nº34 de 20 de dezembro de 2001, do Ministério do Trabalho e Emprego (Brasil, 2001). A correlação entre este biomarcador urinário e o benzeno no ar é detectada a partir de níveis ambientais menores do que 1 ppm (Weisel, 2010). Esses níveis viabilizam a utilização do ácido trans, trans-mucônico urinário como principal biomarcador de exposição no Brasil, onde os limites para a exposição ao benzeno variam de 1 a 2,5 ppm (Fundacentro, 2005). O ácido trans, trans-mucônico é um biomarcador bastante sensível, apresentando concentrações elevadas em exposições a partir de 0,1 ppm de benzeno. Os níveis de ácido trans, trans-mucônico urinário correlacionam-se tanto com exposições isoladas realizadas horas anteriores à análise, como com exposições crônicas em diferentes ambientes ocupacionais (Weisel, 2010). De acordo com a ACGIH, o limite biológico máximo permitido para o ácido trans, trans-mucônico é de 500 µg/g creatinina (ACGIH, 2011). No Brasil, não existe um limite biológico estabelecido, entretanto, considera-se que pessoas não expostas ocupacionalmente ao benzeno devem apresentar níveis menores do que 500 µg/g creatinina para este biomarcador de exposição ao benzeno (Brasil, 2001). Ainda segundo a portaria nº34 de 20 de dezembro de 2001, a correlação entre os níveis urinários de ácido trans, trans-mucônico e benzeno no ar deve ser baseada nos valores estabelecidos pelo órgão alemão DFG (Deutsche Forschungsgemeinschaft), de acordo com a Tabela 1 (Brasil, 2001).

Tabela 1. Correlação das concentrações de ácido trans, trans-mucônico urinário com benzeno no ar, obtidas a partir dos valores estabelecidos pelo DFG, corrigidos para grama/grama de creatinina.

Benzeno Ar		Ácido trans, trans-mucônico urinário	
ppm	mg/m ³	mg/l	mg/g creatinina
0,3	1	--	--
0,6	2	1,6	1,3
0,9	3	--	--
1	3,3	2	1,6
2	6,5	3	2,5
4	13	5	4,2
6	19,5	7	5,8

A principal desvantagem do ácido trans, trans-mucônico, como biomarcador de exposição ao benzeno, é o fato de sua concentração basal ser influenciada por fatores e características individuais, como o hábito de fumar e a dieta, podendo ser encontrado na urina de indivíduos não expostos ao benzeno, uma vez que o ácido trans, trans-mucônico também é metabólito do ácido sórbico, usado largamente como aditivo em diferentes alimentos (Pezzagno, Maestri e Fiorentino, 1999; Oga, 2008; Hoet *et al.*, 2009).

6.2.2. Biomarcadores de efeito

Os biomarcadores de efeito correspondem a qualquer alteração bioquímica ou fisiológica decorrente da interação entre o xenobiótico e o organismo, e que dependendo da sua magnitude pode ser considerada como um potencial distúrbio da saúde ou uma doença propriamente dita (Manini, De Palma e Mutti, 2007; Manno *et al.*, 2010). Na maioria dos casos, este grupo heterogêneo de indicadores apresenta boa correlação com o grau e tempo de exposição aos xenobióticos, podendo ser utilizado como preditores de doenças clínicas e auxiliando na avaliação de risco à saúde ocupacional (Manno *et al.*, 2010; Silins e Hogberg, 2011).

O uso de biomarcadores de efeito no biomonitoramento ocupacional permite identificar tanto os xenobióticos envolvidos na exposição, bem como os efeitos tóxicos que estes agentes podem causar à saúde do trabalhador (Silins e Hogberg, 2011). Uma subclasse importante destes biomarcadores é representada por biomarcadores de dano precoce, caracterizados por testes mais indicativos de um efeito subclínico ou de uma resposta clínica precoce (Manno *et al.*, 2010).

Os biomarcadores de genotoxicidade representam um grupo importante de indicadores que têm sido cada vez mais aplicados em estudos ocupacionais envolvendo agentes mutagênicos ou carcinogênicos, como é o caso do benzeno. Estes indicadores incluem alterações genéticas, aberrações cromossômicas, teste do micronúcleo e ensaio cometa, entre outros (Pandey *et al.*, 2008; Jarabek *et al.*, 2009; Manno *et al.*, 2010; Angelini *et al.*, 2012).

Dentre os biomarcadores de genotoxicidade, o ensaio do cometa destaca-se pela sua simplicidade, sensibilidade, versatilidade, rapidez e economia. Através do ensaio cometa é possível avaliar dano e reparo de DNA em qualquer célula eucariótica (Collins, 2004). Muitos trabalhos têm avaliado a genotoxicidade em trabalhadores expostos ocupacionalmente ao benzeno através deste biomarcador (Roma-Torres *et al.*, 2006; Keretsetse *et al.*, 2008; Fracasso *et al.*, 2010).

O teste do micronúcleo é outro teste citogenético usado para avaliar a instabilidade genômica decorrente da exposição ocupacional a agentes genotóxicos (Zalacain, Sierrasesumaga e Patino, 2005). Este biomarcador permite avaliar alterações a nível de cromossomo, tais como quebra, perda e rearranjo cromossômico, todos eventos relacionados à carcinogênese (Gonzalez-Yebra *et al.*, 2009).

Além dos biomarcadores de genotoxicidade, diversos parâmetros hematológicos também têm sido utilizados rotineiramente no biomonitoramento da exposição ocupacional ao benzeno. Alterações nos níveis de células sanguíneas, tais como redução na contagem de linfócitos, neutrófilos e plaquetas, diminuição dos níveis de hemoglobina e conseqüente desenvolvimento de anemia, estão entre os principais efeitos hematotóxicos decorrentes da exposição ocupacional ao benzeno (Kirkeleit, 2008).

A enzima δ -aminolevulinato desidratase (ALA-D) é uma das enzimas envolvidas na via biossintética do grupo prostético heme, sendo portanto, essencial para a eritropoiese (Baierle *et al.*, 2010). A inibição da ALA-D pode prejudicar a síntese do grupamento heme, e conseqüentemente a produção de hemoglobina, resultando em conseqüências patológicas, tais como a anemia (Souza *et al.*, 2007). A atividade enzimática da ALA-D tem sido relatada como um potencial biomarcador de efeito precoce para as alterações hematológicas decorrentes da exposição ao chumbo (Sakai, 2000; Rocha *et al.*, 2012), e vários estudos têm demonstrado a inibição enzimática em populações expostas ocupacional ou ambientalmente a este metal (Sakai, 2000; Ahamed *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2011). Baseando-se no fato de que um dos principais efeitos hematotóxicos decorrentes da exposição ocupacional ao benzeno é o desenvolvimento de anemia, como descrito acima, a avaliação da atividade enzimática da ALA-D pode ser um biomarcador de grande utilidade no biomonitoramento do benzeno.

Alterações imunológicas como redução dos níveis de imunoglobulinas séricas, complemento, citocinas, número de linfócitos e monócitos circulantes têm sido utilizadas como biomarcadores de efeito para demonstrar a ação imunotóxica decorrente da exposição ocupacional ao benzeno (Uzma, Kumar e Hazari, 2010; Haro-Garcia *et al.*, 2012). Assim, a resposta imune deficiente observada em indivíduos expostos ao benzeno pode ser decorrente tanto da supressão de células produtoras de imunoglobulina, quanto da diminuição da imunidade celular (Uzma, Kumar e Hazari, 2010). O baixo nível de linfócitos T circulantes pode contribuir para o desenvolvimento da carcinogênese, uma vez que estas células são as principais responsáveis pela imunovigilância contra as células tumorais (Costello *et al.*, 1998; Dai *et al.*, 2009). A ativação das células T é mediada principalmente por moléculas de adesão B7-1 (CD80) e B7-2 (CD86) presentes na superfície das células apresentadoras de antígeno (Dai *et al.*, 2009). A ausência ou expressão anormal dessas moléculas de adesão é considerado um dos principais mecanismos de escape das células tumorais frente a imunovigilância, o que pode ser considerado um dos possíveis mecanismos patogênicos envolvidos no desenvolvimento de algumas leucemias (Costello *et al.*, 1998; Dai *et al.*, 2009). Sendo assim, a avaliação da expressão das moléculas de adesão CD80 e CD86 pode ser relevante no

biomonitoramento de indivíduos expostos ocupacionalmente ao benzeno, uma vez que a leucemia é um dos principais efeitos tóxicos causados por este solvente orgânico (Smith, 2010).

Outro grupo importante de biomarcadores de efeito é representado por parâmetros bioquímicos que são indicativos da função hepática e renal de indivíduos expostos (Manno *et al.*, 2010). Dentre os principais biomarcadores de função hepática estão bilirrubina, fosfatase alcalina e transaminases. Em relação aos biomarcadores renais, albuminúria, β -2-microglobulina e N-acetil- β -D-glicosaminidase (NAG) destacam-se como biomarcadores de dano renal precoce, indicativos de dano glomerular e tubular, respectivamente (Silins e Hogberg, 2011). Embora não totalmente específicos, esses biomarcadores de efeito podem ser usados em conjunto com outros biomarcadores mais tradicionais, com a finalidade de contribuir para a avaliação dos riscos à saúde ocupacional e para a implementação de novas políticas eficazes na prevenção de doenças no ambiente de trabalho (Manno *et al.*, 2010).

Os biomarcadores do estresse oxidativo também são indicadores importantes no biomonitoramento da exposição ocupacional ao benzeno (Silins e Hogberg, 2011), uma vez que o estresse oxidativo é indicado como um dos principais mecanismos responsáveis pela toxicidade causada por este solvente orgânico (Rossner *et al.*, 2007; Barreto *et al.*, 2009; Badham e Winn, 2010; Uzma, Kumar e Hazari, 2010). A interação do benzeno com o organismo de indivíduos expostos ocupacionalmente, pode ser investigada por diversos tipos de biomarcadores de dano oxidativo, tais como proteínas carboniladas e nitrosiladas (dano oxidativo proteico), malondialdeído (peroxidação lipídica), 7,8-dihidro-8-oxoguanina (dano oxidativo de DNA) e antioxidantes endógenos (Silins e Hogberg, 2011).

6.2.3. Biomarcadores de suscetibilidade

Adicionalmente aos biomarcadores de exposição e efeito, os biomarcadores de suscetibilidade também são de extrema importância na avaliação de riscos, uma vez que permitem identificar eventuais subgrupos com maior suscetibilidade à

exposição (Bolufer *et al.*, 2006; Smith, 2010). Estes biomarcadores indicam uma condição adquirida ou congênita, baseada na capacidade limitada do organismo, frente à exposição a uma substância química específica (Manno *et al.*, 2010).

Os biomarcadores de suscetibilidade podem ser representados pelo polimorfismo de genes específicos envolvidos no metabolismo do benzeno e no reparo do DNA. A variabilidade genética pode resultar na ativação das enzimas metabolizadoras (CYP2E1 e MPO) e/ou na diminuição da atividade das enzimas detoxificantes (GST e NQO1), influenciando na suscetibilidade individual e resultando em efeitos diferentes para uma mesma exposição (Silins e Hogberg, 2011). As variações polimórficas destas enzimas podem estar associadas com desenvolvimento de leucemia, hematotoxicidade, aberrações cromossômicas e alterações metabólicas, entre outros efeitos (Qu *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2007; Kim *et al.*, 2008; Kirkeleit, 2008; Smith, 2010; Angelini *et al.*, 2012).

Adicionalmente, o polimorfismo da enzima ALA-D também pode ser de extrema importância na avaliação da toxicidade do benzeno. A variabilidade genética poderia contribuir para a inibição da ALA-D e prejudicar a síntese do grupamento heme da hemoglobina, contribuindo consequentemente para o desenvolvimento de anemia (Souza *et al.*, 2007). A relação entre o polimorfismo da ALA-D e a toxicidade ao chumbo já é bastante relatada (Sakai, 2000; Chia, Yap e Chia, 2004; Montenegro *et al.*, 2006; Miyaki *et al.*, 2009), entretanto não existem relatos sobre o polimorfismo desta enzima e a toxicidade ao benzeno.

Tendo em vista os diversos efeitos tóxicos causados pelo benzeno, a exposição crônica a este xenobiótico representa um importante problema de saúde pública. Apesar dos inúmeros esforços para regulamentar as emissões de benzeno e de seu uso restrito, um grande número de trabalhadores ainda continua exposto em diversas situações de trabalho. Frentistas de postos de gasolina constituem um importante grupo de risco decorrente da exposição ocupacional ao benzeno, mesmo com as baixas concentrações deste xenobiótico encontradas na gasolina. Dessa forma, o monitoramento da saúde dos trabalhadores expostos ao benzeno juntamente com a avaliação dos níveis de exposições no ambiente de trabalho é de extrema importância para conhecer os mecanismos de toxicidade sob os quais o benzeno atua; além de contribuir para a detecção precoce de danos causados pelo

benzeno, e para a elaboração de medidas preventivas à saúde, visando em médio ou longo prazo, a maior qualidade de vida do trabalhador.

OBJETIVOS

1. Objetivo geral

Avaliar os riscos relacionados à exposição ocupacional a baixos níveis de benzeno, através do monitoramento ambiental e do biomonitoramento em frentistas de postos de gasolina, investigando possíveis biomarcadores que possibilitem a detecção precoce dos danos causados pelo benzeno aos sistemas hematológico, imunológico, hepático, renal e ao DNA. Além disso, avaliar a influência do tempo de exposição, tabagismo, co-exposição e do estresse oxidativo, como possível mecanismo de toxicidade.

2. Objetivos específicos

- Avaliar níveis de exposição ocupacional (dose externa) sob os quais indivíduos encontram-se expostos ocupacionalmente ao benzeno, tolueno e xilenos (BTX);
- Quantificar os biomarcadores de exposição urinários dos compostos BTX: ácido trans, trans-mucônico (benzeno), ácido hipúrico (tolueno), metilhipúrico (xilenos);
- Quantificar os biomarcadores de exposição sanguíneos dos compostos BTX: benzeno, tolueno e xilenos sanguíneo;
- Avaliar hematotoxicidade, imunotoxicidade, nefrotoxicidade, hepatotoxicidade e genotoxicidade causadas pela exposição ocupacional ao benzeno, através de diferentes biomarcadores de efeito;
- Estudar possíveis correlações entre os níveis de exposição e os diferentes biomarcadores de efeito;
- Avaliar a possível influência do tempo de exposição ocupacional sobre os diferentes biomarcadores de efeito;
- Quantificar biomarcadores de dano oxidativo e antioxidantes endógenos e exógenos;

- Estudar possíveis correlações entre os biomarcadores de efeito e biomarcadores de dano oxidativo;
- Estudar possíveis correlações entre os biomarcadores de efeito e antioxidantes endógenos e exógenos;
- Avaliar a possível influência do tempo de exposição ocupacional sobre os biomarcadores de dano oxidativo e antioxidantes.

PARTE II

CAPÍTULO I

Non-conventional biomarkers of effect for the biological monitoring of occupational exposures to low levels of benzene

Angela M. Moro, Natália Brucker, Mariele F. Charão, Elisa Sauer, Fernando Freitas,
Guilherme B. Bubols, Sarah Campanharo, Rafael Linden, Ana P. Souza,
Cristina Bonorino, Rafael Moresco, Diogo Pilger, Adriana Gioda,
Sandra Farsky, Solange C. Garcia

Manuscrito submetido à publicação na revista *Science of the Total Environment*

**Non-conventional biomarkers of effect for the biological monitoring of
occupational exposures to low levels of benzene**

Angela M. Moro^{a,b}, Natália Brucker^{a,b}, Mariele Charão^{a,b}, Elisa Sauer^b, Fernando Freitas^b, Guilherme Bubols^b, Sarah Campanharo^b, Rafael Linden^c, Ana P. Souza^d, Cristina Bonorino^d, Rafael Moresco^e, Diogo Pilger^a, Adriana Gioda^f, Sandra Farsky^g, Solange C. Garcia^{a,b,*}

^aPost-graduate Programme in Pharmaceutical Sciences, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.

^bLaboratory of Toxicology (LATOX), Department of Analysis, Pharmacy Faculty, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.

^cHealth Sciences Institute, Feevale University, Novo Hamburgo, RS, Brazil.

^dLaboratory of Cellular and Molecular Immunology, Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.

^eLaboratory of Clinical Biochemistry, Department of Clinical and Toxicological Analysis, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil.

^fDepartment of Chemistry of Pontifical Catholic University Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

^gDepartment of Clinical and Toxicological Analysis, School of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, SP, Brazil.

*Corresponding author: Prof Dr Solange Cristina Garcia.

E-mail address: solange.garcia@ufrgs.br (S. C. Garcia).

Address: Avenida Ipiranga 2752, Santa Cecília, Porto Alegre, RS, Brazil.

CEP: 90610-000 Tel.: (+55) 3308-5297. Fax: (+55) 51 3308-5437.

Abstract

Introduction: Benzene is one of the most hazardous components of gasoline. Elucidation of effective biomarkers may provide tools for the early detection of biological alterations caused by benzene exposure and may contribute to the reduction of occupational diseases. This study aimed to assess potential biomarkers for various biological systems in workers exposed to low benzene levels.

Methods: Sixty gasoline station attendants (GSAs), who were divided into two groups (44 non-smokers and 16 smokers), and 28 non-exposed subjects were evaluated. Environmental and biological monitoring of benzene exposure was performed. Among the biomarkers evaluated were CD80 and CD86 expression in lymphocytes and monocytes, as well as ALA-D activity. The influence of confounding factors and toluene co-exposure were considered.

Results: Although exposures were below ACGIH (American Conference of Governmental Industrial Hygienists) limits, reduced ALA-D activity; higher mALB levels; decreased CD80 and CD86 expression in monocytes; and increased ALT, AST and NAG activities were found in both groups of GSA compared to non-exposed subjects. Furthermore, according to multiple linear regression analysis, benzene exposure contributed to a decrease in CD80 and CD86 expression in monocytes, ALA-D inhibition, and increased transaminases.

Conclusions: These findings suggest, for the first time, a potential effect of low benzene exposure on CD80 and CD86 expression and ALA-D activity, effects that could be used as markers for the early detection of benzene-induced alterations. However, additional studies are necessary to elucidate the mechanisms of such alterations.

Keywords: CD80 and CD86 expression; ALA-D activity; early renal damage biomarkers; low benzene exposure; transaminases, occupational toxicology.

1. Introduction

Gasoline is a complex mixture of saturated and unsaturated hydrocarbons and is composed mainly of paraffins, olefins and aromatics (Keenan et al., 2010; Keretsetse et al., 2008). Aromatic compounds are predominantly composed of benzene, toluene and xylenes (BTX) (De Palma et al., 2012; Hopf et al., 2012; Keretsetse et al., 2008). Among these constituents, benzene stands out for its hazardous effects on human health (Keretsetse et al., 2008; Rekhadevi et al., 2010; Tunsaringkarn et al., 2011). Airborne benzene vapors generated from gasoline are accompanied by high concentrations of many other hydrocarbons, which share very similar metabolism and detoxification pathways. Simultaneous exposure to these other hydrocarbons may have a significant impact on benzene toxicity (Keenan et al., 2010).

Benzene has been classified as a Group I carcinogenic chemical by the International Agency for Research on Cancer (IARC, 2012), and it is known to cause the hematologic disorders leukemia and myelodysplastic syndrome and to have several deleterious effects on many other biological systems after long-term exposures (De Palma et al., 2012; Uzma et al., 2010). The hematopoietic system is highly sensitive to the toxic effects of benzene. Exposure to benzene is associated with bone marrow depression and aplastic anemia, resulting in a progressive decrease in erythrocytes, thrombocytes and each of the various types of leukocytes (Sun et al., 2009; Weisel, 2010; Wong et al., 2010). Consequently, benzene can induce immune system depression, which increases the risk for opportunistic

infections and compromised immune surveillance (Tunsaringkarn et al., 2011; Uzma et al., 2010).

Biological monitoring has been used as a potential tool for better assessing integrated benzene exposures (Hays et al., 2012). Biomarkers of effect are a heterogeneous group of biomarkers that can reflect early biological changes in response to benzene toxicity, indicative of health risks (Uzma et al., 2010). Simultaneous evaluation of biomarkers of exposure and effect may be useful in the estimation and reduction of risks caused by occupational exposure to benzene. Such assessments may also be adopted for preventative health initiatives by acting effectively on health surveillance for improving the safety of occupationally exposed workers (De Palma et al., 2012; Tunsaringkarn et al., 2011).

The present study aimed to assess potential biomarkers to detect early effects on different biological systems of gasoline station attendants (GSAs) exposed to low levels of benzene, a recognized professional category of risk. For this purpose, environmental and biological monitoring was performed. The toxic effects of benzene on hematopoietic, immune, hepatic and renal systems were evaluated using different biomarkers of effect. We analyzed the possible influence of additional hydrocarbons present in gasoline, as well as other confounding factors such as age, smoking and exposure time.

2. Materials and Methods

2.1. Study Population

A total of 88 male subjects participated in this study. The exposed group consisted of 60 gasoline station attendants from Rio Grande do Sul, Brazil. GSAs were divided into two groups: non-smokers (n=44) and smokers (n=16). All subjects had been working in their current job position for at least 6 months. The non-exposed group consisted of 28 subjects who were non-smokers and who had no history of occupational exposure to benzene.

Each participant answered a structured questionnaire about general health, lifestyle, smoking status and history of exposure. Personal monitors were used to assess the BTX concentration in the breathing zone during the daily work shifts (approx. 8 hours). Urine and blood samples were collected from all participants at the end of the work shift following 3-4 consecutive days of exposure.

This study was approved by the Ethics Committee in Research from the Federal University of Rio Grande do Sul/RS (No. 21728/11) and informed consent was obtained from each participant.

2.2. Exposure Assessment

Personal breathing-zone air samples were collected using passive samplers (SKC 575-002[®]). BTX (benzene, toluene, o-, m-, p-xylenes) were desorbed with dichloromethane and analyzed by gas chromatography and flame ionization detection (GC-FID). GC column Innowax (25 m, 0.2 mm, 0.4 μ m) was used. The initial oven temperature was 40°C, and the temperature was increased by 4°C min⁻¹ until it reached 53°C, followed by an oven ramp rate of 40°C min⁻¹ up to 200°C. The FID detector temperature was kept at 250°C.

Blood BTX levels were analyzed by headspace GC-FID. For analysis, 1 mL of blood was added to 4 mL of NaCl 30% (w/v) and 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ nitrobenzene (internal standard, IS; 100 μL) into 20 mL headspace vials. After vortexing (10 s), the samples were incubated at 60°C for 15 minutes and then injected into the GC-FID system. A GC OV-1 column (30 m, 0.32 mm, 1 μm) was used. The initial oven temperature of 80°C was maintained for 2 min, increased by 10°C min^{-1} to 110°C, and then increased by 20°C min^{-1} until the temperature reached 200°C, which was maintained for 3 minutes. The FID detector temperature was kept at 250°C.

Quantification of urinary metabolite of benzene (trans,trans-muconic acid - t,t-MA) was carried out by high-performance liquid chromatography with UV detection (HPLC-UV) after solid phase extraction (SPE) according to a previously described analytical method (Ducos et al., 1990), with modifications (SPE cartridge: 100 mg; sample volume: 200 μL). Quantification of urinary metabolites of toluene (hippuric acid - HA) and xylenes (methylhippuric acid - mHA) was simultaneously performed by HPLC-UV (Bulcão et al., 2008). The creatinine concentration was measured by spectrophotometry as previously described (Jaffé, 1886) using commercial kits (Doles reagents, Goiânia, GO, Brazil).

2.3. Hematological Biomarkers

Erythrogram, white blood cell parameter analyses and platelet analyses were performed using a hematology analyzer (Cobas Micros 60 System).

δ -Aminolevulinatase (ALA-D) activity was assayed in erythrocyte lysates according to a previously described method (Sassa, 1982). The enzymatic

activity was also determined in the presence of the reducing agent dithiothreitol (DTT).

2.4. Immune System Biomarkers

Expression of CD80 and CD86 in the membranes of peripheral blood mononuclear cells was analyzed by flow cytometry. Erythrocytes were lysed, and leukocytes were resuspended in PBS buffer. A total of 10^6 leukocytes were incubated with PE-conjugated anti-CD80 and FITC-conjugated anti-CD86. The cells were immediately analyzed using FACSCanto II Flow Cytometer (Becton Dickinson, San Jose, CA) using FlowJo Software (TreeStar).

2.5. Hepatic Biomarkers

Serum aspartate aminotransferase (AST) and alanine aminotransferase (ALT) were quantified using Cobas Integra 400 plus[®] (Roche, Indianapolis, IN) laboratory kits.

2.6. Renal Biomarkers

Classical biomarkers of renal function (serum creatinine, urea and uric acid) were determined using Cobas Integra 400 plus[®] (Roche, Indianapolis, IN) laboratory kits. Microalbuminuria (mALB) was quantified in a Cobas Mira[®] analyzer (Roche, Indianapolis, IN) by an immunoturbidimetric method. Urinary NAG (N-acetyl-beta-D-glucosaminidase) was determined by spectrophotometry based on a previously described method (Maruhn, 1976).

2.7. Statistical Analysis

Data analysis was performed with IBM SPSS Statistics software (version 19). All study variables were tested for normality using Shapiro-Wilk test. Appropriate parametric tests of statistical significance (ANOVA) and equivalent nonparametric tests (Kruskal-Wallis test) were employed to compare groups, followed by multiple comparison tests (Tukey's post hoc test). The results were expressed as mean±standard error of the mean (SEM) or median (interquartile range), according to the distribution of the variables. Spearman's rank correlation tests were used to evaluate the relationship between variables. Multiple linear regression models were applied to verify the involvement of benzene exposure on the biomarkers of effect. The influence of confounding factors (age, smoking habits and exposure time) and toluene co-exposure were considered. Variables that had a non-normal distribution were log transformed to be included in multivariate regressions. The significance level for all tests was $p \leq 0.05$.

3. Results

The main characteristics of the study population assessed by the questionnaire are summarized in Table 1.

Personal exposure to BTX in air is reported in Table 2. GSAs were exposed to significantly higher BTX concentrations than the non-exposed group. Higher median BTX personal sampling levels were found in GSA smokers compared to GSA non-smokers; however, no significant differences were observed within the GSA groups. Data showed that GSAs were exposed to very low levels of BTX, with all values

found to be below the ACGIH (American Conference of Governmental Industrial Hygienists) limits.

Regarding blood biomarkers of exposure to BTX, only 10 (22.8%) non-smoker GSAs and 8 (50%) smoker GSAs presented detectable levels of blood benzene (B-BZ). Higher B-BZ concentrations were observed in GSA smokers compared to GSA non-smokers, with median B-BZ levels of 7.1 ng mL⁻¹ (3.7-9.9 ng mL⁻¹) versus 5.5 ng mL⁻¹ (3.0-12.6 ng mL⁻¹), respectively; however, a statistically significant difference was not observed. Similar levels of blood toluene (B-TOL) were found in both GSA groups, with median concentrations of 8.7 ng mL⁻¹ (6.7-9.7 ng mL⁻¹) and 8.5 ng mL⁻¹ (6.9-9.8 ng mL⁻¹) for GSA smokers and non-smokers, respectively. The non-exposed group did not present measurable levels of B-BZ and B-TOL. Undetectable blood xylenes levels were found in all of the study population.

Significant differences were found for t,t-MA levels between both GSA groups versus the non-exposed group ($p < 0.001$; Table 2). Although t,t-MA levels were higher in both GSA groups compared to the non-exposed group, the median values were below the biological exposure index (BEI: 500 $\mu\text{g g}^{-1}$ creatinine) established by ACGIH.

The urinary biomarker of exposure to toluene was not significantly changed among the groups ($p > 0.05$; Table 2). HA median values were below the biological limit value for occupationally exposed people (BEI: 1.6 g g⁻¹ creatinine; ACGIH). Furthermore, the urinary biomarker of exposure to xylenes could not be detected in any members of the study population (Table 2).

The results of classical hematological parameters are summarized in Table 3. Decreased red blood cells and increased neutrophil counts were observed in both

GSA groups relative to the non-exposed group ($p < 0.001$). In addition, lower hemoglobin levels were found in non-smoker GSAs when compared to the non-exposed group ($p < 0.001$). Other hematological parameters did not present significant differences among the groups. All hematological parameters are within the reference values for adult men.

Figure 1 shows ALA-D enzymatic activity results, indicating that both GSA groups showed reduced ALA-D activity in relation to the non-exposed group ($p < 0.001$). No significant difference in ALA-D activity was observed between the GSA groups. When the reducing agent DTT was added, increases of 30.3%, 22.0% and 16.0% in ALA-D activity were obtained for non-smoker GSAs, smoker GSAs and the non-exposed group, respectively, corresponding to the ALA-D reactivation index (%). ALA-D/DTT activities for both GSA groups remained lower than the non-exposed group ($p < 0.001$; Figure 1), and significant differences were observed in ALA-D activity when assayed either with or without DTT in all groups ($p < 0.001$).

Expression of CD80 and CD86 in the membranes of peripheral blood mononuclear cells is shown in Figure 2. Although no significant difference was found in CD80 expression in lymphocytes among the studied groups ($p > 0.05$; Figure 2A), CD86 expression in lymphocytes was reduced in both GSA groups compared to the non-exposed group ($p < 0.05$; Figure 2A). Monocyte CD80 and CD86 expression was significantly lower in both GSA groups in relation to the non-exposed group ($p < 0.05$; Figure 2B).

Transaminase enzymes were increased in GSA non-smokers and smokers in relation to the non-exposed group: $26.6 \pm 1.5 \text{ U L}^{-1}$ and $25.8 \pm 1.9 \text{ U L}^{-1}$ versus $11.0 \pm 0.8 \text{ U L}^{-1}$ ($p < 0.001$) for AST, respectively; $25.4 \pm 2.0 \text{ U L}^{-1}$ and $23.9 \pm 3.0 \text{ U L}^{-1}$ versus

12.9 ± 1.1 U L⁻¹ (p<0.001) for ALT, respectively. All enzymatic activities were within reference values.

Classical markers of renal function were within reference values and did not show significant differences among the groups (p>0.05) (data not shown). Figure 3 shows the results of early biomarkers of renal damage. Both GSA groups showed increased mALB concentration and higher NAG activity compared to the non-exposed group ((p<0.05 for both; Figure 3A) (p<0.001 for both; Figure 3B), respectively).

Spearman's correlations were analyzed in all subjects, as a single sample. Personal benzene and toluene exposure were well correlated (r= 0.83; p<0.001). No significant correlations were found between personal exposure to airborne benzene or toluene and their blood levels, respectively (p>0.05 for both). A significant correlation was observed between personal benzene exposure and t,t-MA (r= 0.35; p<0.01). Toluene levels in the air were not significantly correlated to HA levels (p>0.05).

Personal exposure to benzene and toluene levels, as well as t,t-MA concentrations, were significantly correlated to ALA-D activity, expression of CD80 and CD86 in monocytes and AST and ALT enzymatic activities (Table 4). Additionally, we observed that increased t,t-MA levels were accompanied by an increase of mALB levels (r= 0.30; p<0.01).

Table 5 summarizes the main correlations between exposure time versus ALA-D activity, CD80 and CD86 expression in monocytes, mALB concentrations, and NAG, AST and ALT activities.

Table 6 displays the main results of the multiple linear regression models. In relation to ALA-D, the best-fit model revealed that exposure time was the only factor that significantly contributed to reduced enzymatic activity. Urinary t,t-MA was modeled as the best predictor for decreased CD80 and CD86 expression in monocytes and increased transaminases. Individual toluene exposure, age and cigarette smoking did not show significant influences on the multiple regression models.

4. Discussion

Characterization of human exposure is an important element in occupational studies, risk evaluations and risk management (Weisel, 2010). Environmental and biological monitoring are complementary tools used to assess integrated exposures, occupational health risk evaluation and occupational health practice (Manno et al., 2010). In the present study, environmental monitoring indicated that GSAs were exposed to low levels of BTX, with median values well below the threshold limit value time-weighted average proposed by ACGIH to the working environment (ACGIH, 2011).

The low concentration of benzene exposure observed in our study may be due to the reduced percentage of this organic solvent in gasoline (EPA, 2011). Nevertheless, even low levels of benzene exposure may represent a critical factor in the development of leukemia. This is because benzene content cannot be completely eliminated from gasoline, and there are no safe limits for exposures to carcinogens, such as benzene (Carrieri et al., 2006; Weisel, 2010). The World Health Organization

(WHO) has estimated that the risk of developing leukemia is approximately six cases per million among people who experience lifetime exposure to benzene concentrations of $1 \mu\text{g m}^{-3}$ in the air (WHO, 1996). Based on these data, occupational exposure to benzene should be considered as a serious public health concern (Manini et al., 2008).

Despite low exposure levels, personal benzene and toluene exposure were highly correlated with each other, indicating the co-exposure occurrence in gasoline stations.

Our data showed significant differences in t,t-MA levels between both GSA groups and the non-exposed group. Additionally, t,t-MA excretion correlated with personal benzene exposure, which confirmed the relevance of this biomarker, even at low levels. HA, in contrast, showed no significant differences among the three studied groups. This indicated a low specificity of this biomarker in the monitoring of toluene exposure, which has already been evidenced in our previous studies with painters (Moro et al., 2012; Moro et al., 2010).

The hematotoxic effects caused by chronic benzene exposure have been thoroughly studied; thus, classical hematological parameters are routinely evaluated in such cases (Kirkeleit, 2008; Robert Schnatter et al., 2010). Our results showed that benzene occupational exposure affected both red blood cell and neutrophil counts; however, these parameters remained within the reference values. According to previously described work, alterations in the number of blood cells are not especially sensitive indicators of early benzene effects (Swaen et al., 2010). These data have been reinforced by experimental studies showing that low levels of hydroquinone exposure, an immunotoxic metabolite of benzene, does not alter bone

marrow or peripheral leukocyte and erythrocyte counts but does affect the function of circulating leukocytes (Ribeiro et al., 2011; Shimada et al., 2012).

Our study showed, for the first time, that circulating mononuclear cells from GSAs, especially monocytes, presented a marked reduction on expression of co-stimulatory molecules CD80 and CD86. According to multiple linear regression analysis, t,t-MA was the only factor that significantly contributed to this reduction, demonstrating the involvement of benzene in the reduced expression of these immunological accessory molecules. CD80 and CD86 molecules play a key role in the activation and proliferation of T-cells and the production of cytokines (Chanan-Khan et al., 2011; Mohamed et al., 2012; Dolen e Esendagli, 2013), which are important effectors of immunological surveillance (Costello et al., 1998; Dai et al., 2009; Dolen e Esendagli, 2013). The lack of both such surface molecules may lead to hyporesponsiveness or anergic T cells (Dai et al., 2009). Studies have reported that leukemia patients express lower levels of CD80 and CD86 compared to healthy people (Dai et al., 2009; Zhao et al., 2012). In addition, the abnormal expression of CD80 and CD86 is considered one of the major mechanisms of tumor cell escape from immune surveillance, which may be one of the pathogenic mechanisms of some types of leukemia (Costello et al., 1998; Dai et al., 2009).

Based on the fact that occupational exposure to benzene is closely linked to the development of leukemia, the assessment of these co-stimulatory molecules in benzene-exposed workers may serve as an interesting tool in biological monitoring. However, the mechanism of CD80 and CD86 molecules in regulating immune responses is very complex. Additional studies are necessary to elucidate the involvement of benzene on the regulatory mechanisms of CD80 and CD86 molecules

and to determine whether these molecules could be predictors of alterations that contribute to leukemia development.

We also assessed ALA-D activity in an attempt to evaluate early biomarkers of hematological alterations caused by benzene exposure. The enzymatic activity of this enzyme was reduced in both GSA groups compared to non-exposed subjects. ALA-D inhibition compromises the heme synthesis of hemoglobin, which may ultimately contribute to the development of anemia (Baierle et al., 2010), a common hematotoxic effect resulting from benzene exposure (Robert Schnatter et al., 2010; Smith, 2010). Furthermore, this enzymatic inhibition leads to ALA (5-aminolevulinic acid) accumulation. ALA behaves as an endogenous pro-oxidant, increasing the formation of reactive oxygen species (ROS) in cells (Muzyka et al., 2004; Muzyka et al., 1998). The involvement of ROS in the inhibition of ALA-D was evaluated by using the reducing agent DTT, a thiol-reducing agent that has been used *in vitro* to prevent and/or reverse ALA-D inhibition induced by oxidizing agents (Valentini et al., 2007). Although ALA-D activity, when assayed with DTT, was higher in both GSA groups, it was still significantly lower than the activity observed in the non-exposed group, suggesting that mechanisms, other than oxidation of thiol groups, could be involved in ALA-D inhibition.

Linear correlations showed that the decreased ALA-D activity was correlated with higher t,t-MA excretion, along with personal benzene and toluene exposures. These findings suggested the possible involvement of benzene and toluene on ALA-D inhibition. A previous study from our group indicated toluene as the major inducer of ALA-D inhibition in painters exposed to a mixture of organic solvents (Moro et al., 2010). To the best of our knowledge, the correlation between benzene exposure and

ALAD inhibition has not been previously shown, as its action had already been proposed on other enzymes responsible for the heme biosynthesis (Muzyka et al., 2004). According to multivariate analysis, exposure time was the only factor which significantly contributed to the reduction of enzymatic activity. This suggests that chronic exposure to benzene may contribute to ALA-D inhibition, which, in the long-term, can supposedly cooperate in the decrease of enzymatic synthesis. However, further studies are needed to completely elucidate the involvement of this enzyme in the development of anemia in subjects exposed to benzene

Regarding hepatic biomarkers, both GSA groups showed increased transaminase activities compared to that of the non-exposed group. A multiple linear regression analysis showed that t,t-MA levels were significantly associated with increased AST and ALT activities, suggesting the involvement of occupational benzene exposure on hepatic alterations observed in GSAs. Despite the fact that transaminase activities were within the reference values, these hepatic biomarkers may be an important tool in continuous occupational biomonitoring. The increase in the transaminase activities was associated with the time of exposure to benzene, enabling the observation of the degree or persistence of the hepatic alterations and consequently the early detection of disorders caused by occupational benzene exposure.

Regarding the possible link between benzene exposure and renal alterations, our results demonstrated that the classical biomarkers remained within reference values. However, we found higher mALB levels and increased NAG activity in both GSA groups compared to the non-exposed group. These increases were accompanied by increased exposure time, suggesting that in the long term, benzene

may contribute to the development of alterations in glomerular and tubular cells of exposed subjects. Several studies have used these biomarkers of early renal dysfunction to assess the nephrotoxicity caused by solvent exposure and other xenobiotics (Franchini et al., 1983; Gonzalez-Yebra et al., 2006; Ohno et al., 2007; Jarosinska et al., 2008; Prozialeck et al., 2009). Our results suggest the reliability of these biomarkers of effect because they indicated kidney system alterations before such alterations were recognized by classic markers of renal function. Additionally, our findings support the hypothesis that in long-term occupational exposure to low benzene levels may be associated with an increased risk of developing renal alterations.

In addition to correlations observed with already established biomarkers of effect (AST, ALT, mALB and NAG), exposure time was also associated with the proposed novel effect biomarkers (enzyme ALA-D, CD80 and CD86 expression in monocytes). This suggests that chronic benzene exposure is associated with the progress of various alterations that in long-term can result in damage, which substantiates the reliability of these biomolecules as suitable biomarkers of effect.

Our study had some limitations. First, the reduced number of GSA smokers in relation to non-smokers may have contributed to the lack of influence of smoking habits on the biomarkers evaluated. Additionally, further studies are needed to completely elucidate the benzene involvement on the ALA-D inhibition and on the reduced expression of CD80 and C86 in monocytes.

5. Conclusions

In the present study, we suggested, for the first time, potential early biomarkers of hematological and immunological alterations (enzyme ALA-D in erythrocytes and CD80 and CD86 expressions in monocytes) for the biological monitoring of low benzene exposure. However, additional studies are necessary to elucidate the mechanisms of such biomarkers and the possible relationship with hematological alterations. Additionally, AST and ALT, as well as mALB and NAG were shown to be useful biomarkers for detecting alterations in the liver and kidney, respectively, in continuous biomonitoring of workers exposed to low benzene levels. Taken together, these findings may contribute to the early detection of benzene-induced alterations after occupational exposures and also may promote the development of preventive health measures for exposed workers, ultimately improving their quality of life.

Conflict of Interest Statement

The authors declare that there are no conflicts of interest.

Acknowledgments

This work was supported by CNPq/Universal (granted to S.C. Garcia; process Nos. 479613/2009-5 and 484096/2011-7) and FAPERGS (granted to S.C. Garcia; process No. 1017503 PqG 06/2010). A.M. Moro is recipient of a CAPES PhD Scholarship; S. Campanharo is recipient of PIBIC Fellowship; S. Farsky and S.C. Garcia are recipients of CNPq Research Fellowships.

References

- ACGIH. TLVs and BEIs based on the Documentation of the Threshold Limit Values for Chemical Substances and Physical Agents and Biological Indices. In: American Conference of Governmental Industrial Hygienists, Cincinnati, 2011.
- Baierle M, Valentini J, Paniz C, Moro A, Barbosa F, Garcia S. Possíveis efeitos do cobre sanguíneo sobre parâmetros hematológicos em idosos. *J Bras Patol Med Lab* 2010; 46: 463-470.
- Bulcão R, Santa Maria L, Charão M, Moro A, Roehrs M, Garcia S. Quantificação Simultânea de Indicadores Biológicos de Exposição a Solventes Orgânicos por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência. *Química Nova* 2008; 31: 1343-1348.
- Carrieri M, Bonfiglio E, Scapellato ML, Macca I, Tranfo G, Faranda P, et al. Comparison of exposure assessment methods in occupational exposure to benzene in gasoline filling-station attendants. *Toxicol Lett* 2006; 162: 146-52.
- Chanan-Khan AA, Chitta K, Ersing N, Paulus A, Masood A, Sher T, et al. Biological effects and clinical significance of lenalidomide-induced tumour flare reaction in patients with chronic lymphocytic leukaemia: in vivo evidence of immune activation and antitumour response. *Br J Haematol* 2011; 155: 457-67.
- Costello RT, Mallet F, Sainty D, Maraninchi D, Gastaut JA, Olive D. Regulation of CD80/B7-1 and CD86/B7-2 molecule expression in human primary acute myeloid leukemia and their role in allogenic immune recognition. *Eur J Immunol* 1998; 28: 90-103.

- Dai ZS, Chen QF, Lu HZ, Xie Y. Defective expression and modulation of B7-2/CD86 on B cells in B cell chronic lymphocytic leukemia. *Int J Hematol* 2009; 89: 656-63.
- De Palma G, Poli D, Manini P, Andreoli R, Mozzoni P, Apostoli P, et al. Biomarkers of exposure to aromatic hydrocarbons and methyl tert-butyl ether in petrol station workers. *Biomarkers* 2012; 17: 343-51.
- Dolen Y, Esendagli G. Myeloid leukemia cells with a B7-2(+) subpopulation provoke Th-cell responses and become immuno-suppressive through the modulation of B7 ligands. *Eur J Immunol* 2013; 43: 747-57.
- Ducos P, Gaudin R, Robert A, Francin JM, Maire C. Improvement in HPLC analysis of urinary trans,trans-muconic acid, a promising substitute for phenol in the assessment of benzene exposure. *Int Arch Occup Environ Health* 1990; 62: 529-34.
- EPA. Control of hazardous air pollutants from mobile sources. In: Environmental Protection Agency, USA, 2011.
- Franchini I, Cavatorta A, Falzoi M, Lucertini S, Mutti A. Early indicators of renal damage in workers exposed to organic solvents. *Int Arch Occup Environ Health* 1983; 52: 1-9.
- Gonzalez-Yebra AL, Kornhauser C, Wrobel K, Perez-Luque EL, Barbosa G. Occupational exposure to toluene and its possible causative role in renal damage development in shoe workers. *Int Arch Occup Environ Health* 2006; 79: 259-64.
- Hays SM, Pyatt DW, Kirman CR, Aylward LL. Biomonitoring Equivalents for benzene. *Regul Toxicol Pharmacol* 2012; 62: 62-73.

- Hopf NB, Kirkeleit J, Bratveit M, Succop P, Talaska G, Moen BE. Evaluation of exposure biomarkers in offshore workers exposed to low benzene and toluene concentrations. *Int Arch Occup Environ Health* 2012; 85: 261-71.
- IARC. Complete List of Agents, Mixtures and Exposures Evaluated and Their Classification. In: International Agency for research on Cancer, Lyon, 2012.
- Jaffé M. Über den Niederschlag welchen Pikrinsäure in normalen Harn erzeugt und Über eine neue Reaktion des kreatinins. *Z Physiol Chem* 1886; 10: 391.
- Jarosinska D, Horvat M, Sallsten G, Mazzolai B, Dabkowska B, Prokopowicz A, et al. Urinary mercury and biomarkers of early renal dysfunction in environmentally and occupationally exposed adults: a three-country study. *Environ Res* 2008; 108: 224-32.
- Keenan JJ, Gaffney SH, Galbraith DA, Beatty P, Paustenbach DJ. Gasoline: a complex chemical mixture, or a dangerous vehicle for benzene exposure? *Chem Biol Interact* 2010; 184: 293-5.
- Keretetse GS, Laubscher PJ, Du Plessis JL, Pretorius PJ, Van Der Westhuizen FH, Van Deventer E, et al. DNA damage and repair detected by the comet assay in lymphocytes of african petrol attendants: a pilot study. *Ann Occup Hyg* 2008; 52: 653-62.
- Kirkeleit J. Effects of benzene on human hematopoiesis. *The Open Hematology Journal* 2008; 2: 87-102.
- Manini P, De Palma G, Andreoli R, Poli D, Petyx M, Corradi M, et al. Biological monitoring of low benzene exposure in Italian traffic policemen. *Toxicol Lett* 2008; 181: 25-30.

- Manno M, Viau C, Cocker J, Colosio C, Lowry L, Mutti A, et al. Biomonitoring for occupational health risk assessment (BOHRA). *Toxicol Lett* 2010; 192: 3-16.
- Maruhn D. Rapid colorimetric assay of beta-galactosidase and N-acetyl-beta-glucosaminidase in human urine. *Clin Chim Acta* 1976; 73: 453-61.
- Mohamed YS, Dunnion D, Teobald I, Walewska R, Browning MJ. Long-lived fusions of human haematological tumour cells and B-lymphoblastoid cells induce tumour antigen-specific cytotoxic T-cell responses in vitro. *Immunobiology* 2012; 217: 719-29.
- Moro AM, Brucker N, Charao M, Bulcao R, Freitas F, Baierle M, et al. Evaluation of genotoxicity and oxidative damage in painters exposed to low levels of toluene. *Mutat Res* 2012; 746: 42-8.
- Moro AM, Charao M, Brucker N, Bulcao R, Freitas F, Guerreiro G, et al. Effects of low-level exposure to xenobiotics present in paints on oxidative stress in workers. *Sci Total Environ* 2010; 408: 4461-7.
- Muzyka V, Scheepers PT, Bogovski S, Lang I, Schmidt N, Ryazanov V, et al. Porphyrin metabolism in lymphocytes of miners exposed to diesel exhaust at oil shale mine. *Sci Total Environ* 2004; 322: 41-50.
- Muzyka V, Veimer S, Schmidt N. On the carcinogenic risk evaluation of diesel exhaust: benzene in airborne particles and alterations of heme metabolism in lymphocytes as markers of exposure. *Sci Total Environ* 1998; 217: 103-11.
- Ohno T, Sakamoto M, Kurosawa T, Dakeishi M, Iwata T, Murata K. Total mercury levels in hair, toenail, and urine among women free from occupational exposure and their relations to renal tubular function. *Environ Res* 2007; 103: 191-7.

- Prozialeck WC, Edwards JR, Vaidya VS, Bonventre JV. Preclinical evaluation of novel urinary biomarkers of cadmium nephrotoxicity. *Toxicol Appl Pharmacol* 2009; 238: 301-5.
- Rekhadevi PV, Rahman MF, Mahboob M, Grover P. Genotoxicity in filling station attendants exposed to petroleum hydrocarbons. *Ann Occup Hyg* 2010; 54: 944-54.
- Ribeiro AL, Shimada AL, Hebeda CB, de Oliveira TF, de Melo Loureiro AP, Filho Wdos R, et al. In vivo hydroquinone exposure alters circulating neutrophil activities and impairs LPS-induced lung inflammation in mice. *Toxicology* 2011; 288: 1-7.
- Robert Schnatter A, Kerzic PJ, Zhou Y, Chen M, Nicolich MJ, Lavelle K, et al. Peripheral blood effects in benzene-exposed workers. *Chem Biol Interact* 2010; 184: 174-81.
- Sassa S. Delta-aminolevulinic acid dehydratase assay. *Enzyme* 1982; 28: 133-45.
- Shimada AL, Ribeiro AL, Bolonheis SM, Ferraz-de-Paula V, Hebeda CB, Farsky SH. In vivo hydroquinone exposure impairs MCP-1 secretion and monocyte recruitment into the inflamed lung. *Toxicology* 2012; 296: 20-6.
- Smith MT. Advances in understanding benzene health effects and susceptibility. *Annu Rev Public Health* 2010; 31: 133-48 2 p following 148.
- Sun P, Qiu Y, Zhang Z, Wan J, Wang T, Jin X, et al. Association of genetic polymorphisms, mRNA expression of p53 and p21 with chronic benzene poisoning in a chinese occupational population. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2009; 18: 1821-8.

- Swaen GM, van Amelsvoort L, Twisk JJ, Verstraeten E, Slootweg R, Collins JJ, et al. Low level occupational benzene exposure and hematological parameters. *Chem Biol Interact* 2010; 184: 94-100.
- Tunsaringkarn T, Suwansaksri J, Soogarun S, Siriwong W, Rungsiyothin A, Zapuang K, et al. Genotoxic monitoring and benzene exposure assessment of gasoline station workers in metropolitan Bangkok: sister chromatid exchange (SCE) and urinary trans, trans-muconic acid (t,t-MA). *Asian Pac J Cancer Prev* 2011; 12: 223-7.
- Uzma N, Kumar BS, Hazari MA. Exposure to benzene induces oxidative stress, alters the immune response and expression of p53 in gasoline filling workers. *Am J Ind Med* 2010; 53: 1264-70.
- Valentini J, Schmitt GC, Grotto D, Santa Maria LD, Boeira SP, Piva SJ, et al. Human erythrocyte delta-aminolevulinate dehydratase activity and oxidative stress in hemodialysis patients. *Clin Biochem* 2007; 40: 591-4.
- Weisel CP. Benzene exposure: an overview of monitoring methods and their findings. *Chem Biol Interact* 2010; 184: 58-66.
- WHO. Updating and Revision of the Air Quality Guidelines for Europe. In: World Health Organization, USA, 1996.
- Wong O, Harris F, Armstrong TW, Hua F. A hospital-based case-control study of acute myeloid leukemia in Shanghai: analysis of environmental and occupational risk factors by subtypes of the WHO classification. *Chem Biol Interact* 2010; 184: 112-28.
- Zhao ZG, Xu W, Sun L, Li WM, Li QB, Zou P. The characteristics and immunoregulatory functions of regulatory dendritic cells induced by

mesenchymal stem cells derived from bone marrow of patient with chronic myeloid leukaemia. *Eur J Cancer* 2012; 48: 1884-95.

Table 1. Main characteristics of the study population.

	Non-exposed group	Gasoline station attendants	
		Non-smokers	Smokers
No. of subjects	28	44	16
Age (years)	30.4 ± 1.8	33.8 ± 1.4	34.3 ± 2.6
Time of occupational exposure (months)	---	114.0 ± 13.5	135.8 ± 30.8

The values are expressed as mean ± SEM.

Table 2. BTX personal exposure and urinary metabolites.

	Non-exposed group (n=28)	Gasoline station attendants	
		Non-smokers (n=44)	Smokers (n=16)
Benzene ($\mu\text{g m}^{-3}$)	42.0 (34.1-52.4)	70.7 (58.1-1067.1)*	165.5 (102.7-2207.5)*
Toluene ($\mu\text{g m}^{-3}$)	107.2 (78.4-172.3)	328.0 (213.0-945.1)*	430.3 (219.7-3945.1)*
<i>o</i> -Xylene ($\mu\text{g m}^{-3}$)	30.0 (21.6-65.3)	154.4 (30.5-313.5)*	347.4 (29.8-627.4)*
<i>m</i> -Xylene ($\mu\text{g m}^{-3}$)	20.0 (17.4-25.5)	29.8 (24.0-58.3)*	32.3 (23.4-32.8)*
<i>p</i> -Xylene ($\mu\text{g m}^{-3}$)	21.2 (18.4-27.0)	28.8 (22.3-36.5)*	31.0 (21.0-34.6)*
t,t-MA ($\mu\text{g g}^{-1}$ creatinine)	70.0 (50.0-120.0)	320.0 (190.0-450.0)*	400.0 (300.0-600.0)*
HA (g g^{-1} creatinine)	0.3 (0.16-0.44)	0.3 (0.2-0.7)	0.3 (0.3-0.6)
mHA (g g^{-1} creatinine)	n.d.	n.d.	n.d.

t,t-MA: trans,trans-muconic acid; HA: hippuric acid; mHA: methylhippuric acid; n.d.: not detectable.

The values are expressed as median (interquartile range).

* $p < 0.001$ compared to the non-exposed group (Kruskal-Wallis test/Tukey test).

Table 3. Hematological parameters.

	Non-exposed group (n=28)	Gasoline station attendants	
		Non-smokers (n=44)	Smokers (n=16)
Red blood cells (10^6 mm^{-3})	5.2 ± 0.1	4.9 ± 0.1*	4.9 ± 0.1*
Hemoglobin (g dL ⁻¹)	15.1 ± 0.1	14.4 ± 0.1*	15.0 ± 0.3
Hematocrit (%)	44.2 ± 0.3	43.5 ± 0.5	43.7 ± 0.8
White blood cells (10^3 mm^{-3})	7.1 ± 0.3	7.2 ± 0.2	7.7 ± 0.3
Lymphocytes (%)	36.2 ± 1.3	33.6 ± 1.2	32.6 ± 1.9
Monocytes (%)	8.9 ± 0.4	9.0 ± 0.5	9.0 ± 0.7
Neutrophils (%)	52.0 ± 1.5	57.0 ± 1.0*	58.4 ± 2.0*
Eosinophils (%)	2.3 ± 0.2	2.0 ± 0.2	2.3 ± 0.5
Basophils (%)	0.5 ± 0.1	0.3 ± 0.1	0.3 ± 0.1
Platelets (10^3 mm^{-3})	242.7 ± 9.6	234.4 ± 9.0	237.2 ± 15.0

The values are expressed as mean ± SEM.

* $p < 0.001$ compared to the non-exposed group (ANOVA/Tukey).

Table 4. Spearman's correlations between personal exposures to benzene and toluene and t,t-MA *versus* biomarkers of effect (n=88).

	Benzene personal exposure ($\mu\text{g m}^{-3}$)	Toluene personal exposure ($\mu\text{g m}^{-3}$)	t,t-MA ($\mu\text{g g}^{-1}$ creatinine)
ALA-D (U L^{-1})	$r = -0.40$ ($p < 0.001$)	$r = -0.31$ ($p < 0.01$)	$r = -0.40$ ($p < 0.001$)
CD80+ in monocytes (%)	$r = -0.37$ ($p < 0.01$)	$r = -0.40$ ($p < 0.001$)	$r = -0.36$ ($p < 0.01$)
CD86+ in monocytes (%)	$r = -0.48$ ($p < 0.001$)	$r = -0.53$ ($p < 0.001$)	$r = -0.41$ ($p < 0.001$)
AST (U L^{-1})	$r = 0.51$ ($p < 0.001$)	$r = 0.39$ ($p < 0.001$)	$r = 0.50$ ($p < 0.001$)
ALT (U L^{-1})	$r = 0.35$ ($p < 0.01$)	$r = 0.29$ ($p < 0.01$)	$r = 0.32$ ($p < 0.01$)

t,t-MA: trans,trans-muconic acid; ALA-D: δ -aminolevulinate dehydratase; AST: aspartate aminotransferase; ALT: alanine aminotransferase.

Table 5. Spearman's correlations between time of benzene exposure *versus* biomarkers of effect (n=88).

	Exposure time (months)
ALA-D (U L ⁻¹)	r= -0.67 (p<0.001)
CD80+ in monocytes (%)	r= -0.32 (p<0.01)
CD86+ in monocytes (%)	r= -0.56 (p<0.001)
AST (U L ⁻¹)	r= 0.66 (p<0.001)
ALT (U L ⁻¹)	r= 0.56 (p<0.001)
mALB (mg g ⁻¹ creatinine)	r= 0.20 (p<0.05)
NAG (U g ⁻¹ creatinine)	r= 0.23 (p<0.05)

ALA-D: δ-aminolevulinate dehydratase; AST: aspartate aminotransferase; ALT: alanine aminotransferase; mALB: microalbuminuria; NAG: N-acetyl-beta-D-glucosaminidase.

Table 6. Multiple linear regression models.

	ALA-D (U L ⁻¹)		Log CD80+ in monocytes (%)		Log CD86+ in monocytes (%)		AST (U L ⁻¹)		ALT (U L ⁻¹)	
	R square= 0.351	R square= 0.288	R square= 0.566	R square= 0.367	R square= 0.307	β	p-values	β	p-values	β
Log personal benzene exposure ($\mu\text{g m}^{-3}$) ^a	0.064	0.734	-0.224	0.261	-0.244	0.119	0.309	0.096	0.072	0.708
Log personal toluene exposure ($\mu\text{g m}^{-3}$) ^a	-0.194	0.313	-0.211	0.296	-0.140	0.378	-0.083	0.656	0.144	0.460
Log t,t-MA ($\mu\text{g g}^{-1}$ creatinine) ^a	-0.112	0.329	-0.278	0.044	-0.379	<0.001	0.242	0.033	0.242	0.045
Age (years) ^a	0.295	0.143	-0.043	0.846	-0.093	0.575	0.045	0.814	0.257	0.204
Exposure time (months) ^a	0.752	0.001	0.081	0.730	-0.197	0.262	0.344	0.087	0.170	0.418
Smoking ^b	0.046	0.713	0.047	0.749	-0.109	0.313	0.018	0.883	-0.104	0.428

ALA-D: δ -aminolevulinatase; AST: aspartate aminotransferase; ALT: alanine aminotransferase; t,t-MA: trans,trans-muconic acid.
^aCategorical variable. ^bContinuous variable.

Figure legends

Figure 1. ALA-D enzymatic activity assayed with or without the reducing agent dithiothreitol (DTT). The data are represented as mean \pm SEM. * $p < 0.001$ compared to the non-exposed group, ** $p < 0.001$ compared to the non-exposed group and the smoker GSA group, # $p < 0.001$ compared to ALA-D/DTT. (ANOVA/Tukey).

Figure 2. (A) Expressions of CD80 and CD86 in lymphocytes. (B) Expressions of CD80 and CD86 in monocytes. Values are expressed as mean \pm SEM. * $p < 0.05$ compared to the non-exposed group, ** $p < 0.001$ compared to the non-exposed group. (ANOVA/Tukey).

Figure 3. (A) Microalbuminuria levels. (B) NAG activity. The data are represented as mean \pm SEM. * $p < 0.05$ compared to the non-exposed group, ** $p < 0.001$ compared to the non-exposed group (ANOVA/Tukey).

Figure 1

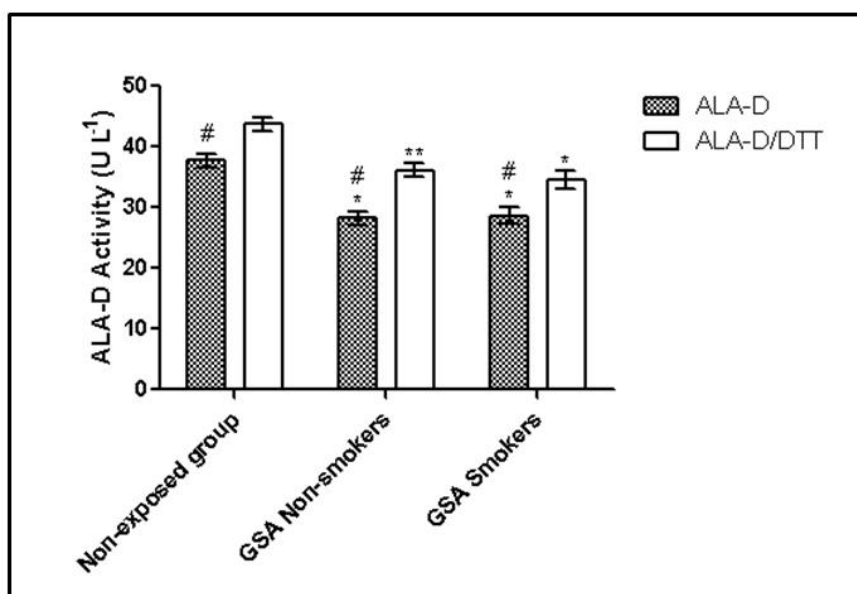


Figure 2

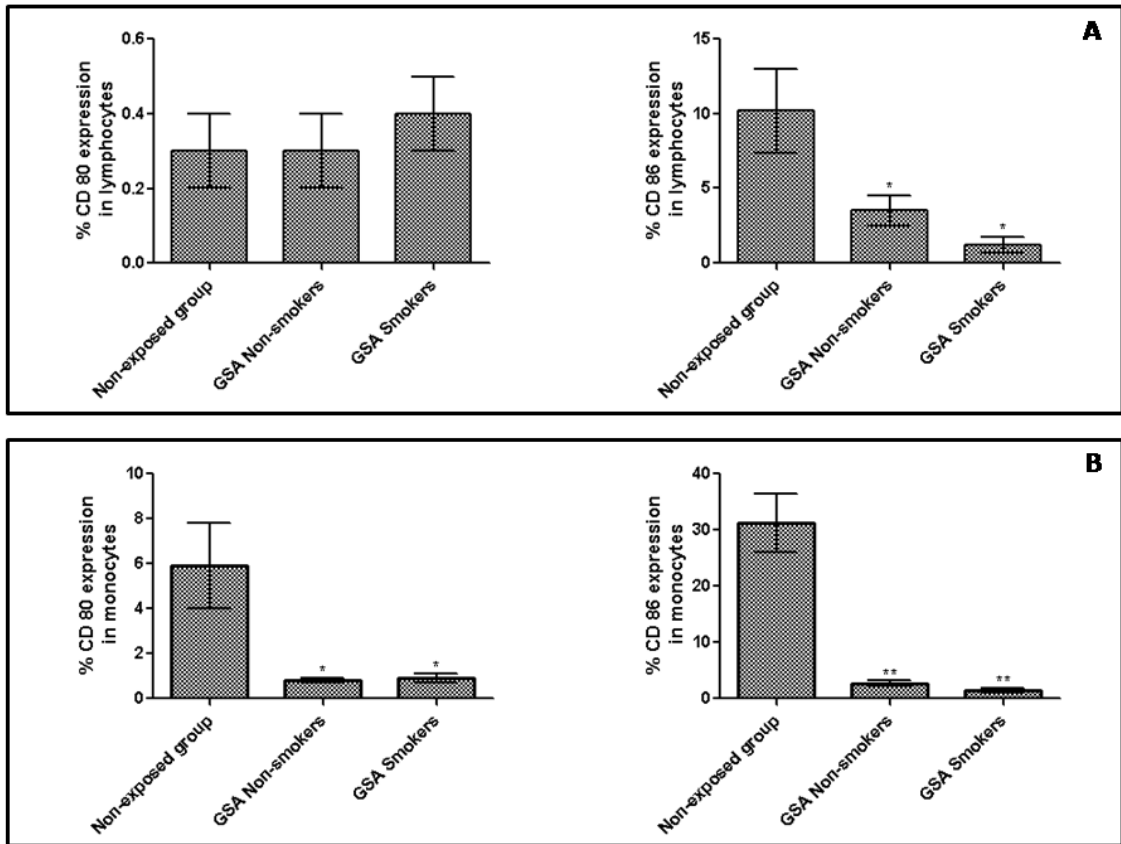
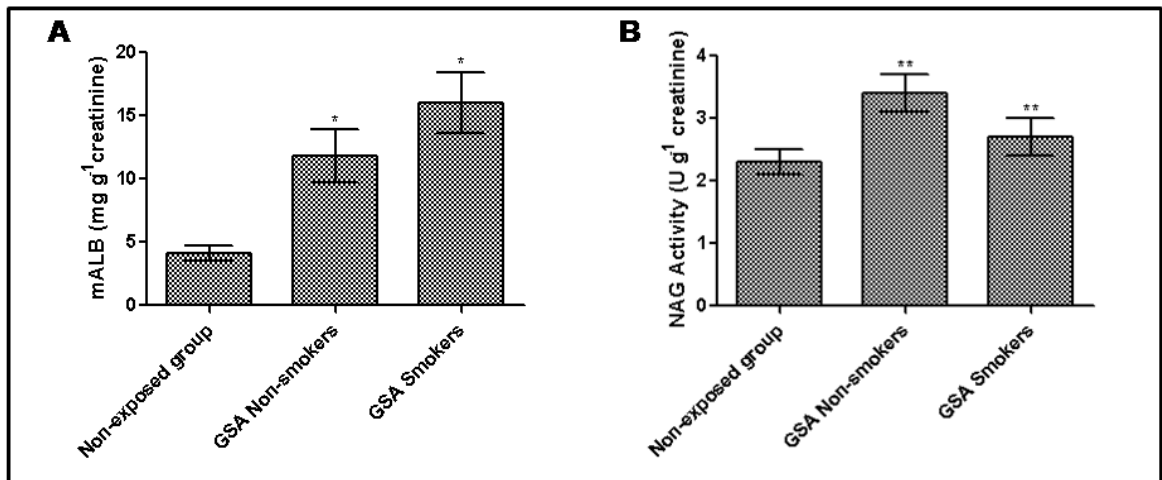


Figure 3



CAPÍTULO II

Genotoxic monitoring and oxidative stress in gasoline station attendants

Angela M. Moro, Mariele F. Charão, Natália Brucker, Juliano Durgante, Marília Baierle, Guilherme Bubols, Gabriela Goethel, Rafael Fracasso, Sabrina Nascimento, Rachel Bulcão, Bruna Gauer, Anelise Barth, Guilherme Bochi, Rafael Moresco, Adriana Gioda, Mirian Salvador, Sandra Farsky, Solange C. Garcia

Manuscrito publicado na revista *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*

Mutat Res. 2013 Jun 14;754(1-2):63-70

doi: 10.1016/j.mrgentox.2013.04.008

Genotoxicity and oxidative stress in gasoline station attendants

Angela M. Moro^{a,b}, Mariele F. Charão^{a,b}, Natália Brucker^{a,b}, Juliano Durgante^a,
Marília Baierle^{a,b}, Guilherme Bubols^{a,b}, Gabriela Goethel^{a,b}, Rafael Fracasso^{a,b},
Sabrina Nascimento^{a,b}, Rachel Bulcão^{a,b}, Bruna Gauer^a, Anelise Barth^{a,b}, Guilherme
Bochi^c, Rafael Moresco^c, Adriana Gioda^d, Mirian Salvador^e, Sandra Farsky^f, Solange
C. Garcia^{a,b,*}

^aLaboratory of Toxicology (LATOX), Department of Analysis, Pharmacy Faculty,
Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.

^bPost-graduate Program in Pharmaceutical Sciences, Federal University of Rio
Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.

^cLaboratory of Clinical Biochemistry, Department of Clinical and Toxicological
Analysis, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil.

^dDepartment of Chemistry of Pontifical Catholic University Rio de Janeiro, Rio de
Janeiro, RJ, Brazil.

^eLaboratory of Oxidative Stress and Antioxidants, Institute of Biotechnology,
University of Caxias do Sul, 95070-560, Caxias do Sul, RS, Brazil.

^fDepartment of Clinical and Toxicological Analysis, School of Pharmaceutical
Sciences, University of São Paulo, São Paulo, SP, Brazil.

*Direct correspondence to Prof Dr Solange Cristina Garcia.

E-mail address: solange.garcia@ufrgs.br (S. C. Garcia).

Address: Avenida Ipiranga 2752, Santa Cecília, Porto Alegre, RS, Brazil.

CEP.: 90610-000 Tel.: (+55) 3308-5297. Fax: (+55) 51 3308-5437

Abstract

We evaluated genotoxic effects of exposure to low levels of benzene, a class I human carcinogen, among gasoline station attendants (GSA). Oxidative stress and the protective effects of antioxidants on DNA damage were also analyzed. Although exposures were below ACGIH (American Conference of Governmental Industrial Hygienists) limits, the GSA group presented higher DNA damage indices and micronucleus frequencies, increased oxidative protein damage, and decreased antioxidant capacity relative to the control group. Duration of benzene exposure was correlated with DNA and protein damage. The biomarkers evaluated in this work may provide early signals of damage in subjects occupationally exposed to benzene.

Keywords: Low benzene exposure; genotoxicity; protein carbonyl; 3-nitrotyrosine; vitamin C.

1. Introduction

Benzene, a hazardous component of gasoline, is a genotoxic class I human carcinogen [1-4]. Benzene exposure has been strictly regulated [5]; its use in workplaces is declining, reducing occupational exposure and associated health hazards [6, 7]. Concern remains with regards to prolonged exposure to low levels of benzene in occupational and environmental settings [7].

The mechanisms of benzene toxicity remain elusive [8]. Reactive oxygen species (superoxide anion, hydrogen peroxide, hydroxyl radical) resulting from benzene metabolism [3, 9, 10] may damage biomolecules [5,6], and may lead to DNA strand breaks, micronuclei, and chromosomal aberrations [6,11]. Thus, the genotoxic effects of benzene may be associated with oxidative DNA damage [11, 12].

Biological monitoring is fundamental for evaluation of risks to human health due to exposure to chemical substances [7]. In Brazil, biological monitoring of occupational benzene exposure is performed by quantification of the urinary metabolite *t,t*-muconic acid [13], formed via cytochrome P450-catalyzed oxidation [9, 14].

Evaluation of biomarkers of susceptibility or effect are also important tools [15]. The comet and micronucleus assays are widely used in biomonitoring studies to evaluate genotoxicity and DNA damage [4, 12, 16-19]. Oxidative damage biomarkers can also supply information about early biological effects and eventual health risks [3].

We have investigated genotoxicity caused by low-level exposure to benzene among gasoline station attendants. Comet and micronucleus assays were conducted to evaluate genetic damage. The involvement of oxidative stress was assessed through biomarkers of protein oxidation and nitration. Possible protective effects of endogenous and exogenous antioxidants were also analyzed.

2. Materials and Methods

2.1. Subjects

Initially, 105 male subjects were recruited, including 70 exposed workers and 35 non-exposed individuals. All participants were interviewed about aspects of general health, lifestyle, smoking status, and history of exposure. Individuals were excluded based on any diagnosed diseases, taking medication or antioxidant vitamins at the time of the study, smoking, and any subjects who had failed to provide the required samples of personal air, urine, blood, and buccal cells. Individuals who had worked in their current job position for less than 6 months were also excluded. Based on these exclusion criteria, 71 men were enrolled. The exposed group comprised 43 gasoline station attendants (GSA). The control group consisted of 28 subjects with no history of occupational exposure to benzene or other xenobiotics. The average ages of the GSA and control groups were 33.9 ± 1.5 and 30.4 ± 1.8 years, respectively. No significant difference between GSA and control group was found related to age. The mean exposure time in the GSA group was 9.7 ± 1.1 years (range 0.5 - 32 years). This study was approved by the Research Ethics Committee of the Federal University of Rio Grande do Sul/RS (No. 21728/11) and

informed consent was obtained from all participants prior to their enrollment in the study.

2.2 Sampling

Sampling was conducted at the end of the work shift, after 3-4 consecutive days of exposure. Individual air samples were collected in the breathing zone of study subjects during the daily work shift, for approximately 8 h. After air sampling, the samples were capped, transported to the lab and stored at -20°C until analysis. Urine samples were collected and stored in polyethylene bottles at -80°C until *t,t*-muconic acid analysis. Blood venous samples were collected by venipuncture using vacuum tubes. EDTA-blood tube was collected and centrifuged at 1500 g for 10 min at 4°C. Aliquots of EDTA-plasma were stored at -80°C until analysis of the protein damage biomarkers, α -tocopherol, retinol, lycopene, and β -carotene. The remaining erythrocytes were used to measure reduced glutathione content. A blood-heparin tube was collected for comet assay analysis. To avoid any damage associated with storage, the samples were processed immediately. The remaining heparin-blood was stored at -80°C for antioxidant enzymes analysis. Serum was obtained by centrifugation at 1500 g for 10 min and stored at -80°C until measurement of nitric oxide and vitamin C levels. Additionally, buccal cells were collected for the micronucleus assay.

2.3. Benzene exposure

Airborne benzene was collected using passive samplers (SKC 575-002[®]). Benzene was determined in samples after desorption with dichloromethane followed

by gas chromatography with flame ionization detection (GC-FID) analysis. Chromatographic separation was achieved using an Innowax GC column (25 m, 0.2 mm, 0.4 μm), with the following chromatographic conditions: 99.99% purity H_2 was used as carrier gas, pressure 10,055 psi, initial column temperature 40°C , increased at 4°C min^{-1} to 53°C , followed by an oven ramp rate of $40^\circ\text{C min}^{-1}$ to 200°C . FID detector temperature was kept at 250°C . The results were expressed as $\mu\text{g m}^{-3}$.

2.4. Urinary t,t -muconic acid (t,t -MA)

Urinary t,t -MA was measured by solid-phase extraction followed by high performance liquid chromatography and UV detection (HPLC-UV), according to the method previously described [20], with some modifications. The t,t -MA levels were expressed as $\mu\text{g g}^{-1}$ creatinine.

2.5. Creatinine concentration

Urine samples were collected and refrigerated at 4°C until further analysis. Creatinine concentration was measured by spectrophotometry [21], utilizing commercial kits (Doles Reagents, Goiânia, GO, Brazil).

2.6. Comet assay

A standard protocol was adopted for comet assay preparation and analysis [22, 23]. Slides were prepared by mixing 5 μL whole blood and 95 μL low-melting-point agarose (0.75%). The mixture was poured into a frosted microscope slide coated with normal-melting-point agarose (1.5%). After solidification, the coverslip was removed and the slides were placed in lysis solution (NaCl 2.5 M,

ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) 100 mM, Tris 10 mM, pH 10.0-10.5, with freshly prepared Triton X-100 1% and dimethylsulfoxide 10%) for a minimum of 1 h and a maximum of 5 d. Subsequently, the slides were incubated in freshly made alkaline solution (NaOH 300 mM and EDTA 1 mM, pH 12.6) for 10 min. Separation of DNA fragments was obtained by electrophoresis for 20 min at 25V (0.9V cm¹) and 300 mA and then the solution was neutralized with Tris 0.4 M (pH 7.5). Finally, DNA was stained with silver nitrate, and the slides were coded for blind analysis. The electrophoresis procedures and the efficiency for each electrophoresis run were checked using negative and positive reference controls. The negative reference control was whole blood and the positive reference control consisted of whole blood mixed with methyl methanesulfonate at a final concentration of 8×10^{-5} M. This mixture was incubated at 37°C for 2 h. Images of 100 randomly selected cells (50 cells from each of two replicated slides) were analyzed from each sample. Each electrophoresis run was considered valid only if the negative and positive controls yielded the expected results. DNA damages were visually scored according to tail size into five classes, from no tail (0) to maximal (4) tail length, resulting in a single DNA damage score (DNA damage index – DNA DI). Therefore, the DNA damage score could range from 0 (all cells with no tail, 100 cells x 0) to 400 (all cells with maximally long tails, 100 cells x 4). All analyses performed in this study were considered valid when DNA DI values in positive and negative controls were 380-400 and 0-4, respectively.

2.7. Micronucleus (MN) assay

For the micronucleus assay, buccal cells were collected at the end of the work shift. Subjects were asked to wash their oral cavities with water before sampling. Small brushes were used to collect samples from buccal mucosa. Cells were fixed with acetic acid: methanol (75:25, v/v), transferred onto clean microscope slides in duplicates and stained with Giemsa 5%. The criterion of scoring cells with MN was as described in the literature [24]. One thousand cells were counted for each sample. Results were expressed as the micronucleus frequency per 1000 cells.

2.8. Protein carbonyl (PCO) assay

PCO were determined using a noncompetitive ELISA method [25], with some modifications. Total protein concentration in plasma was measured by the Bradford method using bovine serum albumin as standard. PCO levels were determined as follows: plasma samples were diluted with PBS buffer to a normalized concentration of 4 mg protein mL⁻¹ and then samples were derivatized with 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH) and incubated in Maxisorb multiwallplates (Nunc Immuno 96 Microwell™ Maxisorp) overnight at 4 °C in the dark. Protein carbonyls were detected using a dinitrophenyl rabbit IgG-antiserum (Sigma) as the primary antibody and a monoclonal anti-rabbit immunoglobulin G peroxidase conjugate (Sigma) as the secondary antibody. Color development was performed with *o*-phenylenediamine and H₂O₂ and the reaction was stopped with H₂SO₄ after 15 min incubation at 37 °C. The absorbance was measured using a microplate reader with a detection wavelength of 492 nm. Each sample was analyzed in triplicate. Plasma protein carbonyl concentration was expressed as nmol mg⁻¹ protein.

2.9. 3-Nitrotyrosine (3-NT) assay

3-NT plasma levels were assessed according to Weber et al. [26]. Total protein concentration in plasma was measured by the Bradford method and the samples were diluted to 2 mg protein ml⁻¹. The diluted samples were incubated in Maxisorb multiwallplates (Nunc Immuno 96 Microwell™ Maxisorp) overnight at 4 °C in the dark. A noncompetitive ELISA method was used to measure 3-NT levels. Polyclonal anti-nitrotyrosine (Millipore) and monoclonal goat anti-rabbit IgG, HRP-conjugate (Millipore) were used as primary and secondary antibodies, respectively. After color development, the reaction was stopped and the absorbance was measured at 492 nm in an ELISA microplate reader. The samples were assayed in triplicate. The 3-NT content in plasma was expressed as pmol mg⁻¹ protein.

2.10. Nitric oxide (NO)

Serum NO levels, indicated by nitrites/nitrates (NO_x) concentration, were measured in the Cobas Mira automated analyzer, by a modified Griess method as described by Tatsch et al. [27]. The contents of NO were expressed as μmol l⁻¹.

2.11. Erythrocyte reduced glutathione (GSH)

GSH levels were measured by spectrophotometry at 412 nm, as previously described in the literature [28]. The erythrocytes were hemolyzed by Triton X-100, and precipitated with 20% trichloroacetic acid (w/v). After centrifugation, the supernatant aliquots were reacted with 10 mM of 5,5'-dithio-bis(2-nitrobenzoic acid) (DTNB). The GSH content was expressed as μmol ml⁻¹ of erythrocytes.

2.12. Antioxidant enzymes

Enzyme assays were performed in 96-well microplates and measured by spectrophotometry in a microplate reader (SpectraMax M2, Molecular Devices). Superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), and glutathione S-transferase (GST) activities were determined as previously described [29-31]. Activities were expressed as units per mg protein.

2.13. Exogenous Antioxidants

Serum vitamin C levels were quantified by HPLC with UV detector (HPLC-UV), according to a method developed by our group [32]. Serum samples were deproteinized with 10% perchloric acid (v/v) and the supernatants were measured at 245 nm. Vitamin C concentrations were expressed as mg l⁻¹.

Simultaneous quantification of α -tocopherol, retinol, lycopene, and β -carotene was performed according to a method developed in our laboratory [33]. Plasma samples were extracted with ethanol:n-butanol solution (50:50, v/v) and supernatants were injected into the HPLC system. Samples had their absorption monitored at 450 nm for the quantification of lycopene and β -carotene. Fluorescence at two different excitation and emission wavelengths was monitored to quantify retinol (340 and 520 nm, exc./ em.) and α -tocopherol (298 and 328 nm, exc./ em.). Results were expressed as μ mol l⁻¹.

2.14. Statistical analysis

Analysis of the data was performed with IBM SPSS Statistics software (version 19). All study variables were tested for normality by the Shapiro-Wilk test.

Comparisons between groups were achieved by Student's t-test and Mann-Whitney U-test. The results were expressed as mean \pm standard error of the mean (SEM) or median (interquartile range), according to variables distribution. Correlation tests were performed according to Pearson's correlation coefficient and Spearman's rank according to each variable. Values of $p \leq 0.05$ were considered significant.

3. Results

Personal benzene exposure levels were determined by personal passive air sampling (Table 1). Gasoline station attendants (GSA) were exposed to significantly higher benzene concentrations than the control group ($p < 0.001$). However, GSA were subject to very low levels of benzene exposure, since all values were below the ACGIH (American Conference of Governmental Industrial Hygienists) limits.

Biological monitoring was performed through the determination of urinary t,t-MA levels (Table 1). The median levels of t,t-MA in the GSA group were significantly elevated (4.4-fold) compared to the control group ($p < 0.001$). All t,t-MA concentrations were also found below the biological limits established by ACGIH.

Genotoxicity results are presented in Figure 1. Regarding the DNA damage index, assessed by the comet assay, a significant increase in the damage score was observed in the GSA group compared to controls ($p < 0.001$) (Figure 1A). According to tail size score, the damage scores were classified into five classes. The results showed significant difference between the groups for classes 0, 1 and 2. The classes 3 and 4 showed no damaged cell for the both groups (Figure 1B). In relation to MN assay, the frequency of abnormal cells was significantly higher (3.8-fold) in the GSA group compared to controls ($p < 0.001$) (Figure 1C).

Results of oxidative protein damage, assessed through PCO and 3-NT concentrations, are shown in Figure 2. The GSA group showed increased PCO and 3-NT levels in relation to controls: 0.36 ± 0.01 vs 0.28 ± 0.01 nmol mg⁻¹ protein ($p < 0.001$) (Figure 2A) for PCO and 9.47 ± 0.96 vs 5.64 ± 0.56 pmol mg⁻¹ protein ($p < 0.001$) for 3-NT (Figure 2B). The GSA group also showed increased NO levels, 233.17 ± 16.07 vs 184.45 ± 9.74 $\mu\text{mol l}^{-1}$ ($p < 0.001$).

Antioxidant status was evaluated in terms of endogenous (enzymatic and non-enzymatic) and exogenous antioxidants. Endogenous antioxidant status is shown in Table 2. Regarding the erythrocyte reduced glutathione (GSH) levels, a significant difference was found between GSA and control groups ($p < 0.001$). Mean GSH levels in the GSA group were decreased 1.2-fold in relation to the control group. Decreased SOD and CAT activities were also observed in the GSA group compared to controls; however, no significant difference was found between them ($p > 0.05$). Additionally, GSA showed decreased GST activities compared to the control group ($p < 0.01$).

In relation to the exogenous antioxidants, decreased vitamin C levels were found in the GSA group compared to the control group ($p < 0.05$) (Table 3). No significant differences were observed between the groups for α -tocopherol, retinol, lycopene, or β -carotene ($p > 0.05$) (Table 3). All the results, except for lycopene, were within the reference value ranges [34].

Univariate correlations were analyzed in all subjects, as a single sample. Personal benzene exposure was positively associated with urinary t,t-MA excretion ($r = 0.51$; $p < 0.001$).

Personal benzene exposure and t,t-MA levels were directly correlated with DNA DI and micronucleus frequency (Table 4). Moreover, the elevation on DNA DI

was accompanied by increased micronucleus frequency ($r= 0.25$; $p<0.05$). Additionally, air-borne benzene and its urinary metabolite were positively associated with biomarkers of protein damage and inversely correlated to GSH levels and GST activity (Table 4).

Additional correlations were revealed among biomarkers of DNA and protein damages, GSH and GST. DNA DI was correlated with PCO ($r= 0.59$; $p<0.001$) (Figure 3A). Furthermore, frequencies of micronuclei also showed positive correlations with PCO concentration ($r= 0.25$; $p<0.05$) (Figure 3B) and 3-NT levels (0.38 ; $p<0.001$) (Figure 3C). Negative correlations between MN frequency *versus* GSH concentration ($r= -0.37$; $p<0.01$) and MN frequency *versus* GST activity ($r= -0.25$; $p<0.05$) were observed.

Vitamin C was the unique exogenous antioxidant that showed association with biomarkers of DNA and protein damage. Vitamin C levels were inversely correlated with DNA DI ($r= -0.30$; $p<0.05$) (Figure 4A) and PCO ($r= -0.34$; $p<0.01$) (Figure 4B).

Our study also revealed a significant correlation between time of benzene exposure and *t,t*-MA levels ($r= 0.61$; $p<0.001$). Table 5 summarizes the main correlations between time of exposure to benzene *vs* biomarkers of genotoxicity, biomarkers of protein damages, GSH levels, and GST activity.

4. Discussion

Monitoring occupational exposures to chemical substances is important in evaluating risks and implementing strategies for improving occupational conditions to establish a safe work environment [7,12]. Monitoring of air and of personnel

employed at gasoline stations is important, due to the known health effects of petroleum products, especially benzene [12]. Gasoline station attendants evaluated in our study were exposed to low benzene levels, with median values well below the Threshold Limit Value-Time Weighted Average (TLV-TWA) proposed by ACGIH to working environments. The low levels of personal benzene exposure evidenced in our work may be due to the development of measures to control the benzene content of gasoline [35, 36]. In gasoline, this solvent has been replaced to a large degree by other, less toxic solvents [37]. Recently, the U. S. Environmental Protection Agency (EPA) set new regulations that lower the acceptable benzene concentration in gasoline to 0.62% [36]. However, benzene in gasoline cannot be eliminated [37, 38].

TLV-TWA values have dropped substantially in past decades. The first limit for occupational exposures to benzene proposed by ACGIH was 100 ppm [7, 35]. However, in 1997, the ACGIH established a new TLV-TWA, 0.5 ppm ($1600 \mu\text{g m}^{-3}$) for occupational benzene exposure, which is currently being adopted [7, 35]. The estimated risk of developing leukemia is determined based on the airborne benzene concentration. According to the World Health Organization, the risk of developing leukemia has been estimated at approximately 6 cases per million among subjects who experience chronic exposures to benzene in the air at concentrations of $1 \mu\text{g m}^{-3}$ during their lives [39]. However, the isolated information obtained from the environmental monitoring of benzene levels cannot be used to estimate personal exposure. In this context, biomarkers of exposure or biological effects are helpful complementary tools for a suitable monitoring of the occupational exposures [39].

Biological monitoring was performed by determining urinary *t,t*-MA excretion, whose results confirmed the exposure to low levels of benzene. Urinary *t,t*-MA

allowed a distinction between exposed and control groups. *t,t*-MA levels were higher in the GSA group compared to controls; however, all the median values were below the biological exposure index (BEI: 500 $\mu\text{g g}^{-1}$ creatinine), according to ACGIH [35]. Increased *t,t*-MA excretion accompanied elevated airborne benzene levels, highlighting the value of this biomarker [37, 40].

Despite the fact that exposures as determined by environmental and biological monitoring were below the ACGIH limits, GSA revealed some imbalance in oxidative state, resulting in damage to different cellular macromolecules. DNA damage was assessed through comet and MN assays. Our results revealed that the GSA group presented an increased DNA damage index and a higher frequency of micronuclei in buccal cells compared to controls (Figure 1). Considering these findings, we suggest that occupational benzene exposure induces DNA damage, since the increases in both biomarkers of genotoxicity were associated with higher personal benzene exposure and *t,t*-MA levels. Additionally, the elevation of DNA DI was accompanied by increased micronucleus frequencies - evidence that occupational exposure to benzene leads to DNA damages, which, if not repaired, could be expressed as micronuclei [12].

According to Angelini et al. [11], the genotoxicity of benzene could be associated with the generation of reactive oxygen species (ROS) during the redox cycling of benzene metabolites, which can also inhibit topoisomerase II, a critical enzyme in DNA replication and repair. Both the topoisomerase II inhibition and the ROS imbalance in such cases also contribute to genomic instability, leading to DNA strand breaks, gene deletions and rearrangements and chromosomal alterations, as well as to oxidative DNA damage [6, 11, 12, 41].

Besides oxidative damage to DNA, the continuous production reactive species during benzene metabolism could induce toxicity to key cellular components, other than DNA [42]. Indeed, the activation of benzene and its metabolites culminates in damage to lipids, proteins, and carbohydrates by various chemical reactions such as oxidation, nitration, and halogenation leading to functional alterations in different tissues [3,43]. Furthermore, chronic benzene exposure compromises antioxidant capacity, which also contributes to the development of oxidative damage in exposed subjects [3,4].

It was possible to observe protein oxidative damage due to oxidation and nitration reactions, indicated by increased PCO and 3-NT levels, respectively, in the GSA group compared to controls (Figure 2). These alterations were closely associated to the airborne benzene concentrations and the urinary *t,t*-MA excretion. According to Barreto et al. [44], the multiple forms of reactive species produced during the biotransformation of benzene could contribute to the development of oxidative damage, and could be the cause of increased levels of the biomarkers of protein damage.

In our study, the elevated NO levels observed in GSA group may have contributed to the development of protein damage, since NO reacts directly with the tyrosyl radical to form 3-nitrotyrosine [45]. Moreover, in high concentrations, nitric oxide together with superoxide anion ($O_2^{\cdot-}$) give rise to peroxynitrite ($ONOO^{\cdot-}$), which is a major nitration agent [46-48]. To our knowledge, there are no reports involving 3-NT as a biomarker of oxidative damage in subjects occupationally exposed to benzene. In addition to protein nitration, peroxynitrite could also induce protein carbonylation, a common oxidative protein damage [46]. Both forms of protein

damage observed in our study can lead to changes in protein function and subsequent alteration in biological responses [46]. Based on our data, PCO and 3-NT could be useful early biomarkers in occupational studies, indicating eventual worker health risks.

Regarding the endogenous antioxidant status, lower GSH levels and decreased SOD, CAT and GST activities were observed in the GSA group. However, a significant difference compared to controls was found only for GSH and GST. The benzene exposure was implicated in alterations observed in GSH levels and GST activity, since the reduction of both antioxidants was accompanied by increased personal benzene exposure and t,t-MA excretion. These data indicate the involvement of benzene on imbalance of antioxidant defense and demonstrate the consumption of cellular antioxidant defenses that act in the attempt to protect the cells from free radicals produced during benzene biotransformation [49]. GSH is an important intracellular radical scavenger, which regulates the redox status of many other cellular substances, thus playing an essential role in the detoxication processes [3, 6], especially those involved in the biotransformation of benzene [43].

In addition to GSH, enzymes of the antioxidant defense system participate in detoxication of benzene and its metabolites. These enzymes remove the reactive intermediates produced during benzene biotransformation, maintaining homeostasis [50]. SOD neutralizes excessive superoxide anions originating during benzene biotransformation and is considered the primary defense mechanism against oxidative stress [51]. Although not significant in our study, SOD inhibition could be implicated in the reduction of CAT activity observed, since lower SOD activity is linked to a decreased production of hydrogen peroxide, the substrate of catalase

[50]. The same hypothesis could be suggested for the GST inhibition, since hydrogen peroxide is also removed by GST, in conjunction with GSH, and converted to water and molecular oxygen [50, 52]. Moreover, reduced SOD activity may be linked to the fact that superoxide anion could be used on peroxynitrite formation. According to Trujillo et al. [46], the reaction of ONOO⁻ production occurs quickly enough to outcompete O₂⁻ dismutation catalyzed by SOD, leading to enzyme inactivation [53].

In addition, GSH and GST are involved in benzene biotransformation in the liver. In the first step, benzene is oxidized to benzene oxide in a reaction catalyzed by cytochrome P450 2E1; rearrangement generates phenol; reaction with GSH catalyzed by GST produces less toxic metabolites, such as S-phenylmercapturic acid, which is excreted in the urine [6, 14, 54]. Therefore, another possible explanation to the diminished GSH levels and GST activity observed in our study could be linked to S-phenylmercapturic acid excretion. However, this metabolite was not measured in the present work.

Linear correlations showed that the higher biomarkers of genotoxicity were accompanied by increased levels of protein damage markers (Figure 3). These data suggested that oxidative stress was involved in the development of genotoxic effects caused by benzene exposure. Additionally, the increased frequency of micronuclei in buccal cells was associated with diminished GSH content and GST activity. The depletion of antioxidant mechanisms occurs in an attempt to contain the development of DNA damage etiologically related to oxidative stress. According to Fracasso et al. [6], this negative correlation reveals that these antioxidants may play an important defense role against benzene-dependent DNA damage, suggesting that subjects

with lower GSH levels and/or GST activity could be less protected than subjects with higher activity of these cellular antioxidant systems.

In relation to exogenous antioxidants, only vitamin C demonstrated linkage to decreases in biomarkers of DNA and protein damages. Our data agree with that reported in the literature regarding the protective effect of this exogenous antioxidant [55, 56]. The intake of vitamin C could be an alternative to protect against the mutagenic and carcinogenic effects of environmental chemicals, and it has been used as a prophylactic agent in several occupational studies [56].

Other exogenous antioxidants did not demonstrate association with biomarkers of damage. Despite being considered an alternative response of the organism against oxidative stress [47], the relationship between exogenous antioxidants levels and markers of oxidative stress is often contradictory, since their concentrations are closely altered by diet [47].

With regard to time of exposure to benzene, several relationships with different biomarkers of genotoxicity and protein damage, as well as antioxidants were observed. These findings indicate the possibility of the use of these biomarkers in the continuous monitoring of surveillance activities for occupational hazard.

In conclusion, our results indicate that benzene exposure is linked to genotoxicity and oxidative stress. This study has also provided evidence that GSH and GST may protect against benzene-induced DNA damage, and vitamin C against both DNA and protein damage. The biomarkers evaluated in this work may be useful in biomonitoring studies, since the alterations observed in this study can provide early signals of damage to biomolecules in subjects occupationally exposed to benzene.

Conflict of Interest

The authors declare that there are no conflicts of interest.

Acknowledgments

This work was supported by CNPq/Universal (granted to S.C. Garcia; process Nos. 479613/2009-5 and 484096/2011-7) and FAPERGS (granted to S.C. Garcia; process No. 1017503 PqG 06/2010). A.M. Moro is recipient of a CAPES PhD scholarship; and S.C. Garcia is recipient of CNPq Research Fellowship.

References

- [1] IARC, Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, A Review of Human Carcinogens, Part F: Chemical agents and related occupations, Agency for Research on Cancer, Benzene, World Health Organization, Lyon, 100F (2012) 249-285.
- [2] T. Tunsaringkarn, J. Suwansaksri, S. Soogarun, W. Siriwong, A. Rungsiyothin, K. Zapuang, M. Robson, Genotoxic monitoring and benzene exposure assessment of gasoline station workers in metropolitan Bangkok: sister chromatid exchange (SCE) and urinary trans, trans-muconic acid (t,t-MA), *Asian Pac J Cancer Prev*, 12 (2011) 223-227.
- [3] N. Uzma, B.S. Kumar, M.A. Hazari, Exposure to benzene induces oxidative stress, alters the immune response and expression of p53 in gasoline filling workers, *Am J Ind Med*, 53 (2010) 1264-1270.
- [4] G.S. Keretsetse, P.J. Laubscher, J.L. Du Plessis, P.J. Pretorius, F.H. Van Der Westhuizen, E. Van Deventer, E. Van Dyk, F.C. Eloff, M.N. Van Aarde, L.H. Du Plessis, DNA damage and repair detected by the comet assay in lymphocytes of African petrol attendants: a pilot study, *Ann Occup Hyg*, 52 (2008) 653-662.
- [5] M. Ruchirawat, P. Navasumrit, D. Settachan, Exposure to benzene in various susceptible populations: co-exposures to 1,3-butadiene and PAHs and implications for carcinogenic risk, *Chem Biol Interact*, 184 (2010) 67-76.
- [6] M.E. Fracasso, D. Doria, G.B. Bartolucci, M. Carrieri, P. Lovreglio, A. Ballini, L. Soleo, G. Tranfo, M. Manno, Low air levels of benzene: correlation between biomarkers of exposure and genotoxic effects, *Toxicol Lett*, 192 (2010) 22-28.

- [7] J. Roma-Torres, J.P. Teixeira, S. Silva, B. Laffon, L.M. Cunha, J. Mendez, O. Mayan, Evaluation of genotoxicity in a group of workers from a petroleum refinery aromatics plant, *Mutat Res*, 604 (2006) 19-27.
- [8] P. Sun, Y. Qiu, Z. Zhang, J. Wan, T. Wang, X. Jin, Q. Lan, N. Rothman, Z.L. Xia, Association of genetic polymorphisms, mRNA expression of p53 and p21 with chronic benzene poisoning in a Chinese occupational population, *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 18 (2009) 1821-1828.
- [9] L. Wang, X. He, Y. Bi, Q. Ma, Stem cell and benzene-induced malignancy and hematotoxicity, *Chem Res Toxicol*, 25 (2012) 1303-1315.
- [10] M. Sorensen, J. Poole, H. Autrup, V. Muzyka, A. Jensen, S. Loft, L.E. Knudsen, Benzene exposure assessed by metabolite excretion in Estonian oil shale mineworkers: influence of glutathione s-transferase polymorphisms, *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 13 (2004) 1729-1735.
- [11] S. Angelini, R. Kumar, J.L. Bermejo, F. Maffei, A. Barbieri, F. Graziosi, F. Carbone, G. Cantelli-Forti, F.S. Violante, K. Hemminki, P. Hrelia, Exposure to low environmental levels of benzene: evaluation of micronucleus frequencies and S-phenylmercapturic acid excretion in relation to polymorphisms in genes encoding metabolic enzymes, *Mutat Res*, 719 (2011) 7-13.
- [12] A.K. Pandey, M. Bajpayee, D. Parmar, R. Kumar, S.K. Rastogi, N. Mathur, P. Thorning, M. de Matas, Q. Shao, D. Anderson, A. Dhawan, Multipronged evaluation of genotoxicity in Indian petrol-pump workers, *Environ Mol Mutagen*, 49 (2008) 695-707.

- [13] Brasil, Protocolo para a utilização de indicador biológico da exposição ocupacional ao benzeno, in: S.d.l.d.T. Ministério do Trabalho e Emprego, Departamento de Segurança e Saúde do Trabalhador. (Ed.) Portaria 34, Editora do Ministério da Saúde, Brasília, 2001.
- [14] M. Carrieri, G.B. Bartolucci, M.L. Scapellato, G. Spatari, D. Sapienza, L. Soleo, P. Lovreglio, G. Tranfo, M. Manno, A. Trevisan, Influence of glutathione S-transferases polymorphisms on biological monitoring of exposure to low doses of benzene, *Toxicol Lett*, 213 (2012) 63-68.
- [15] M. Manno, C. Viau, J. Cocker, C. Colosio, L. Lowry, A. Mutti, M. Nordberg, S. Wang, Biomonitoring for occupational health risk assessment (BOHRA), *Toxicol Lett*, 192 (2010) 3-16.
- [16] S. Angelini, F. Maffei, J.L. Bermejo, G. Ravegnini, D. L'Insalata, G. Cantelli-Forti, F.S. Violante, P. Hrelia, Environmental exposure to benzene, micronucleus formation and polymorphisms in DNA-repair genes: a pilot study, *Mutat Res*, 743 (2012) 99-104.
- [17] Y. Bagryantseva, B. Novotna, P. Rossner, Jr., I. Chvatalova, A. Milcova, V. Svecova, Z. Lnenickova, I. Solansky, R.J. Sram, Oxidative damage to biological macromolecules in Prague bus drivers and garagemen: impact of air pollution and genetic polymorphisms, *Toxicol Lett*, 199 (2010) 60-68.
- [18] P.V. Rekhadevi, M.F. Rahman, M. Mahboob, P. Grover, Genotoxicity in filling station attendants exposed to petroleum hydrocarbons, *Ann Occup Hyg*, 54 (2010) 944-954.

- [19] C.S. Chen, Y.C. Hseu, S.H. Liang, J.Y. Kuo, S.C. Chen, Assessment of genotoxicity of methyl-tert-butyl ether, benzene, toluene, ethylbenzene, and xylene to human lymphocytes using comet assay, *J Hazard Mater*, 153 (2008) 351-356.
- [20] P. Ducos, R. Gaudin, A. Robert, J.M. Francin, C. Maire, Improvement in HPLC analysis of urinary trans,trans-muconic acid, a promising substitute for phenol in the assessment of benzene exposure, *Int Arch Occup Environ Health*, 62 (1990) 529-534.
- [21] M. Jaffé, Über den Niederschlag welchen Pikrinsäure in normalen Harn erzeugt und Über eine neue Reaktion des kreatinins, *Z Physiol Chem* 10 (1886) 391.
- [22] R.R. Tice, E. Agurell, D. Anderson, B. Burlinson, A. Hartmann, H. Kobayashi, Y. Miyamae, E. Rojas, J.C. Ryu, Y.F. Sasaki, Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing, *Environ Mol Mutagen*, 35 (2000) 206-221.
- [23] N.P. Singh, M.T. McCoy, R.R. Tice, E.L. Schneider, A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells, *Exp Cell Res*, 175 (1988) 184-191.
- [24] P. Thomas, S. Harvey, T. Gruner, M. Fenech, The buccal cytome and micronucleus frequency is substantially altered in Down's syndrome and normal ageing compared to young healthy controls, *Mutat Res*, 638 (2008) 37-47.
- [25] H. Buss, T.P. Chan, K.B. Sluis, N.M. Domigan, C.C. Winterbourn, Protein carbonyl measurement by a sensitive ELISA method, *Free Radic Biol Med*, 23 (1997) 361-366.

- [26] D. Weber, N. Kneschke, S. Grimm, I. Bergheim, N. Breusing, T. Grune, Rapid and sensitive determination of protein-nitrotyrosine by ELISA: Application to human plasma, *Free Radic Res*, 46 (2012) 276-285.
- [27] E. Tatsch, G.V. Bochi, S. Pereira Rda, H. Kober, V.A. Agertt, M.M. de Campos, P. Gomes, M.M. Duarte, R.N. Moresco, A simple and inexpensive automated technique for measurement of serum nitrite/nitrate, *Clin Biochem*, 44 (2011) 348-350.
- [28] G.L. Ellman, Tissue sulfhydryl groups, *Arch Biochem Biophys*, 82 (1959) 70-77.
- [29] J.M. McCord, I. Fridovich, Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein), *J Biol Chem*, 244 (1969) 6049-6055.
- [30] H. Aebi, Catalase in vitro, *Methods Enzymol*, 105 (1984) 121-126.
- [31] W.H. Habig, M.J. Pabst, W.B. Jakoby, Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation, *J Biol Chem*, 249 (1974) 7130-7139.
- [32] M. Baierle, A. Bairos, A.P. Moreira, R. Bulcão, M. Roehrs, F. Freitas, J. Durgante, N. Brucker, M. Charão, S.C. Garcia, Quantificação sérica de vitamina C por CLAE-UV e estudo de estabilidade, *Química Nova*, 35 (2012) 403-407.
- [33] M. Charão, A. Moro, N. Brucker, R. Bulcão, M. Baierle, F. Freitas, J. Durgante, S. Nascimento, G.B. Bubols, P.H. Saldiva, D. Bohrer, S.C. Garcia, Simultaneous Quantification of Lycopene, β -Carotene, Retinol and α -Tocopherol in Plasma after a Simple Extraction Procedure: Stability Study and Application to Human Volunteers, *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 23 (2012) 1441-1449.
- [34] C.A. Burts, E.R. Ashwood, D.E. Bruns, Tietz - Fundamentos de Clínica Química, 6th ed., Saunders, São Paulo, Brasil, 2008.

- [35] ACGIH, TLVs and BEIs based on the Documentation of the Threshold Limit Values for Chemical Substances and Physical Agents and Biological Indices, in: American Conference of Governmental Industrial Hygienists, Cincinnati, 2011.
- [36] EPA, Control of hazardous air pollutants from mobile sources, in: Environmental Protection Agency (USA), 2011.
- [37] S. Chanvaivit, P. Navasumrit, P. Hunsonti, H. Autrup, M. Ruchirawat, Exposure assessment of benzene in Thai workers, DNA-repair capacity and influence of genetic polymorphisms, *Mutat Res*, 626 (2007) 79-87.
- [38] M. Carrieri, E. Bonfiglio, M.L. Scapellato, I. Macca, G. Tranfo, P. Faranda, E. Paci, G.B. Bartolucci, Comparison of exposure assessment methods in occupational exposure to benzene in gasoline filling-station attendants, *Toxicol Lett*, 162 (2006) 146-152.
- [39] M. Sorensen, H. Skov, H. Autrup, O. Hertel, S. Loft, Urban benzene exposure and oxidative DNA damage: influence of genetic polymorphisms in metabolism genes, *Sci Total Environ*, 309 (2003) 69-80.
- [40] C.P. Weisel, Benzene exposure: an overview of monitoring methods and their findings, *Chem Biol Interact*, 184 (2010) 58-66.
- [41] J. Kirkeleit, Effects of benzene on human hematopoiesis, *The Open Hematology Journal*, 2 (2008) 87-102.
- [42] H.J. Badham, S.J. Renaud, J. Wan, L.M. Winn, Benzene-initiated oxidative stress: Effects on embryonic signaling pathways, *Chem Biol Interact*, 184 (2010) 218-221.

- [43] H.J. Badham, L.M. Winn, In utero exposure to benzene disrupts fetal hematopoietic progenitor cell growth via reactive oxygen species, *Toxicol Sci*, 113 (2010) 207-215.
- [44] G. Barreto, D. Madureira, F. Capani, L. Aon-Bertolino, E. Saraceno, L.D. Alvarez-Giraldez, The role of catechols and free radicals in benzene toxicity: an oxidative DNA damage pathway, *Environ Mol Mutagen*, 50 (2009) 771-780.
- [45] S.A. Greenacre, H. Ischiropoulos, Tyrosine nitration: localisation, quantification, consequences for protein function and signal transduction, *Free Radic Res*, 34 (2001) 541-581.
- [46] M. Trujillo, B. Alvarez, J.M. Souza, N. Romero, L. Castro, L. Thomson, R. Radi, *Mechanisms and Biological Consequences of Peroxynitrite-Dependent Protein Oxidation and Nitration*, Elsevier Inc, San Diego, California, USA, 2010.
- [47] P. Rossner, Jr., V. Svecova, A. Milcova, Z. Lnenickova, I. Solansky, R.M. Santella, R.J. Sram, Oxidative and nitrosative stress markers in bus drivers, *Mutat Res*, 617 (2007) 23-32.
- [48] F.L. Ricciardolo, A. Di Stefano, F. Sabatini, G. Folkerts, Reactive nitrogen species in the respiratory tract, *Eur J Pharmacol*, 533 (2006) 240-252.
- [49] C. Costa, R.D. Pasquale, V. Silvari, M. Barbaro, S. Catania, In vitro evaluation of oxidative damage from organic solvent vapours on human skin, *Toxicol In Vitro*, 20 (2006) 324-331.
- [50] A. Otitoloju, O. Olagoke, Lipid peroxidation and antioxidant defense enzymes in *Clarias gariepinus* as useful biomarkers for monitoring exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons, *Environ Monit Assess*, 182 (2011) 205-213.

- [51] E.Z. Ulakoglu, A. Saygi, M.K. Gumustas, E. Zor, I. Oztek, E. Kokoglu, Alterations in superoxide dismutase activities, lipid peroxidation and glutathione levels in thinner inhaled rat lungs: relationship between histopathological properties, *Pharmacol Res*, 38 (1998) 209-214.
- [52] Y. Verma, S.V. Rana, Modulation of phase-II enzyme activities in benzene treated ovariectomized rats, *Environ Toxicol Pharmacol*, 31 (2011) 371-377.
- [53] V. Demicheli, C. Quijano, B. Alvarez, R. Radi, Inactivation and nitration of human superoxide dismutase (SOD) by fluxes of nitric oxide and superoxide, *Free Radic Biol Med*, 42 (2007) 1359-1368.
- [54] M. Arayasiri, C. Mahidol, P. Navasumrit, H. Autrup, M. Ruchirawat, Biomonitoring of benzene and 1,3-butadiene exposure and early biological effects in traffic policemen, *Sci Total Environ*, 408 (2010) 4855-4862.
- [55] E. Ginter, [Optimum vitamin C allowance for the human organism (author's transl)], *Cesk Gastroenterol Vyz*, 36 (1982) 206-216.
- [56] R.J. Sram, B. Binkova, P. Rossner, Jr., Vitamin C for DNA damage prevention, *Mutat Res*, 733 (2012) 39-49.

Table 1. Environmental and biological monitoring.

	Control group (n=28)	GSA group (n=43)	ACGIH Limits
Benzene ($\mu\text{g m}^{-3}$)	42.01 (34.10-52.47)	76.20 (54.34 – 1285.48) ^a	1600.0
t,t-MA ($\mu\text{g g}^{-1}$ creatinine)	74.85 (47.60 – 121.50)	326.30 (189.60 – 454.00) ^a	500.0

The values are expressed as median (interquartile range).

^a $p < 0.001$.

Table 2. Endogenous antioxidant status in study population.

	Control group (n=28)	GSA group (n=43)
GSH ($\mu\text{mol ml}^{-1}$ of erythrocytes)	62.31 ± 2.25	$52.90 \pm 0.97^{\text{a}}$
SOD (U SOD mg^{-1} protein)	15.92 ± 2.46	13.72 ± 1.41
CAT (U CAT mg^{-1} protein)	7.84 ± 0.56	6.99 ± 0.45
GST (U GST mg^{-1} protein)	4.59 ± 0.92	$2.12 \pm 0.15^{\text{b}}$

The values are expressed as mean \pm SEM.

^a $p < 0.001$; ^b $p < 0.01$.

Table 3. Exogenous antioxidant status in study population.

	Control group (n=28)	GSA group (n=43)	Reference Values [#]
Vitamin C (mg l ⁻¹)	6.47 ± 0.73	4.36 ± 0.38 ^a	4 – 15
α-tocopherol (μmol l ⁻¹)	22.27 ± 1.34	21.38 ± 1.11	12 – 42
Retinol (μmol l ⁻¹)	2.41 ± 0.07	2.24 ± 0.08	1.05 – 2.80
Lycopene (μmol l ⁻¹)	0.78 ± 0.10	0.90 ± 0.06	0.4 – 0.6
β-carotene (μmol l ⁻¹)	0.34 ± 0.03	0.33 ± 0.03	0.19 – 1.58

The values are expressed as mean ± SEM.

^a $p < 0.05$. [#] According to Burts et al.[34].

Table 4. Spearman's correlations among personal benzene exposure, trans, trans-muconic acid, biomarkers of genotoxicity, protein damage and endogenous antioxidants (n=71).

	Personal benzene exposure ($\mu\text{g m}^{-3}$)	t,t-MA ($\mu\text{g g}^{-1}$ creatinine)
DNA DI (arbitrary units)	r= 0.47 (p<0.001)	r= 0.26 (p<0.05)
MN (frequency/1000 cells)	r= 0.33 (p<0.01)	r= 0.49 (p<0.001)
PCO (nmol mg^{-1} protein)	r= 0.70 (p<0.001)	r= 0.51 (p<0.001)
3-NT (pmol mg^{-1} protein)	r= 0.27 (p<0.05)	r= 0.32 (p<0.01)
GSH ($\mu\text{mol ml}^{-1}$ of erythrocytes)	r= -0.22 (p<0.05)	r= -0.43 (p<0.001)
GST (U GST mg^{-1} protein)	r= -0.31 (p<0.05)	r= -0.30 (p<0.05)

Table 5. Correlations between time of benzene exposure *versus* biomarkers of genotoxicity, protein damages and endogenous antioxidants (n=71).

	Time of benzene exposure (years)
DNA DI (arbitrary units)	r= 0.40 (p<0.001)
MN (frequency/1000 cells)	r= 0.52 (p<0.001)
PCO (nmol mg ⁻¹ protein)	r= 0.50 (p<0.001)
3-NT (pmol mg ⁻¹ protein)	r= 0.40 (p<0.001)
GSH (μmol ml ⁻¹ of erythrocytes)	r= -0.37 (p<0.001)
GST (U GST mg ⁻¹ protein)	r= -0.24 (p<0.05)

Figure List

Figure 1. Biomarkers of genotoxicity in gasoline station attendants and control group. (A) DNA damage index (DNA DI) obtained from the comet assay; (B) DNA damage classes; (C) micronuclei (MN) frequency per 1000 cells counted in the micronucleus assay. Data represented as mean \pm SEM. * $p < 0.001$.

Figure 2. Biomarkers of oxidative protein damage in gasoline station attendants and control group. (A) Protein carbonyl (PCO) levels; (B) 3-nitrotyrosine (3-NT) levels. Data represented as mean \pm SEM. * $p < 0.001$.

Figure 3. (A) Correlation between DNA damage index and PCO ($r = 0.59$; $p < 0.001$, $n = 71$); (B) correlation between MN frequency and PCO ($r = 0.25$; $p < 0.05$, $n = 71$); (C) correlation between MN frequency and 3-NT ($r = 0.38$; $p < 0.001$, $n = 71$).

Figure 4. (A) Correlation between vitamin C and DNA damage index ($r = -0.30$; $p < 0.05$, $n = 71$); (B) Correlation between vitamin C and PCO ($r = -0.34$; $p < 0.01$, $n = 71$).

Figure 1

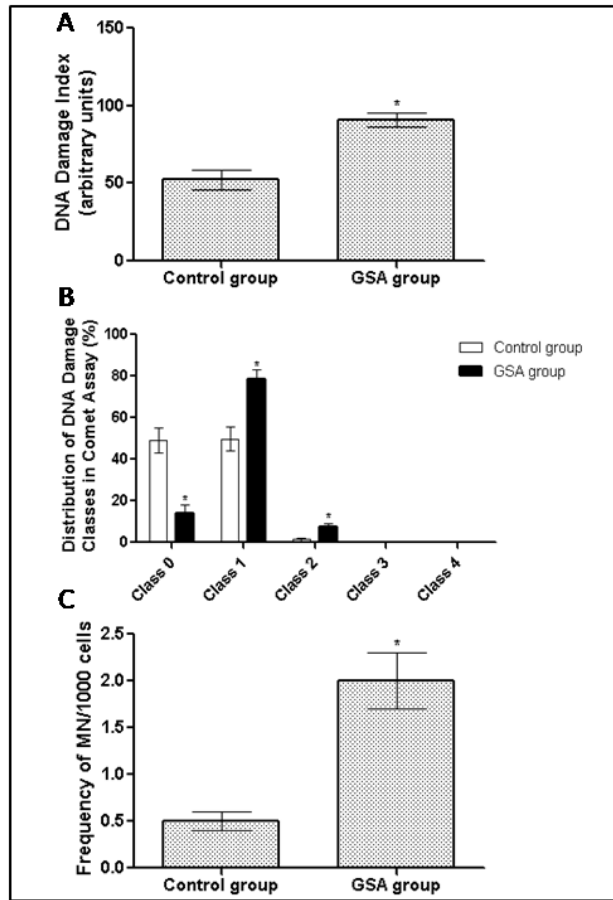


Figure 2

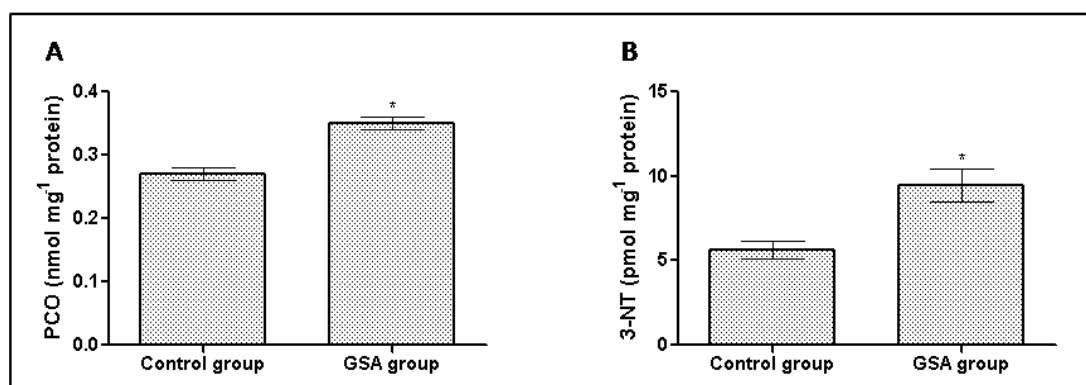


Figure 3

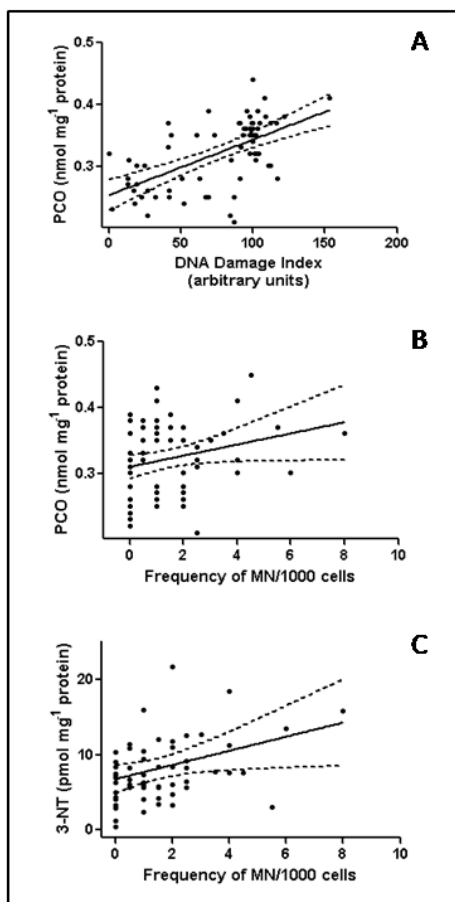
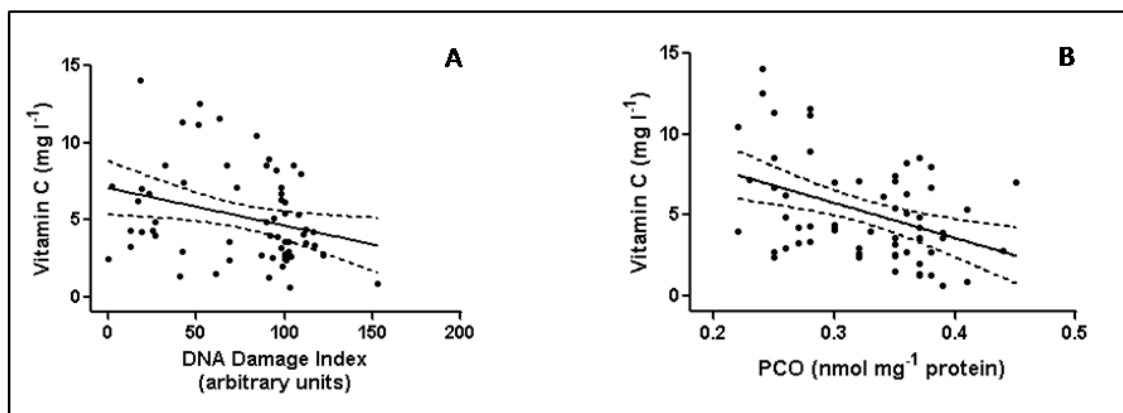


Figure 4



PARTE III

DISCUSSÃO

O monitoramento da exposição ocupacional a diferentes substâncias químicas possibilita a avaliação dos riscos e a implementação de estratégias que visam melhorias nas condições de saúde e segurança no ambiente de trabalho (Roma-Torres *et al.*, 2006; Pandey *et al.*, 2008), apresentando papel fundamental em estudos ocupacionais (Weisel, 2010). O monitoramento ambiental e o biomonitoramento atuam como ferramentas complementares na caracterização da exposição ocupacional, permitindo uma avaliação global da exposição sob a qual o indivíduo encontra-se exposto (Manno *et al.*, 2010). A caracterização da exposição ocupacional que acomete frentistas de postos de gasolina é de extrema importância, visto os efeitos tóxicos causados pelos produtos petrolíferos, especialmente pelo benzeno (Pandey *et al.*, 2008). Atualmente, o monitoramento da exposição ocupacional ao benzeno está focado principalmente na prevenção da saúde de trabalhadores submetidos a baixos níveis de exposição (Fracasso *et al.*, 2010).

Os resultados do presente trabalho indicam que os frentistas avaliados estavam expostos a baixos níveis de benzeno, com valores abaixo dos valores preconizados pela ACGIH e pela NR-15, confirmando a eficácia das medidas adotadas no controle do teor deste solvente orgânico na gasolina, bem como suas concentrações no ambiente de trabalho (Fundacentro, 2005; ACGIH, 2011; EPA, 2011). No Brasil, a percentagem máxima de benzeno permitida na gasolina é de 1% (Fundacentro, 2005). Com base nos efeitos tóxicos que a exposição ocupacional ao benzeno pode provocar à saúde humana, a presença deste solvente na gasolina vem sendo cada vez mais substituída por outros solventes menos tóxicos (Chanvaivit *et al.*, 2007). Recentemente, novas normas de regulamentação foram implementadas nos Estados Unidos, reduzindo ainda mais os teores de benzeno, chegando a 0,62% (Smith, 2010; EPA, 2011). No entanto, a concentração de benzeno na gasolina não pode ser totalmente eliminada, podendo ser apenas controlada (Carrieri *et al.*, 2006; Chanvaivit *et al.*, 2007).

Da mesma maneira, os limites de benzeno ambiental vem diminuindo drasticamente ao longo das últimas décadas. Atualmente, o limite estabelecido pela

ACGIH para exposição ocupacional ao benzeno é de 0,5 ppm, correspondendo a concentração máxima ambiental de 1600 µg/m³ (ACGIH, 2011).

Adicionalmente, também foram encontradas baixas concentrações de tolueno e xilenos no ambiente ocupacional, com valores bastante abaixo dos limites estabelecidos pela ACGIH para tolueno (75400 µg/m³) e xilenos (434000 µg/m³) (ACGIH, 2011). No Brasil, os limites ambientais preconizados para o benzeno pela NR-15 são de 1 ppm para as indústrias químicas e petroquímicas e 2,5 ppm para as indústrias siderúrgicas (Brasil, 1995). Enquanto que para o tolueno e xilenos, o limite estabelecido é de 78 ppm para ambos os solventes orgânicos (Brasil, 1995). Apesar das baixas concentrações encontradas para benzeno e tolueno no ambiente ocupacional, os níveis dos solventes orgânicos no ar inalado pelos frentistas se mostraram altamente correlacionados, evidenciando a ocorrência de co-exposição, mesmo em baixas concentrações nos postos de gasolina avaliados.

A baixa exposição ao benzeno e ao tolueno também foi confirmada pelas baixas concentrações dos seus respectivos biomarcadores de exposição avaliados no presente trabalho. Em relação aos xilenos, não foram encontrados níveis quantificáveis, tanto para o seu biomarcador de exposição sanguíneo, quanto para o urinário. Apesar da elevada especificidade apresentada pelos biomarcadores sanguíneos do benzeno e do tolueno, não foram encontradas correlações entre os seus níveis sanguíneos e ambientais, bem como entre estes biomarcadores sanguíneos e os seus respectivos metabólitos urinários. Segundo Weisel (2010), a falta de correlação encontrada pode ser justificada pelo fato de que a concentração sanguínea reflete a exposição recente, correspondendo aos últimos minutos antes da coleta de sangue, enquanto que a concentração do ar reflete os valores médios ao longo da exposição total. Dessa forma, a diferença entre os tempos de amostragem pode ter interferido nos resultados obtidos.

Em relação aos biomarcadores urinários do benzeno (ácido trans, trans-mucônico) e do tolueno (ácido hipúrico), ambos apresentaram valores dentro dos limites biológicos estabelecidos pela ACGIH e pela NR-7 (Norma Regulamentadora nº 7 que estabelece os parâmetros biológicos para controle da exposição a agentes químicos, como o tolueno). No Brasil, não existe um limite biológico estabelecido para o ácido trans, trans-mucônico, o que se emprega é a correlação entre os níveis

urinários deste biomarcador e os níveis de benzeno no ar com base nos valores estabelecidos pelo órgão alemão DFG (Brasil, 2001).

Apesar da dificuldade em realizar o monitoramento biológico de exposições ocupacionais a baixos níveis, devido à baixa confiabilidade dos biomarcadores tradicionais nestas condições (Lovreglio *et al.*, 2010), nossos resultados mostraram aumento no biomarcador urinário de exposição ao benzeno nos frentistas em comparação com o grupo controle, demonstrando que o ácido trans, trans-mucônico pode ser considerado um biomarcador aplicável no biomonitoramento da exposição a baixos níveis de benzeno. Além disso, este biomarcador urinário demonstrou ser mais efetivo no biomonitoramento do benzeno do que os níveis do próprio solvente orgânico no sangue. Os níveis de ácido trans, trans-mucônico urinário mostraram estar associados com as concentrações de benzeno no ar, destacando a utilidade deste biomarcador na caracterização da exposição interna aos baixos níveis de benzeno (Chanvaivit *et al.*, 2007; Weisel, 2010).

O ácido hipúrico demonstrou baixa especificidade no biomonitoramento do tolueno. A validade deste biomarcador de exposição vem sendo frequentemente questionada, em decorrência da diminuição da exposição ocupacional ao tolueno e também pelo fato de que o ácido hipúrico urinário também pode ser encontrado em indivíduos não expostos, provenientes de alimentos, bebidas e medicamentos que contenham ácido benzóico ou benzoatos, comprometendo a utilização deste metabólito no biomonitoramento de exposições a baixos níveis de tolueno (Truchon, Tardif e Brodeur, 1999; Roma-Torres *et al.*, 2006; Ukai *et al.*, 2007).

Os dados obtidos pelo monitoramento ambiental e biomonitoramento demonstraram que os frentistas encontram-se submetidos a baixos níveis de exposição. Entretanto, tal fato não impediu que alterações em diferentes sistemas biológicos, bem como nos sistemas oxidante e antioxidante do organismo, fossem observadas.

A hematotoxicidade do benzeno é rotineiramente avaliada através de parâmetros hematológicos clássicos (Kirkeleit, 2008; Robert Schnatter *et al.*, 2010). No presente estudo, embora tenham sido observadas diferenças significativas entre os frentistas e o grupo não exposto, em alguns parâmetros hematológicos avaliados,

tais alterações não apresentam relevância clínica no biomonitoramento ao benzeno, uma vez que todos os parâmetros avaliados encontram-se dentro dos valores de referência. Entretanto, alterações hematológicas não são os indicativos mais sensíveis para evidenciar efeitos precoces do benzeno em células sanguíneas (Swaen *et al.*, 2010).

Assim, com o objetivo de avaliar possíveis biomarcadores precoces de alterações hematológicas causadas pela exposição ao benzeno, nós avaliamos a ALA-D. A ALA-D é uma enzima envolvida na biossíntese do grupamento heme da hemoglobina, que necessita de grupamentos tiólicos reduzidos (-SH) para a sua atividade (Fukuda, Paredes e Batlle, 1988; Fonte *et al.*, 2007). No presente estudo, foi observada uma inibição na atividade enzimática da ALA-D em frentistas, o que compromete a síntese do grupamento heme e conseqüentemente contribui para o desenvolvimento de anemia (Baierle *et al.*, 2010), um comum efeito hematotóxico resultante da exposição ao benzeno (Robert Schnatter *et al.*, 2010; Smith, 2010). Embora os nossos resultados demonstrem o envolvimento de agentes oxidantes na inibição da enzima ALA-D, nós sugerimos que outros mecanismos também possam estar envolvidos, uma vez que, se os grupamentos -SH fossem os únicos alvos de inibição, a reativação da atividade enzimática pelo agente redutor DTT seria total, o que não ocorreu. As associações observadas entre a inibição da atividade enzimática e aumento nos níveis de benzeno e tolueno no ar, bem como aumento da excreção do ácido trans, trans-mucônico, sugerem o possível envolvimento de benzeno e tolueno na inibição da ALA-D em frentistas e reforçam a nossa hipótese. Um estudo anterior do nosso grupo, revelou o tolueno como principal responsável pela inibição da atividade da enzima ALA-D em pintores (Moro *et al.*, 2010). Além disso, a literatura tem relatado o possível envolvimento do benzeno na inibição de outras enzimas responsáveis pela síntese do grupamento heme da hemoglobina, como a ferroquelatase (Muzyka *et al.*, 2004). No entanto, conforme nosso conhecimento, este é o primeiro estudo a descrever a associação entre a inibição da enzima ALA-D e exposição ocupacional ao benzeno.

Uma análise multivariada foi realizada para avaliar a influência da co-exposição sobre a atividade da enzima ALA-D. Considerando os níveis de benzeno e tolueno no ar, excreção de ácido trans, trans-mucônico, tempo de exposição, idade

e tabagismo, foi observado que a inibição da atividade enzimática da ALA-D está intimamente relacionada com o tempo de exposição ao benzeno, ou seja, a inibição da enzima é acompanhada pelo aumento no tempo de exposição. As demais variáveis independentes avaliadas no modelo estatístico não apresentaram influências significativas sobre a inibição da ALA-D. Dessa forma, nós sugerimos que a exposição crônica ao benzeno ao longo tempo pode contribuir para a diminuição da síntese enzimática da ALA-D. Entretanto, mais estudos são necessários para elucidar o envolvimento desta enzima em anemias decorrentes da exposição ao benzeno e para verificar se esta enzima pode ser um possível biomarcador precoce de efeito para este xenobiótico.

No presente estudo também foi observado diminuição na expressão das moléculas de adesão CD80 em monócitos e CD86 em linfócitos e monócitos de frentistas expostos ao benzeno. Estas moléculas desempenham papel importante na ativação da células T (Chanan-Khan *et al.*, 2011; Mohamed *et al.*, 2012), as quais participam ativamente da resposta imunológica. As expressões diminuídas das CD80 e CD86 podem provocar anergia das células T, principais efetoras da resposta imune do organismo (Dai *et al.*, 2009). Nossos resultados mostraram que as baixas expressões dessas moléculas em monócitos estavam correlacionadas com o aumento da exposição ao benzeno e tolueno no ar, bem como com os níveis aumentados do ácido trans, trans-mucônico. Análise multivariada foi utilizada para avaliar o envolvimento de cada um dos fatores acima citados sobre as expressões das moléculas CD80 e CD86 em monócitos. Nossos resultados demonstraram que a diminuição das expressões está associada principalmente com os níveis de ácido trans, trans-mucônico urinário, revelando o envolvimento da exposição ao benzeno sobre a baixa expressão dessas moléculas imunológicas. Além disso, a literatura tem reportado que pacientes leucêmicos apresentam menor expressão de CD80 e CD86 do que pessoas saudáveis (Dai *et al.*, 2009; Zhao *et al.*, 2012). A expressão anormal dessas moléculas é sugerida como um dos possíveis mecanismos patológicos da leucemia (Dai *et al.*, 2009), decorrente da diminuição da resposta imune.

Tendo em vista que a exposição ocupacional ao benzeno está estreitamente relacionada com o desenvolvimento de leucemia, a avaliação de moléculas de

adesão pode ser um potencial biomarcador no biomonitoramento de trabalhadores expostos ao benzeno, avaliando distúrbios ligados ao sistema imune. Entretanto, o mecanismo de ativação das células T é muito complexo e mais estudos são necessários para verificar qual o real envolvimento destas moléculas de adesão na leucemia induzida pelo benzeno em trabalhadores expostos.

Adicionalmente, foi observado aumento das enzimas hepáticas em frentistas. Apesar dos valores obtidos estarem dentro dos valores de referência, essas alterações parecem estar intimamente ligadas aos efeitos tóxicos causados pela exposição ao benzeno, uma vez que o ácido trans, trans-mucônico urinário foi o único fator que significativamente contribuiu para o aumento das transaminases, no cenário de co-exposição entre benzeno e tolueno visualizado nos postos de gasolina do presente estudo. Além disso, o aumento das transaminases foi acompanhado pelo tempo de exposição ao benzeno, destacando a importância do uso destes biomarcadores no monitoramento contínuo da saúde dos trabalhadores expostos.

O fígado é o principal órgão responsável pela biotransformação de substâncias químicas tóxicas (Malaguarnera *et al.*, 2012) e o controle das enzimas hepáticas, apesar de pouco executado, é recomendado no biomonitoramento de trabalhadores expostos (Barberino *et al.*, 2005). Embora o aumento das transaminases não seja considerado um biomarcador específico (Manno *et al.*, 2010), o uso dessas enzimas hepáticas pode contribuir em longo prazo para a detecção precoce dos danos causados pela exposição ocupacional ao benzeno.

Em relação aos biomarcadores clássicos de função renal avaliados neste estudo, os resultados encontrados estavam todos dentro dos valores de referência. Entretanto foi observado um aumento nos níveis de microalbuminúria em frentistas, acompanhado pelo aumento nos níveis de ácido trans, trans-mucônico urinário, bem como pelo tempo de exposição, sugerindo que a exposição ao benzeno pode em longo prazo, contribuir para o desenvolvimento de alterações nas células glomerulares renais de indivíduos expostos. Nossos resultados também demonstraram o aumento da enzima N-acetil-beta-D-glucosaminidase em frentistas, sugerindo um possível efeito nas células tubulares renais. Além disso, o aumento dessa enzima foi acompanhado pelo aumento do tempo de exposição ao benzeno, justificando o seu uso como biomarcador de efeito em alterações precoces. Esses

biomarcadores de função renal precoce já vêm sendo utilizados em vários estudos com o objetivo de avaliar de forma precoce os potenciais danos que diferentes xenobióticos podem causar ao sistema renal (Franchini *et al.*, 1983; Gonzalez-Yebra *et al.*, 2006; Ohno *et al.*, 2007; Jarosinska *et al.*, 2008; Prozialeck *et al.*, 2009). Nossos resultados corroboram para o uso desses biomarcadores no biomonitoramento do benzeno, uma vez que eles apontaram alterações não detectadas pelos biomarcadores clássicos da função renal.

Nossos resultados também comprovaram a ação genotóxica decorrente da exposição ocupacional ao benzeno, uma vez que o aumento nos biomarcadores de genotoxicidade foi acompanhado por elevados níveis de benzeno no ar e pelo aumento do ácido trans, trans-mucônico urinário. Além disso, o aumento nas quebras das fitas de DNA, evidenciado pelo ensaio cometa, foi acompanhado pelo aumento na frequência de micronúcleos, sugerindo que a falta de reparo do dano de DNA contribui para o aparecimento de micronúcleos (Pandey *et al.*, 2008).

O processo de biotransformação do benzeno tem sido associado à produção de espécies reativas de oxigênio e estresse oxidativo (Barreto *et al.*, 2009). De acordo com Angelini *et al.* (2011), as espécies produzidas durante a biotransformação do benzeno inibem a enzima topoisomerase II, contribuindo para a instabilidade do material genético e provocando quebras na molécula de DNA, alterações cromossômicas e danos oxidativos (Kirkeleit, 2008; Pandey *et al.*, 2008; Fracasso *et al.*, 2010; Angelini *et al.*, 2011).

Adicionalmente, as espécies reativas de oxigênio, produzidas durante a biotransformação do benzeno, podem atuar sobre outras macromoléculas importantes do organismo, provocando dano em lipídios, proteínas e carboidratos (Badham *et al.*, 2010), e alterar a capacidade antioxidante, contribuindo para o dano oxidativo (Keretetse *et al.*, 2008; Uzma, Kumar e Hazari, 2010).

No presente estudo os danos genéticos causados pela exposição ocupacional ao benzeno foram acompanhados pelo aumento da oxidação e nitrosilação de proteínas e pela depleção de antioxidantes endógenos, como a GSH e GST. Os níveis elevados de óxido nítrico encontrados nos frentistas podem ter contribuído para o desenvolvimento dos danos oxidativos proteicos, uma vez que o óxido nítrico reage diretamente com o radical tirosil dando origem a 3-nitrotirosina (Greenacre e

Ischiropoulos, 2001). Além disso, em altas concentrações, o óxido nítrico liga-se ao ânion superóxido dando origem ao peroxinitrito, que atua promovendo nitrosilação e carbonilação de proteínas (Ricciardolo *et al.*, 2006; Rossner *et al.*, 2007; Trujillo *et al.*, 2010).

Além disso, sugerimos que a depleção dos mecanismos antioxidantes ocorreu na tentativa de conter o desenvolvimento do dano genético etilologicamente relacionado ao estresse oxidativo. Adicionalmente, nossos resultados mostraram que o aumento da frequência de micronúcleos estava associado com a diminuição da concentração de GSH e da atividade da enzima GST. De acordo com Fracasso *et al.* (2010), esta correlação revela o importante envolvimento destes antioxidantes na defesa contra o dano de DNA induzido pelo benzeno, sugerindo que os indivíduos com níveis reduzidos de GSH e/ou GST podem ser mais suscetíveis do que aqueles indivíduos com uma maior ação destes sistemas antioxidantes.

Adicionalmente, a vitamina C foi o único antioxidante exógeno que demonstrou efeito protetor contra os danos oxidativos causados pela exposição ocupacional ao benzeno. Para os demais antioxidantes exógenos não foi encontrado qualquer associação com biomarcadores de dano de DNA e proteínas. Apesar destes antioxidantes serem considerados uma resposta alternativa do organismo frente ao estresse oxidativo (Rossner *et al.*, 2007), a relação entre os níveis de antioxidantes exógenos e marcadores de estresse oxidativo é muitas vezes contraditória, pois suas concentrações são facilmente alteradas pela dieta.

Adicionalmente, o tempo de exposição influenciou significativamente os possíveis novos biomarcadores de efeito propostos neste estudo (enzima ALA-D e expressão de CD80 e DC86 em monócitos), bem como os biomarcadores já estabelecidos em outros estudos para diferentes xenobióticos (transaminases, microalbuminúria e N-acetil-beta-D-glucosaminidase). Além disso, os níveis de ácido trans, trans-mucônico também aumentaram com o aumento do tempo de exposição. Ainda foi possível observar influência do tempo de exposição sobre os biomarcadores de genotoxicidade, biomarcadores de dano protéico e antioxidantes. Esses resultados destacam a confiabilidade do uso destes biomarcadores em estudos de biomonitoramento envolvendo o benzeno, sugerindo que o tempo de exposição está associado com o desenvolvimento de diferentes alterações

observadas neste estudo. Além disso, podem indicar a suscetibilidade ao desenvolvimento de doenças em trabalhadores expostos ao benzeno. Dessa forma, o uso destes biomarcadores pode representar uma tentativa de detecção precoce dos efeitos tóxicos causados pela exposição ocupacional ao benzeno, compreendendo o principal objetivo do biomonitoramento. Finalmente, o tabagismo e a co-exposição ao tolueno não apresentaram influência sobre os resultados obtidos neste estudo.

CONCLUSÕES

- Os resultados deste estudo demonstraram que, mesmo em baixas concentrações, o benzeno interage com diferentes sistemas biológicos, provocando alterações.
- O ácido trans, trans-mucônico urinário demonstrou ser um biomarcador de exposição aplicável no biomonitoramento à baixos níveis de exposição ao benzeno, correlacionado-se com diversas alterações observadas.
- A expressão das moléculas de adesão CD80 e CD86 em monócitos demonstrou ser potencial biomarcador de efeito útil no biomonitoramento das alterações imunológicas causadas pelo benzeno. A sua relação no desenvolvimento da leucemia induzida pelo benzeno precisa ser melhor estudada.
- Em relação ao uso da ALA-D, como um possível biomarcador de efeito precoce para alterações hematológicas decorrentes da exposição ao benzeno, mais estudos são necessários para avaliar o uso desta enzima.
- Os efeitos da exposição ocupacional ao benzeno contribuem para o desenvolvimento de danos genotóxicos induzidos pelo estresse oxidativo.
- GSH, GST e vitamina C desempenham papel fundamental na proteção dos danos de DNA causados pelo benzeno.
- Em conjunto esses resultados podem contribuir para a detecção precoce das alterações causadas pela exposição ocupacional ao benzeno, bem como para o desenvolvimento de medidas preventivas para saúde do trabalhador, melhorando a sua qualidade de vida.

PERSPECTIVAS

- Avaliar toxicidade do benzeno em frentistas do sexo feminino, como um possível grupo de maior suscetibilidade aos danos causados pela exposição ocupacional.
- Avaliar a influência do benzeno e de seus metabólitos sobre a atividade enzimática da ALA-D e sobre a expressão das moléculas de adesão CD80 e CD86, *in vitro*.
- Avaliar a influência do estresse oxidativo sobre a expressão das moléculas de adesão CD80 e CD86.
- Avaliar biomarcadores de suscetibilidade, através das isoformas polimórficas das enzimas envolvidas na biotransformação do benzeno e com isso identificar eventuais subgrupos com maior suscetibilidade a danos decorrentes da exposição ao benzeno.
- Estudar possíveis correlações entre os biomarcadores de suscetibilidade e os biomarcadores de danos causados pelo exposição ao benzeno.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACGIH. TLVs and BEIs based on the Documentation of the Threshold Limit Values for Chemical Substances and Physical Agents and Biological Indices. In: **American Conference of Governmental Industrial Hygienists**, Cincinnati, 2011.

AHAMED, M. et al. Environmental lead exposure as a risk for childhood aplastic anemia. **Biosci Trends**, v. 5, n. 1, p. 38-43, 2011.

AMORIM, L. Os biomarcadores e sua aplicação na avaliação da exposição aos agentes químicos ambientais. **Rev Bras de Epidemiol**, v. 6, p. 158-170, 2003.

ANGELINI, S. et al. Exposure to low environmental levels of benzene: evaluation of micronucleus frequencies and S-phenylmercapturic acid excretion in relation to polymorphisms in genes encoding metabolic enzymes. **Mutat Res**, v. 719, n. 1-2, p. 7-13, 2011.

ANGELINI, S. et al. Environmental exposure to benzene, micronucleus formation and polymorphisms in DNA-repair genes: a pilot study. **Mutat Res**, v. 743, n. 1-2, p. 99-104, 2012.

ANGERER, J.; EWERS, U.; WILHELM, M. Human biomonitoring: state of the art. **Int J Hyg Environ Health**, v. 210, n. 3-4, p. 201-228, 2007.

ARAYASIRI, M. et al. Biomonitoring of benzene and 1,3-butadiene exposure and early biological effects in traffic policemen. **Sci Total Environ**, v. 408, n. 20, p. 4855-4862, 2010.

ASTDR. Department of Health and Human Services, Public Health Service. In: **Agency for Toxic Substances and Disease Registry**, EUA, 2007.

BADHAM, H. et al. Benzene-initiated oxidative stress: Effects on embryonic signaling pathways. **Chem Biol Interact**, v. 184, n. 1-2, p. 218-221, 2010.

BADHAM, H. J.; WINN, L. M. In utero exposure to benzene disrupts fetal hematopoietic progenitor cell growth via reactive oxygen species. **Toxicol Sci**, v. 113, n. 1, p. 207-215, 2010.

BAIERLE, M. et al. Possíveis efeitos do cobre sanguíneo sobre parâmetros hematológicos em idosos. **J Bras Patol Med Lab**, v. 46, n. 6, p. 463-470, 2010.

BARBERINO, J. et al. Liver changes in workers at an oil refinery and in a reference population in the state of Bahia, Brazil. **Rev Panam Salud Publica**, v. 17, n. 1, p. 30-37, 2005.

BARRETO, G. et al. The role of catechols and free radicals in benzene toxicity: an oxidative DNA damage pathway. **Environ Mol Mutagen**, v. 50, n. 9, p. 771-780, 2009.

BOLUFER, P. et al. Influence of genetic polymorphisms on the risk of developing leukemia and on disease progression. **Leuk Res**, v. 30, n. 12, p. 1471-1491, 2006.

BORGOMANO, D. A. Leucemie aigue au cours de l'intoxication benzenique: sur l'origine toxique de certaines leucemies aigues et leur relations avec les anemies graves. **J Med Lyon**, v. 9, p. 227-233, 1928.

BRASIL. NR 15 - Atividades e operações insalubres. In: **Ministério do Trabalho e Emprego**, Brasil, 1995.

BRASIL. Portaria 35: Protocolo para a utilização de indicador biológico da exposição ocupacional ao benzeno. In: **Ministério do Trabalho e Emprego**, Brasil, 2001.

CARRIERI, M. et al. Influence of glutathione S-transferases polymorphisms on biological monitoring of exposure to low doses of benzene. **Toxicol Lett**, v. 213, n. 1, p. 63-68, 2012.

CARRIERI, M. et al. Comparison of exposure assessment methods in occupational exposure to benzene in gasoline filling-station attendants. **Toxicol Lett**, v. 162, n. 2-3, p. 146-152, 2006.

CHANAN-KHAN, A. et al. Biological effects and clinical significance of lenalidomide-induced tumour flare reaction in patients with chronic lymphocytic leukaemia: in vivo evidence of immune activation and antitumour response. **Br J Haematol**, v. 155, n. 4, p. 457-467, 2011.

CHANVAIVIT, S. et al. Exposure assessment of benzene in Thai workers, DNA-repair capacity and influence of genetic polymorphisms. **Mutat Res**, v. 626, n. 1-2, p. 79-87, 2007.

CHEN, C. et al. Assessment of genotoxicity of methyl-tert-butyl ether, benzene, toluene, ethylbenzene, and xylene to human lymphocytes using comet assay. **J Hazard Mater**, v. 153, n. 1-2, p. 351-356, 2008.

CHIA, S. E.; YAP, E.; CHIA, K. S. Delta-aminolevulinic acid dehydratase (ALAD) polymorphism and susceptibility of workers exposed to inorganic lead and its effects on neurobehavioral functions. **Neurotoxicology**, v. 25, n. 6, p. 1041-1047, 2004.

CHO, J. Suppressive effect of hydroquinone, a benzene metabolite, on in vitro inflammatory responses mediated by macrophages, monocytes, and lymphocytes. **Mediators Inflamm**, v. 28, p. 1-11, 2008.

COLLINS, A. The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations. **Mol Biotechnol**, v. 26, n. 3, p. 249-261, 2004.

COSTELLO, R. et al. Regulation of CD80/B7-1 and CD86/B7-2 molecule expression in human primary acute myeloid leukemia and their role in allogenic immune recognition. **Eur J Immunol**, v. 28, n. 1, p. 90-103, 1998.

DAI, Z. et al. Defective expression and modulation of B7-2/CD86 on B cells in B cell chronic lymphocytic leukemia. **Int J Hematol**, v. 89, n. 5, p. 656-663, 2009.

DOUGHERTY, D. et al. NQO1, MPO, CYP2E1, GSTT1 and GSTM1 polymorphisms and biological effects of benzene exposure--a literature review. **Toxicol Lett**, v. 182, n. 1-3, p. 7-17, 2008.

EPA. Control of hazardous air pollutants from mobile sources. In: **Environmental Protection Agency**, EUA, 2011.

FERREIRA, A. et al. Exposição a hidroquinona e ao fenol sobre a resposta inflamatória pulmonar induzida por bactéria. **Braz J of Pharm Sci**, v. 43, n. 3, p. 455-464, 2007.

FONTE, R. et al. Anaemia and abdominal pain due to occupational lead poisoning. **Haematologica**, v. 92, n. 2, p. 13-14, 2007.

FRACASSO, M. et al. Low air levels of benzene: correlation between biomarkers of exposure and genotoxic effects. **Toxicol Lett**, v. 192, n. 1, p. 22-28, 2010.

FRANCHINI, I. et al. Early indicators of renal damage in workers exposed to organic solvents. **Int Arch Occup Environ Health**, v. 52, n. 1, p. 1-9, 1983.

FRITSCHI, L. et al. OccIDEAS: retrospective occupational exposure assessment in community-based studies made easier. **J Environ Public Health**, v. 29, p. 1-5, 2009.

FUKUDA, H.; PAREDES, S. R.; BATLLE, A. M. Active site histidine in pig liver aminolevulinic acid dehydratase modified by diethylpyrocarbonate and protected by Zn²⁺ ions. **Comp Biochem Physiol B**, v. 91, n. 2, p. 285-291, 1988.

FUNDACENTRO. Acordo e Legislação sobre o Benzeno - 10 Anos. In: **Fundacentro**, São Paulo, 2005.

GLASS, D. et al. Leukemia risk and relevant benzene exposure period-Re: follow-up time on risk estimates. **Am J Ind Med**, v. 45, n. 2, p. 222-223, 2004.

GONZALEZ-YEBRA, A. et al. Exposure to organic solvents and cytogenetic damage in exfoliated cells of the buccal mucosa from shoe workers. **Int Arch Occup Environ Health**, v. 82, n. 3, p. 373-380, 2009.

GONZALEZ-YEBRA, A. et al. Occupational exposure to toluene and its possible causative role in renal damage development in shoe workers. **Int Arch Occup Environ Health**, v. 79, n. 3, p. 259-264, 2006.

GREENACRE, S. A.; ISCHIROPOULOS, H. Tyrosine nitration: localisation, quantification, consequences for protein function and signal transduction. **Free Radic Res**, v. 34, n. 6, p. 541-581, 2001.

HARO-GARCIA, L. et al. Production of IL-10, TNF and IL-12 by peripheral blood mononuclear cells in Mexican workers exposed to a mixture of benzene-toluene-xylene. **Arch Med Res**, v. 43, n. 1, p. 51-57, 2012.

HOET, P. et al. Evaluation of urinary biomarkers of exposure to benzene: correlation with blood benzene and influence of confounding factors. **Int Arch Occup Environ Health**, v. 82, n. 8, p. 985-995, 2009.

IARC. Complete List of Agents, Mixtures and Exposures Evaluated and Their Classification. In: **International Agency for research on Cancer**, EUA, 2012.

INCA. Coordenação de Prevenção e Vigilância. Vigilância do câncer relacionado ao trabalho e ao ambiente. In: **Instituto Nacional de Câncer**, Rio de Janeiro, 2010.

JARABEK, A. et al. Creating context for the use of DNA adduct data in cancer risk assessment: I. Data organization. **Crit Rev Toxicol**, v. 39, n. 8, p. 659-678, 2009.

JAROSINSKA, D. et al. Urinary mercury and biomarkers of early renal dysfunction in environmentally and occupationally exposed adults: a three-country study. **Environ Res**, v. 108, n. 2, p. 224-232, 2008.

KEENAN, J. et al. Gasoline: a complex chemical mixture, or a dangerous vehicle for benzene exposure? **Chem Biol Interact**, v. 184, n. 1-2, p. 293-295, 2010.

KERETETSE, G. et al. DNA damage and repair detected by the comet assay in lymphocytes of african petrol attendants: a pilot study. **Ann Occup Hyg**, v. 52, n. 7, p. 653-662, 2008.

KIM, Y. et al. Association of the NQO1, MPO, and XRCC1 polymorphisms and chromosome damage among workers at a petroleum refinery. **J Toxicol Environ Health A**, v. 71, n. 5, p. 333-341, 2008.

KIRKELEIT, J. Effects of benzene on human hematopoiesis. **Open J Hematol**, v. 2, p. 87-102, 2008.

LAN, Q. et al. Polymorphisms in cytokine and cellular adhesion molecule genes and susceptibility to hematotoxicity among workers exposed to benzene. **Cancer Res**, v. 65, n. 20, p. 9574-9581, 2005.

LOVREGLIO, P. et al. Validity of new biomarkers of internal dose for use in the biological monitoring of occupational and environmental exposure to low concentrations of benzene and toluene. **Int Arch Occup Environ Health**, v. 83, n. 3, p. 341-356, 2010.

MACDONALD, J. Peer reviewed: evaluating natural attenuation for groundwater cleanup. **Environ Sci Technol**, v. 34, n. 15, p. 346-353, 2000.

MACHADO, J. Alternativas e processos de vigilância em saúde do trabalhador relacionados à exposição ao benzeno no Brasil. **Cienc Saúde Coletiva**, v. 8, p. 913-921, 2003.

MALAGUARNERA, G. et al. Toxic hepatitis in occupational exposure to solvents. **World J Gastroenterol**, v. 18, n. 22, p. 2756-2766, 2012.

MANINI, P. et al. Biological monitoring of low benzene exposure in Italian traffic policemen. **Toxicol Lett**, v. 181, n. 1, p. 25-30, 2008.

MANINI, P.; DE PALMA, G.; MUTTI, A. Exposure assessment at the workplace: implications of biological variability. **Toxicol Lett**, v. 168, n. 3, p. 210-218, 2007.

MANNO, M. et al. Biomonitoring for occupational health risk assessment (BOHRA). **Toxicol Lett**, v. 192, n. 1, p. 3-16, 2010.

MIYAKI, K. et al. Association between a polymorphism of aminolevulinate dehydrogenase (ALAD) gene and blood lead levels in Japanese subjects. **Int J Environ Res Public Health**, v. 6, n. 3, p. 999-1009, 2009.

MOHAMED, Y. et al. Long-lived fusions of human haematological tumour cells and B-lymphoblastoid cells induce tumour antigen-specific cytotoxic T-cell responses in vitro. **Immunobiology**, v. 217, n. 7, p. 719-729, 2012.

MONTENEGRO, M. et al. A polymorphism in the delta-aminolevulinic acid dehydratase gene modifies plasma/whole blood lead ratio. **Arch Toxicol**, v. 80, n. 7, p. 394-398, 2006.

MORAN, J. L.; SIEGEL, D.; ROSS, D. A potential mechanism underlying the increased susceptibility of individuals with a polymorphism in NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 (NQO1) to benzene toxicity. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 96, n. 14, p. 8150-8155, 1999.

MORO, A. et al. Effects of low-level exposure to xenobiotics present in paints on oxidative stress in workers. **Sci Total Environ**, v. 408, n. 20, p. 4461-4467, 2010.

MUZYKA, V. et al. Porphyrin metabolism in lymphocytes of miners exposed to diesel exhaust at oil shale mine. **Sci Total Environ**, v. 322, n. 1-3, p. 41-50, 2004.

NEVES, H. Vigilância de Exposição Ocupacional a Substâncias Tóxicas. **Informe epidemiológico do SUS**, v. 8, p. 35-46, 1999.

OGA. **Fundamentos de Toxicologia**. São Paulo, SP: Atheneu, 2008.

OHNO, T. et al. Total mercury levels in hair, toenail, and urine among women free from occupational exposure and their relations to renal tubular function. **Environ Res**, v. 103, n. 2, p. 191-197, 2007.

PANDEY, A. et al. Multipronged evaluation of genotoxicity in Indian petrol-pump workers. **Environ Mol Mutagen**, v. 49, n. 9, p. 695-707, 2008.

PEZZAGNO, G.; MAESTRI, L.; FIORENTINO, M. L. Trans,trans-muconic acid, a biological indicator to low levels of environmental benzene: some aspects of its specificity. **Am J Ind Med**, v. 35, n. 5, p. 511-518, 1999.

PONS, M.; MARIN-CASTANO, M. E. Cigarette smoke-related hydroquinone dysregulates MCP-1, VEGF and PEDF expression in retinal pigment epithelium in vitro and in vivo. **PLoS One**, v. 6, n. 2, p. 16-22, 2011.

PROZIALECK, W. et al. Preclinical evaluation of novel urinary biomarkers of cadmium nephrotoxicity. **Toxicol Appl Pharmacol**, v. 238, n. 3, p. 301-305, 2009.

QU, Q. et al. Biomarkers of benzene: urinary metabolites in relation to individual genotype and personal exposure. **Chem Biol Interact**, v. 153-154, p. 85-95, 2005.

REKHADEVI, P. et al. Genotoxicity in filling station attendants exposed to petroleum hydrocarbons. **Ann Occup Hyg**, v. 54, n. 8, p. 944-954, 2010.

RICCIARDOLO, F. et al. Reactive nitrogen species in the respiratory tract. **Eur J Pharmacol**, v. 533, n. 1-3, p. 240-252, 2006.

ROBERT SCHNATTER, A. et al. Peripheral blood effects in benzene-exposed workers. **Chem Biol Interact**, v. 184, n. 1-2, p. 174-181, 2010.

ROCHA, J. et al. Aminolevulinatase (δ -ALA-D) as marker protein of intoxication with metals and other pro-oxidant situations. **Toxicol Res**, v. 1, p. 85-102, 2012.

ROMA-TORRES, J. et al. Evaluation of genotoxicity in a group of workers from a petroleum refinery aromatics plant. **Mutat Res**, v. 604, n. 1-2, p. 19-27, 2006.

ROSSNER, P. et al. Oxidative and nitrosative stress markers in bus drivers. **Mutat Res**, v. 617, n. 1-2, p. 23-32, 2007.

SAKAI, T. Biomarkers of lead exposure. **Ind Health**, v. 38, n. 2, p. 127-142, 2000.

SCHENCK, L. Risk assessment and occupational exposure limits. **Toxicol Lett**, v. 180, p. 232-246, 2008.

SILINS, I.; HOGBERG, J. Combined toxic exposures and human health: biomarkers of exposure and effect. **Int J Environ Res Public Health**, v. 8, n. 3, p. 629-647, 2011.

SMITH, M. Advances in understanding benzene health effects and susceptibility. **Annu Rev Public Health**, v. 31, p. 133-148, 2010.

SNYDER, R. Benzene's toxicity: a consolidated short review of human and animal studies by HA Khan. **Hum Exp Toxicol**, v. 26, n. 9, p. 687-696, 2007.

SORENSEN, M. et al. Urban benzene exposure and oxidative DNA damage: influence of genetic polymorphisms in metabolism genes. **Sci Total Environ**, v. 309, n. 1-3, p. 69-80, 2003.

SOUZA, J. et al. Delta-aminolevulinatase (delta-ALA-D) activity in diabetes and hypothyroidism. **Clin Biochem**, v. 40, n. 5-6, p. 321-325, 2007.

SUN, P. et al. Association of genetic polymorphisms, mRNA expression of p53 and p21 with chronic benzene poisoning in a chinese occupational population. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**, v. 18, n. 6, p. 1821-1828, 2009.

SWAEN, G. et al. Low level occupational benzene exposure and hematological parameters. **Chem Biol Interact**, v. 184, n. 1-2, p. 94-100, 2010.

TRUCHON, G.; TARDIF, R.; BRODEUR, J. o-cresol: a good indicator of exposure to low levels of toluene. **Appl Occup Environ Hyg**, v. 14, n. 10, p. 677-681, 1999.

TRUJILLO, M. et al. **Mechanisms and Biological Consequences of Peroxynitrite-Dependent Protein Oxidation and Nitration**. California, USA: Elsevier, 2010.

TUNSARINGKARN, T. et al. Genotoxic monitoring and benzene exposure assessment of gasoline station workers in metropolitan Bangkok: sister chromatid exchange (SCE) and urinary trans, trans-muconic acid (t,t-MA). **Asian Pac J Cancer Prev**, v. 12, n. 1, p. 223-227, 2011.

UKAI, H. et al. Comparative evaluation of biomarkers of occupational exposure to toluene. **Int Arch Occup Environ Health**, v. 81, n. 1, p. 81-93, 2007.

URSO, M. L.; CLARKSON, P. M. Oxidative stress, exercise, and antioxidant supplementation. **Toxicology**, v. 189, n. 1-2, p. 41-54, 2003.

UZMA, N.; KUMAR, B.; HAZARI, M. Exposure to benzene induces oxidative stress, alters the immune response and expression of p53 in gasoline filling workers. **Am J Ind Med**, v. 53, n. 12, p. 1264-1270, 2010.

VASCONCELOS, S. et al. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para a sua determinação. **Quim Nova**, v. 30, p. 1323-1338, 2007.

VERMEULEN, R. et al. Decreased levels of CXC-chemokines in serum of benzene-exposed workers identified by array-based proteomics. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 102, n. 47, p. 17041-17046, 2005.

WANG, Q. et al. Benchmark dose approach for low-level lead induced haematogenesis inhibition and associations of childhood intelligences with ALAD activity and ALA levels. **Sci Total Environ**, v. 409, n. 10, p. 1806-1810, 2011.

WEISEL, C. Benzene exposure: an overview of monitoring methods and their findings. **Chem Biol Interact**, v. 184, n. 1-2, p. 58-66, 2010.

WILBUR, S. et al. ATSDR evaluation of health effects of benzene and relevance to public health. **Toxicol Ind Health**, v. 24, n. 5-6, p. 263-398, 2008.

WIWANITKIT, V. Classification of risk occupation for benzene exposure by urine trans, trans-munconic acid level. **Asian Pac J Cancer Prev**, v. 7, n. 1, p. 149-150, 2006.

WONG, O. et al. A hospital-based case-control study of acute myeloid leukemia in Shanghai: analysis of environmental and occupational risk factors by subtypes of the WHO classification. **Chem Biol Interact**, v. 184, n. 1-2, p. 112-128, 2010.

ZALACAIN, M.; SIERRASESUMAGA, L.; PATINO, A. The cytogenetic assay as a measure of genetic instability induced by genotoxic agents. **An Sist Sanit Navar**, v. 28, n. 2, p. 227-236, 2005.

ZHANG, J. et al. Analysis of multiple single nucleotide polymorphisms (SNPs) of myeloperoxidase (MPO) to screen for genetic markers associated with acute leukemia in Chinese Han population. **J Toxicol Environ Health A**, v. 70, n. 11, p. 901-907, 2007.

ZHANG, L.; EASTMOND, D. A.; SMITH, M. T. The nature of chromosomal aberrations detected in humans exposed to benzene. **Crit Rev Toxicol**, v. 32, n. 1, p. 1-42, 2002.

ZHAO, Z. et al. The characteristics and immunoregulatory functions of regulatory dendritic cells induced by mesenchymal stem cells derived from bone marrow of patient with chronic myeloid leukaemia. **Eur J Cancer**, v. 48, n. 12, p. 1884-1895, 2012.

ANEXOS

Aceite do Comitê de Ética em Pesquisa

Projetos

<https://www1.ufrgs.br/PortalServidor/Pesquisa/ComissaoUnidade/form...>

Projeto Nº: 21728

Título: AVALIACAO DOS DANOS CAUSADOS PELO BENZENO NO AMBIENTE OCUPACIONAL E SUA INTER-RELACAO COM DIFERENTES BIOMARCADORES

COMITE DE ETICA EM PESQUISA DA UFRGS: Parecer

Os pesquisadores atenderam às solicitações do Comitê de Ética em Pesquisa. E o projeto está aprovado.

CEP/UFRGS

ANEXO II

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido assinado pelos participantes do estudo

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Você está sendo convidado a participar de um estudo intitulado “**AVALIAÇÃO DOS DANOS CAUSADOS PELO BENZENO NO AMBIENTE OCUPACIONAL E SUA INTER-RELAÇÃO COM DIFERENTES BIOMARCADORES**”, que tem como objetivo avaliar os possíveis problemas causados à saúde do trabalhador através da exposição ao benzeno no posto de gasolina. Este estudo é importante para prevenção das possíveis alterações em exames de sangue, urina e material bucal coletado com escova dental.

O estudo será desenvolvido no Laboratório de Toxicologia (LATOX) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul em parceria com o Centro de Vigilância em Saúde e Centros de Referência em Saúde do Trabalhador (CERESTs).

Os pesquisadores responsáveis pelo estudo são a Profa. Dra. Solange Cristina Garcia e a doutoranda Angela Maria Moro da UFRGS. Em qualquer etapa do estudo você terá acesso aos pesquisadores responsáveis para esclarecimento de eventuais dúvidas, fone (51) 33085297. Além disso, a secretária do Comitê de Ética em pesquisa da UFRGS, fone (51) 33083629, também poderá ser contactada para apresentar recursos ou reclamações em relação ao estudo.

Procedimentos a serem realizados

Você deverá realizar coleta de sangue (cerca de 10 ml), urina (cerca de 50 ml) e material bucal coletada com escova. A presença de benzeno no ambiente de trabalho também será avaliada através de um prendedor com filtros que será colocado na gola da camisa. Além disso, você deverá responder a um questionário sobre hábitos de vida e uso de medicamentos. As amostras coletadas serão armazenadas no Laboratório de Toxicologia (LATOX), da Faculdade de Farmácia da UFRGS, sob a responsabilidade da Profa. Dra. Solange Cristina Garcia. Você receberá os resultados de todos os exames laboratoriais realizados no sangue, urina e amostra bucal. A equipe médica dos CERESTs realizarão encaminhamentos, caso seja encontrada qualquer alteração.

Riscos individuais, possibilidade de exclusão e benefícios

A coleta de sangue é um procedimento de baixo risco e desconforto, que será realizada sem nenhum custo ao voluntário. Fica claro que sua participação na pesquisa é voluntária, sendo que você poderá desistir de fazer parte do trabalho a qualquer momento, sem qualquer tipo de constrangimento, restrições ou consequências por parte dos pesquisadores. No caso de aceite, fica claro que não haverá benefício financeiro pela sua participação, nem riscos ou prejuízos à saúde.

Confidencialidade

Os dados desta pesquisa serão disponibilizados aos Centros de Referência em Saúde do Trabalhador (CERESTs) para encaminhamento aos trabalhadores expostos ao benzeno. Além disso, os dados serão utilizados em publicações em revistas médico-científicas, sendo mantida em sigilo a identificação dos participantes.

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas por mim, descrevendo o estudo “**AVALIAÇÃO DOS DANOS CAUSADOS PELO BENZENO NO AMBIENTE OCUPACIONAL E SUA INTER-RELAÇÃO COM DIFERENTES BIOMARCADORES**”. Concordo, voluntariamente, em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer hora, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido.

Identificação do voluntário

Nome: _____

RG (número de identidade): _____

Data: _____, _____ / _____ / _____

Ass. do Responsável pelo estudo

Assinatura do voluntário

Questionário de Avaliação utilizado no estudo

QUESTIONÁRIO DE AVALIAÇÃO

Data: ___/___/___

IDENTIFICAÇÃO

Nome: _____

Telefone: _____

Idade: _____ Data de nascimento: ___/___/___

Etnia: _____

Entrevistador: _____

DADOS GERAIS

Função: _____

Tempo que exerce a função: _____

Número de horas diárias de permanência no trabalho? _____

Turno: (1) Manhã (2) Tarde (3) Noite

Jornada de Trabalho Semanal: _____

Função anterior: _____

Tempo que exerceu a função: _____

EQUIPAMENTOS DE PROTEÇÃO INDIVIDUAL (EPIs)

Uso de EPIs: (1) SIM (2) NÃO

Quais?

Máscaras Respiradoras ()

Óculos de Segurança: ()

Calçados de Segurança: ()

Luvas: ()

Aventais Impermeáveis: ()

DADOS DE DIAGNÓSTICO

Faz uso de medicamentos? Quais? Por quanto tempo?

Faz uso de Polivitamínicos? _____

Apresenta alguns destes sintomas ?

- () dor de cabeça
- () tontura
- () dor de estômago
- () dor pernas
- () irritação olhos
- () irritação nariz
- () irritação pele
- () palpitações
- () bronquite
- () falta de ar
- () rinite alérgica
- () dor coluna
- () cansaço
- () problemas auditivos
- () dor muscular
- () sonolência
- () alteração salivação
- () tremores
- () insônia
- () alteração humor
- () outros sintomas

HÁBITOS DE VIDA

FUMO: () Nunca fumou () Fumante () Ex-fumante

Se sim, quantos cigarros por dia? ____

Com que idade começou a fumar? _____ anos

Ex-fumante

Se sim, quantos cigarros por dia? _____

Há quanto tempo parou de fumar? _____ anos ____ meses

ETILISMO

Faz uso de bebidas alcoólicas? () SIM () NÃO

Qual a frequência, a quantidade e o tipo de bebida (por semana)? _____

Fez uso de bebidas alcoólicas nos últimos 2 dias? Qual? _____