

Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**

**Fundação Oswaldo Cruz**



ESCOLA NACIONAL DE SAÚDE PÚBLICA  
SERGIO AROUCA  
ENSP

Simone Mitri Nogueira

**Polimorfismos metabólicos e alterações clínicas e laboratoriais relacionadas à  
exposição ao benzeno em trabalhadores de postos de combustíveis da cidade do Rio  
de Janeiro**

Rio de Janeiro

2016

Simone Mitri Nogueira

**Polimorfismos metabólicos e alterações clínicas e laboratoriais relacionadas à  
exposição ao benzeno em trabalhadores de postos de combustíveis da cidade do Rio  
de Janeiro**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Saúde Pública e Meio Ambiente, da Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca, na Fundação Oswaldo Cruz, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Orientadores:

Prof.<sup>a</sup> Dra. Paula de Novaes Sarcinelli

Prof. Dr. Josino Costa Moreira

Rio de Janeiro

2016

Catálogo na fonte

Instituto de Comunicação e Informação Científica e Tecnológica

Biblioteca de Saúde Pública

N778p Nogueira, Simone Mitri.

Polimorfismos metabólicos e alterações clínicas e laboratoriais relacionadas à exposição ao benzeno em trabalhadores de postos de combustíveis da cidade do Rio de Janeiro. / Simone Mitri Nogueira. -- 2016.

110 f. : mapa ; ilustr.; tab.; graf.

Orientadores: Paula de Novaes Sarcinelli  
Josino Costa Moreira

Dissertação (doutor) – Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca, Rio de Janeiro, 2016.

1. Benzeno – efeitos adversos. 2. Benzeno – toxicidade. 3. Benzeno – metabolismo. 4. Polimorfismos Metabólicos. 5. Exposição Ocupacional. 6. Posto de Combustível. I. Título.

CDD - 22.ed. – 363.11098153

Simone Mitri Nogueira

**Polimorfismos metabólicos e alterações clínicas e laboratoriais relacionadas à  
exposição ao benzeno em trabalhadores de postos de combustíveis da cidade do Rio  
de Janeiro**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Saúde Pública e Meio Ambiente da Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca, na Fundação Oswaldo Cruz, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Aprovada em: 06 de abril de 2016.

Banca Examinadora

---

Prof. Dr. Jorge Mesquita Huet Machado  
Fundação Oswaldo Cruz – Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca

---

Prof. Dr. Ivano R. V. de Filippis Capa  
Fundação Oswaldo Cruz – Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca

---

Prof.<sup>a</sup> Dra. Rita de Cássia de Oliveira da Costa Mattos  
Fundação Oswaldo Cruz – Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca

---

Prof.<sup>a</sup> Dra. Maria de Fátima Moreira  
Fundação Oswaldo Cruz – Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca

---

Prof.<sup>a</sup> Dra. Paula de Novaes Sarcinelli  
Fundação Oswaldo Cruz – Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca

Rio de Janeiro

2016

Dedico esta tese a minha filha Carolina, minha “*She*”.

“She ... May be the reason I survive  
The why and wherefore I'm alive  
The one I'll care for through the rough and ready years  
Me I'll take her laughter and her tears  
And make them all my souvenirs  
For where she goes I've got to be  
The meaning of my life is”  
Charles Aznavour

## AGRADECIMENTOS

A Deus, meu companheiro de vida e de eternidade.

A minha filha Carolina, que, desde seu nascimento, é uma fonte de alegria, determinação e força para mim.

A minha família, sobretudo a minha mãe, dona Marlene, que é o verdadeiro “pau pra toda obra” da minha vida, que sempre me serve de suporte no árduo caminho que leva às conquistas.

Ao meu “cãopanheiro” Whisky pela constante e tão alegre companhia. Do mesmo modo, ao meu amado Tuttinho, que levou consigo uma parte do meu coração, ao virar estrelinha há dois anos.

Aos meus amigos pelos tão necessários momentos de descontração, nos quais o assunto “tese” apareceu diversas vezes e, estranhamente, de maneira tão leve. Muito obrigada, principalmente a Rosane, Luis e Malú.

Aos colegas do Laboratório de Toxicologia do CESTEJ, pelo prazeroso ambiente de trabalho que compartilhamos.

Aos colegas de trabalho mais próximos, na verdade amigos e grande colaboradores, Thelma, Caroline, Vinício, Cristiane Barata e Enrico.

Aos meus orientadores Dra. Paula de Novaes Sarcinelli e Dr. Josino Costa Moreira por todos os ensinamentos e por todo o tempo e atenção dedicados a mim durante esse tempo. E ao Dr. Josino, um agradecimento particular, por ter me acolhido em sua equipe de trabalho em um momento profissional difícil e delicado para mim.

Um agradecimento especial a Dra. Rita Mattos, pela participação fundamental na fase inicial de elaboração deste trabalho. Muito obrigada, Rita, por todo o incentivo, ajuda e apoio que marcaram o longo tempo em que tive o privilégio de fazer parte de seu grupo de trabalho.

*Aprendi a não tentar convencer ninguém. O trabalho de convencer é uma falta de respeito,  
é uma tentativa de colonização do outro*

**José Saramago**

## RESUMO

A exposição ao benzeno representa um sério problema de Saúde Pública, apesar das medidas de limitação e controle empregadas nas últimas décadas. Os trabalhadores de postos de combustíveis representam uma categoria que vem sendo continuamente exposta a substâncias presentes na gasolina, dentre as quais o benzeno, capaz de causar um conjunto de sinais e sintomas denominado benzenismo, cujo diagnóstico é epidemiológico e clínico baseado na busca de alterações clínicas, principalmente hematológicas. Este estudo avaliou alterações clínicas relacionadas ao benzenismo e seis polimorfismos de genes de metabolização do benzeno em trabalhadores de postos de combustíveis do município do Rio de Janeiro. Os polimorfismos de genes analisados foram: glutathione S-transferase M1 (GSTM1), glutathione S-transferase T1 (GSTT1), citocromo P450 2E1 7632T>A - *DraI* (CYP2E1 7632T>A - *DraI*), citocromo P450 2E1 1053C>T - *RsaI* (CYP2E1 1053C>T - *RsaI*), NADPH-quinona oxidoreductase 1 (NQO1) e mieloperoxidase (MPO). A população foi categorizada em dois grupos, de acordo com a presença das alterações clínicas, principalmente sinais hematológicos. A maioria dos trabalhadores, 63,2%, apresentou alterações clínicas compatíveis com o benzenismo. Estes trabalhadores mostraram diminuição na contagem de células sanguíneas, com diferença significativa para os valores de neutrófilos e MCV (indicativo de macrocitose). Este grupo mostrou maior frequência de sintomas como cefaléia, infecções repetidas, câimbras musculares, formigamentos, sonolência, tontura e perda de peso, embora nem todos com diferença significativa. Dos seis polimorfismos metabólicos analisados, GSTM1, GSTT1 e CYP2E1 7632T>A mostraram frequências mais altas dos alelos relacionados ao risco entre os trabalhadores com alterações clínicas. Foi observada uma associação entre as alterações clínicas relacionadas ao benzenismo e o genótipo nulo da GSTM1 e também com maior número de alelos relacionados ao risco (em conjunto). Entretanto, estudos baseados em maior tamanho amostral, são necessários para confirmação destes achados. Variações em genes de metabolização do benzeno devem ser consideradas nos estudos de avaliação de risco de trabalhadores expostos, por serem capazes de modificar a toxicidade do composto.

Palavras-chave: Polimorfismos genéticos. Metabolismo do benzeno. Benzenismo. Saúde Ocupacional. Trabalhadores de postos de combustíveis.



## ABSTRACT

Exposure to benzene, especially in developing countries like Brazil, continues to represent a serious Public Health problem despite limiting exposure measures used in recent decades. The gas station workers represent a category that has been continuously exposed to substances present in gasoline, especially benzene, which can cause a number of signs and symptoms which characterize the benzene poisoning. The diagnosis of benzene poisoning is epidemiological and clinical, based on the search for clinical findings, mainly hematologic. This study evaluated clinical alterations related to benzene poisoning and six polymorphisms of benzene metabolism genes in gas station workers in the city of Rio de Janeiro. The glutathione S-transferase M1 (GSTM1), glutathione S-transferase T1 (GSTT1), cytochrome P450 2E1 7632T>A - *DraI* (CYP2E1 7632T>A - *DraI*), cytochrome P450 2E1 1053C>T - *RsaI* (CYP2E1 1053C>T - *RsaI*), NADPH-quinone oxidoreductase 1 (NQO1) and myeloperoxidase (MPO). metabolic polymorphisms of benzene were analyzed in this study. The population was categorized into two groups according to the presence of clinical changes, hematological signs mainly. Most workers presented clinical findings, 63.2%. These workers showed a decrease in blood cells count, with a significant difference to the values of neutrophils and Mean Corpuscular Volume (MCV) (indicative of macrocytosis). This group showed a higher frequency of symptoms such as headache, repeated infections, muscle cramps, tingling, drowsiness, dizziness and weight loss, although not all with significant differences. The frequencies of alleles related to risk were higher in the group with clinical findings for GSTM1, GSTT1, CYP2E1 7632T>A genotypes. Moreover, an association was found between alterations related to benzene poisoning and GSTM1 null and the highest number of alleles related to risk. Further studies of larger samples are needed to confirm these findings. Variations in benzene metabolizing genes may modify benzene toxicity and should be taken into consideration during risk assessment evaluations.

Keywords: Genetic polymorphisms. Benzene metabolism. Benzene poisoning. Occupational health. Gas station workers.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Estrutura química molecular do benzeno.....	18
Figura 2 -	Principais vias bioquímicas de metabolização do benzeno.....	20
Figura 3 -	Vias de diferenciação hematopoiética. Linhagem mielóide e linhagem linfóide.....	23
Figura 4 -	Liberação de poluentes no ambiente por parte de postos de combustíveis.....	29
Figura 5 -	Fontes de liberação de combustível não queimado em postos de combustíveis durante o abastecimento de veículos automotores.....	35
Figura 6 -	Limites internacionais de benzeno na gasolina.....	37
Figura 7 -	Locus do gene CYP2E1. Cromossomo 10q24.3.....	48
Figura 8 -	Variação polimórfica do CYP2E1 <i>RsaI</i> e efeitos.....	49
Figura 9 -	Variação polimórfica do CYP2E1 <i>DraI</i> e efeitos.....	50
Figura 10 -	Variação polimórfica do MPO e efeitos.....	52
Figura 11 -	Locus do gene NQO1. Cromossomo 16q22.1.....	53
Figura 12 -	Variação polimórfica do NQO1 e efeitos.....	54
Figura 13 -	Etapas da genotipagem para determinação dos polimorfismos.....	61
Figura 14 -	Comparação dos sintomas relacionados ao benzenismo entre os grupos TS e TC.....	76
Figura 15 -	<i>PCR</i> e digestão para genotipagem da NQO1.....	78
Figura 16 -	<i>PCR</i> e digestão para genotipagem da MPO.....	79
Figura 17 -	<i>PCR</i> e digestão para genotipagem da CYP2E1 <i>DraI</i> .....	80
Figura 18 -	<i>PCR</i> e digestão genotipagem da CYP2E1 <i>RsaI</i> .....	81
Figura 19 -	<i>PCR</i> para genotipagem de GSTM1 e GSTT1.....	82
Quadro 1 -	Efeitos hematotóxicos relacionados ao benzeno.....	24

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Limite de aromáticos e de benzeno na gasolina produzida no Brasil.....	37
Tabela 2 -	Distribuição dos 114 trabalhadores nos postos de combustíveis.....	59
Tabela 3 -	Condições de amplificação e digestão dos fragmentos polimórficos analisados no estudo.....	62
Tabela 4 -	Características sociodemográficas da população estudada.....	67
Tabela 5 -	Dados ocupacionais da população estudada.....	69
Tabela 6 -	Dados sociodemográficos dos grupos TS e TC da população estudada..	73
Tabela 7 -	Dados ocupacionais dos grupos TS e TC da população estudada.....	74
Tabela 8 -	Valores hematológicos observados nos grupos TS e TC.....	75
Tabela 9 -	Frequências genótípicas e alélicas dos polimorfismos analisados na população estudada.....	83
Tabela 10 -	Frequências dos alelos variantes encontradas nos grupos TS e TC.....	85

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A	Adenina
ABIQUIM	Associação Brasileira da Indústria Química
ACGIH	American Conference of Governmental Industrial Hygienists
ANP	Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis
ATSDR	Agency for Toxic Substances and Disease Registry
BQ	Benzoquinona
C	Citosina
CESAT	Centro Estadual de Referência à Saúde do Trabalhador
CYP	Citocromo P450
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTPs	Desoxirribonucleotídeos fosfatados
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EPA	Environmental Protection Agency
EPI	Equipamento de Proteção Individual
G	Guanina
GST	Glutathione S-transferase
HQ	Hidroquinona
IARC	International Agency for Research on Cancer
IBE	Indicador Biológico de Exposição
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
INCA	Instituto Nacional do Câncer
MgCl <sub>2</sub>	Cloreto de magnésio
MPO	Mieloperoxidase
NIOSH	National Institute for Occupational safety and Health
NQO1	NADPH: quinona oxidoreductase 1
OR	Odds ratio
OSHA	Occupational safety and Health Administration
pb	Pares de base
PCR	Polimerase Chain Reaction
PCR-RFLP	Polimerase Chain Reaction-Restriction-Fragment Length Polymorphisms

ppb	Partes por bilhão
RNA	Ácido ribonucléico
SINPOSPETRO-	Sindicato dos Empregados em Postos de Serviço de Combustíveis e
RJ	Derivados de Petróleo do Estado do Rio de Janeiro
SMS-VR	Secretaria Municipal de Saúde - Volta Redonda
S-PMA	Ácido fenil mercaptúrico
T	Timina
t,t-MA	Ácido trans, trans mucônico
TC	Trabalhadores com alterações clínicas relacionadas ao benzenismo
TLV-TWA	Threshold Limit Value Time Weighted Average
TS	Trabalhadores sem alterações clínicas relacionadas ao benzenismo
VGM	Volume Globular Médio
WHO	World Health Organization
8-OHdG	8-hidroxi-2'-desoxiguanosina

## SUMÁRIO

1	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	14
2	<b>REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	17
2.1	<b>Benzeno</b> .....	17
2.2	<b>Toxicocinética do benzeno</b> .....	18
2.3	<b>Toxicodinâmica do benzeno</b> .....	21
2.3.1	<i>Efeitos adversos sobre a saúde humana</i> .....	21
2.3.2	<i>Mecanismos de ação do benzeno</i> .....	26
2.4	<b>Exposição ao benzeno</b> .....	27
2.4.1	<i>Exposição ambiental</i> .....	28
2.4.2	<i>Exposição ocupacional</i> .....	30
2.4.3	<i>Exposição ao benzeno em postos de combustíveis</i> .....	33
2.5	<b>Avaliação da exposição ao benzeno</b> .....	38
2.5.1	<i>Indicadores de exposição ao benzeno</i> .....	38
2.5.1.1	<i>Benzeno no ar exalado, na urina e no sangue</i> .....	39
2.5.1.2	<i>Fenol urinário</i> .....	40
2.5.1.3	<i>Ácido trans, trans-mucônico urinário (t,t-MA)</i> .....	40
2.5.1.4	<i>Ácido fenil mercaptúrico – S-PMA</i> .....	41
2.5.1.5	<i>Catecol e hidroquinona na urina</i> .....	42
2.5.1.6	<i>Biomarcadores de citotoxicidade e de genotoxicidade</i> .....	42
2.5.2	<i>Avaliação clínica: sinais e sintomas relacionados ao benzeno</i> .....	44
2.5.2.1	<i>Sinais hematológicos</i> .....	44
2.5.2.2	<i>Sintomas</i> .....	45
2.6	<b>Polimorfismos metabólicos do benzeno como fatores de susceptibilidade genética</b> .....	45
2.6.1	<i>Citocromo P450 2E1 – CYP2E1</i> .....	47
2.6.2	<i>Mieloperoxidase</i> .....	51
2.6.3	<i>NAD(P)H:quinona oxidoreductase 1 – NQO1</i> .....	53
2.6.4	<i>Glutathione S-Transferase T1 e M1 – GSTT1 e GSTM1</i> .....	55
3	<b>OBJETIVOS</b> .....	57
3.1	<b>Geral</b> .....	57
3.2	<b>Específicos</b> .....	57

4	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	58
4.1	<b>População estudada e coleta de amostras</b> .....	58
4.2	<b>Avaliação clínica das alterações relacionadas à intoxicação por benzeno</b> .....	60
4.3	<b>Análise molecular dos polimorfismos metabólicos</b> .....	60
4.3.1	<i>Genotipagem da CYP2E1 DraI</i> .....	63
4.3.2	<i>Genotipagem da CYP2E1 RsaI</i> .....	63
4.3.3	<i>Genotipagem da MPO</i> .....	64
4.3.4	<i>Genotipagem da NQO1</i> .....	64
4.3.5	<i>Genotipagem da GSTT1 e GSTM1</i> .....	64
4.4	<b>Análise estatística</b> .....	65
5	<b>RESULTADOS</b> .....	66
5.1	<b>Caracterização da população estudada</b> .....	66
5.2	<b>Avaliação clínica da população estudada</b> .....	75
5.3	<b>Análises moleculares</b> .....	77
5.3.1	<i>Determinação dos polimorfismos</i> .....	77
5.3.2	<i>Frequências genotípicas e alélicas dos polimorfismos</i> .....	83
6	<b>DISCUSSÃO</b> .....	86
7	<b>CONCLUSÕES</b> .....	92
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	93
	<b>ANEXO – ARTIGO PUBLICADO EM REVISTA CIENTÍFICA</b> .....	110

## 1 INTRODUÇÃO

Não obstante à implementação de medidas de prevenção e controle, como mudanças na legislação, que vêm contribuindo para diminuir os níveis de exposição ao longo das últimas décadas, a exposição ao benzeno continua representando um grave problema de Saúde Ocupacional, principalmente em países em desenvolvimento como o Brasil (COUTRIM et al., 2000; COSTA et al., 2002; WEISEL, 2010; WANG et al., 2012).

Os postos de revenda e distribuição de combustíveis apresentam um sério potencial contaminante para seus trabalhadores, especialmente do ponto de vista das exposições a substâncias químicas perigosas, como o benzeno, presente na gasolina, amplamente comercializada nestes locais e manipulada pelos milhares de trabalhadores desta categoria. A gasolina, como combustível, é uma mistura complexa de diversos hidrocarbonetos, dentre os quais estão os compostos aromáticos, sendo o benzeno o mais perigoso deles devido ao seu potencial carcinogênico e por ser um contaminante universal (IARC, 1989; WHO, 1993; ACGIH, 2003; TIBURTIUS et al., 2004). Os efeitos potenciais do benzeno à saúde estão relacionados a sua toxicidade intrínseca e às características da exposição, como a estrutura química do composto, a quantidade inalada, a frequência da exposição, exposições múltiplas e fatores de suscetibilidade inter individual.

O benzeno é capaz de causar uma série de efeitos adversos ao organismo, incluindo danos hematológicos, genotóxicos e o desenvolvimento de cânceres, especialmente a leucemia mieloide aguda. Tendo em vista que a medula óssea é o principal alvo da toxicidade do composto, as alterações hematológicas se constituem no principal sinal clínico da intoxicação (SNYDER et al., 2000; KRIEG et al., 2012). Achados



hematológicos observados isolados ou em conjunto, tais como anemia, neutropenia, leucopenia, eosinofilia, linfocitopenia, monocitopenia, macrocitose, pontilhado basófilo, pseudo Pelger (hipossegmentação dos neutrófilos) e plaquetopenia compõem os dados laboratoriais hematológicos mais significativos (RUIZ, 1987; RUIZ et al., 1993; RUIZ et al., 1994; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006; D'ALASCIO et al., 2014). Adicionalmente, a busca dos sintomas comuns ao quadro de alterações clínicas, como mialgia, sonolência, cefaleia, tonturas e tremores, também faz parte da investigação da intoxicação por benzeno (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006; D'ALASCIO et al., 2014).

Uma vez absorvido, no organismo, o benzeno passa por um processo de metabolização, que ocorre, sobretudo, no fígado e na medula óssea, no qual são gerados diversos metabólitos intermediários reativos apontados pela literatura científica como sendo responsáveis por grande parte dos efeitos tóxicos dessa substância (GARTE et al., 2008; BARRY et al., 2011; CARRIERI et al., 2012; WANG et al., 2012; DE PALMA et al., 2013). O sistema bioquímico de metabolização do benzeno é composto por um aparato enzimático complexo que inclui enzimas de ativação e de detoxificação, a maioria das quais apresenta polimorfismos funcionais que vêm sendo investigados como fatores de susceptibilidade genética à exposição, por serem capazes de conferir vulnerabilidade diferenciada a indivíduos submetidos, muitas vezes, a níveis similares de exposição ao benzeno (GARTE et al., 2008; CARBONARI et al., 2014; DE PALMA et al., 2014). De fato, diversos estudos têm mostrado que trabalhadores expostos ao benzeno podem apresentar uma larga faixa de variação nos níveis de biomarcadores (KIM et al., 2007; CARRIERI et al., 2012; CARBONARI et al., 2014).

Os polimorfismos metabólicos se devem a variações nos genes codificantes das enzimas de metabolização de xenobióticos, e, no caso do benzeno, as enzimas CYPs (especialmente a subfamília CYP2E1), MPO, GSTs (principalmente as isoformas GSTT1 e GSTM1) e a NQO1 se destacam como objetos de estudos concernentes à vulnerabilidade genética ao benzeno (CHEN et al., 2007; DOUGHERTY et al., 2008; WEISEL, 2010; BARRY et al., 2011).

Tais variações podem alterar significativamente a toxicidade do benzeno e têm sido incorporadas à execução e interpretação de estudos realizados em populações expostas, por tornarem o processo mais amplo e abrangente. Com esta perspectiva, pesquisadores de várias instituições de nível internacional têm investigado genes associados à susceptibilidade individual a fim de identificar e proteger subgrupos mais vulneráveis de populações expostas, especialmente no que diz respeito às exposições ocupacionais (DOUGHERTY et al., 2008; CARRIERI et al., 2012; WANG et al., 2012; DE PALMA et al., 2014).

A susceptibilidade individual a xenobióticos, incluindo o benzeno, não está restrita apenas aos fatores genéticos. O gênero, a idade, estilo de vida, uso de cigarro e álcool, dentre outros, são exemplos de fatores de natureza não genética capazes de influenciar no desenvolvimento dos efeitos da exposição e, também fizeram parte deste estudo (WAN et al., 2006; AMORIM, 2003; SUN et al., 2008).

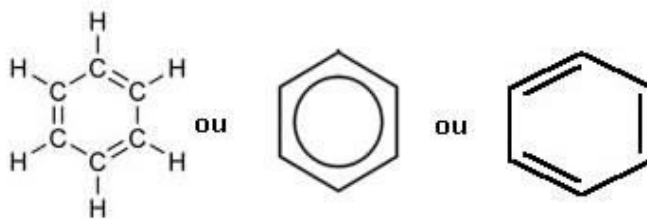
## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Benzeno

O benzeno é um composto químico de fórmula  $C_6H_6$  (figura 1), classificado como hidrocarboneto aromático, apresentando-se como um líquido, incolor, volátil, altamente inflamável, explosivo, solúvel em solventes orgânicos (ATSDR, 2007; KLAASSEN, 2012).

O benzeno é encontrado principalmente no petróleo, podendo ser oriundo também da siderurgia como produto secundário do coque (COSTA et al., 2002; KLAASSEN et al., 2012; WANG et al., 2012). Devido às suas características, o benzeno é amplamente utilizado em diversos processos industriais desde a I Guerra Mundial, podendo ser encontrado em produtos como combustíveis, desengraxantes, misturas com tintas, vernizes, “thinners”, colas, óleos, adesivos, compostos usados na fabricação de calçados e artigos de couro, oficinas mecânicas, pinturas, indústria gráfica, limpeza e aplicação de carpetes, além de ser matéria prima em processos de síntese de uma variedade de produtos da indústria química, como plásticos, borracha, cosméticos, medicamentos e na extração de óleos e gorduras (AUGUSTO, 1991; WEISEL, 2010; WANG et al., 2012). Além disso, o benzeno também pode ser proveniente de emissões antropogênicas não industriais, como gases de escapamento de veículos automotores, queimadas e fumaça de cigarro (COUTRIM et al., 2000; WEISEL, 2010).

Figura 1 - Estrutura química molecular do benzeno. Fórmula estrutural do anel aromático



Fonte: GOOGLE, 2016.

## 2.2 Toxicocinética do benzeno

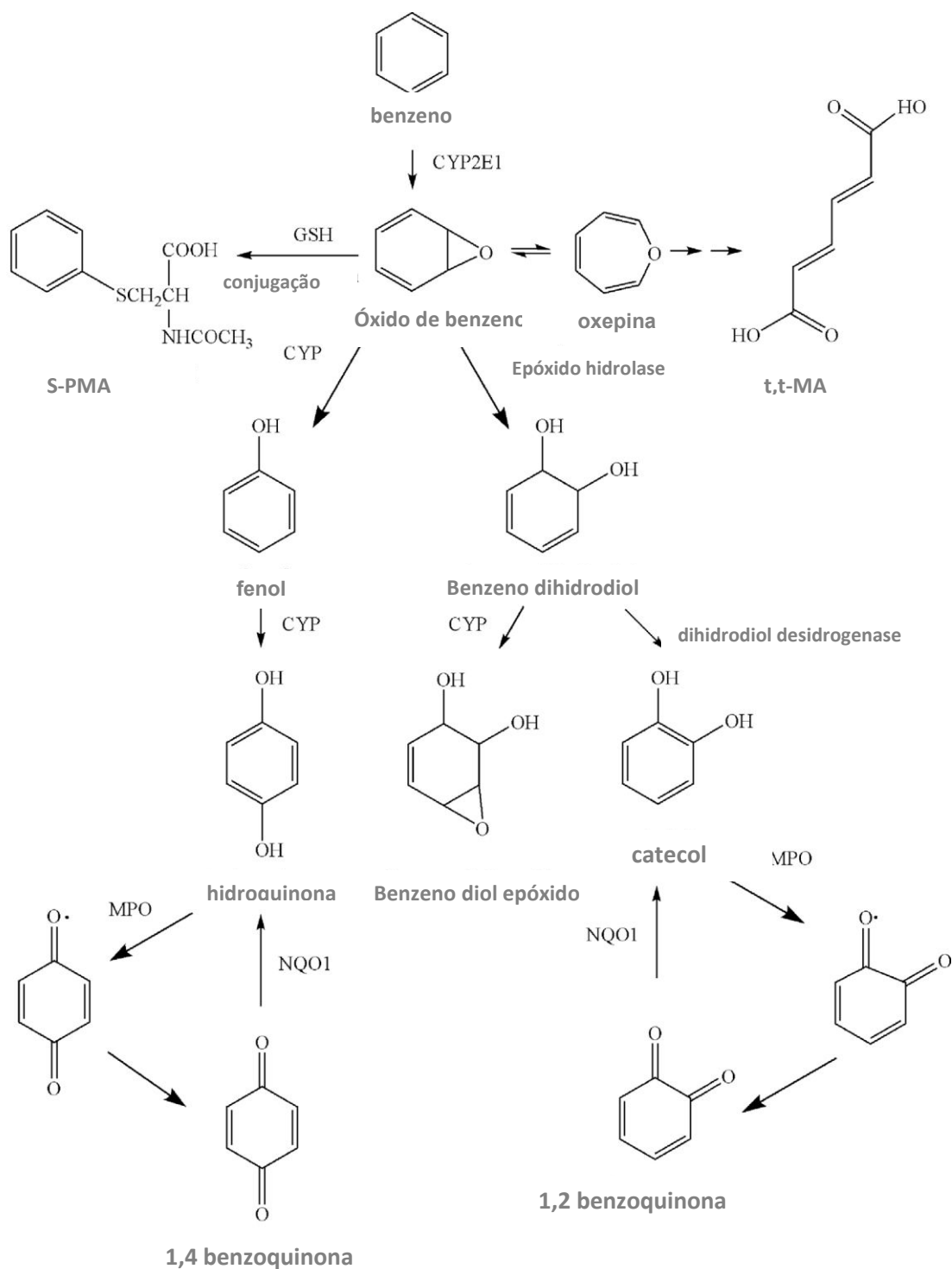
Uma vez em contato com o organismo, o benzeno é absorvido principalmente pelas vias inalatória e oral (JOHNSON et al., 2007; KLASSEN et al., 2012). A absorção pela via cutânea é menos expressiva, mas também pode ocorrer, especialmente se o composto estiver em sua forma líquida (WEISEL, 2010; KLASSEN et al., 2012). A maior parte do benzeno inalado é eliminada pela expiração, uma fração do que é absorvido é biotransformada e a outra permanece inalterada no sangue, rins e, sobretudo, nos tecidos gordurosos, sendo eliminada pela urina e pelos pulmões através da respiração (CANDURA et al., 1995; COUTRIM et al., 2000).

O metabolismo do benzeno ocorre predominantemente no fígado, embora a biotransformação sofrida na medula óssea exerça um papel-chave na toxicidade do composto. No fígado são formados intermediários conjugados fenólicos os quais são transportados pela corrente sanguínea até a medula óssea, onde são hidrolisados e oxidados a quinonas tóxicas (KLAASSEN et al., 2012).

A figura 2 representa um esquema simplificado das vias bioquímicas de metabolização do benzeno em humanos. O primeiro passo envolve a oxidação do benzeno, através da CYP2E1, a óxido de benzeno, que fica em equilíbrio com seu tautômero oxepina. A maior parte de óxido de benzeno é transformada, por rearranjo espontâneo, em fenol, o qual pode ser diretamente excretado ou transformado em hidroquinona também pela CYP2E1, e esta, por sua vez, em 1,4 benzoquinona, através da enzima MPO. O restante de óxido de benzeno é hidrolisado em catecol e 1,2 benzoquinona ou reage com a glutatona para produzir ácido fenil mercaptúrico (S-PMA), ou ainda, pela ação da epóxido hidrolase, pode passar a benzeno dihidrodiol que, por sua vez, é transformado em catecol e 1,2-benzoquinona pela dihidrodiol desidrogenase. O metabolismo de oxepina ocorre também através da família CYP, que o converte em muconaldeído e ácido E,E-mucônico, que por sua vez é convertido em ácido trans,trans-muconaldeído por ação da enzima aldeído desidrogenase e este, por fim, é transformado em t,t-MA (WAN et al., 2002; WANG et al., 2012; DE PALMA et al., 2013).

A eliminação do benzeno pode acontecer através da respiração, entretanto, ocorre quase que totalmente pela urina, sendo a maior parte como fenol (70-85%), seguido de catecol, hidroquinona e t, t-MA (de 5 a 10%) e S-PMA (< 1%) (WANG et al., 2012; RAPPAPORT et al., 2010).

Figura 2 - Principais vias bioquímicas de metabolização do benzeno



Fonte: Adaptado de JOHNSON et al., 2007.

## 2.3 Toxicodinâmica do benzeno

### 2.3.1 *Efeitos adversos sobre a saúde humana*

Os efeitos potenciais do benzeno no organismo estão relacionados às condições da exposição e a sua toxicidade intrínseca, como a estrutura química do composto, a quantidade absorvida, a frequência e nível da exposição, a ocorrência de exposições múltiplas e suscetibilidade individual.

O benzeno é capaz de causar uma série de efeitos adversos à saúde humana, e o conjunto de sinais, sintomas e complicações decorrentes da intoxicação recebe o nome de benzenismo. O diagnóstico do benzenismo de natureza ocupacional é eminentemente clínico e epidemiológico, se fundamentando no histórico da exposição ocupacional e na observação de sintomas e sinais clínicos e laboratoriais (RUIZ et al., 1993; BRASIL, 2003; BRASIL, 2006).

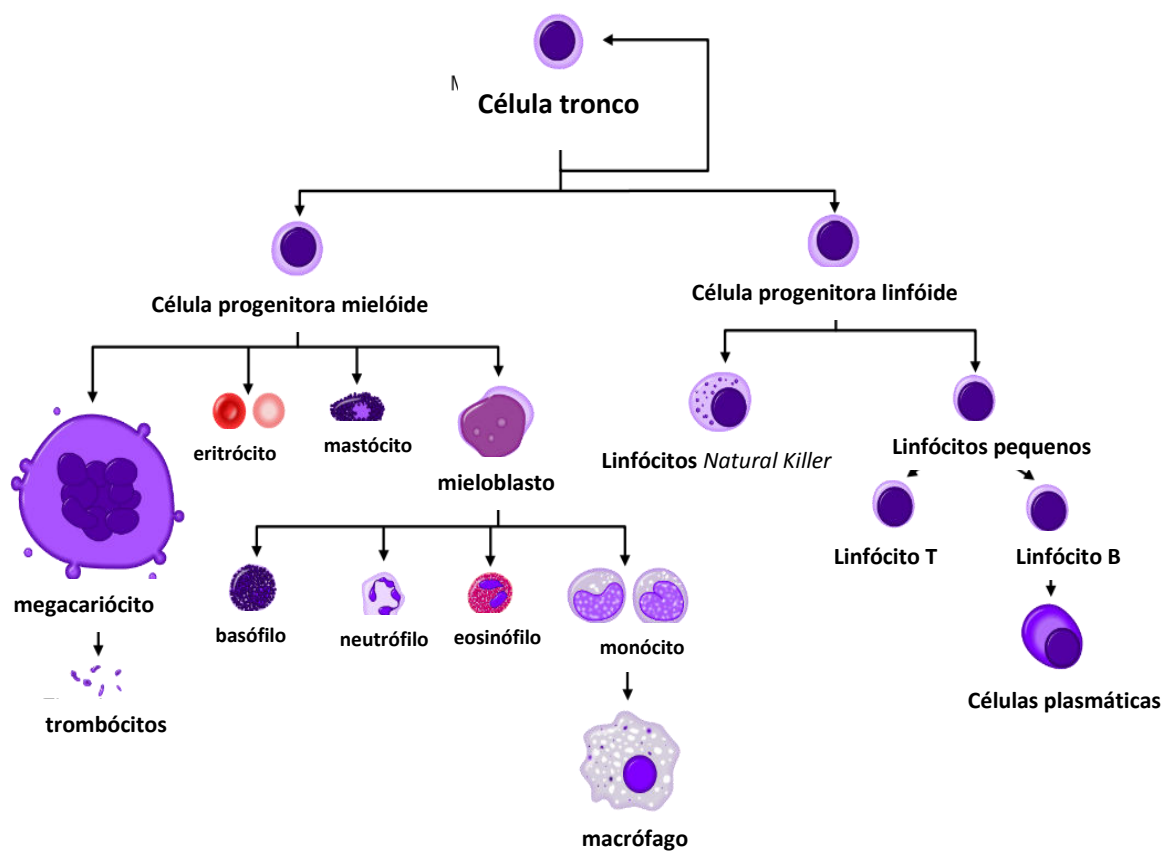
Nos casos das intoxicações agudas, o benzeno exerce seus efeitos sobre o Sistema Nervoso Central (SNC), podendo causar, dependendo da quantidade absorvida, narcose e excitação seguida de sonolência, tonturas, tremores, cefaleia, náuseas, taquicardia, dificuldade respiratória, convulsões, perda da consciência e até a morte. Além disso, o benzeno é um irritante moderado de mucosas oculares e respiratórias, onde pode causar edema pulmonar se for aspirado em altas concentrações (RUIZ et al., 1993).

Nas intoxicações crônicas podem ser observados danos, principalmente, ao sistema hematopoiético (figura 3), como hipoplasia, aplasia e displasia de medula óssea. De fato, a hemotoxicidade do benzeno tem sido reportada mesmo em níveis baixos de exposição

(MANUELA et al., 2012; WANG et al., 2012; ZHANG et al., 2014; YE et al., 2015). A hipoplasia da medula óssea leva a um quadro de citopenias no sangue periférico, com leucopenia, onde a neutropenia aparece como a principal repercussão hematológica da hipoplasia proveniente da exposição ao benzeno e plaquetopenia isolada ou associada à neutropenia. Estudos realizados com medula óssea de trabalhadores com benzenismo têm reportado uma relação entre a neutropenia periférica e a hipoplasia granulocítica. A aplasia da medula óssea é evidenciada no sangue periférico através de pancitopenia: leucopenia, plaquetopenia e anemia aplástica (Quadro 1) (WAKAMATSU, 1976; SNYDER et al., 2002; ROSS et al., 2011). As intoxicações crônicas a baixas doses representam o maior problema atual da exposição ao benzeno, tendo sido alvo de grande preocupação.



Figura 3 - Vias de diferenciação hematopoiética. Linhagem mieloide e linhagem linfóide.



Fonte: Adaptado de GREIM et al., 2014.

Quadro 1 - Efeitos hematotóxicos relacionados ao benzeno.

---

**Condições hematopoiéticas adversas associadas a exposições ao benzeno**

---

**Hematotoxicidade**

---

Anemia

Leucopenia

Trombocitopenia

Anemia aplástica

Leucemia mielogênica aguda

Síndrome mielodisplásica

Disfunções imunes

Mieloma múltiplo

Linfoma não-Hodkin

Mielofibrose

---

Fonte: ATSDR, 2007.

O sistema imune também é afetado pelo benzeno. A literatura reporta agravos tanto aos componentes humorais quanto celulares do sistema, onde podem ser observados decréscimos nos níveis de anticorpos e leucócitos (ATSDR, 2007; SHEN et al., 2011). A supressão das funções imunológicas relacionadas ao benzeno foi observada em estudos recentes de sua toxicidade, nos quais a exposição a certos níveis do composto foi capaz de provocar depressão de medula óssea e apoptose de células sanguíneas, alterando a

expressão e secreção de citocinas imunitárias e inflamatórias e de fatores de crescimento (SNYDER, 2002; WANG et al., 2012).

A exposição ao benzeno também pode causar distúrbios neurológicos e neuropsicológicos, onde podem ser observadas alterações de atenção, percepção, memória, habilidade motora, viso-espacial, viso-construtiva, função executiva, raciocínio lógico, linguagem, aprendizagem e humor. Disfunções cognitivas como astenia, cefaleia, depressões, insônia, agitação e alterações de comportamento também são relatadas. Em relação ao sistema auditivo, podem ocorrer perdas auditivas neurosensoriais, zumbidos, vertigens e dificuldades no processamento auditivo (WAKAMATSU, 1976).

O benzeno é um composto carcinogênico classificado pela Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (IARC) como Reconhecidamente Carcinogênico para Humanos – grupo I (IARC, 1989). O caráter leucemogênico do benzeno é amplamente reconhecido, sendo a leucemia mielóide aguda a forma mais comum da doença. Entretanto, levando em consideração a plausibilidade biológica, outras leucemias podem ser atribuídas à exposição, mas a baixa frequência de notificações tem dificultado a comprovação de associação estatística. Segundo estimativas da WHO (1996), são esperados 6 casos de leucemia para 1 milhão de habitantes, nos casos de exposição de populações urbanas (GU et al., 2007). Além disso, a toxicidade do benzeno também tem sido relacionada a outras patologias onco-hematológicas, como linfoma não-Hodgkin, mieloma múltiplo e mielofibrose, embora em menor frequência (BRASIL, 2006) (quadro 1). Por não haver limite seguro de exposição para substâncias carcinogênicas e genotóxicas, a exposição ao benzeno demanda maior controle e precaução (JOHNSON et al., 1992; SCHERER et al., 1995; COUTRIM et al., 2000). A WHO (1993) apresentou uma estimativa de que para

uma exposição de populações urbanas a concentrações em torno de  $1 \mu\text{g m}^{-3}$  de benzeno no ar atmosférico, são esperados 4 casos de leucemia por milhão de habitantes.

### 2.3.2 *Mecanismos de ação do benzeno*

Os mecanismos de ação do benzeno, principalmente de sua hematotoxicidade e carcinogenicidade, ainda não estão completamente elucidados, mas é de conhecimento geral que a medula óssea é o órgão-alvo de sua toxicidade específica (WHO, 1993; SNYDER et al., 1993; WANG et al., 2012; CARBONARI et al., 2014).

O benzeno é considerado uma substância não reativa devido a sua estrutura química de anel aromático fechado, de modo que o processo de metabolização é importante para sua ação tóxica, principalmente sobre o sistema hematopoiético, bem como seu potencial carcinogênico (SNYDER et al., 1996; ROSS, 2000; WANG et al., 2012). Estudos afirmam que propriamente o benzeno não possui atividade mutagênica e citotóxica, que esta ação se deve a seus metabólitos tóxicos (RAPPAPORT et al., 2010; YE et al., 2015). Determinados metabólitos do benzeno são genotóxicos e citotóxicos, sendo capazes de danificar, especialmente células hematopoiéticas, através de mecanismos já bem conhecidos, como aberrações cromossômicas, ligação covalente a macromoléculas e indução de mutação genética; e de outros meios recentemente identificados, como a alteração de expressão gênica, estresse oxidativo, indução à apoptose celular, erros nos sistemas de reparo de DNA, regulação e supressão imunológica e ações epigenéticas (SCHRENK et al., 1996; WAN et al., 2002; WANG et al., 2012). Acredita-se que mecanismos epigenéticos contribuam para a carcinogenicidade e hematotoxicidade

induzida pelo benzeno (BACCARELLI et al., 2009). De fato, alterações nos padrões de metilação de DNA foram observadas em populações expostas a baixas doses da substância, incluindo policiais de trânsito e trabalhadores de postos de revenda de gasolina (BOLLATI et al., 2007).

Diversos autores afirmam que o estresse oxidativo é um dos principais mecanismos da toxicidade induzida pelo benzeno, sua ocorrência relacionado à ação dos intermediários reativos do xenobiótico, especialmente a p-benzoquinona tem sido reportada pela literatura (Snyder et al., 1996; Atkinson, 2009). O estresse oxidativo provocado pelo benzeno pode danificar macromoléculas através de vários mecanismos, incluindo a oxidação de bases nitrogenadas da molécula de DNA, nas quais os intermediários BQ, HQ e 1,2,4-tri-hidroxibenzeno induzem à formação de 8-OHdG; quebras nas fitas DNA e mutações; indução de recombinação homóloga; e danos às mitocôndrias (KOLACHANA et al., 1993; WIEMELS et al., 1999; SHEN et al., 2008). Em baixos níveis de exposição, vários biomarcadores de estresse oxidativo têm se mostrado significativamente aumentados em indivíduos expostos ao benzeno, quando comparados com não expostos (SNYDER et al., 1993; SORENSEN et al., 2003; BUTHBUMRUNG et al., 2008; MANINI et al., 2010; SPATARI et al., 2012; ANDREOLI et al., 2012; MORO et al., 2013).

## **2.4 Exposição ao benzeno**

A exposição ao benzeno vem diminuindo ao longo das últimas décadas, mas ainda representa um sério problema de Saúde Pública, sobretudo no âmbito ocupacional, de forma crônica a baixas doses (COSTA et al., 2002; WEISEL, 2010; WANG et al., 2012).

#### 2.4.1 *Exposição ambiental*

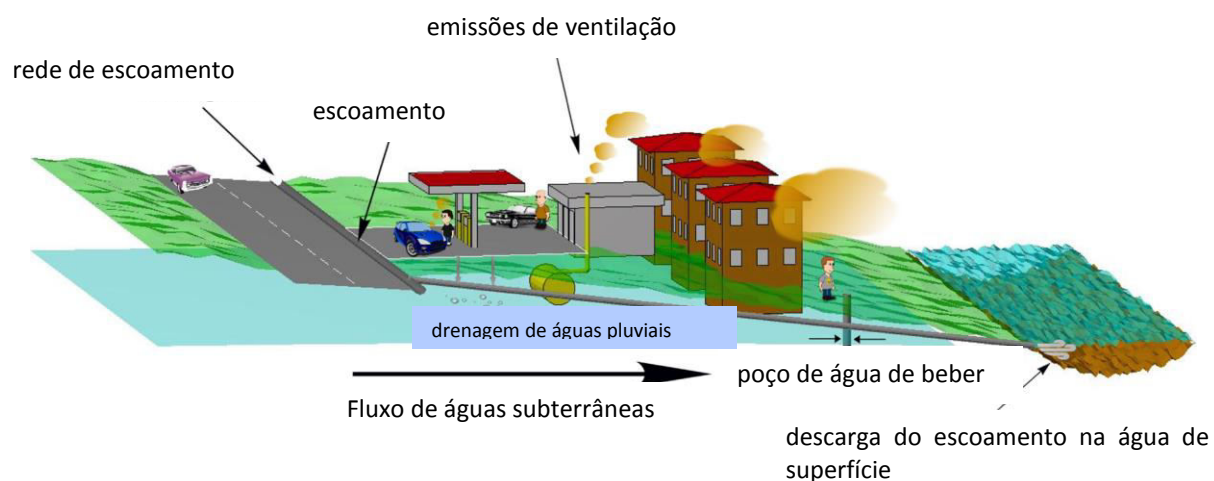
O benzeno é considerado um contaminante global e sua concentração atmosférica varia de acordo com a localização das fontes emissoras, de modo que locais próximos ou com aglomeração de várias fontes apresentam concentrações mais elevadas, podendo ser superiores a  $10 \text{ mg dm}^{-3}$  (BARATA-SILVA et al., 2014). As principais fontes de exposição ambiental ao benzeno são o cigarro (fumo ativo ou passivo), emissões industriais, emissões de veículos automotivos e vapores da gasolina provenientes de veículos automotores ou de postos de abastecimento de combustíveis, bem como a contaminação de água e solo adjacentes aos postos (GALBRAITH et al., 2000; COSTA et al., 2002; CARRIERI et al., 2012).

A exposição de populações circunvizinhas aos postos de combustíveis também tem sido uma preocupação para a Saúde Pública. Esta exposição ocorre, principalmente, devido à liberação cumulativa de combustível nos postos, os quais são amplamente distribuídos em áreas residenciais (figura 4) (JOHNSON et al., 2007; WEISEL, 2010; HILPERT et al., 2015). O número de indivíduos potencialmente expostos não se restringe à população residente, pois a circulação diária de pessoas de passagem pelos locais, também deve ser considerada (MOURA-CORREA et al., 2014). Vários estudos examinaram as concentrações de benzeno em áreas do entorno de postos. Um estudo canadense reportou níveis médios de benzeno de 146 ppb no verão e 461 ppb no inverno nos limites de postos de gasolina (AKLAND, 1993).

Pesquisadores sul-coreanos analisaram as concentrações de benzeno no interior e exterior de residências situadas a distâncias de 30, 60 e 100 m de postos e encontraram valores médios de 9, 9 e  $6 \text{ mg m}^{-3}$  de benzeno no ar, respectivamente, com concentrações mais elevadas no interior das residências (JO et al., 1999). Outro trabalho observou níveis

médios de benzeno no ar de 1,9 ppb, tanto em residências localizadas a menos de 50 m, quanto nas casas distando mais de 100 m dos postos (JO et al., 2001).

Figura 4 - Liberação de poluentes no ambiente por parte de postos de combustíveis.



Fonte: Adaptado de HILPERT et al., 2015.

O cigarro é a principal fonte de exposição não ocupacional ao benzeno (Fustinoni et al., 2005). Os indivíduos fumantes ingerem cerca de 40-80 µg de benzeno em cada cigarro e podem apresentar uma carga corpórea de 6 a 10 vezes maior que os não fumantes (GALBRAITH et al., 2010; KLAASEEN et al., 2012).

Outras possíveis vias são o solo, a água e os alimentos. A Agência de Proteção Ambiental Norte Americana (EPA) estabelece o valor de 5µg L<sup>-1</sup> de benzeno em água potável como limite máximo, o qual também foi adotado pelo Brasil em dezembro de 2011, através da portaria nº 2914 (ATSDR, 2007; ATKINSON, 2009; ARNOLD et al., 2013; BARATA-SILVA et al., 2014). A dieta também contribui para o aumento da carga corpórea de benzeno (WALLACE, 1996; GALBRAITH et al., 2010).

#### 2.4.2 *Exposição ocupacional*

A exposição ocupacional ao benzeno representa um grave problema de Saúde Pública. Estima-se que mundialmente cerca de dois milhões de trabalhadores sejam expostos ocupacionalmente a esta substância a cada ano, e, segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), cerca de 1% destes trabalhadores estão expostos a concentrações acima de 10 ppm; 4% na faixa compreendida entre 1 e 5 ppm e 95% a níveis abaixo de 1 ppm (PEZZAGNO, 1995; COUTRIM et al., 2000).

Estratégias para reduzir o nível de exposição ocupacional têm sido elaboradas e efetuadas, como o melhoramento das tecnologias empregadas nos meios de produção, a pressão das políticas de vigilância à saúde ocupacional, a tendência mundial de substituição do benzeno como solvente nos processos industriais, o avanço tecnológico para a detecção de concentrações mais baixas e redução dos limites de exposição (GILLI et



al., 1996; COUTRIM et al., 2000). Como parte do esforço mundial no sentido de reduzir ao máximo possível os limites de exposição ao benzeno, em 1946, a American Conference of Governmental Industrial Hygienists (ACGIH) recomendou o valor de 100 ppm ( $325 \text{ mg m}^{-3}$ ) como concentração máxima permitida para o benzeno no ar. Em 1947, esta mesma organização propôs a redução do limite aceitável para 50 ppm ( $163 \text{ mg m}^{-3}$ ). Com a introdução do conceito de TLV-TWA (Threshold Limit Value Time Weighted Average), o valor foi reduzido gradativamente para 35 ppm ( $114 \text{ mg m}^{-3}$ ) em 1948, 25 ppm ( $82 \text{ mg m}^{-3}$ ) em 1957, 25 ppm como valor teto (concentração que não pode ser excedida em nenhum momento da jornada de trabalho) em 1963 e 10 ppm ( $33 \text{ mg m}^{-3}$ ) em 1977. A Occupational Safety and Health Administration (OSHA), cujos limites estabelecidos têm valor legal, estabeleceu em 1974, 10 ppm como concentração atmosférica máxima permitida para exposição ocupacional, reduzindo-o em 1987, para 1 ppm (BARTOLUCCI et al., 1995; STRANGELO, 1995). Em 1997, a National Institute for Occupational Safety and Health (NIOSH) fixou o valor de 0,1 ppm ( $0,3 \text{ mg m}^{-3}$ ) e a ACGIH estabeleceu o valor de 0,5 ppm ( $1,6 \text{ mg m}^{-3}$ ) para o TLV-TWA (ACGIH, 2003).

O Brasil adota os mesmos limites que a Alemanha, ou seja, valores de referência tecnológicos com níveis de 1,0 ppm ( $3,3 \text{ mg m}^{-3}$ ) e 2,5 ppm ( $8,1 \text{ mg m}^{-3}$ ), dependendo da tecnologia da fonte emissora (PEZZAGNO, 1995; BRASIL, 1995). Entretanto, embora o estabelecimento de limites baixos de exposição reduza o risco de contaminação, não assegura a proteção absoluta do trabalhador, considerando que a ação carcinogênica do benzeno pode ocorrer mesmo em baixíssimas concentrações baseando-se na ideia de que não existe limite seguro de exposição para agentes carcinogênicos (JOHNSON et al., 1992).

O controle da exposição no Brasil teve início na resolução interministerial de 1983, que limitou em até 1% a quantidade de benzeno em produtos acabados. Em 1994, foi formada uma comissão tripartite entre representantes dos Ministérios do Trabalho, Saúde e Previdência Social, dos empregadores e dos trabalhadores para a criação da Comissão Nacional Permanente do Benzeno, através da portaria 10 de 8 de setembro de 1994 (MACHADO et al., 2003; CEZAR-VAZ et al., 2012; BARATA-SILVA et al., 2014). E em 1995 foi pactuado o Acordo sobre o Benzeno e estabelecida a normatizada através do anexo 13-A da NR-15, onde se introduziu o Valor de Referência Tecnológico (VRT), definido como a concentração de benzeno no ar considerada exequível do ponto de vista técnico, 2,5 ppm para indústrias siderúrgicas e 1,0 ppm para as demais indústrias que produzem, transportam, armazenam, utilizam ou manipulam o benzeno e suas misturas líquidas contendo 1% ou mais em volume (COUTRIM et al., 2000; MACHADO et al., 2003; BARATA-SILVA et al., 2014). Em 2011, o Ministério do Trabalho modificou alguns regulamentos da NR-15, por meio da Portaria SIT nº 203/2011 - DOU 1 de 1º.02.2011, intensificando o controle sobre as empresas.

Apesar de o benzeno ser um dos poluentes mais estudados no Brasil, em termos de Saúde do Trabalhador, não se têm dados adequados de notificação de mortalidades, internações hospitalares e estimativas de trabalhadores expostos. Historicamente, a cidade de Cubatão desencadeou um estudo por conta do grande potencial poluidor das indústrias da região. De acordo com Augusto e Novaes (1999), no período de 1983 a 1995, mais de mil trabalhadores da siderúrgica do Município de Cubatão foram afastados do trabalho por apresentarem alterações hematológicas atribuíveis à exposição ambiental e ocupacional ao benzeno. A Secretaria Municipal de Saúde de Volta Redonda registrou 688 casos de benzenismo nesse município no período compreendido entre 1984 a 1999 (SMS-VR, 1999).

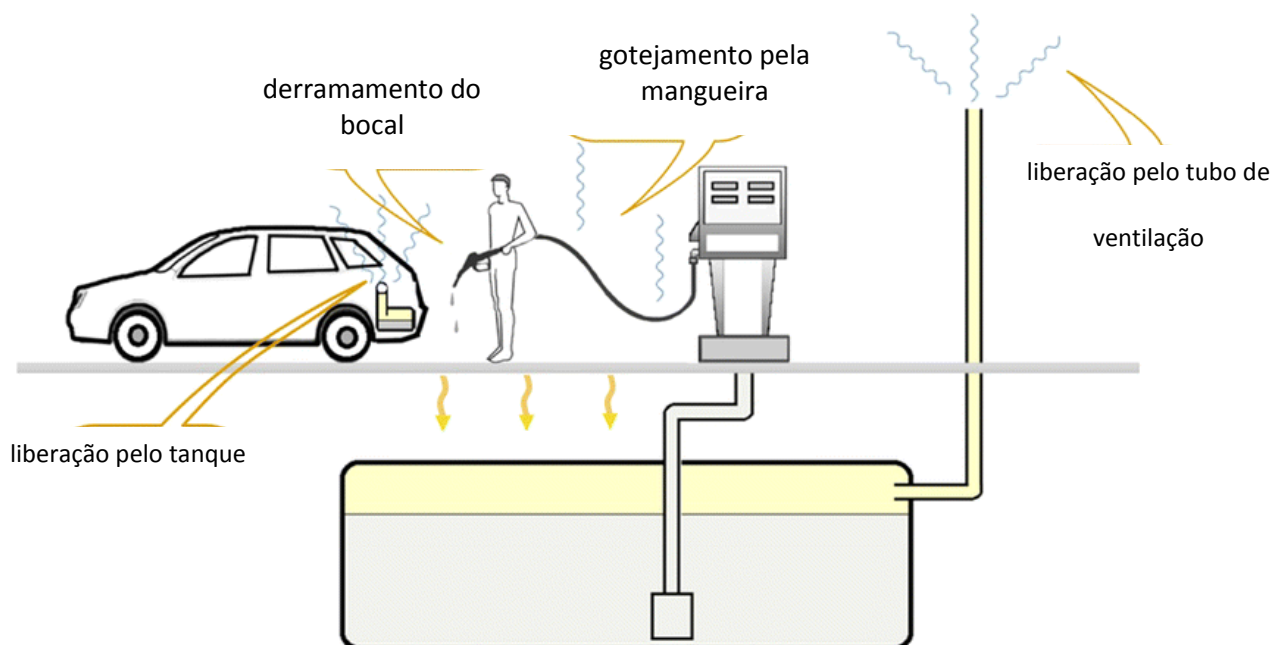
### 2.4.3 *Exposição ao benzeno em postos de combustíveis*

Os postos de combustíveis que estão distribuídos por todo o país, apresentam um sério potencial contaminante (CARRIERI et al., 2006), seja em razão do passivo ambiental, representado pelos tanques de armazenamento de combustíveis ou pela sua manipulação diária e (quase) ininterrupta por parte de milhares de trabalhadores. A grave situação de vulnerabilidade dos postos de combustíveis no país é evidenciada pela falta de organização de um setor fragmentado. A maioria dos equipamentos operantes tem muito tempo de uso, estando mais sujeitos aos desgastes e deterioração de material (CEZAR-VAZ et al., 2012; MOURA-CORREA et al., 2014). Além disso, não há clareza quanto aos efeitos nocivos que os compostos químicos comercializados e utilizados nos postos podem provocar à saúde da população em geral e dos trabalhadores, bem como os danos potenciais ao ambiente (CEZAR-VAZ et al., 2012; MOURA-CORREA et al., 2014; HILPERT et al., 2015). Outro fato a se considerar é o risco de contaminações provocadas por vazamentos ocorridos nos postos. Brito et al. (2005) relataram que, em 2005, havia cerca de 30.000 postos de combustíveis registrados no Brasil, dos quais 20 a 30% possuíam pequenos e contínuos vazamentos em virtude do envelhecimento dos tanques de estocagem. Este tipo de falha atinge principalmente a população que reside próximo a esses postos e que muitas vezes consome água proveniente de poços artesianos (BARATA-SILVA et al., 2014).

Existem várias fontes de liberação constante de combustível nos postos por conta do armazenamento e da dispensação, como por exemplo, a liberação de vapor através dos tubos de ventilação dos tanques de armazenamento, liberação de vapor durante o abastecimento dos veículos, por mangueiras de distribuição com vazamentos, por derramamentos de líquidos durante o abastecimento de veículos e por evaporação de

combustível derramado (WEISEL, 2010; HILPERT et al., 2015) (figura 5). O emprego de tecnologias adequadas para prevenção deste tipo de poluição poderia minimizar o problema dos lançamentos no ambiente que ocorrem rotineiramente durante o armazenamento e distribuição de combustíveis (HILPERT et al., 2015). A substituição dos compostos antidetonantes contendo chumbo por benzeno determinou um aumento considerável nas emissões de benzeno por veículos movidos à gasolina, agravando ainda mais o problema da contaminação atmosférica, principalmente urbana (GILLI et al., 1996; PERIAGO et al., 1997; WEISEL, 2010).

Figura 5 - Fontes de liberação de combustível não queimado em postos de combustíveis durante o abastecimento de veículos automotores.

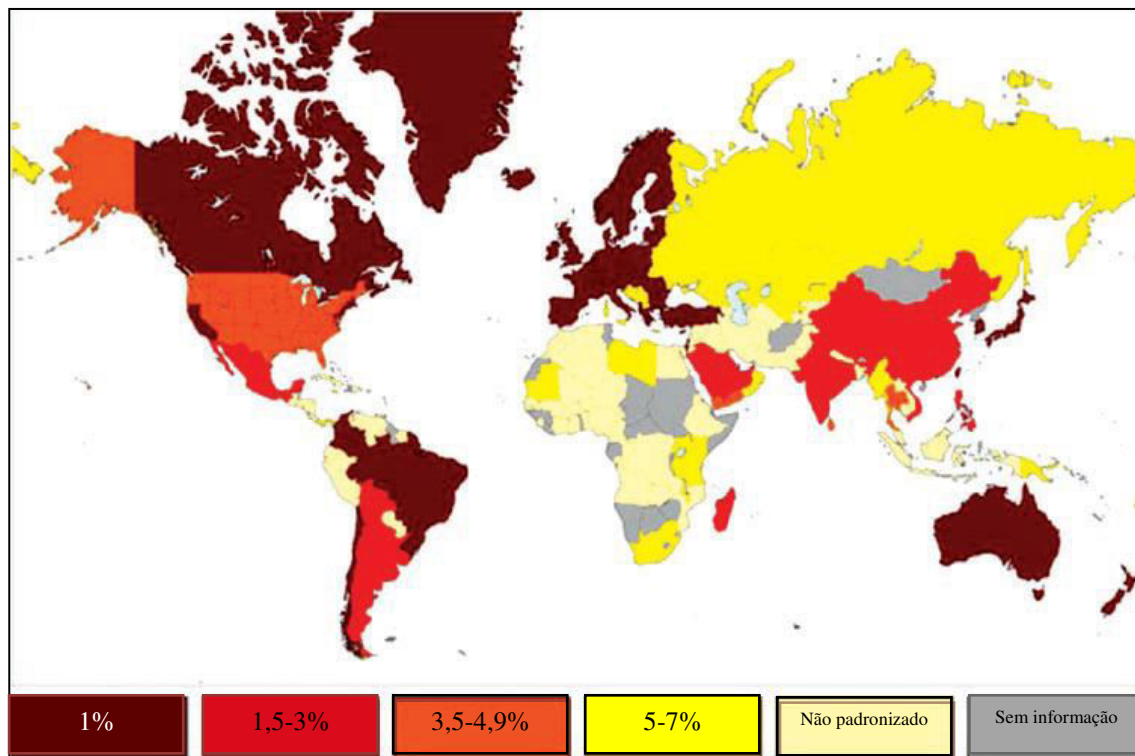


Fonte: HILPERT et al., 2015.

A gasolina é uma mistura de hidrocarbonetos parafínicos, olefínicos, naftênicos e aromáticos (benzeno, tolueno, xileno e outros alquilbenzenos), compondo estes últimos cerca de 10 a 59% da mistura (TIBURTIUS et al., 2004). O benzeno é adicionado à gasolina como antidetonante em substituição ao chumbo, sendo encontrado na faixa de 1 a 7%, dependendo do país e para o quê se destina (figura 6) (GALBRAITH, et al., 2010; KLAASSEN et al., 2012). Com relação a sua regulamentação, no ano 2000, a legislação

européia restringiu os teores de aromáticos e de benzeno no combustível, de modo que o teor de aromáticos foi limitado a no máximo 42%, e a partir de 2005 deveria ser inferior a 35%. O benzeno foi limitado a 1% no máximo a partir do ano de 2000 (GAUTAM et al., 1999). Nos Estados Unidos, a especificação da gasolina é definida pela *American Society for Testing and Materials*, D-4814/ASTM D-4814 (Chevron, 1996). As regulamentações adicionais da Environmental Protection Agency (EPA) sobre a gasolina também não preveem esses limites. No Brasil, a Portaria da Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis/ANP número 30, de 29/06/2015, atualizou as especificações para a comercialização do combustível, na qual o teor máximo de aromáticos foi limitado em 35% na gasolina disponível ao consumidor final, tipo C; e o de benzeno neste tipo de gasolina e na Premium tipo C ficou limitado em 1% (tabela 1).

Figura 6 - Limites internacionais de benzeno na gasolina.



Fonte: INTERNATIONAL FUEL QUALITY CENTER, 2008.

Tabela 1 - Limite de aromáticos e de benzeno (percentual v/v) na gasolina produzida no Brasil.

Tipo da gasolina	Aromáticos (% v/v)	Benzeno máximo (% v/v)
Gasolina comum tipo C	35	1
Gasolina Premium tipo C	35	1

Fonte: ANP N° 30 de 29/06/2015, DOU 30/06/2015.

## 2. 5 Avaliação da exposição ao benzeno

A exposição ao benzeno é comumente avaliada através dos biomarcadores, em especial, os de exposição, e da investigação de alterações clínicas e laboratoriais relacionadas ao benzenismo, principalmente as hematológicas (BRASIL, 2006; D'ALASCIO et al., 2014; MITRI et al., 2015). Além disso, é fundamental o levantamento do histórico ocupacional dos trabalhadores, com informações sobre as empresas, setores, funções, tarefas e respectivos períodos de trabalho (BRASIL, 2006).

### 2.5.1 Indicadores do benzeno

A concentração de benzeno no ar atmosférico é utilizada como marcador ambiental da exposição ao composto. O Brasil adota os mesmos valores que a, 0,5 ppm como *Time Weighted Average - TWA* e 2,5 ppm como concentração máxima (*short-term exposure level* — STEL/Teto) (ACGIH, 2003).

Os biomarcadores de exposição ao benzeno incluem o benzeno não metabolizado no sangue, no ar exalado e na urina, além de seus metabólitos e adutos de DNA, hemoglobina e albumina (WEISEL, 2010). O benzeno possui uma gama de biomarcadores provenientes de sua metabolização, como o fenol, catecol, hidroquinona, 1,2,4 trihidroquinona e os ácidos S-PMA e t,t-MA (WAIDYANATHA et al., 2004; WAIDYANATHA et al., 2005; WEISEL, 2010). Destes, a legislação brasileira preconiza a medição de S-PMA e t,t-MA em urina, coletada ao final da jornada de trabalho, com valores de referência de 25  $\mu\text{g g}^{-1}$  e 500  $\mu\text{g g}^{-1}$  de creatinina, respectivamente. A utilização da creatinina como fator de comparação deve-se a variabilidade individual do volume



urinário expelido, o que impossibilitaria a comparação. Assim, como a creatinina tem uma eliminação aproximadamente constante ela é utilizada com este objetivo (ACGIH, 2003).

A utilização de biomarcadores de estresse oxidativo e de genotoxicidade, que são também utilizados de maneira complementar aos indicadores clássicos, a fim de prever os efeitos do benzeno no organismo, tem sido crescente (EREXSON et al., 1985; KIM et al., 2004; WEISEL, 2010). Outra ferramenta útil são os indicadores de susceptibilidade representados por polimorfismos de enzimas envolvidas no metabolismo da substância, cuja incorporação na avaliação da exposição pode tornar o processo mais completo devido à capacidade de identificação de subgrupos mais vulneráveis da população (DOUGHERTY et al., 2008; WEISEL, 2010; DE PALMA et al., 2014).

#### 2.5.1.1 *Benzeno no ar exalado, na urina e no sangue*

As medições de benzeno não metabolizado no ar exalado, no sangue e na urina são utilizadas como biomarcadores de exposição (COUTRIM et al., 2000; JOHNSON et al., 2007). Em geral, a relação entre a concentração ambiental de benzeno e as concentrações dessa substância nessas matrizes biológicas é linear, especialmente no caso de trabalhadores expostos (BRUGNONE et al., 1989; WAIDYANATHA et al., 2001).

A possibilidade de perdas durante a coleta, estocagem e análise das amostras representa uma limitação ao uso destes marcadores (WEISEL, 2010). A meia vida relativamente curta do benzeno no corpo humano, cerca de algumas horas, limita a utilidade de tais marcadores às exposições recentes (JOHNSON et al., 2007).

### 2.5.1.2 *Fenol urinário*

Cerca de 40% do benzeno absorvido pelo organismo é biotransformado em compostos fenólicos, sendo o fenol o mais importante destes. Este metabólito é excretado principalmente através da urina, em sua forma livre ou combinada com os ácidos glicurônico ou sulfúrico (COUTRIM et al., 2000). O fenol, juntamente com o catecol e a hidroquinona, não se mostra um biomarcador sensível e específico por conta dos níveis relativamente altos encontrados em indivíduos não expostos (MEDEIROS et al., 1997; KLAASSEN et al., 2012). As concentrações na urina podem estar aumentadas devido à ingestão de determinadas substâncias químicas contidas em alimentos e fármacos (COUTRIM et al., 2000). Não obstante, o fenol urinário tem sido usado mundialmente como Indicador Biológico de Exposição (IBE) ao benzeno, estando especialmente relacionado a níveis altos de exposição ocupacional, maiores que 1 ppm, mais frequentemente superiores a 10 ppm (ONG et al., 1995; ONG et al., 1996).

### 2.5.1.3 *Ácido trans, trans-mucônico urinário (t,t,MA)*

Aproximadamente 3,9% do benzeno absorvido são eliminados sob a forma deste metabólito na urina e seu pico máximo ocorre 5,1 horas após uma jornada de 6 a 8 horas de trabalho (COUTRIM et al., 2010).

O uso do t,t-MA foi estabelecido como IBE na monitorização da exposição ao benzeno no Brasil através da portaria nº 34, de 20 de dezembro de 2001, do Ministério do Trabalho e Emprego, no valor de 500 µg . g de creatinina, o mesmo adotado pela ACGIH (COSTA et al., 2000; BRASIL, 2001; COSTA, 2001; CARBONARI et al., 2014). A concentração de t,t-MA na urina é preconizada nas avaliações de exposições

abaixo de 1 ppm (YU et al., 1996; WEISEL, 2010), mas segundo Weisel (2010), em ambientes ocupacionais, os níveis do ácido se mostram alterados na faixa de 0,1 a 20 ppm de benzeno no ar atmosférico. Já os estudos de Boogaard et al. (1995) e Boogaard et al. (1996) afirmam que o monitoramento biológico através do t,t-MA urinário é plenamente confiável apenas em exposições a concentrações acima de 0,25 ppm (0,81 mg m<sup>-3</sup>) ou, mais rigorosamente, acima de 1,0 ppm (3,3 mg m<sup>-3</sup>).

Entretanto, sabe-se que o nível urinário do ácido t,t-MA não é um biomarcador específico do benzeno, pois pode ser afetado pela ingestão de ácido sórbico, um preservativo alimentar comum do qual o t,t-MA é metabólito também. O uso de bebida alcoólica, o tabagismo ou ainda a exposição simultânea ao tolueno e aos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) também podem interferir na sua excreção (PEZZAGNO et al., 1999; WEAVER et al., 2000; NEGRI et al., 2005; HOET et al., 2009; CARBONARI et al., 2014).

#### 2.5.1.4 Ácido fenil mercaptúrico urinário – S-PMA

O estudo de COUTRIM et al. (2000) reportou que dentre os possíveis IBEs do benzeno, o S-PMA urinário é o que apresenta maior confiabilidade. O S-PMA é formado na metabolização do benzeno como produto final da conjugação do óxido de benzeno com a glutatona por ação catalítica da GST, sendo eliminado através da urina (KLAASSEN, 2012; BARATA-SILVA et al., 2014).

A determinação do S-PMA urinário tem sido útil na avaliação da exposição ocupacional ao benzeno como IBE com valor limite de 25 µg g<sup>-1</sup> de creatinina, em níveis de exposição abaixo de 1 ppm de benzeno no ar (PEZZAGNO, 1995; YU et al., 1996; FARMER et al., 2005; WEISEL, 2010).

A concentração urinária de S-PMA não sofre interferência da dieta e seu tempo de permanência é maior que o do t,t-MA, possuindo meia vida de 10 horas. Entretanto, tal qual o t,t-MA, o hábito de fumar pode ser um fator de confundimento para o uso de sua medição (KLAASSEN et al., 2012; BARATA-SILVA et al., 2014).

#### 2.5.1.5 *Catecol e hidroquinona na urina*

Alguns estudos têm apresentado vantagens no uso dos metabólitos catecol e hidroquinona em relação ao fenol urinário. Porém, a coexposição ao tolueno é uma questão a ser considerada na utilização destes metabólitos como IBEs do benzeno (COUTRIM et al., 2000).

#### 2.5.1.6 *Biomarcadores de citotoxicidade e de genotoxicidade*

Mesmo em baixas concentrações, o benzeno é um mielotóxico regular, leucemogênico e cancerígeno (IARC, 1989; BRASIL, 2006; WANG et al., 2012). O benzeno e seus metabólitos não atuam efetivamente como mutagênicos, mas são altamente clastogênicos e aneuploidogênicos, podendo induzir a aberrações cromossômicas (AC), formação de micronúcleos (MN), troca de cromátides irmãs e à formação de adutos de DNA (SNYDER et al., 1993; WHYSNER et al., 2004; KIM, et al., 2008; ATKINSON et al., 2009).

Diversos metabólitos do benzeno como o óxido de benzeno, a 1,2-benzoquinona e 1,4-benzoquinona, muconaldeídos e o diol epóxido de benzeno são reativos eletrofílicos e

apresentam potencial para formação de aduto de DNA, que tem sido proposto como biomarcador em exposições de longo termo, refletindo a ação genotóxica do xenobiótico (JOHNSON et al., 2007; WEISEL, 2010; BARRY et al., 2011). Entretanto a formação de adutos não ocorre somente com o DNA, mas também com proteínas, especialmente com a hemoglobina e a albumina. Maiores níveis séricos de adutos de proteína foram observados em trabalhadores expostos em comparação com indivíduos de grupos controle (0.2–55 ppm x 0.01–0.5 ppm) (RAPPAPORT et al., 2005; Lin, 2007).

A determinação de N-7-fenilguanina na urina de indivíduos expostos também pode ser útil como indicador biológico do efeito genotóxico do benzeno. A N-7-fenilguanina é uma base arilada liberada por intermediários formados quando o metabólito benzeno epóxido se liga ao DNA, RNA ou proteínas, como um mecanismo de reparo de danos. A concentração máxima deste metabólito na urina é atingida de 2 a 3 dias após a exposição. Mas, embora a determinação desta base seja específica, estando diretamente ligada ao caráter carcinogênico do benzeno, a sensibilidade do método analítico ainda não permite seu uso em exposições inferiores a 5 ppm (16 mg m<sup>-3</sup>) de benzeno no ar (COUTRIM et al., 2000).

Em baixos níveis de exposição, alguns biomarcadores de estresse oxidativo já se apresentam significativamente aumentados. De fato, estudos têm destacado o papel do estresse oxidativo nos efeitos tóxicos do benzeno e de seus metabólitos (SNYDER et al. 1993; ROSS et al., 2011). Produtos de oxidação de proteínas circulantes, 3-nitrotirosina plasmática, 8-hidroxi-2-desoxiguanosina, 8-oxodGuo e 8-hidroxiguanosina, 8-oxoGuo, além de alterações nas enzimas de estresse oxidativo têm sido usados como biomarcadores na avaliação dos danos citotóxicos e genotóxicos do benzeno (SORENSEN et al., 2003; MANINI et al., 2010; SPATARI et al., 2012; MORO et al., 2013).

## 2.5.2 Avaliação clínica: sinais e sintomas relacionados ao benzenismo

### 2.5.2.1 Sinais hematológicos

O quadro clínico da toxicidade do benzeno se caracteriza por múltiplos danos orgânicos, onde o comprometimento da medula óssea é o mais frequente e significativo, sendo a origem das diversas alterações hematológicas encontradas na exposição (Ministério da Saúde, 2006). Diversos tipos de alterações sanguíneas, isoladas ou associadas, estão relacionadas à exposição ao composto. Achados como anemia, neutropenia, leucopenia, eosinofilia, linfocitopenia, monocitopenia, macrocitose, pontilhado basófilo, pseudo Pelger e plaquetopenia representam os dados laboratoriais hematológicos mais relevantes (RUIZ, 1987, RUIZ et al., 1993; BRASIL, 2006; D'ALASCIO et al., 2014; MITRI et al., 2015). Tais achados no hemograma de indivíduos expostos se devem à hipoplasia, displasia e aplasia de medula óssea. A neutropenia associada à plaquetopenia e à leucopenia representa a principal repercussão hematológica da hipoplasia causada pelo benzeno (RUIZ et al., 1994; BRASIL, 2006; SCHNATER et al., 2010).

O hemograma é um dos principais instrumentos laboratoriais utilizados na investigação clínica da toxicidade crônica do benzeno, o qual deve ser repetido em série (protocolo). Neste tipo de investigação, parte-se do princípio que, todas as alterações hematológicas devem ser valorizadas em pessoas expostas ao composto (BRASIL, 2006).

Os parâmetros sanguíneos mais comuns aos efeitos do benzeno são a neutropenia, linfocitopenia, anemia e sinais como macrocitose (SCHNATTER et al., 2010). O estudo de Lan e colaboradores (2004) reportou decréscimos na contagem de células brancas e de

plaquetas dentre outros parâmetros hematológicos em pessoas expostas a níveis de 1 ppm de benzeno. Mais recentemente, o estudo de Ye et al. (2015) confirmou estes achados.

#### 2.5.2.2 *Sintomas*

Os sintomas mais comumente encontrados na intoxicação por benzeno são a astenia, cefaleia, dores nas pernas, mialgia, fraqueza, sonolência, tremor, tontura e infecções recorrentes, que, embora pareçam vagos, possuem prevalência alta (RUIZ et al., 1994; ARCURI et al., 2005; MCHALE et al., 2009; TUNSARINGKARN et al., 2012; TREVISAN et al., 2014; MITRI et al., 2015).

Outras investigações como as de ordem neuropsicológicas e neuropsiquiátricas, efeitos ototóxicos e alterações citogenéticas podem ser requeridas sempre que se julgar necessário (BRASIL, 2006; D'ALASCIO et al., 2014).

### **2.6 Polimorfismos metabólicos do benzeno como fatores de susceptibilidade genética**

Idade, gênero, tabagismo, ingestão de álcool, hábitos alimentares, constituição genética, dentre outros, são todos fatores geradores de variabilidade inter individual em relação à exposição ao benzeno (WAN et al., 2002; SUN et al., 2008; SMITH, 2010; YE et al., 2015). Segundo Wang et al. (2012), o entendimento desta variabilidade e a identificação de trabalhadores mais susceptíveis estão entre os principais desafios da segurança ocupacional.

A literatura científica tem destacado o papel dos polimorfismos das enzimas metabólicas como fatores de susceptibilidade genética a diversos xenobióticos, como o

benzeno, os quais têm sido, cada vez mais, incorporados aos estudos das exposições (DOUGUERTY et al., 2008; DE PALMA et al., 2014). Os polimorfismos metabólicos se devem a variações nos genes das enzimas metabolizadoras de xenobióticos, que podem resultar em modificações no funcionamento dessas enzimas. Dentre as possíveis alterações resultantes, a não expressão da enzima (no caso dos genótipos nulos) e o aumento ou diminuição da velocidade catalítica, que determina a diferença entre indivíduos metabolizadores rápidos e lentos, parecem ser as mais relevantes (GRANT et al., 1997; ROTHMAN et al., 1997; KIM et al., 2007).

A maioria das enzimas envolvidas na biotransformação do benzeno é altamente polimórfica e, estes polimorfismos metabólicos parecem afetar as concentrações dos intermediários tóxicos do solvente no organismo, independente dos níveis de exposição aos quais os indivíduos estejam sujeitos (ROSSI et al., 1999; CARBONARI et al., 2014; ZHANG et al., 2014). Estudos têm mostrado que os indivíduos expostos apresentam uma

larga faixa de variação nas concentrações de biomarcadores do benzeno, sugerindo que a toxicidade do composto pode sofrer interferência das variações genéticas das enzimas metabólicas (BOLUFER et al., 2006; KIM et al., 2008). Entretanto, considerando a multiplicidade enzimática envolvida nas possíveis rotas bioquímicas de metabolização do benzeno, o entendimento dessa questão não é simples (JOHNSON et al., 2007). De acordo com Johnson et al. (2007), os indivíduos geneticamente susceptíveis, por conta de polimorfismos enzimáticos que levam à conversão preferencial do benzeno em intermediários reativos mais tóxicos, como muconaldeído e benzoquinona, podem apresentar um risco à saúde mais elevado que os demais.



Já foram identificados relevantes polimorfismos funcionais no sistema enzimático de metabolização do benzeno, os quais têm sido objeto de diversos estudos dentro da literatura científica. Dentre as mais importantes, destacam-se as da superfamília CYP (especialmente a subfamília CYP2E1) e a MPO como enzimas envolvidas nas reações de ativação, e as GSTs (principalmente as isoformas GSTT1 e GSTM1) e NQO1 atuantes na detoxificação dos metabólitos reativos (CHEN et al., 2007; DOUGHERTY et al., 2008; WEISEL, 2010; BARRY et al., 2011). Os trabalhos de autores como Kim et al. (2007) e Wan et al. (2002) afirmam que os genes polimórficos dessas enzimas predispõem alguns indivíduos à toxicidade do benzeno por conta de seu metabolismo. O entendimento da variabilidade individual e a identificação de indivíduos expostos mais susceptíveis à toxicidade do benzeno estão entre os principais desafios da área da segurança e Saúde do Trabalhador.

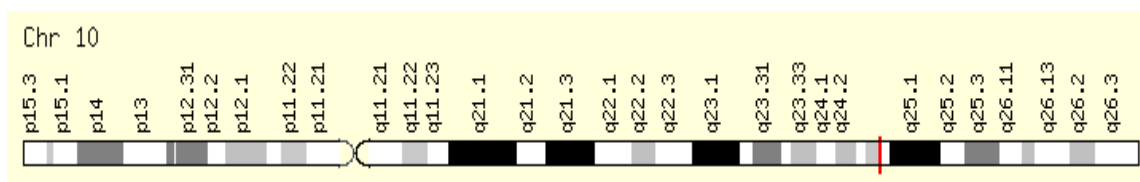
### **2.6.1 *Citocromo P450 2E1 - CYP2E1***

O sistema enzimático CYP tem sido extensivamente estudado devido a sua participação no metabolismo de inúmeros xenobióticos (HATAGIMA et al., 2002; COURA et al., 2007; PICOLLI et al., 2010; TANG et al., 2010). Em humanos, a família CYP é mais expressada no fígado e possui alto grau de variabilidade (PAVANELLO et al., 2000).

O genoma humano possui mais de 50 genes diferentes para o CYP, divididos em 10 famílias, as quais são subdivididas em subfamílias e estas, por sua vez, em isoformas (AUTRUP, 2000). A principal CYP atuante no metabolismo do benzeno é a isoforma CYP2E1, uma enzima de fase I que converte o benzeno em óxido de benzeno e também

catalisa a transformação de hidroquinona (HQ) e catecol em 1,2,4-trihidroxibenzeno (ROTHMAN et al., 1997; BARRY et al., 2011; DE PALMA et al., 2013). O gene CYP2E1 é encontrado no cromossomo 10, em 10q24.3 (ROSSINI et al., 2006).

Figura 7 - Locus do gene CYP2E1. Cromossomo 10q24.3.

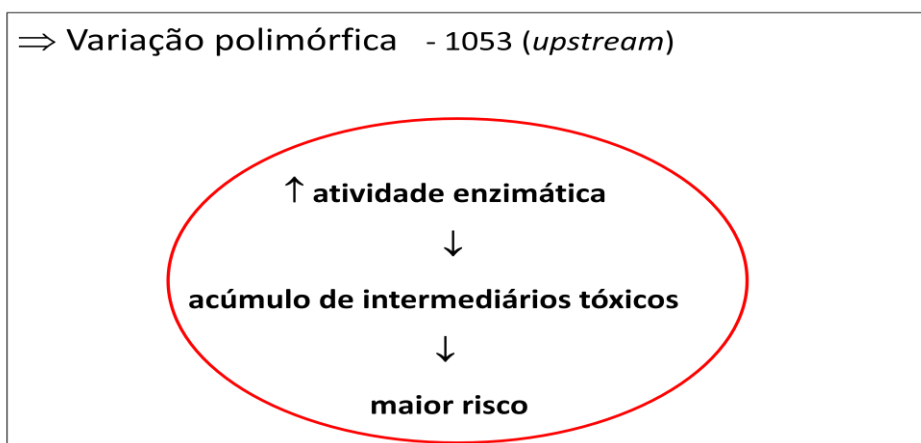


Fonte: GeneCards.org.

A literatura reporta a presença de polimorfismos na região promotora, em -1053 (sítio de restrição *RsaI*) e na posição 7632 do gene (sítio de restrição *DraI*), cujas variantes estão associadas ao aumento da atividade enzimática e ao maior risco para o desenvolvimento de leucemia, provavelmente devido à maior produção de intermediários tóxicos (figuras 8 e 9) (SEATON et al., 1994; DOUGHERTY et al., 2008, WANG et al., 2012). Em seu trabalho, Fustinoni et al. (2005) mostraram a influência dos polimorfismos CYP2E1 *RsaI* e *DraI* nos níveis de benzeno urinário em indivíduos portadores dos alelos

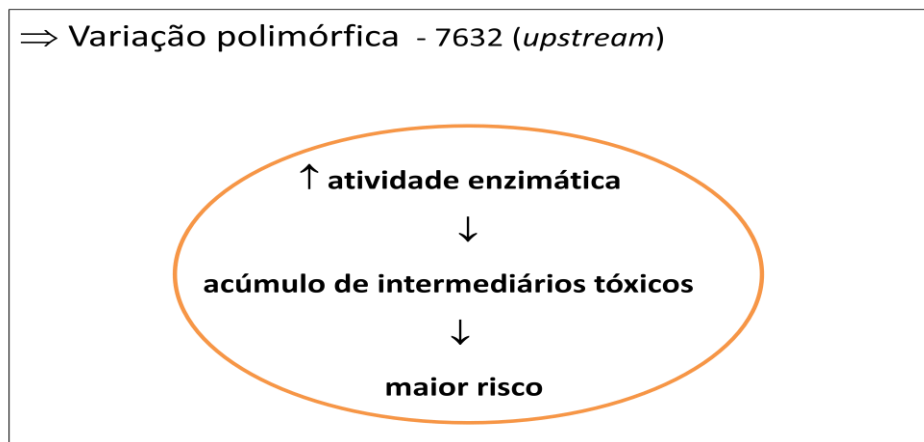
variantes. Kim et al. (2007) observaram que a variação genética da isoforma exerceu efeito sobre as concentrações dos metabólitos t,t-MA, S-PMA, fenol e HQ. Ye e colaboradores (2015) reportaram que indivíduos homozigotos dos variantes polimórficos da CYP2E1 apresentaram redução no número de leucócitos no sangue periférico em comparação com portadores homozigotos do alelo selvagem.

Figura 8 – Variação polimórfica do CYP2E1 *RsaI* e efeitos.



Fonte: A autora, 2016.

Figura 9 – Variação polimórfica do CYP2E1 *DraI* e efeitos.



Fonte: A autora, 2016.

A distribuição étnica do polimorfismo da CYP2E1 *RsaI* varia nas faixas de 0,23-0,27 em asiáticos, 0,02-0,05 em populações brancas e 0,01-0,03 em negros (LIU et al., 2001; NEUHAUS et al., 2004; ROSSINI et al., 2006). A frequência do polimorfismo CYP2E1 *DraI* também varia de acordo com a etnia da população, de modo que são reportadas frequência em torno de 0,09 em caucasianos e de 0,08 em negros (NEUHAUS et al., 2004; COURA et al., 2007). Rossini e colaboradores (2006) reportaram a frequência de 0,08 em uma população brasileira do estado do Rio de Janeiro.

### 2.6.2 *Mieloperoxidase - MPO*

A MPO é uma enzima de fase I, altamente expressa por neutrófilos e por células precursoras mieloides da medula óssea, estando envolvida na oxidação de procarcinógenos (MALLET et al., 1991; SCHABATH et al., 2000; ISKANDER et al., 2005; WANG et al., 2012). No metabolismo do benzeno, sua função catalítica é a conversão de HQ e catecol em quinonas mais tóxicas, p-benzoquinona e o-benzoquinona, respectivamente, e a detoxificação destes reativos intermediários ocorre posteriormente através da NQO1 ou ainda via GSTs (KLEBANOFF, 1991; WANG et al., 2012; DE PALMA et al., 2014).

O polimorfismo da MPO tem origem na posição 463 *upstream* ao gene, na região promotora do gene no cromossomo 17 (17q22) (AUSTIN et al., 1993; PIEDRAFITA et al., 1996; SCHABATH et al., 2000; BARRY et al., 2011). A variação consiste em uma troca de bases G→A, de modo que portadores do alelo variante **A** apresentam uma taxa mais baixa de transcrição do gene devido à inativação de um sítio de ligação a um fator transcricional SP1, o que culmina no decréscimo da atividade enzimática (figura 10) (PIEDRAFITA et al. 1996; KIYOHARA et al., 2005; ZHANG et al., 2007; ROSS et al., 2011).

Figura 10 – Variação polimórfica do MPO e efeitos.

⇒ Ponto polimórfico -463 (upstream)



Fonte: A autora, 2016.

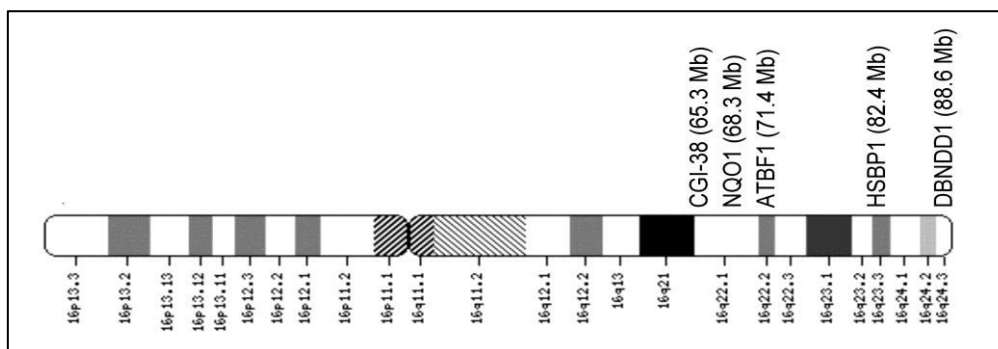
O alelo variante parece exercer efeito protetor, uma vez que está associado à menor produção de metabólitos reativos tóxicos, e tem sido relacionado a um risco reduzido para leucemia aguda (SCHABATH et al., 2000; KIYOHARA et al., 2005; CHEN et al., 2007; ZHANG et al., 2007; DOUGHERTY et al. 2008). Estudos realizados na China observaram um risco elevado de intoxicação, bem como níveis reduzidos de células sanguíneas em portadores homozigotos do genótipo selvagem (GG) expostos ao benzeno (LAN et al., 2004).´

### 2.6.3 *NADPH:quinona oxidoreductase 1 – NQO1*

A NQO1 é uma enzima de fase II, encontrada na medula óssea, que no processo de metabolização do benzeno é responsável pela redução de benzoquinonas a dihidroxi-quinonas menos tóxicas, protegendo, assim, o organismo da ação destes intermediários reativos (SNYDER et al., 1993; Ross, 2000; NEBERT et al., 2002; ISKANDER et al., 2005).

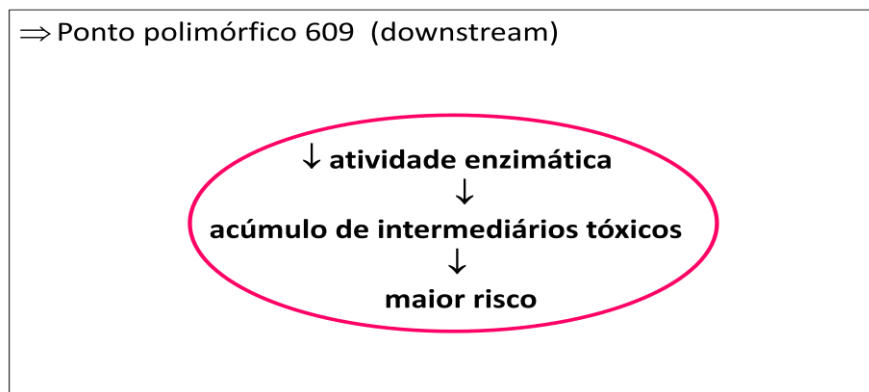
O gene NQO1 que, na espécie humana, está localizado no cromossomo 16 (16q22.1) (figura 11), apresenta um polimorfismo funcional com origem em uma substituição de bases C→T na posição 609 do gene (figura 12), que determina a substituição de um aminoácido prolina por uma serina na posição 187 da proteína (LARSON et al., 1999; SIEGEL et al., 1999; KIM et al., 2008).

Figura 11 - Locus do gene NQO1. Cromossomo 16q22.1.



Fonte: GeneCards.org.

Figura 12 – Variação polimórfica do NQO1 e efeitos.



Fonte: A autora, 2016.

Esta variação tem consequências fenotípicas significantes, podendo resultar em ausência da atividade enzimática em indivíduos portadores do genótipo homozigoto (ROSS, 2005). A variação, portanto, parece diminuir a ação protetora da NQO1 (TRAVER et al., 1992; NEBERT et al., 2002; ROSS, 2005). Entre indivíduos brancos a frequência do gene é de 0,21 para o alelo variante (LARSON et al., 1999).

Estudos têm reportado uma associação entre este polimorfismo e uma maior ocorrência de malignidades hematológicas, especialmente de leucemia em adultos (SMITH et al. 2001; LAN et al., 2004). Rothman et al. (1997) encontraram um risco aumentado de intoxicação por benzeno entre trabalhadores expostos homozigotos do alelo variante. Outros autores, em estudos mais recentes, observaram o mesmo resultado (WANG et al., 2002; CHEN et al., 2007; BARRY et al., 2011). A pesquisa de Kim e colaboradores (2007)



relatou a influência da variante NQO1 609C→T sobre os níveis de cinco metabólitos do benzeno (t,t-MA, S-PMA, fenol, catecol e HQ). Um outro estudo, realizado na Dinamarca, apresentou o mesmo resultado para os metabólitos t,t-MA e S-PMA (SORENSEN et al., 2003). O estudo de Garte e colaboradores (2005), em trabalhadores búlgaros do setor petroquímico, reportou a influencia exercida pelo polimorfismo NQO1 sobre os danos genotóxicos provenientes da exposição ao benzeno. Lan et al. (2004) também observaram efeitos do polimorfismo NQO1, em conjunto com o MPO, sobre a hematotoxicidade do benzeno em trabalhadores chineses.

#### 2.6.4 *Glutathione S-Transferase M1 e T1 – GSTM1 e GSTT1*

As GSTs formam um dos principais grupos de enzimas de detoxificação do organismo. Cada GST apresenta propriedades catalíticas distintas em relação à conjugação com glutathione, peroxidação ou isomerização. Cinco diferentes classes de GSTs citossólicas são conhecidas até o momento, sendo codificadas por no mínimo cinco famílias distintas de genes, A, M, P, S e U (HAYES et al., 1995; PAVANELLO et al., 2000).

Na metabolização do benzeno, as GSTs catalisam a conjugação do metabólito BO com o peptídeo glutathione, formando o S-PMA (SNYDER et al., 1993; ROSS et al., 2000). Vários polimorfismos funcionais foram identificados nas enzimas GSTs (STRANGE et al., 2000). GSTT1 e GSTM1 são duas isoformas com participação importante no processo de metabolização do benzeno que apresentam polimorfismos genéticos, cujas formas variantes se consistem em deleções dos genes, acarretando em perda total da atividade enzimática (REBBECK, 1997; BAGRYANTSEVA et al., 2010). O locus do gene GSTM1

encontra-se no cromossomo 1, em 1p13.3, enquanto o da GSTT1 localiza-se no cromossomo 22, em 22q11.2 (ROHR et al., 2004; AGUIAR et al., 2012).

A distribuição dos genótipos nulos de GSTM1 e GSTT1 na população varia de acordo com a etnia. Estudos reportaram uma faixa de prevalência de 47 a 58% para GSTM1 e de 13 a 27,6% para GSTT1 (REBBECK, 1997; GATTAS et al., 2004; HATAGIMA et al., 2008). Na população brasileira, frequências de 45% e 21% para GSTM1 e GSTT1, respectivamente, foram observadas em mulheres na pesquisa de Aguiar et al. (2012). Strange e colaboradores (2000), reportaram uma frequência 20% de homozigotos nulos da GSTT1 em caucasianos. O estudo de Pavanello et al. (2000) apresentou frequências de 16% para caucasianos e 38% em negros.

Em estudos de exposição ao benzeno, os genótipos nulos das duas isoformas têm sido substancialmente associados à excreção de biomarcadores, especialmente o S-PMA (SORENSEN et al., 2004; MANINI et al., 2010; WANG et al., 2012). Diversos trabalhos reportaram a relação entre as concentrações de S-PMA e as deleções dos genes GSTM1 e GSTT1, com valores significativamente mais elevados nos indivíduos portadores do genótipo nulo de ambas as enzimas (QU et al., 2005; MANINI et al., 2010; JOHNSON et al., 2007, KIM et al., 2007; CARRIERI et al., 2012; WANG et al., 2012). Outros trabalhos encontraram associação dos genótipos nulos de GSTT1 e GSTM1 com maior risco para o desenvolvimento de leucemia mielóide aguda e síndrome mieloplástica (SNYDER et al., 1993; BOLLUFER et al., 2006; JOHNSON et al., 2007). Segundo Wan et al. (2002), o genótipo GSTT1 nulo pode aumentar a susceptibilidade à síndrome mieloplástica. Wan e colaboradores (2006) observaram um risco 4 vezes maior para os efeitos hematotóxicos do benzeno em portadores da variante nula GSTT1. Em um estudo recente realizado com trabalhadores chineses expostos, Ye et al. (2015) observaram que os genótipos nulos de ambas as isoformas podem contribuir para a redução dos níveis de leucócitos periféricos

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Geral

Este trabalho, que fez parte de um estudo mais amplo, teve como objetivo avaliar alterações clínicas relacionadas ao benzenismo e polimorfismos em genes de enzimas de metabolização do benzeno em trabalhadores de postos de combustíveis do município do Rio de Janeiro.

#### 3.2 Específicos

1. Caracterizar a população de trabalhadores dos postos de combustíveis participantes do estudo, com relação às variáveis sócio demográficas e ocupacionais envolvidas na exposição ao benzeno;
2. Investigar alterações clínicas e laboratoriais relacionadas ao benzenismo nos trabalhadores estudados;
3. Otimizar metodologias de genotipagem para determinação dos polimorfismos metabólicos CYP2E1 1053C>T (*RsaI*), CYP2E1 7632T>A (*DraI*), MPO, NQO1, GSTT1 e GSTM1;
4. Analisar os polimorfismos metabólicos como fatores de susceptibilidade genética na população estudada;
5. Fornecer as frequências genótípicas e alélicas dos polimorfismos metabólicos na população do estudo;
6. Investigar possíveis correlações entre os achados clínicos sugestivos de benzenismo e os polimorfismos metabólicos.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo fez parte de um trabalho mais amplo de avaliação de trabalhadores de postos de combustíveis do município do Rio de Janeiro expostos ao benzeno, tendo sido submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca (ENSP), Fundação Oswaldo Cruz (CAAE 0021.0.031.000-10).

### 4.1 População estudada e coleta de amostras

Participaram do estudo 114 trabalhadores de 7 postos de combustíveis do município do Rio de Janeiro (tabela 2), sendo de ambos os sexos e de idade igual ou superior a 18 anos. Todos os indivíduos receberam as devidas informações sobre a pesquisa e assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. O contato com os trabalhadores se deu através do sindicato da classe, o Sindicato dos Empregados em Postos de Serviço de Combustíveis e Derivados de Petróleo do Estado do Rio de Janeiro (SINPOSPETRO-RJ). Foram feitas visitas aos postos de combustíveis para coleta das amostras de material biológico (sangue) e aplicação de questionários para coleta dados.

As amostras (sangue) foram coletadas em tubos a vácuo contendo anticoagulante (EDTA ou heparina) e seguiram para o Laboratório de Toxicologia do CESTEH e para o Instituto Nacional do Câncer (INCA) para processamento dos exames laboratoriais. As análises genéticas foram realizadas no setor de Biologia Molecular do Laboratório de Toxicologia do CESTEH e os exames sanguíneos (hematológicos e bioquímicos) foram

efetuados no Serviço de Patologia Clínica e Serviço de Hemoterapia do INCA. As consultas médicas para avaliação clínica foram realizadas no Ambulatório do CESTEHE.

Os trabalhadores responderam a dois questionários, sendo um para avaliação do ambiente e do processo de trabalho e outro para levantamento de dados sociodemográficos e ocupacionais. As informações referentes ao processo de trabalho com detalhamento de todas as atividades realizadas nos postos de combustíveis foram obtidas a partir de um questionário desenvolvido para este fim pelo Centro Estadual de Referência à Saúde do Trabalhador (CESAT-SES) – Bahia. Além disso, esta avaliação também foi baseada na observação participante do ambiente de trabalho.

Tabela 2 - Distribuição dos 114 trabalhadores nos postos de combustíveis.

<b>Postos</b>	<b>Trabalhadores (n)</b>
Campo Grande	5
São Cristovão	20
Vila Isabel	18
Tijuca	16
Lins de Vasconcelos	25
Engenho de Dentro	15
Bonsucesso	15
<b>Total</b>	<b>114</b>

#### **4.2 Avaliação clínica das alterações relacionadas à intoxicação por benzeno**

A avaliação clínica dos trabalhadores participantes do estudo foi realizada no CESTEJ e no Serviço de Patologia Clínica e Serviço de Hemoterapia do Instituto Nacional do Câncer (INCA). Foram realizados exames de sangue, incluindo hemograma completo e indicadores bioquímicos. Os trabalhadores responderam a um questionário para coleta de informações sobre seu histórico de saúde e de informações sobre sinais e sintomas relacionados ao benzenismo. A interpretação dos dados clínicos foi realizada por um profissional médico do Ambulatório do CESTEJ. De acordo com os resultados, a população do estudo foi dividida em dois grupos com base na presença de alterações clínicas e laboratoriais relacionadas ao benzenismo.

#### **4.3 Análise molecular dos polimorfismos metabólicos**

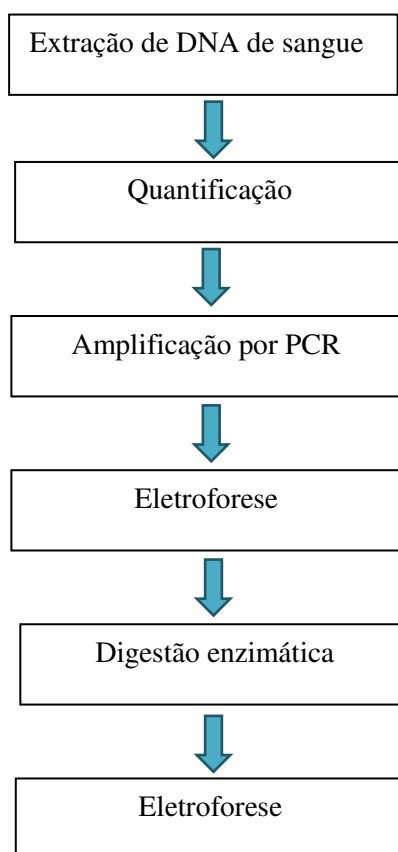
A determinação dos polimorfismos foi realizada por genotipagem, baseada na técnica da Polimerase Chain Reaction (PCR) para amplificação do fragmento polimórfico, cujas etapas estão representadas na figura 13.

Para todos os polimorfismos, foi preparada uma solução única de DNA genômico usando sangue total como matriz biológica. A extração foi executada a partir de 500  $\mu$ L de sangue por *Salting-Out*.

Após a extração, foram retiradas alíquotas da solução para quantificação da concentração de DNA por fluorescência, utilizando o fluorômetro Qubit 2.0 (Invitrogen, Life Technologies, CA, USA). A relação de 50 $\mu$ g de DNA por mL foi usada para o cálculo. As amostras de DNA extraído foram armazenadas sob refrigeração a  $-20^{\circ}\text{C}$  até o momento da análise.

As ampliações por PCR foram feitas usando de 50–200 ng de DNA genômico, 20-40pmol de cada *primer*, 1 × tampão de *PCR* (fornecido pelo fabricante da enzima Taq DNA polimerase), 0,2 mM de cada dNTP, 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub> e de 1–2,5 U de Taq DNA polimerase (Thermo Scientific, EU, Lithuania) em um volume final de 50µL de reação. As condições de amplificação e digestão dos fragmentos polimórficos de cada gene analisado no estudo estão resumidas na tabela 3.

Figura 13 - Etapas da genotipagem para determinação dos polimorfismos metabólicos.



Fonte: A autora, 2016.

Tabela 3 - Condições de amplificação e digestão dos fragmentos polimórficos analisado no estudo.

Polimorfismos	Primers	PCR	Digestão	Produtos de PCR e de digestão
CYP2E1 1053C>T (RsaI)	F: 5'- CCAGTCGAGTCTACATTGTCA-3' R: 5'-TTCATTCTGTCTTCTAACTGG- 3'	35 ciclos: 95°C por 1min, 60°C por 1min e 72°C por 1min	RsaI, overnight a 37°C	PCR:410pb CC: 360, 50pb CT: 410, 360, 50pb TT: 410pb
CYP2E1 7632T>A (DraI)	F: 5'- TCGTCAGTTCCTGAAAGCAGG-3' R: 5'- GAGCTCTGATGCAAGTATCGCA- 3'	35 ciclos: 94°C por 30s; 63°C por 30s e 72°C por 1min.	DraI, por 3-5h, a 37°C.	PCR: 375pb TT: 375pb TA: 375, 249, 126pb AA: 249, 126pb
NQO1 609 C>T	F: 5'- GAGACGCTAGCTCTGAACTGAT-3' R: 5'- ATTTGAATTCGGGCGTCTGCTG-3'	30 ciclos: 94°C por 10s; 57°C por 20s e 72°C por 45s.	HinfI, overnight, a 37°C	PCR: 304pb CC: 271pb CT: 151, 120pb TT: 271, 151, 120pb
MPO 463 G>A	F: 5'- CGGTATAGGCACACAATGGTGAG- 3' R: 5'- GCAATGGTTCAAGCGATTCTT-3'	35 ciclos: 94°C por 1min; 59°C por 1min e 71°C por 1min.	AciI, por 3h, a 37°C	PCR: 350pb GG: 169, 120, 61pb GA: 289, 169, 120, 61pb AA: 289, 61pb
GSTM1	F: 5'- GAACTCCCTGAAAAGCTAAAGC- 3' R: 5'- GTTGGGCTCAAATATACGGTG-3'	35 ciclos: 94°C por 2 min.; 61°C por 1min e 72°C por 2min.	-	PCR: 215pb
GSTT1	F: 5'- TTCCTTACTGGTCCTCACATCTC-3' R: 5'-TCACCGGATCATGGCCAGCA- 3'	35 ciclos: 94°C por 2min; 61°C por 1min e 72°C por 2min.	-	PCR: 480pb
β-globina	F: 5'-CAACTTCATCCACGTTACC- 3' R: 5'- GAAGAGCCAAGGACAGGTAC-3'	35 ciclos: 94°C por 2min; 61°C por 1min e 72°C por 2min.	-	PCR: 268pb



#### 4.3.1 *Genotipagem da CYP2E1 DraI*

A genotipagem da enzima foi realizada por PCR-Restriction Fragment Length Polymorphisms (PCR-RFLP), utilizando os seguintes oligos 5'-TCGTCAGTTCCTGAAAGCAGG-3' (senso) e 5'-GAGCTCTGATGCAAGTATCGCA-3' (antisenso) como iniciadores, nas seguintes condições: 35 ciclos de 94°C por 30s; 63°C por 30s e 72°C por 1 min. Após a amplificação, o *amplicon* foi submetido à digestão com a endonuclease de restrição *DraI* (Thermo Scientific, EU, Lithuania), a 37°C durante 3-5 horas. Os resultados foram revelados por eletroforese em gel de agarose 3%, corado com o corante gelRed<sup>TM</sup> (Biotium, Inc., Hayward, CA, USA.) ou brometo de etídio (Invitrogen, Thermo Scientific), visualizado em equipamento de foto documentação com transiluminador.

#### 4.3.2 *Genotipagem da CYP2E1 RsaI*

Foi realizada por *PCR-RFLP*. A amplificação foi feita em 35 ciclos: 95°C por 1 min., 60°C por 1 min. e 72°C por 1 min., usando os *primers*: 5'-CCAGTCGAGTCTACATTGTCA-3' (senso) e 5'-TTCATTCTGTCTTCTAACTGG-3' (antisenso). A digestão foi realizada a 37°C *overnight*. Os resultados foram revelados por eletroforese em gel de agarose 3% corado com gelred<sup>TM</sup> ou brometo de etídio e visualizado em equipamento de fotodocumentação com transiluminador.

#### 4.3.3 *Genotipagem da MPO*

O fragmento polimórfico foi amplificado usando os iniciadores 5'-CGGTATAGGCACACAATGGTGAG-3' (senso) e 5'-GCAATGGTTCAAGCGATTCTT-3' (antisenso), nas seguintes condições: 35 ciclos de 94°C por 1 min.; 59°C por 1 min. e 71°C por 1min. O *amplicon* foi submetido à digestão por 3h, a 37°C com a enzima *AciI*. Uma eletroforese em gel de agarose 3% foi realizada usando com GelRed™ ou brometo de etídio, seguida de análise por fotodocumentação, para revelação do resultado.

#### 4.3.4 *Genotipagem da NQO1*

Efetuada através de *PCR-RFLP*. Os oligos 5'-GAGACGCTAGCTCTGAACTGAT-3' (senso) e 5'-ATTTGAATTCGGGCGTCTGCTG-3' (antisenso) foram utilizados como iniciadores na *PCR*. As condições foram fixadas em 30 ciclos de 94°C por 10s, 57°C por 20s e 72°C por 45s. Para a digestão foi usada a enzima *HinfI*, a 37°C *overnight*. Os resultados foram revelados por eletroforese em gel de agarose 3% corado com Gelred™ ou brometo de etídio, visualizado em transiluminador.

#### 4.3.5 *Genotipagem da GSTT1 e GSTM1*

Foi feita por *PCR multiplex*, com os iniciadores 5'-TTCCTTACTGGTCCTCACATCTC-3' (senso) e 5'-TCACCGGATCATGGCCAGCA-3' (antisenso) para GSTT1 e 5'-GAACTCCCTGAAAAGCTAAAGC-3' (senso) e 5'-

GTTGGGCTCAAATATACGGTG-3' (antisense) para GSTM1. O gene da  $\beta$ -globina foi usado como controle positivo da reação, utilizando os *primers* 5'-CAACTTCATCCACGTTCCACC-3 (senso) e 5'-GAAGAGCCAAGGACAGGTAC-3' (antisense). A reação foi efetuada em 35 ciclos de 94°C por 2 min; 61°C por 1 min; 72 °C por 2 min. O resultado foi revelado por eletroforese em gel de agarose 3% corado com Gelred™ ou brometo e etídio, visualizado em transiluminador.

#### 4.4 Análise estatística

Os resultados obtidos, bem como os dados coletados através dos questionários foram analisados estatisticamente utilizando o software SPSS, versão 17 (Chicago, IL, USA). A normalidade das distribuições foi avaliada de acordo com o teste Kolmogorov–Smirnov. Teste-t, Qui-quadrado e Mann–Whitney U foram usados para analisar as diferenças entre os grupos. A relação entre as diversas variáveis, principalmente entre polimorfismos genéticos e as alterações clínicas e laboratoriais foram verificadas por correlação de Spearman. O impacto dos genótipos e das demais variáveis sobre os achados relacionados ao benzenismo foi testado usando Regressão Logística multivariada. Desvios do equilíbrio de Hardy-Weinberg foram avaliados por Qui-quadrado. O nível de significância para todos os testes foi de  $p \leq 0.05$ .

## 5 RESULTADOS

No presente estudo, foram avaliados 114 trabalhadores pertencentes a sete postos de combustíveis do município do Rio de Janeiro, expostos ocupacionalmente ao benzeno. Esta população foi dividida em dois grupos, Trabalhadores sem alterações clínicas (TS) e Trabalhadores com alterações clínicas (TC), de acordo com a presença de alterações clínicas relacionadas ao benzenismo.

### 5.1 Caracterização da população estudada

As características da população estudada são apresentadas na tabela 4, a qual mostra os principais dados sociodemográficos, coletados a partir de questionário auto referido, onde verificou-se que a maioria era do sexo masculino (76,36%), com média de idade abaixo de 40 anos e estado civil casado (60,2%). Quanto ao nível de escolaridade, 33% apresentaram ensino fundamental incompleto, 33% fundamental completo, 32,2% ensino médio. Foram encontrados 1 indivíduo com ensino superior e 1 analfabeto. Em relação à cor da pele, 37% se auto definiram como brancos, 11,1% como negros, 46,3% como pardos, 2,8% como amarelos e 2,8% como indígenas. A renda familiar mostrou uma média de R\$ 1551,11 e valores mínimo e máximo de R\$ 500,00 e R\$ 6000,00, respectivamente. As informações quanto ao consumo de álcool e de cigarro (tabaco) mostraram que 71,4% relataram fazer uso de álcool e 61,6% relataram nunca ter fumado, enquanto 17,9% disseram ser ex fumantes e 20,5% fumantes.

Tabela 4 - Características sociodemográficas da população estudada.

<b>Variáveis</b>	<b>% (n)</b>
Sexo	n=114
Feminino	23,7 (27)
Masculino	76,3 (87)
Estado civil	n=108
Solteiro	34,2 (37)
Casado	60,2 (65)
Separado <sup>1</sup>	2,8 (3)
Viúvo	2,8 (3)
Cor	n=108
Branco	37 (40)
Negro	11,1 (12)
Pardo	46,3 (50)
Amarelo	2,8 (3)
Indígena	2,8 (3)
Escolaridade	n=106
Analfabeto	0,9 (1)
Fundamental incompleto	33 (35)
Fundamental	33 (35)
Médio	32,2 (34)
Superior	0,9 (1)
Renda familiar (R\$)	n=106
Média	1551,11 ± 83,6
Mínimo	500,00
Máximo	6000,00
Idade (anos)	n=108
Média	37,63 ± 1,16
Mínimo	19
Máximo	82
Fumo/cigarro	n=112
Nunca fumaram	61,6 (69)
Fumante	20,5 (23)
Ex fumante	17,9 (20)
Álcool	n=112
Não	28,6 (32)
Sim	71,4 (80)

Em relação aos dados ocupacionais, a população estudada foi formada por indivíduos com exposição ocupacional ao benzeno em diversas atividades dentro de seu processo de trabalho nos postos de combustíveis. Conforme apresenta a tabela 5, 82,4% foram frentistas e 17,6% não frentistas, ou seja, profissionais que atuavam na parte administrativa dos postos e nas lojas de conveniência. Do total, 56,5% eram sindicalizados e 43,5% não sindicalizados. Quanto ao tempo de exposição, o valor médio foi de  $14,50 \pm 1,14$ , com tempo mínimo de menos de um ano e máximo de 52 anos. A tabela 5 também mostra a jornada diária dos trabalhadores e sua distribuição nos postos de combustíveis.

Tabela 5 - Dados ocupacionais da população estudada.

<b>Variáveis</b>	<b>% (n)</b>
Ocupação	n=108
Frentista	82,4 (89)
Não frentista <sup>1</sup>	17,6 (19)
Sindicalizado	n=108
Sim	56,5 (61)
Não	43,5 (47)
Posto	n=114
Bonsucesso	13,2 (15)
Campo Grande	4,4 (5)
São Cristovão	17,5 (20)
Vila Isabel	15,8 (18)
Tijuca	14,0 (16)
Engenho Dentro	13,2 (15)
Lins de Vasconcelos	21,9 (25)
Tempo trabalho (anos)	n=106
Média	14,50 ± 1,14
Mínimo	< 1
Máximo	52
Jornada diária (h)	n=108
Média	8,21 ± 0,61
Mínimo	8
Máximo	11

<sup>1</sup> Administração e loja de conveniência

As informações sobre o processo de trabalho nos postos foram obtidas por meio do questionário desenvolvido pelo CESAT-SES – Bahia e por observação do ambiente de trabalho. Com este fim, foram avaliados os 7 postos que participaram do estudo, os quais comercializavam os seguintes produtos: gasolina, etanol, diesel, GNV, óleos lubrificantes, extintores de incêndio, além de água e outras bebidas, alimentos e gelo.

Em relação a medidas de proteção e controle, todos os postos avaliados tinham procedimento de contenção de derramamento de combustível e extintores de incêndio. Cinco postos apresentaram sinalização de segurança. Mas, na maioria dos postos, os trabalhadores não receberam treinamento para combate a incêndio, segurança de trabalho e operacional. Apenas 1 posto tinha sistema de exaustão ativado e um número insignificante de trabalhadores dos postos fazia uso de equipamentos de proteção individual (EPI), como máscara, óculos, luvas, calçados especiais, avental, capacete e protetor auricular (dados não mostrados).

Quanto à infraestrutura e condição das instalações, quase todos os postos apresentaram problemas de ventilação e iluminação inadequada, ausência de chuveiro e falta de produtos de higiene como papel sanitário e sabonete nos banheiros e vestiários. Os refeitórios também funcionavam em locais inapropriados. Os empregadores forneciam, em média, 2 uniformes aos empregados, os quais eram responsáveis pela lavagem dos mesmos em suas residências. A periodicidade média das lavagens foi de 4 a 5 dias de utilização.

Foram identificados os seguintes cargos: administrador (geralmente o proprietário do posto), gerente, chefe de pista, caixa de pista, frentista e auxiliar de serviços gerais. Com respeito às atividades exercidas, a administração e supervisão eram de responsabilidade do administrador, do gerente e, algumas vezes, do chefe de pista. As



demais atividades como abastecimento, verificação e troca de óleo, lavagem de veículos e recebimento de pagamento eram realizadas por quase todos os funcionários, independente do cargo. Algumas particularidades, como teste de qualidade, acompanhamento de descarregamento de combustível e medição de tanque eram da competência do gerente ou do chefe de pista; e a limpeza das instalações cabia ao auxiliar de serviços gerais.

A população do estudo foi dividida em dois grupos: Trabalhadores sem alterações clínicas (TS) e Trabalhadores com alterações clínicas (TC), de acordo com a presença de alterações clínicas e laboratoriais que possam estar envolvidas no benzenismo, principalmente os parâmetros hematológicos. De um total de 114 trabalhadores, 63.2% (n=72) foram classificados no grupo TC.

A distribuição das características sócio-demográficas nos grupos TS e TC é apresentada na tabela 6. Nos dois grupos, a maioria dos trabalhadores foi do sexo masculino. As médias de idades foram maiores no grupo TC. Quanto ao estado civil, a maior parte mostrou ser casada. Com relação à cor da pele, a maioria se definiu como pardo em ambos os grupos.

O grupo TC mostrou nível de escolaridade mais baixo que o grupo TS, com menor percentual de nível médio (26,5% x 42%) e maior percentual de indivíduos com nível fundamental incompleto (35,3% x 28,9%). Adicionalmente, o único caso de analfabetismo foi encontrado no grupo TC. Foram encontradas médias de renda familiar de  $1483,14 \pm 114,38$  e  $1558,22 \pm 111,82$  para TS e TC, respectivamente.

Quanto ao consumo de cigarro, 24,4% foram de fumantes, 14,6% de ex fumantes e 61 % de indivíduos que nunca fumaram no grupo TS; e 18,3% de fumantes, 19,7% de ex fumantes e 62% de indivíduos que nunca fumaram no grupo TC. Em relação ao álcool foi

encontrado um percentual maior de usuários no grupo TC (77,5%), em comparação ao grupo TS (65,9%).

Tabela 6 - Dados sociodemográficos dos grupos TS e TC da população estudada.

<b>Variáveis</b>	<b>Grupo TS % (n)</b>	<b>Grupo TC % (n)</b>
Sexo	n=42	n=72
Feminino	16,7 (7)	27,8 (20)
Masculino	83,3 (35)	72,2 (52)
Estado civil	n=39	n=69
Solteiro	43,6 (17)	29 (20)
Casado	53,8 (21)	63,8 (44)
Separado <sup>1</sup>	2,6 (1)	2,9 (2)
Viúvo	...	4,3 (3)
Cor/etnia	n=69	n=69
Branco	33,3 (13)	39,1 (27)
Negro	15,4 (6)	8,7 (6)
Pardo	43,6 (17)	47,8 (33)
Amarelo	5,1 (2)	1,4 (1)
Indígena	2,6 (1)	2,9 (2)
Escolaridade	n=38	n=68
Analfabeto	-	1,5 (1)
Fundamental incompleto	28,9 (11)	35,3 (24)
Fundamental	28,9 (11)	35,3 (24)
Médio	42,1 (16)	26,5 (18)
Superior	-	1,5 (1)
Renda familiar (R\$)	n=38	n=68
Média	1483,14 ± 114,38	1558,22 ± 111,82
Mínimo	600,00	500,00
Máximo	3500,00	6000,00
Idade (anos)	n=39	n=69
Média	35	38,4
Mínimo	20	19
Máximo	61	82
Fumo/cigarro	n=41	n=71
Nunca fumaram	61 (25)	62 (44)
Fumante	24,4 (10)	18,3 (13)
Ex fumante	14,6 (6)	19,7 (14)
Álcool	n=41	n=71
Não	34,1 (14)	22,5 (16)
Sim	65,9 (27)	77,5 (55)

A tabela 7 mostra os resultados dos dados ocupacionais. Em ambos os grupos, a presença de frentistas foi maior que de não frentistas. Quanto ao tempo de trabalho em postos, que representa o tempo de exposição ocupacional ao benzeno dos trabalhadores, a média do grupo TC ( $15,2 \pm 1,38$  anos) foi maior que a do TS ( $13,0 \pm 1,97$ ). Mas esta diferença não se mostrou estatisticamente significativa.

Tabela 7 – Dados ocupacionais dos grupos TS e TC da população estudada.

<b>Variáveis</b>	<b>Grupo TS % (n)</b>	<b>Grupo TC % (n)</b>
Ocupação	n=39	n=69
Frentista	79,5 (31)	84,1 (58)
Não frentista <sup>1</sup>	20,5 (8)	15,9 (11)
Sindicalizado	n=39	n=69
Sim	59 (23)	55,1 (38)
Não	41 (16)	44,9 (31)
Tempo trabalho (anos)	n=38	n=68
Média	$13 \pm 1,97$	$15,2 \pm 1,38$
Mínimo	-	-
Máximo	42	52
Jornada diária (h)	n=39	n=69
Média	$8,09 \pm 0,63$	$8,28 \pm 0,08$
Mínimo	8	8
Máximo	10	11

1

Administração e loja de conveniência

## 5.2 Avaliação clínica da população estudada

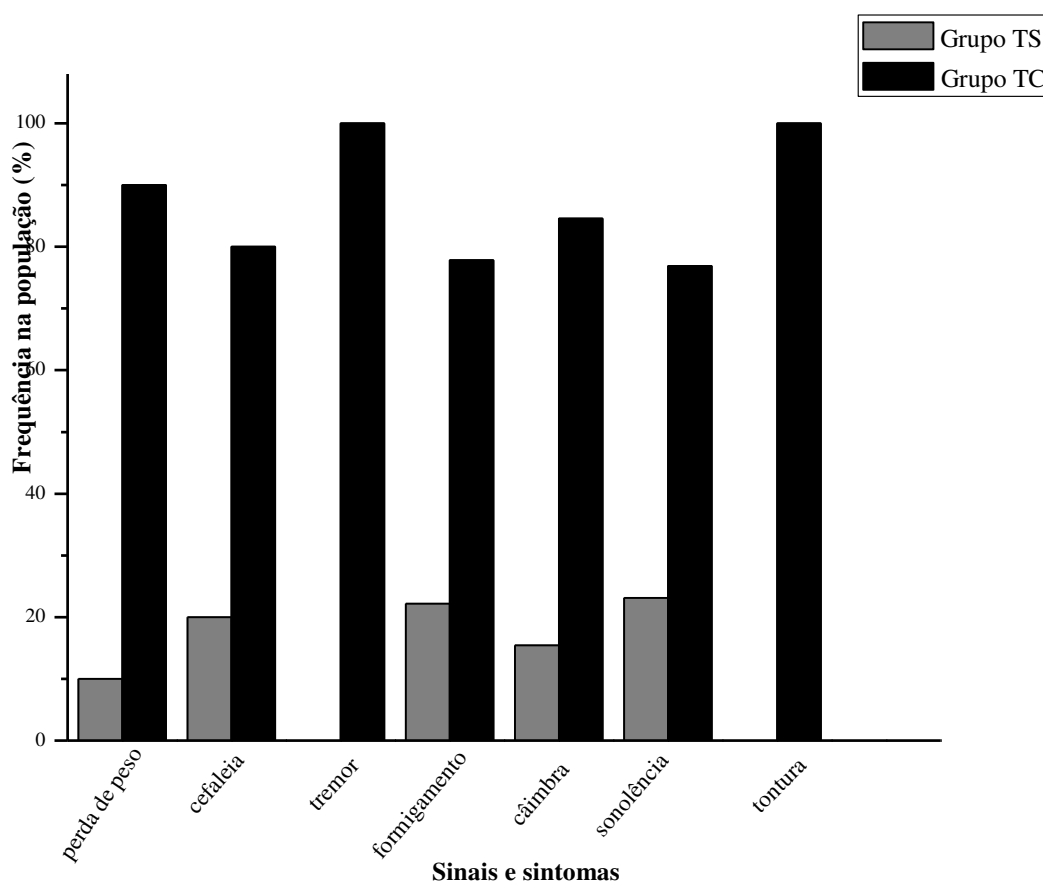
Os dados apresentados na tabela 8 representam as diferenças entre os dois grupos quanto aos índices hematológicos. O grupo TC mostrou valores mais baixos em relação ao grupo TS, exceto para linfócitos e Volume Globular Médio (VGM). A contagem de neutrófilos mostrou um peso significativo dentre as alterações relacionadas ao benzenismo ( $OR= 1.130$ , 95% CI= 1.035–1.234).

Tabela 8 - Valores hematológicos observados nos grupos TC e TS.

Indicadores	Grupo TS	Grupo TC	Valor de <i>p</i>
Hemácia (U/mL)	4905 ± 0,332	4778 ± 0,551	0,139
Hemoglobina (g/dL)	14,0 ± 1,2	14,33 ± 1,7	0,940
Hematócrito (%)	41,3 ± 3,07	41,0 ± 4,6	0,673
VGM (fl)	84,5 ± 3,9	86,13 ± 6,78	0,005
Neutrófilo (%)	58,5 ± 5,88	53,9 ± 9,54	0,003
Linfócito(%)	30,9 ± 5,56	34,2 ± 8,76	0,019
Leucócito (%)	7,8 ± 2,11	7,2 ± 1,63	0,158

Os principais sinais e sintomas reportados pelos indivíduos estão ilustrados na figura 14. O gráfico mostra que o grupo TC apresentou frequências mais altas de cefaleia (80% x 20%;  $p=0.023$ ), câimbras musculares (84.6% x 15.4%;  $p=0.009$ ), formigamento (77.8% x 22.2%;  $p=0.161$ ), sonolência (76.9% x 23.1%;  $p=0.243$ ), tontura (75% x 25%;  $p=0.369$ ), perda de peso (90% x 10%; *borderline*  $p=0.065$  e infecções repetidas (0 x 100%;  $p=0.037$ ) (este último não ilustrado no gráfico).

Figura 14 - Comparação dos sinais e sintomas relacionados ao benzenismo entre os grupos TC e TS.



Fonte: A autora, 2016.

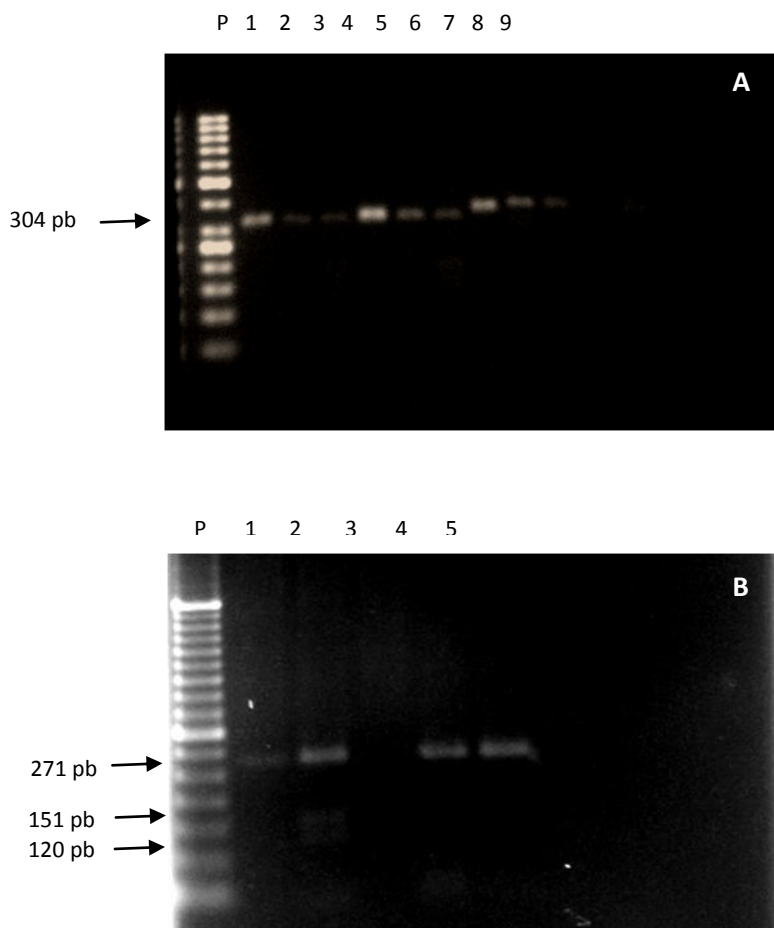
### 5.3 Análises moleculares

#### 5.3.1 *Determinação dos polimorfismos*

Foram analisados seis polimorfismos metabólicos: GSTM1, GSTT1, NQO1, MPO, CYP2E1 *RsaI* e CYP2E1 *DraI*. Os polimorfismos foram determinados por genotipagem, sendo NQO1, MPO, CYP2E1 *DraI* e CYP2E1 *RsaI* através de amplificação por PCR seguida de digestão com enzimas de restrição e GSTM1 e GSTT1 por *PCR multiplex*. As figuras de 15-19 mostram imagens dos resultados de reações de amplificação e de digestão de cada polimorfismo analisado.

Na figura 15, vê-se o resultado da genotipagem da NQO1. No primeiro gel (A), são vistas bandas de 304 pb referentes ao *amplicon*; e no segundo gel (B), os produtos da digestão com bandas de 271pb para o genótipo CC e 120 e 151 e 271pb para o heterozigoto CT. O homozigoto TT com bandas de 120 e 151 pb não é mostrado no gel.

Figura 15 – *PCR* e digestão da genotipagem da NQO1.



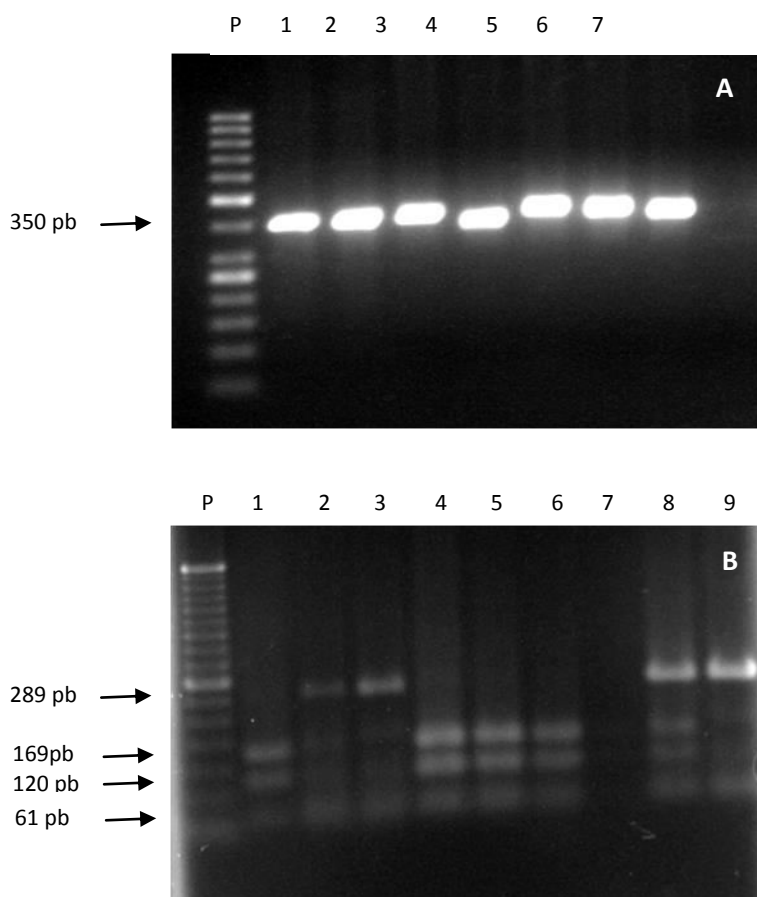
Legenda: Eletroforeses dos produtos de amplificação e de digestão, em gel de agarose corado com brometo de etídio, usando padrão de peso molecular de 50 pb. Em A, um gel com produtos de *PCR* de 9 amostras, com bandas de 304 pb (colunas 1-9); Em B, um gel com produtos da digestão: genótipo CC com banda de 271 pb (colunas 1, 4 e 5) e genótipo heterozigoto CT com bandas de 271; 151 e 120 pb (coluna 2), a reação não funcionou para a amostra da coluna 3.

Fonte: A autora, 2016.



A figura 16 apresenta um resultado de genotipagem da MPO. O gel em A, amostra a amplificação de 7 amostras com bandas de 350 pb; o gel em B, apresenta os produtos da digestão de 9 amostras, sendo GG (61pb, 120pb e 169 pb) e GA (61, 120, 169 e 289 pb). O homozigoto AA (61 e 289 pb) não é mostrado neste gel.

Figura 16 – *PCR* e digestão para genotipagem da MPO.

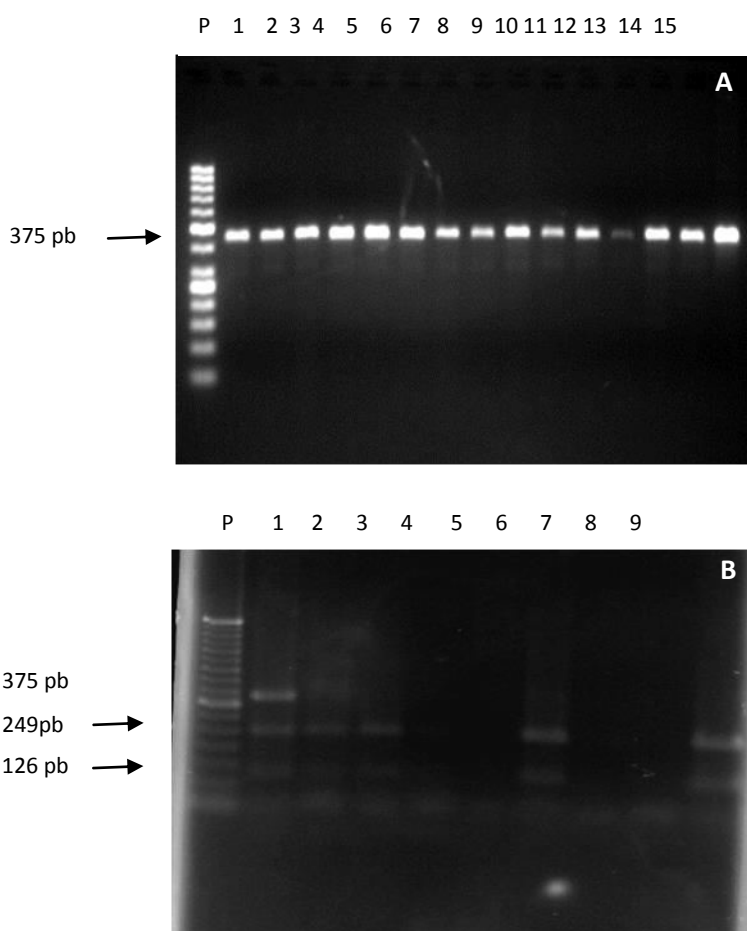


Legenda: Eletroforese em gel de agarose corado com brometo de etídio. Padrão de peso molecular de 50 pb. (A) imagem de um gel com produtos de *PCR* de 7 amostras, com bandas de 350 pb (colunas 1-7); (B) imagem de gel com os fragmentos da digestão: genótipo GG com bandas de 61, 120 e 169 pb (colunas 1, 4, 5 e 6) e genótipo heterozigoto GA com bandas de 61, 120, 169 e 289 pb (colunas 2, 3, 8 e 9), a reação não funcionou para a amostra da coluna 7.

Fonte: A autora, 2016

Na figura 17, pode-se ver resultados da genotipagem da CYP2E1 *Dra*I, mostrando no primeiro gel, a amplificação de 15 amostras, com bandas de 375 pb referentes aos produtos da PCR (A). No segundo gel, são vistos os produtos da digestão: 126, 249 pb e 375 pb referentes ao genótipo heterozigoto TA, e 126 pb e 249 pb referentes ao genótipo AA. O genótipo TT com banda de 375 pb não foi mostrado no gel (B).

Figura 17 – PCR e digestão para genotipagem da CYP2E1 *Dra*I.

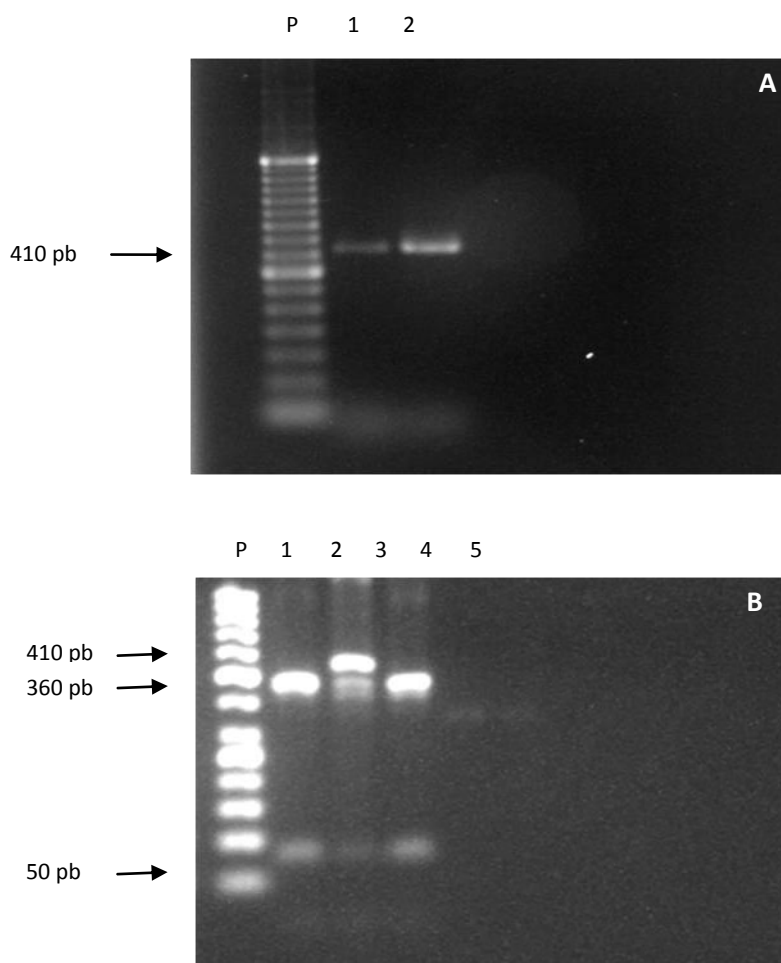


Legenda: Eletroforese em gel de agarose corado com brometo de etídio. Padrão de peso molecular de 50 pb. Em A, imagem de gel com produtos de PCR de 15 amostras, com bandas de 375 pb (colunas 1-15); Em B, imagem de gel com os produtos da digestão: genótipo heterozigoto TA com bandas de 126, 249 e 375 pb (colunas 1 e 2) e genótipo AA com bandas de 126 e 249 pb (colunas 3, 6 e 9). As reações das amostras das colunas 4, 5, 7 e 8 não funcionaram.

Fonte: A autora, 2016.

A figura 18 mostra imagens da genotipagem de CYP2E1 *Rsa*I. Em A, pode ser observada uma banda de 410 pb referente ao *amplicon*; e em B, após a digestão, bandas de 50 e 360 pb (genótipo CC), 50, 360 e 410pb (genótipo heterozigoto CT).

Figura 18 – PCR e digestão para genotipagem da CYP2E1 *Rsa*I.

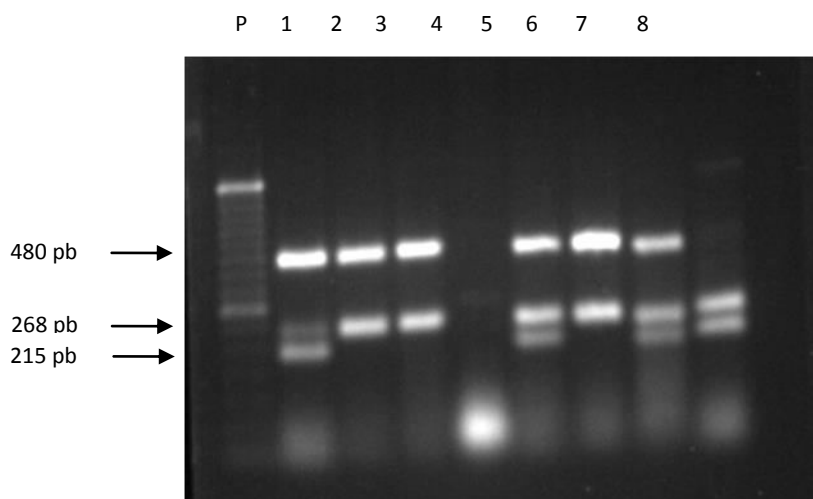


Legenda: Eletroforeses dos produtos de amplificação e de digestão, em gel de agarose corado com brometo de etídio, usando padrão de peso molecular de 50 pb. (A) gel com produtos de PCR de 2 amostras, com bandas de 410 pb (colunas 1 e 2); (B) gel com fragmentos da digestão: genótipo CC com bandas de 50, 360 pb (colunas 1 e 3) e genótipo heterozigoto CT com bandas de 50, 360 e 410 pb (coluna 2), a reação não funcionou para as amostras das colunas 4 e 5.

Fonte: A autora, 2016.

Os polimorfismos de deleção das enzimas GSTM1 e GSTT1 foram determinados por *PCR multiplex*. Um gel de eletroforese resultante da *PCR* de 8 amostras é apresentado na figura 19, onde podem ser observadas bandas de 215 e 480 pb referentes aos genótipos positivos de GSTM1 e GSTT1, respectivamente. A banda de 268 pb é relativa ao *amplicon* do gene da  $\beta$ -globina, usado como controle positivo da reação.

Figura 19 – *PCR* para genotipagem de GSTM1 e GSTT1 por *PCR multiplex*.



Legenda: Eletroforese em gel de agarose corado com brometo de etídio. Padrão de peso molecular de 50 pb. *PCR* de 8 amostras, mostrando genótipo positivo para GSTM1 e GSTT1 com bandas de 215 e 480 pb, respectivamente, nas colunas 1, 5 e 7; GSTT1 positivo e GSTM1 nulo nas colunas 2, 3 e 6; GSTM1 positivo e GSTT1 nulo na coluna 8. A banda de 268 pb é relativa à amplificação do gene da  $\beta$ -globina. A amplificação da amostra da coluna 4 não funcionou.

Fonte: A autora, 2016.

### 5.3.2 Frequências genóticas e alélicas dos polimorfismos

As seguintes frequências genóticas de cada polimorfismo foram encontradas na população estudada: GSTM1-68,7% (positivo) e 31,3% (nulo); GSTT1-75,8% (positivo) e 24,2% (nulo); NQO1-64,1% (CC), 30,4% (CT), 5,4% (TT); MPO-43,2% (GG), 49,5% (GA), 7,4% (AA); CYP2E1 *RsaI*-77% (CC), 13,8% (CT), 9,2% (TT) e CYP2E1 *DraI*-82,1% (AA), 16,8% (TA) e 1,1% (TT) (tabela 9).

Tabela 9 - Frequências genóticas e alélicas dos polimorfismos analisados na população estudada.

Frequências	NQO1 % (n)	CYP2E1 <i>RsaI</i> % (n)	CYP2E1 <i>DraI</i> % (n)	MPO % (n)	GSTM1 % (n)	GSTT1 % (n)
Genotípica	CC 64,1 (59)	CC 77 (67)	TT 1,1 (1)	GG 43,2 (41)	+ 68,7 (68)	+75,8 (75)
	CT 30,4 (28)	CT 13,8 (12)	TA 16,8 (16)	GA 49,5 (47)	- 31,3 (31)	- 24,2 (24)
	TT 5,4 (5)	TT 9,2 (8)	A 82,1 (78)	AA 7,4 (7)		
Alélicas	C 0,79	C 0,84	T 10,09	A 0,32	+ 0,69	+ 0,76
	T 0,21	T 0,16	A 20,91	G 0,68	- 0,31	- 0,24

As frequências dos alelos relacionados ao risco entre os grupos TS e TC são apresentadas na tabela 10. Em comparação com o grupo TS, o grupo TC apresentou frequências mais altas do alelo variantes do gene CYP2E1 7632T>A (*DraI*) e dos alelos nulos de GSTM1 e GSTT1. Mas mostrou frequências mais baixas dos variantes dos genes NQO1 e CYP2E1 1053C>T (*RsaI*). Não houve significância estatística entre as diferenças.

Para GSTM1, as frequências dos alelos nulos foram 0.26 e 0.34 para TS e TC, respectivamente. Em relação ao gene GSTT1, os grupos apresentaram frequências de 0.20 (TS) e 0.26 (TC). O alelo T do gene CYP2E1 1053C > T mostrou 0.21 (14.3% homozigoto e 14.3% heterozigoto) e 0.14 (6.8% homozigotos e 13.6% heterozigotos) para TS e TC, respectivamente. Para o gene CYP2E1 7632T>A foram encontradas 0.06 (12.1% de heterozigotos e nenhum homozigoto) no grupo TS, e 0.11 (19.4% heterozigotos e 1.6% homozigotos) no grupo TC. O gene NQO1 mostrou 0.32 (38.7% de heterozigotos e 6.5% de homozigotos) no grupo TS e 0.18 (26.2% heterozigotos e 4.9% homozigotos) no TC. O polimorfismo MPO apresentou 0.30 (48.5% heterozigotos e 9.1% homozigotos) no grupo TS e 0.31 (50% heterozigotos e 6.5% homozigotos) no grupo TC. A distribuição dos genótipos mostrou-se em equilíbrio de Hardy-Weinberg para os genes MPO, NQO1 e CYP2E1 7632T>A, e desvio para os genes GSTM1, GSTT1 e CYP2E1 1053C>T.

Tabela 10 - Frequências dos alelos variantes encontradas nos grupos TS e TC.

<b>Polimorfismos</b>	<b>Alelo variante</b>	<b>TS</b>	<b>TC</b>	<b>p-valor</b>
NQO1	T <sup>1</sup>	0.32	0.18	0.233
CYP2E1 1053C>T	C <sup>1</sup>	0.21	0.14	0.394
CYP2E17632T>A	A <sup>1</sup>	0.06	0.11	0.284
GSTM1	Nulo <sup>1</sup>	0.26	0.34	0.452
GSTT1	Nulo <sup>1</sup>	0.20	0.26	0.539
MPO	A <sup>2</sup>	0.30	0.31	0.639

1-alelos relacionados ao risco.

2-alelos relacionados à proteção.

De acordo com a literatura, os alelos apresentados na tabela 10 estão relacionados com a exposição ao benzeno e seus efeitos sobre a saúde humana (ROTHMAN et al., 1997; WAN et al., 2002; SNYDER, 2004; LAN et al., 2004; CHEN et al., 2007; DOUGUERTY et al., 2008; MITRI et al., 2015). O número de alelos relacionados com o risco mostrou associação com a presença de achados clínicos envolvidos no benzenismo (Spearman Qui-quadrado=0.196;  $p=0.024$ ). O teste de regressão logística mostrou que o genótipo nulo da GSTM1 teve impacto sobre as alterações clínicas e laboratoriais encontradas no benzenismo (OR=5.131, 95% CI=1.137–23,151). Não foi observada significância estatística para a influência dos demais polimorfismos sobre os achados clínicos.

## 6 DISCUSSÃO

Nesta população, foram analisadas alterações clínicas e laboratoriais relacionadas ao benzenismo como desfecho da exposição e também polimorfismos metabólicos como fatores genéticos de risco, que podem conferir susceptibilidade individual ao benzeno. Uma busca por este tema na literatura científica mostra que estudos concernentes à vulnerabilidade inter individual de natureza genética ao benzeno, especialmente estando relacionada a desfechos da exposição, são ainda incipientes.

Estudos mostram que esta categoria de trabalhadores tem sido ocupacionalmente exposta de forma contínua às substâncias presentes na gasolina, especialmente o benzeno a níveis que vão de dezenas a centenas de ppb do xenobiótico em seus ambientes de trabalho (NAVASUMRIT et al., 2005; WEISEL, 2010; MOURA-CORREA et al., 2014). Neste trabalho, a análise das informações sobre o ambiente e processo de trabalho da população estudada, obtidas através dos questionários, revelou que as medidas de proteção e de controle da exposição nos postos se mostraram insuficientes e, muitas vezes, inexistentes. De maneira geral, poucos trabalhadores dos postos faziam uso de equipamentos de proteção individual (EPIs), como máscara, óculos, luvas, calçados especiais, avental, capacete e proteção auricular. Além disso, a grande maioria relatou o uso constante da “flanelinha” junto ao corpo próximo à área respiratória, o que pode potencializar a exposição, tendo em vista que esta é a mesma flanelinha utilizada no contato entre o bico da mangueira da bomba e o tanque do veículo durante o abastecimento.

No Brasil, o número de trabalhadores nesta categoria é expressivo. Segundo o censo de 2010, são 184.733 frentistas, distribuídos em 39.450 postos por todo o país (IBGE, 2010; ANP, 2013). A situação é ainda mais grave devido ao não treinamento dos



trabalhadores, à falta de informação sobre o risco, à baixa frequência de realização de exames periódicos específicos para exposição ao benzeno e à coexposição com outros compostos da gasolina, álcool, gás e diesel (MOURA-CORREA et al., 2014). As pesquisas de Costa (2001) e Moura-Correa (2014) chamam a atenção para a necessidade da vigilância deste grupo ocupacional em função dos danos à saúde e ausência de normatização, fiscalização e monitoramento.

A região Sudeste apresenta a maior concentração de postos (16.182 - 41%), seguida pelo Nordeste (8.952 - 22,7%), Sul (8.105 - 20,5%), Centro-Oeste (3.381 - 8,5%) e Norte (2.830 - 7,2%). No presente estudo, os postos não apresentaram adequação quanto às medidas de controle, como ventilação, sinalização, refeitório apropriado e higienização dos uniformes dos trabalhadores. Situações similares foram reportadas por estudos prévios em postos de combustíveis de várias regiões brasileiras (CEZAR-VAZ et al., 2012; D'ALASCIO et al., 2014; MOURA-CORREA et al., 2014).

De acordo com a publicação do Ministério da Saúde: Atenção à Saúde dos Trabalhadores Expostos ao benzeno, de 2006, diagnóstico do benzenismo oriundo da exposição ocupacional é predominantemente clínico e epidemiológico, baseado no histórico médico, dados laboratoriais, sobretudo hematológicos, e sintomas clínicos. O benzenismo é considerado quando o indivíduo apresenta um determinado quadro de sinais e sintomas após a exposição ao benzeno. Os sintomas mais comumente relatados são astenia, cefaleia, mialgia, sonolência, tontura, tremor e infecções recorrentes e são de fundamental relevância para o diagnóstico (RUIZ et al., 1993; TUNSARINGKAN et al., 2012; TREVISAN et al., 2014; D'ALASCIO et al., 2014), e os sinais hematológicos mais relevantes são o decréscimo do número de células sanguíneas e macrocitose (RUIZ, 1987; RUIZ et al., 1993; RUIZ et al., 1994; DE PALMA et al., 2013; MITRI et al., 2015).

Neste estudo, a maioria dos trabalhadores avaliados apresentou alterações clínicas e laboratoriais relacionadas ao benzenismo, 63,2%. Quanto aos sintomas, foram observadas frequências altas de cefaleia, infecções repetidas, câimbras musculares, formigamentos, sonolência, tontura e perda de peso no grupo TC, embora nem todos com diferença estatisticamente significativa. D'Alascio e colaboradores (2014) reportaram sintomas semelhantes em uma população brasileira de trabalhadores de postos de combustíveis, com prevalência mais alta de sintomas como fadiga, cefaleia, tremor, insônia e sonolência.

Em relação aos dados hematológicos, embora a diferença não tenha sido estatisticamente significativa, o grupo TC mostrou redução na contagem de células sanguíneas em comparação com o grupo TS. Os valores de neutrófilos e VGM (indicativo de macrocitose) apresentaram diferença significativa entre os grupos, e o percentual de neutrófilos foi a variável hematológica que mostrou impacto sobre os achados clínicos sugestivos de benzenismo avaliados neste estudo, segundo o teste de regressão logística. Estes resultados mostraram-se consistentes com estudos prévios. A literatura afirma que achados como anemia, neutropenia, leucopenia, eosinofilia, linfocitopenia, monocitopenia, macrocitose, pontilhado basófilo, pseudo Pelger e plaquetopenia representam os dados laboratoriais hematológicos mais significativos do benzenismo (RUIZ, 1987, RUIZ et al., 1994, RUIZ et al., 1993; RUIZ, 1994; D'ALASCIO et al., 2014). O trabalho de Qu et al. (2002) relatou um decréscimo de células vermelhas e brancas em trabalhadores chineses expostos ao benzeno. Lan et al. (2004) também encontraram diminuição no número de quase todas as células, em estudo realizado com trabalhadores expostos, o que chama a atenção para a amplitude da hematotoxicidade do benzeno, com ação em vários subtipos de células hematológicas.

Seis polimorfismos funcionais de enzimas metabolizadoras do benzeno foram analisados a fim de investigar a susceptibilidade genética ao benzeno nestes trabalhadores. As frequências dos alelos relacionados com risco foram mais altas no grupo TC para os genes GSTM1, GSTT1 e CYP2E1 7632T>A, porém mais baixas para NQO1 e CYP2E1 1053C>T. Nenhuma diferença foi encontrada entre os grupos quanto à variante do gene MPO, cuja variante não está relacionada à susceptibilidade, mas sim à proteção. Com exceção da GSTM1 e CYP2E1 1053C>T, as frequências alélicas foram similares às reportadas em outros estudos (GATTÁS et al., 2000; ROSSINI et al., 2002; CANALE et al., 2004; ROSSINI et al., 2006; SILVA et al., 2008; MACIEL et al., 2009; SILVEIRA et al., 2010; PINHEIRO et al., 2013). Chen et al. (2007) investigaram a relação entre os mesmos polimorfismos e a intoxicação por benzeno em uma população de trabalhadores expostos ao composto, e não encontraram associação com NQO1 e GSTT1, entretanto, com CYP2E1s, GSTM1, e MPO sim. O estudo de Wan et al. (2002) também observou associação entre o genótipo nulo de GSTT1 e um aumento significativo do risco de desenvolvimento de benzenismo, todavia, os estudos de Sun et al. (2008) e Lan et al. (2004) não relataram nenhuma associação. Neste estudo, não foi observada associação entre alterações clínicas e laboratoriais relacionadas ao benzenismo e os polimorfismos NQO1, MPO, CYP2E1s e GSTT1, mas com o polimorfismo da enzima GSTM1 sim. De acordo com alguns estudos, o genótipo nulo da GSTM1 é considerado de alto risco, inclusive em relação ao benzeno (STRANGE et al., 2000; DOUGHERTY et al., 2008).

A literatura também reporta a influência da interação gene-gene sobre a toxicidade do benzeno. Vários estudos têm mostrado ser possível que combinações entre a maior atividade de enzimas de ativação (como a CYP2E1 e a MPO) e uma menor atividade de enzimas de detoxificação como NQO1, GSTM1 e GSTT1 – alta bioativação e baixa

detoxificação, podem elevar o risco dos efeitos da toxicidade do benzeno (SORENSEN et al., 2004; CARRIERI et al., 2006; CHEN et al., 2007; JOHNSON et al., 2007; MANINI et al., 2010; ANGELINI et al., 2011; MANSI et al., 2012; CARBONARI et al., 2014; KELLY et al., 2014).

No presente estudo, foi observada uma associação entre indivíduos portadores de um número maior de alelos, que a literatura tem tratado como alelos de risco (ROTHMAN et al., 1997; WAN et al., 2002; LAN et al., 2004; SNYDER, 2004; CHEN et al., 2007; DOUGUERTY et al., 2008) e os achados clínicos sugestivos de benzenismo, o que pode apontar para os efeitos das interações multi-genes no metabolismo do benzeno sobre o risco de desenvolvimento de tais alterações.

No grupo de trabalhadores com achados clínicos relacionados ao benzenismo foram observados outros fatores, de natureza não genética, mas que também atuam como geradores de vulnerabilidade à exposição (SUN et al., 2008; SMITH, 2010). Foram eles: média de idade mais elevada; menor nível de escolaridade; maior número maior de usuários de álcool e tempo de exposição médio maior.

Em suma, os resultados encontrados neste estudo mostraram que a maior parte dos trabalhadores dos postos de combustíveis analisados, expostos ocupacionalmente ao benzeno, apresentou alterações clínicas e laboratoriais relacionadas ao benzenismo; e apontam para a relevância do papel do genótipo nulo da GSTM1 no desenvolvimento de tais alterações. Entretanto, são necessários mais estudos, de maior tamanho amostral, para confirmação destes achados.

Embora os dados da literatura concernentes à susceptibilidade genética ao benzenismo sejam inconclusivos, é de conhecimento geral que variações nos genes das enzimas de metabolização do benzeno são capazes de exercer modificações na toxicidade

da substância e, por isso, devem ser levadas em consideração nos estudos de avaliação de risco de trabalhadores expostos, especialmente nos que incluam investigações dos desfechos clínicos da exposição.

## 7 CONCLUSÕES

O polimorfismo nulo GSTM1 foi um fator de risco para a exposição ao benzeno, neste estudo, tendo mostrado associação com a presença de alterações clínicas e laboratoriais relacionadas ao benzenismo nos trabalhadores avaliados, fornecendo, assim, evidências sobre a relevância de seu papel na avaliação da intoxicação ao benzeno.

## REFERÊNCIAS

AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO, GÁS NATURAL E BIOCOMBUSTÍVEIS - ANP. Anuário estatístico brasileiro do petróleo, gás natural e biocombustíveis, Rio de Janeiro. 2013.

AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY - ATSDR. Toxicological profile for benzene. Atlanta, USA: **Agency for Toxic Substances and Disease Registry**, 2007.

AGUIAR, E. S. et al. GSTM1, GSTT1, and GSTP1 polymorphisms, breast cancer risk factors and mammographic density in women submitted to breast cancer screening. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 15, n. 2, p 246-255, 2012.

AKLAND, G. G. Exposure of the general population to gasoline. **Environmental Health Perspectives**, v. 101 Suppl. 6, p. 27–32, 1993.

AMERICAN CONFERENCE OF GOVERNMENTAL INDUSTRIAL HYGIENIST - ACGIH. Threshold limit values for chemicals substances and physical agents and biological exposure indices. Cincinnati, OH. 2003.

AMORIM, L. C. A. O uso dos biomarcadores na avaliação da exposição ocupacional a substâncias químicas. **Revista Brasileira de Medicina do Trabalho**, v. 1, n. 2, p. 124-132, 2003.

ANDREOLI, R. et al. Association between environmental exposure to benzene and oxidative damage to nucleic acids in children. **La Medicina del Lavoro**, v. 103, n. 5, p. 324-337, 2012.

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. **Mutation Research**, v. 719, p.7–13. 2011.

ARCURI, A. et al. Surveillance of the chemical risk of benzene. Secretaria de Atenção à Saúde, Departamento de Ações Programáticas Estratégicas, Brasília, 2005.

ARNOLD, S. M. et al. The use of biomonitoring data in exposure and human health risk assessment: benzene case study. **Critical Review in Toxicology**. v. 43, n. 2, p. 119-53, 2013.

ATKINSON, T. J. A review of the role of benzene metabolites and mechanisms in malignant transformation: Summative evidence for a lack of research in non myelogenous cancer types. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**. v. 212, n. 1, p. 1-10, 2009.

AUGUSTO, L. G. Estudo longitudinal e morfológico (medula óssea) em pacientes com neutropenia secundária à exposição ocupacional crônica ao benzeno. Dissertação de mestrado. Universidade de Campinas, 1991.

AUGUSTO, L. G. S.; NOVAES, T. C. P. Ação médico-social no caso do benzenismo em Cubatão, São Paulo: Uma abordagem interdisciplinar. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 15, n. 4, p. 729-738, 1999.

AUSTIN, G. E. et al. Sequence comparison of putative regulatory DNA of the 5' flanking region of the myeloperoxidase gene in normal and leukemic bone marrow cells. **Leukemia**, v. 7, n. 9, p. 1445-1450, 1993.

AUTRUP, H. Polymorphisms in human xenobiotica metabolizing enzymes as susceptibility factors in toxic response. **Mutation Research**, v. 464, n. 1, p. 65-76, 2000.

BACCARELLI, A.; BOLLATI, V. Epigenetics and Environmental Chemicals. **Current Opinion in Pediatrics**, v. 21, p. 243-251, 2009.

BAGRYANTSEVA, Y. et al. Oxidative damage to biological macromolecules in Prague bus drivers, and garagemen: Impact air pollution and genetic polymorphisms. **Toxicology Letters**, v. 199, n. 1, p. 60-68, 2010.

BARATA-SILVA et al. Benzeno: reflexões sobre a saúde pública, presença ambiental e indicadores biológicos utilizados para a determinação da exposição. **Caderno de Saúde Coletiva**, v. 22, n. 4, p. 329-342, 2014.

BARRY, K. H. et al. Genetic variation in metabolic genes: Occupational solvent exposure, and risk of non-Hodgkin lymphoma. **American Journal of Epidemiology**, v. 173, n. 4, p. 404-413, 2011.



BARTOLUCCI, G. B.; ALESSANDRO, G.; SAIA, B. In *Il Benzene: Tossicologia, Ambienti di Vita e di Lavoro*. MINOIA et al., ed. Morgan Edizioni Tecniche, Milano, 1995, p 69.

BOLLATI, V. et al. Changes in DNA methylation patterns in subjects exposed to low-dose benzene. **Cancer Research**, v. 67, p. 876–880, 2007.

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

BOOGAARD, P. J.; VAN-SITTERT, N. J. et al. Biological monitoring of exposure to benzene: a comparison between S-phenylmercapturic acid, trans,trans-muconic acid, and phenol. **Occupational and Environmental Medicine**, v. 52, n. 9, p. 611-620, 1995.

BOOGAARD, P. J.; VAN SITTERT, N. J. Suitability of S-phenyl mercapturic acid and trans-trans-muconic acid as biomarkers for exposure to low concentrations of benzene. **Environmental Health Perspective**, v. 104, suppl. 6, p. 1151-1157, 1996.

BRASIL. MINISTÉRIO DO TRABALHO E EMPREGO. Acordo e legislação sobre o benzeno. São Paulo, Fundacentro, 1995.

BRASIL. MINISTÉRIO DO TRABALHO E EMPREGO. Portaria n° 34, de 20 de dezembro de 2001. Diário Oficial da União, 20 de dezembro, 2001.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Norma de Vigilância da Saúde dos Trabalhadores expostos ao Benzeno. Julho de 2003.

BRASL, MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Atenção à Saúde Departamento de Ações Programáticas Estratégicas. Risco Químico: Atenção à Saúde dos Trabalhadores Expostos ao Benzeno. **Saúde do trabalhador, Protocolos de Complexidades Diferenciadas, Série A Normas e Manuais Técnicos**, Brasília, 2006.

BRITO, F. V. *et al.* Estudo da contaminação de águas subterrâneas por BTEX oriundas de postos de distribuição no Brasil. In: 3° Congresso Brasileiro de P&D em Petróleo e Gás; 2005.

BRUGNONE, F. et al. Breath and blood levels of benzene, toluene, cumene and styrene in non-occupational exposure. **International Archives of Occupational and Environmental Health**, v. 61, p. 303–311, 1989.

BUTHBUMRUMG, N. et al. Oxidative DNA damage and influence of genetic polymorphisms among urban and rural schoolchildren exposed to benzene. **Chemico-Biology Interaction**, v. 172, n. 3, p. 185-194, 2008.

CANALLE, R. et al. Genetic polymorphisms and susceptibility to childhood acute lymphoblastic leukemia. **Environmental and Molecular Mutagenesis**. v. 4, p. 100–109. 2004.

CANDURA, S. M.; LA PAGLIA, G.; MANZO, L. In *Il Benzene – Tossicologia, Ambienti di Vita e di Lavoro*, Milano, ed. Morgan Edizioni Tecniche, 1995, p. 3

CARBONARI, D. et al. Influence of genetic polymorphism on t, t-MA/S-PMA ratio in 301 benzene exposed subjects. **Toxicology Letters**, v. 231, p. 205–212, 2014.

CARRIERI, M. et al. Comparison of exposure assessment methods in occupational exposure to benzene in gasoline filling-station attendants. **Toxicology Letters**, v. 162, p. 146–152, 2006.

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

CEZAR-VAZ, M. R. et al. Risk perception and occupational accident: A study of gas station workers in southern Brazil. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 9, n. 7, p. 2362-2377, 2012.

CHEN, Y. et al. Genetic polymorphism involved in toxicant-metabolizing enzymes and the risk of chronic benzene poisoning in Chinese occupationally exposed population. **Xenobiotica**, v. 37, n. 1, p. 103-112, 2007.

CHEVRON. Motor Gasoline Technical Review. 1996. Disponível em:<<http://www.chevron.com/prodserv/fuels/bulletin/motorgas>>. Acesso em: 16 nov. 2009.

COSTA, M. F. B. et al. Aplicabilidade do ácido trans,trans-mucônico urinário como indicador biológico na avaliação da exposição ocupacional ao benzeno. **Revista Brasileira de Toxicologia**, v. 13, p. 63-68, 2000.

COSTA, M. F. B. Estudo da aplicabilidade do ácido trans, trans-mucônico urinário como indicador biológico de exposição ao benzeno. Tese de doutorado, Escola Nacional de Saúde Pública, Rio de Janeiro, 2001.

COSTA, M. A. F.; COSTA, M. F. B. Benzeno: Uma questão de Saúde Pública. **Interciência**, v. 27, n. 4, p. 201-204, 2002.

COURA, R. S. et al. CYP1A1 and CYP2E1 polymorphism frequencies in a large Brazilian population. **Genetic and Molecular Biology**, v. 30, n. 1, p. 1-5, 2007.

COUTRIM, M. X.; CARVALHO, L. R. F.; ARCURI, A. S. A. Avaliação dos métodos analíticos para a determinação de metabólitos do benzeno como potenciais biomarcadores de exposição humana ao benzeno no ar. **Química Nova**, v. 23, n. 5, p. 653-663, 2000.

D'ALASCIO et al. Sintomas relacionados à exposição ocupacional ao benzeno e hábitos ocupacionais em trabalhadores de postos de revenda de combustíveis a varejo na região sul de Santa Catarina. **Revista Brasileira de Medicina do Trabalho**, v. 12, n. 1, p. 21-29, 2014.

DE PALMA, G. et al. Biomarkers of effect and susceptibility to low doses of benzene. **Giornale Italiano di Medicina del Lavoro ed ergonomia**, v. 35, n. 4, p. 259-262, 2013.

DE PALMA, G.; MANNO, M.. Metabolic polymorphisms and biomarkers of effect in the biomonitoring of occupational exposure to low-levels of benzene: state of the art. **Toxicology Letters**, v. 231, n. 2, p. 194-204, 2014.

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

EREXSON, G. L.; WILMER, J. L.; KLIGERMAN, A. D. Sister chromatid exchange induction in human lymphocytes exposed to benzene and its metabolites *in Vitro*. **Cancer Research**, v. 45, n. 6, p. 2471-2477, 1985.

FARMER, P. B. et al. The use of S-phenylmercapturic acid as a biomarker in molecular epidemiology studies of benzene. **Chemico-Biological Interactions**, v. 153-154, p. 97-102. 2005.

FUSTINONI, S. et al. Monitoring low benzene exposure: comparative evaluation of urinary biomarkers, influence of cigarette smoking, and genetic polymorphisms. **Cancer Epidemiology Biomarkers Prevention**, v. 14, p. 2237–2244, 2005.

GALBRAITH, D. et al. Benzene and human health: A history review and appraisal of associations with various diseases. **Critical Reviews in Toxicology**, v. 40, suppl. 2, p. 1-46, 2010.

GARTE, S. et al. Biomarkers of exposure and effect in Bulgarian petrochemical workers exposed to benzene. **Chemico-Biology Interaction**, v. 153–154, p. 247–251, 2005.

GARTE, S. et al. Genetic susceptibility to benzene toxicity in humans. **Journal of Toxicology and Environmental Health A**, v. 71, n. 22, p. 1482-1489, 2008.

GATTÁS, G. J.; SOARES-VIEIRA, J. A. Cytochrome P450-2E1 and glutathione S-transferase um polymorphisms among caucasians and mulattoes from Brazil. **Occupational Medicine**, v. 50, p. 508–511, 2000.

GATTÁS, G. J. F. et al. Ethnicity and glutathione S-transferase (GSTM1/GSTT1) polymorphisms in a Brazilian population. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 37, n. 4, p. 451-458, 2004.

GAUTAM, R.; BOGDAN, P.; LICHTSCHEIDL, J. Maximize use of existing assets through advances in CCRTM reforming catalysts. In: EUROPEAN REFINING TECHNOLOGY CONFERENCE, Paris, 1999.

GILLI, G.; SCURSATONE, E.; BONO, R. Geographical distribution of benzene in air in northwestern Italy and personal exposure. **Environmental Health Perspectives**, v. 104, suppl. 6, p. 1137-1140, 1996.

GREIM, H. *et al.* The bone marrow niche, stem cells, and leukemia: impact of drugs, chemicals, and the environment. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1310, p. 7-31, 2014.

GU, S. Y. et al. Genetic polymorphisms in CYP1A1, CYP2D6, UGT1A6, UGT1A7, and SULT1A1 genes and correlation with benzene exposure in a Chinese occupational population. **Journal of Toxicology and Environmental Health**, v. 70, n. 11, p. 916-924, 2007.

HATAGIMA, A. Genetic polymorphism of endocrine disruptors in cancer susceptibility. **Caderno de Saúde Pública**, v. 18, n. 2, p. 357-377, 2002.

HATAGIMA, A. et al. Glutathione S-transferase polymorphisms and oral cancer: a case-control study in Rio de Janeiro, Brazil. **Oral Oncology**, v. 44, n. 2, p. 200-207, 2008.

HAYES, J. D.; PULFORD, D. J. The glutathione S-transferase supergene Family Regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance. **Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology**, v. 30, p. 445–600, 1995.

HILPERT, M. et al. Hydrocarbon release during fuel storage and transfer at gas station: Environmental and health effects. **Current and Environmental Health Reports**, v. 2, n. 4, p. 412-422, 2015.

HOET, P. et al. Evaluation of urinary biomarkers of exposure to benzene: correlation with blood benzene and influence of confounding factors. **International Archives of Occupational & Environmental Health**, v. 82, n 8, p. 985–995. 2009.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA -IBGE. Censo Demográfico 2010 – Resultados gerais da amostra. Rio de Janeiro, 2010.

IARC. International Agency for Research on Cancer. Benzene. Monograph Evaluation Carcinogenic Risk Chemical Human. 45, p. 159-218, 1989.

International Fuel Quality Center. 2008. International Gasoline Rankings—Top 100 Benzene. Houston, TX: **Hart Energy Publishing**, Available at: <http://www.ifqc.org/MiscellaneousContent.aspx?ContentId=20>.

ISKANDER, K.; JAISWAL, A. K. Quinone oxidoreductases in protection against myelogenous hyperplasia and benzene toxicity. **Chemico-Biological Interaction**, v. 153–154, p. 147–157, 2005.

JO, W. K.; MOON, K. C. Housewives' exposure to volatile organic compounds relative to proximity to roadside service stations. **Atmospheric Environment**, v. 33, n. 18, p. 2921–2928, 1999.

JO, W. K.; OH, J. W. Exposure to methyl tertiary butyl ether and benzene in close proximity to service stations. **Journal of the Air and Waste Management Association**, v. 51, n. 8, p. 1122–1128, 2001.

JOHNSON, E. S.; LUCIER, G. Perspectives on risk assessment impact of recent reports on benzene. **American Journal of Industrial Medicine**, v.21, n. 5, p. 749-757, 1992.

JOHNSON, E. S.; LANGARD, S.; LIN, Y. S. A critique of benzene exposure in the general population. **The Science of the Total Environment**, v. 374, n. 2-3, p. 183- 198, 2007.

KELLY, R. S.; VINEIS, P. Biomarkers of susceptibility to chemical carcinogens: the example of non-Hodgkin lymphomas. **British Medical Bulletin**, v. 111, p. 89-100, 2014.

KIM, S. et al. Hematotoxicity in workers exposed to low levels of benzene. **Science**, v. 306, p. 1774–1776, 2004.

KIM, S. et al. Genetic polymorphisms and benzene metabolism in humans exposed to a wide range of air concentrations. **Pharmacogenetics and genomics**, v. 17, n. 10, p. 789-801, 2007.

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

KIYOHARA, C. et al. NQO1, MPO, and the risk of lung cancer: a HuGE review. **Genetics in Medicine**, v. 7, n. 7, p. 463-478, 2005.

KLAASSEN, C.; WATKINS, B. J. **Fundamentos em Toxicologia**. 2<sup>a</sup> ed, Porto Alegre, 2012, p. 460.

KLEBANOFF, S. J. Myeloperoxidase: Occurrence and biological function. In Everse, J.; Everse, K. E.; Grisham, M. B. ed. **Peroxidases in Chemistry and Biology**. CRV Press, Boca Raton, FL, v. 1, p. 1-35, 1991.

KOLACHANA, P. et al. Benzene and its phenolic metabolites produce oxidative DNA damage in H160 cells *in vitro* and in the bone marrow *in vivo*. **Cancer Research**, v. 53, p. 1023–1026, 1993.

KRIEG, J. E. F. et al. Detection of DNA damage in workers exposed to JP-8 jet fuel. **Mutation Research**, v. 747, p. 218–227, 2012.

LAN, Q.; ZHANG, L.; Li, G. et al. Hematotoxicity in workers exposed to low levels of benzene. **Science**, v. 306, n. 5702, 1774–1776, 2004.

LARSON, R. A. et al. Prevalence of the inactivating <sup>609</sup>C→T polymorphism in the NAD(P)H:Quinone oxidoreductase (NQO1) gene in patients with primary and therapy-related myeloid leukemia. **Blood**, v. 94, n. 2, p. 803-807, 1999.

LIN, Y. S. et al. Albumin adducts of electrophilic benzene metabolites in benzene-exposed and control workers. **Environmental Health Perspectives**, v. 115, n. 1, p. 28–34, 2007.

LIU, S. et al. Elucidation of CYP2E1 5' regulatory *RsaI/PstI* allelic variant and their risk for oral cancer. **Oral oncology**, v. 37, p. 437-455, 2001.

MACHADO, J. M. H. et al. Alternativas e processos de vigilância em saúde do trabalhador relacionados à exposição ao benzeno no Brasil. **Ciência e Saúde Coletiva**, v. 8, n. 4, p. 913-921, 2003.

MACIEL, M. E. et al. Population analysis of xenobiotic metabolizing genes in south Brazilian euro and afro-descendants. **Genetics and Molecular Biology**, v. 32, p. 723–728, 2009.

MALLET, W. G.; MOSEBROOK, D. R.; TRUSH, M. A. Activation of (±)-trans-7,8-dihydroxy-7,8-dihydrobenzo[a]pyrene to diolepoxides by human polymorphonuclear leukocytes or myeloperoxidase. **Carcinogenesis**, v. 12, n.3, p. 521-524, 1991.

MANINI, P. et al. Occupational exposure to low levels of benzene: Biomarkers of exposure and nucleic acid oxidation and their modulation by polymorphic xenobiotic metabolizing enzymes. **Toxicology Letters**, v. 193, p. 229–235, 2010.

MANSI, A. et al. Low occupational exposure to benzene in a petrochemical plant: Modulating effect of genetic polymorphisms and smoking habit on the urinary t, t-MA/SPMA ratio. **Toxicology letters**, v. 213, p. 57–62, 2012.

MANUELA, C. et al. Environmental and biological monitoring of benzene in traffic policemen, police drivers and rural outdoor male workers. **Journal of Environmental Monitoring**, v. 14, n. 6, p. 1542-1550, 2012.

MASTRANGELO, G. In *Il Benzene: Tossicologia, Ambienti di Vita e di Lavoro*, Minoia et al. eds. Morgan Edizioni Tecniche, Milano, p. 51, 1995.

MCHALE, C. M. et al. Changes in the peripheral blood transcription associated with occupational benzene exposure identified by cross-comparison on two microarray platforms. **Genomics**, v. 93, n. 4, p. 343-349, 2009.

MEDEIROS, A. M.; BIRD, M. G.; WITZ, G. Potential biomarkers of benzene exposure. **Journal of Toxicology and Environmental Health**, v. 51, n. 6, p. 519-539, 1997.

MITRI, S. et al. Metabolic polymorphisms and clinical findings related to benzene poisoning detected in exposed Brazilian gas-station workers. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 12, n.7, p. 8434-8447, 2015.

MORO, A. M. et al. Genotoxicity and oxidative stress in gasoline station attendants. **Mutation Research**, v. 754, n. 1-2, p. 63-70, 2013.

MOURA-CORREA, M. J. Prevalência da exposição ocupacional ao benzeno e mortalidade por leucemia entre os expostos: Estimativas para o Brasil. Tese de doutorado. Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2014.

MOURA-CORREA, M. J. et al. Exposição ao benzeno em postos de revenda de combustíveis no Brasil: Rede de Vigilância em Saúde do Trabalhador (VISAT). **Ciência e Saúde Coletiva**, v. 19, n. 12, p. 4637-4648, 2014.

NAVASUMRIT, P. et al. Environmental and occupational exposure to benzene in Thailand. **Chemico-Biology Interaction**, v. 30, v. 153-154, p. 75-83, 2005.

NEBERT, D. W. et al. NAD(P)H:quinone oxidoreductase (NQO1) polymorphism, exposure to benzene, and predisposition to disease: A HuGE review. **Genetics in Medicine**, v. 4, n. 2, p. 62-70, 2002.

NEGRI, S. et al. High-pressure liquid chromatographic-mass spectrometric determination of sorbic acid in urine: verification of formation of trans,transmuconic acid. **Chemico-Biological Interactions**, v. 153-154, p. 243-246, 2005.

NEUHAUS, T. et al. Association of cytochrome P450 E1 polymorphisms and head and neck squamous cell cancer. **Toxicology Letters**, v. 151, p. 273-282, 2004.

ONG, C. N. et al. Evaluation of biomarkers for occupational exposure to benzene. **Occupational and Environmental Medicine**, v. 52, n. 8, p. 528-533, 1995.



ONG, C. N. et al. Biomarkers of exposure to low concentrations of benzene: a field assessment. **Occupational and Environmental Medicine**, v. 53, n. 5, p. 328–333, 1996.

PAVANELLO, S.; CLONFERO, E. et al. Biological indicator of genotoxic risk and metabolic polymorphisms. **Mutation Research**, v. 463, n. 3, p. 285-308, 2000.

PERIAGO, J. F.; ZAMBUDIO, A.; PRADO, C. Evolution of environmental levels of aromatic hydrocarbons in gasoline service stations by gas chromatography. **Journal of Chromatography, A**, v. 22, n. 778, p. 263-268, 1997.

PEZZAGNO, G. In *Il Benzene – Tossicologia, Ambienti di Vita e di Lavoro*, ed. Morgan Edizioni Tecniche, Milano, 1995, p. 125.

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

PICCOLI, P. et al. In vitro CYP2E1 phenotyping as a new potential biomarker of occupational and experimental exposure to benzene. **Toxicology Letters**, v. 192, n. 1, p. 29-33, 2010.

PIEDRAFITA, F. J. et al. Na Alu element in the myeloperoxidase promoter contains a composite SP1-thyroid hormone-retinoic acid response element. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 14, n. 271, p. 14412-14420, 1996.

PINHEIRO, D. S. et al. Evaluation of glutathione S-transferase GSTM1 and GSTT1 deletion polymorphisms on type-2 diabetes mellitus risk. **PLoS ONE**,v. 8, p. e76262, 2013.

QU, Q. et al. Hematological changes among Chinese workers with a broad range of benzene exposures. **American Journal of Industrial Medicine**, v. 42, p. 275–285, 2002.

QU, Q. et al. Biomarkers of benzene: Urinary metabolites in relation to individual genotype and personal exposure. **Chemico-Biology Interaction**, v. 153–154, p. 85–95, 2005.

RAPPAPORT, S. M. et al. Protein adducts as biomarkers of human benzene metabolism. **Chemico-Biological Interactions**, v. 30, n. 153–154, p. 103–109, 2005.

RAPPAPORT, S. M. et al. Human benzene metabolism following occupational and Environmental exposures. **Chemico-Biological Interactions**, v. 184, n. 1-2, p. 189-195, 2010.

REBBECK, T. R. Molecular epidemiology of the human glutathione S-transferase genotype GSTM1 and GSTT1 in cancer susceptibility. **Cancer Epidemiology Biomarker Prevention**, v. 6, p. 733–743, 1997.

ROHR, P. et al. Análise dos polimorfismos GSTM1 e GSTT1 em pacientes que desenvolveram leucemias agudas. **Revista Brasileira de biociências**, v. 2, n. ¾, p. 143-150, 2004.

ROSS, D. The role of metabolism and specific metabolites in benzene-induced toxicity: evidence and issues. **Journal of Toxicology and Environmental Health, A**, v. 61, p. 357–372, 2000.

ROSS, D. Function and distribution of NQO1 in human bone marrow: potential clues to benzene toxicity. **Chemico-Biology Interaction**, v. 30, n. 153-154, p. 137-146, 2005.

ROSS, D.; ZHOU, H.; SIEGEL, D. benzene toxicity: The role of the susceptibility factor NQO1 in bone marrow endothelial cell signaling and function. **Chemico-Biology Interaction**, v. 192, n. 1-2, p. 145-149, 2011.

ROSSI, A. M. et al. Genetic polymorphisms influence variability in benzene metabolism in humans. **Pharmacogenetics**, v. 9, n. 4, p. 445-451, 1999.

ROSSINI, A. et al. Frequencies of GSTM1, GSTT1, and GSTP1 polymorphisms in a Brazilian population. **Genetics and Molecular Research**, v. 3, p. 233–240, 2002.

ROSSINI, A. et al. CYP2A6 and CYP2E1 polymorphisms in a Brazilian population living in Rio de Janeiro. **Brazilian Journal of Medical and Biology Research**, v. 39, p. 195–201, 2006.

ROTHMAN N. et al. Benzene poisoning, a risk factor for hematological malignancy, is associated with the NQO1 609C/T mutation and rapid fractional excretion of chlorzoxazone. **Cancer Research**, v. 57, n. 14, p. 2839–2842, 1997.

RUIZ, M. A. Alterações hematológicas do benzenismo. **Boletim da Sociedade Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 9, p. 129–134, 1987.

RUIZ, M. A.; VASSALLO, J.; SOUZA, C. A. Alterações hematológicas em pacientes expostos cronicamente ao benzeno. **Revista de Saúde Pública**, v. 27, p. 145–151, 1993.

RUIZ, M. A. et al. Bone marrow morphology in patients with neutropenia due to chronic exposure to organic solvents (benzene): Early lesions. **Pathology Research and Practice**, v. 190, n. 2, p. 151-54, 1994.

SCHABATH, M. et al. Genetic variation of myeloperoxidase and lung cancer risk. **Carcinogenesis**, v. 21, n. 6, p. 1163-1166, 2000.

SCHERER, G. et al. Contribution of tobacco smoke to environmental benzene exposure in Germany. **Environment International**, v. 21, n. 6, p. 779-789, 1995.

SCHNATTER, A. R. et al. Peripheral blood effects in benzene-exposed workers. **Chemico-Biology Interaction**, v. 184, n. 1-2, p. 174-181, 2010.

SCHRENK, D. et al. Phase II metabolism of benzene. **Environmental Health Perspectives**, v. 104, suppl. 6, p. 1183–1188, 1996.

SEATON, M. J. et al. Benzene metabolism by human liver microsomes in relation to cytochrome P4502E1 activity. **Carcinogenesis**, v. 15, n. 9, p. 1799-1806, 1994.

SHEN, M. et al. Association between Mitochondrial DNA copy number, blood cell counts, and Occupational Benzene Exposure. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 49, p. 453–457, 2008.

SHEN, M. et al. Polymorphisms in genes involved in innate immunity and susceptibility to benzene-induced hematotoxicity. **Experimental and Molecular Medicine**, v. 43, n. 6, p. 374-378, 2011.

SIEGEL, D. et al. Genotype-phenotype relationships in studies of a polymorphism in NAD(P)H:quinine oxidoreductase 1. **Pharmacogenetics**, v. 9, n. 1, p. 113-121, 1999.

SILVA, J. et al. Evaluation of genetic damage in a Brazilian population occupationally exposed to pesticides and its correlation with polymorphisms in metabolizing genes. **Mutagenesis**, v. 23, p. 415-422, 2008.

SILVEIRA, V. S. et al. Role of the CYP2D6, EPHX1, MPO, and NQO1 genes in the susceptibility to acute lymphoblastic leukemia in Brazilian children. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 51, p. 48-56, 2010.

SMITH, M. T. et al. Low NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 activity is associated with increased risk of acute leukemia in adults. **Blood**, v. 97, n. 5, p. 1422-1426, 2001.

SMITH, M. T. et al. Advances in understanding benzene health effects and susceptibility. **Annual Review of Public Health**, v. 31, p. 13-148, 2010.

SNYDER, R.; WITZ, G.; GOLDSTEIN, B. D. The Toxicology of Benzene. **Environmental Health Perspectives**, v. 100, p. 293-306, 1993.

SNYDER, R.; HEDLI, C. C. An overview of benzene metabolism. **Environmental Health Perspective**, v. 104, Suppl. 6, p. 1165-1171, 1996.

SNYDER, R. Overview of the toxicology of benzene. **Journal of Toxicology and Environmental Health A**, v. 61, p. 5-6, 2000.

SNYDER, R. Benzene and leukemia. **Critical Reviews in Toxicology**, v. 32, n.3, p. 155-210, 2002.

SNYDER, R. Xenobiotic metabolism and the mechanism(s) of benzene toxicity. **Drug Metabolism Review**, v. 36, p. 531-547, 2004.

SORENSEN, M. et al. Urban benzene exposure and oxidative DNA damage: Influence of genetic polymorphisms in metabolism genes. **Science of the Total Environment**, v. 309, p. 69–80, 2003.

SORENSEN, M. et al. Benzene exposure assessed by metabolite excretion in Estonian oil shale mineworkers: Influence of glutathione s-transferase polymorphisms. **Cancer Epidemiology, Biomarker and Prevention**, v. 13, p. 1729–1735, 2004.

SPATARI, G. et al. Increased serum levels of advanced oxidation protein products and glycation end products in subjects exposed to low-dose benzene. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, v. 215, n. 3, p. 389-392, 2012.

STRANGE, R. C.; JONES, P. W.; FRYER, A. A. Glutathione S-transferase: Genetic and role toxicology. **Toxicology Letters**, v. 15, n. 112-113, p. 357-363, 2000.

SUN, P. et al. Polymorphisms in phase I and phase II metabolism genes and risk of chronic benzene poisoning in a Chinese occupational population. **Carcinogenesis**, v. 29, n. 12, p. 2325-2329, 2008.

TANG, K. et al. Genetic polymorphism analysis of cytochrome P4502E1 (CYP2E1) in Chinese Han populations from four different geographic areas of mainland china. **Genomics**, v. 95, n. 4, p. 224-229, 2010.

TIBURTIUS, E. R. L.; PERALTA-ZAMORA, P.; LEAL, E. S. Contaminação de águas por BTXs e processos utilizados na remediação de sítios contaminados. **Química Nova**, v. 27, n. 3, p. 441-446, 2004.

TREVISAN, P. et al. Evaluation of genotoxic effect of benzene and its derivatives in workers of gas stations. **Environmental Monitoring Assessment**, v. 186, p. 2195-2204, 2014.

TUNSARINGKARN, T. et al. Occupational exposure of gasoline station workers to BTEX compounds in Bangkok, Thailand. **International Journal of Occupational and Environmental Medicine**, v. 3, n. 3, p. 117-125, 2012.

WAIDYANATHA, S. et al. Urinary benzene as a biomarker of exposure among occupationally exposed and unexposed subjects. **Carcinogenesis**, v. 22, p. 279–286, 2001.

WAIDYANATHA, S. et al. Rapid determination of six urinary benzene metabolites in occupationally exposed and unexposed subjects. **Analytical Biochemistry**, v. 327, p. 184–199, 2004.

WAIDYANATHA, S. et al. Investigation of cysteinyl protein adducts of benzene dilepoxide. **Chemico-Biology Interaction**, v. 30, n. 153–154, p. 261–266, 2005.

WAKAMATSU, C. T. Contribuição ao estudo da exposição profissional ao benzeno em trabalhadores de indústrias de calçados, SP. São Paulo, USP, p. 97, 1976.

WALLACE, L. A. Environmental exposure to benzene: An update. **Environmental Health Perspective**, v. 104, supp. 6, p. 1129–1136, 1996.

WALLACE, L. A. The exposure of the general population to benzene. **Cell Biology and Toxicology**, v. 5, p. 297–314, 1996.

WAN, J. et al. Association of genetic polymorphisms in CYP2E1, MPO, NQO1, GSTM1, and GSTT1 genes with benzene poisoning. **Environmental Health Perspectives**, v. 110, n. 12, p. 1213-1218, 2002.

WAN, J. X. et al. Genetic polymorphism of toxicant-metabolizing enzymes and prognosis of chinese workers with chronic benzene poisoning. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1076, p. 129–136, 2006.

WANG, L. et al. Stem cell and benzene-induced malignancy and hematotoxicity. **Chemical Research Toxicology**, v. 25, n. 7, p. 1303-1315, 2012.

WEAVER, V. M.; Buckley, T.; Groopman, J. D. Lack of specificity of trans,trans-muconic acid as a benzene biomarker after ingestion of sorbic acid-preserved foods. **Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention**, v. 9, n. 7, p. 749-55, 2000.

WEISEL, C. P. Benzene exposure: An overview of monitoring methods and their findings. **Chemico-Biology Interaction**, v. 184, p. 58–66, 2010.

WIEMELS, J. et al. Modulation of the toxicity and macromolecular binding of benzene metabolites by NAD(P)H:quinona oxidoreductase in transfected HL-60 cells. **Chemical Research in Toxicology**, v. 12, n. 6, p. 467-475, 1999.

WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO. Environmental Health Criteria 150: Benzene, 1993.

WORLD HEALTH ORGANIZATION – WHO. Updating and revision of the air quality guidelines for Europe, Report on the WHO working group on volatile organic compounds, 1996, EUR/ICP/EHAZ9405/MT12.

WHYSNER, J. et al. Genotoxicity of benzene and its metabolites. **Mutation Research**, v. 566, p. 99–130, 2004.

YE, L. L. et al. Are polymorphisms in metabolism protective or a risk for reduced white blood cell counts in a Chinese population with low occupational benzene exposures? **International Journal of Occupational and Environmental Health**, v. 21, n. 3, p. 232-240, 2015.

YU, R.; WEISEL, C. P. Measurement of the urinary benzene metabolite trans,trans-muconic acid from benzene exposure in humans. **Journal of Toxicology and Environmental Health**, v. 48, n. 5, p. 453–477, 1996.

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. **Journal of Toxicology and Environmental health, A**, v. 70, n. 11, p. 901-907, 2007.

ZHANG, G. H. et al. Effect of polymorphic metabolizing genes on micronucleus frequencies among benzene-exposed shoe workers in China. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, v. 217, n. 7, p. 726-732, 2014.

Article

## Metabolic Polymorphisms and Clinical Findings Related to Benzene Poisoning Detected in Exposed Brazilian Gas-Station Workers

Simone Mitri <sup>1,\*</sup>, Antônio Sérgio Almeida Fonseca <sup>2</sup>, Ubirani Barros Otero <sup>3</sup>,  
Marianne Medeiros Tabalipa <sup>3</sup>, Josino Costa Moreira <sup>1</sup> and Paula de Novaes Sarcinelli <sup>1</sup>

<sup>1</sup> Toxicology Laboratory, Center for Studies of Worker's Health and Human Ecology, Oswaldo Cruz Foundation, Rio de Janeiro 21041-210, Brazil; E-Mails: josinocm@fiocruz.br (J.C.M.); paula@ensp.fiocruz.br (P.N.S.)

<sup>2</sup> Medical Ambulatory, Center for Studies of Worker's Health and Human Ecology, Oswaldo Cruz Foundation, Rio de Janeiro 21041-210, Brazil; E-Mail: antoniosergio@ensp.fiocruz.br

<sup>3</sup> Technical Unit of Occupational Exposure, Environmental and Cancer, Prevention and Surveillance Coordination, National Cancer Institute, Rio de Janeiro 20230-130, Brazil; E-Mails: uotero@inca.gov.br (U.B.O.); mtabalipa@yahoo.com (M.M.T.)

\* Author to whom correspondence should be addressed; E-Mail: simitri@ensp.fiocruz.br.

Academic Editor: Paul B. Tchounwou

Received: 10 June 2015 / Accepted: 14 July 2015 / Published: 21 July 2015

---

**Abstract:** Benzene is a ubiquitous environmental pollutant and an important industrial chemical present in both gasoline and motor vehicle emissions. Occupational human exposure to benzene occurs in the petrochemical and petroleum refining industries as well as in gas-station workers, where it can lead to benzene poisoning (BP), but the mechanisms of BP are not completely understood. In Brazil, a significant number of gas-station service workers are employed. The aim of the present study was to evaluate alterations related to BP and metabolic polymorphisms in gas-station service workers exposed to benzene in the city of Rio de Janeiro, Brazil. Occupational exposure was based on clinical findings related to BP, and metabolic polymorphisms in 114 Brazilian gas-station attendants. These workers were divided into No Clinical Findings (NCF) and Clinical Findings (CF) groups. Neutrophil and Mean Corpuscular Volume (MCV) showed a significant difference between the two study groups, and neutrophil has the greatest impact on the alterations suggestive of BP. The clinical findings revealed higher frequencies of symptoms in the CF



group, although not all members presented statistical significance. The frequencies of alleles related to risk were higher in the CF group for GSTM1, GSTT1, CYP2E1 7632T > A, but lower for NQO1 and CYP2E1 1053C > T genotypes. Moreover, an association was found between GSTM1 null and alterations related to BP, but we did not observe any effects of other polymorphisms. Variations in benzene metabolizing genes may modify benzene toxicity and should be taken into consideration during risk assessment evaluations.

**Keywords:** occupational health; benzene poisoning; gas station worker; genetic polymorphisms; benzene metabolism

---

## 1. Introduction

Benzene is a ubiquitous environmental pollutant, and an important industrial chemical [1,2]. Exposure to it can cause various health hazards and contributes to increasing the risk of blood and bone marrow disorders, including hematotoxicity, genotoxicity and leukemia, even in workers exposed to low levels in the air [3–7]. Exposure to benzene can be environmental or occupational. Benzene is a component of crude oil, cigarette smoke and gasoline [8–11]. Occupational human exposure to benzene occurs in the petrochemical and petroleum refining industries, as well as from exposure to gasoline and automobile exhaust, so employees of gas-stations are constantly occupationally exposed to higher benzene concentrations and for longer time periods than people driving cars and the general population. In addition, these workers are also exposed to other toxic substances present in gasoline, such as toluene, ethylbenzene and xylene [12,13]. This occupation employs a significant number of workers in Brazil, a total of 184,733 distributed over 39,450 gas stations across the country (data of 2010) [14].

Occupational exposure to benzene frequently leads to benzene poisoning (BP), and there is an accepted set of signs, symptoms and complications, among which impaired bone marrow is the most important one. The most frequent signs and symptoms are asthenia, myalgia, drowsiness, dizziness and repeated infections, and the most relevant hematological data are neutropenia, leukopenia, eosinophilia, lymphopenia, monocytopenia, macrocytosis, basophilic stippling, pseudo Pelger and thrombocytopenia [15–17]. The mechanisms of BP are not completely understood, but it is generally accepted that it is mediated by a series of benzene activation and detoxification enzymes, which can be modified by genetic variation [18–20]. Several genes of benzene metabolism responsible for its activating and detoxifying have polymorphic variants, which may alter its exposure risk [21–24]. Thus, polymorphism of cytochrome P450 2E1 (CYP2E1), myeloperoxidase (MPO), NAD(P)H:quinoneoxidoreductase 1 (NQO1), glutathione S-transferase theta 1 (GSTT1), and glutathione S-transferase mu 1 (GSTM1), which are involved in benzene activation and detoxification, may affect individual susceptibility to benzene toxicity [20,25–34]. In the current study, we evaluated alterations related to BP and metabolic polymorphisms in gas station attendants exposed to benzene in the city of Rio de Janeiro, Brazil.

## **2. Material and Methods**

### *2.1. Chemicals and Suppliers*

Taq DNA polymerase, Taq buffer and MgCl<sub>2</sub>, dNTPs, and digestion enzymes were purchased from Thermo Scientific, (EU) Lithuania. Primers, ladders, and agarose were obtained from Invitrogen by Life Technologies, CA, USA. The Gelred™ staining was supplied by Biotium, Inc., Hayward, CA, USA. Proteinase K was obtained from Roche Diagnostic, Mannheim, Germany.

### *2.2. Study Population and Collection of Samples*

A total of 114 workers from seven gas stations in the city of Rio de Janeiro, Brazil, were enrolled in a cross-sectional study. The study was open to participation by male and female workers over 18 years of age. The study was approved by the ethical committee of the Sergio Arouca National School of Public Health (ENSP), Oswaldo Cruz Foundation, number CAAE 0021.0.031.000-10, and all participants signed an informed consent form. The participating workers were interviewed by trained personnel, and a questionnaire was used to obtain general information, including demographic characteristics, cigarette smoking, alcohol consumption, medical history, and occupational data. A blood sample of about 5mL was collected from each study participant, and these were stored under refrigeration until analysis.

### *2.3. Evaluation of Clinical Alterations Related to Benzene Poisoning*

Clinical evaluations were performed at the Center for Studies of Worker Health and Human Ecology (CESTEH) and the National Cancer Institute (INCA), based on the Evaluation Protocols of Health Workers Exposed to Benzene [17,35]. All participants underwent physical and hematological examination.

Hematological indices such as white blood cell (WBC), erythrocytes, hematocrit, and neutrophil counts were evaluated at INCA. Additionally, data on somatic symptoms were collected from all participants. The interpretation of these data was carried out by physicians from CESTEH. The studied population was categorized into two groups based on clinical findings suggestive of benzene poisoning.

### *2.4. Genotyping*

Genotyping was conducted at the Toxicology Laboratory of CESTEH. Genomic DNA was extracted from whole blood samples by the salting-out method. Polymerase Chain Reaction-Restricted Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP) techniques were applied to amplify the polymorphic fragments of CYP2E1 1053C > T and CYP2E1 7632T > A, NQO1 609C > T and MPO 463G > A. Multiplex PCR was done for GSTM1 and GSTT1 deletion polymorphisms, and beta-globin gene was used in the same system as a control. The PCR was done using 50–200 ng of genomic DNA, 0.4 μM of each primer, 1× PCR buffer, 250 μM of dNTPs, 1.5 mM of MgCl<sub>2</sub> and 1–2.5 units of Taq polymerase in a 50 μL reaction volume. Table 1 shows primers sequences and PCR and digestion conditions for each polymorphism. The resulting products of PCR and digestion were separated on 2–3% agarose gels by electrophoresis and visualized with GelRed™ (Biotium) Nucleic Acid Gel staining and ultraviolet transilluminator. All genotypes were evaluated and independently confirmed

by at least two people. A total of 10% of DNA samples were selected randomly for repeat analyses in order to verify the accuracy of the method, and the concordance rate was 100%.

**Table 1.** Primer sequences, amplification and digestion conditions used in the study.

Polymorphisms	Primer sequences	PCR	Digestion	PCR and restriction patterns (bp)
CYP2E1 1053C > T	F: 5'-CCAGTCGAGTCTACATTGTCA-3' R: 5'-TTCATTCTGTCTTCTAACTGG-3'	35 cycles: 95 °C for 1 min, 60 °C for 1 min, and 72 °C for 1 min	<i>RsaI</i> , overnight at 37 °C	PCR: 410 CC: 360, 50 CT: 410, 360, 50 TT: 410
CYP2E1 7632T > A	F: 5'-TCGTCAGTTCCTGAAAGCAGG-3' R: 5'-GAGCTCTGATGCAAGTATCGCA-3'	35 cycles: 94 °C for 30 s; 63 °C for 30 s; 72 °C for 1 min	<i>DraI</i> , 3–5h at 37 °C	PCR: 375 TT: 375 TA: 375, 249, 126 AA: 249, 126
NQO1 609 C > T	F: 5'-GAGACGCTAGCTCTGAACTGAT-3' R: 5'-ATTTGAATTCGGGCGTCTGCTG-3'	30 cycles: 94 °C for 10 s; 57 °C for 20 s; 72 °C for 45 s	<i>HinfI</i> , overnight at 37 °C	PCR: 304 CC: 271 CT: 151, 120 TT: 271, 151, 120
MPO 463 G > A	F: 5'-CGGTATAGGCACACAATGGTGAG-3' R: 5'-GCAATGGTTCAAGCGATTCTT-3'	35 cycles: 91 °C for 1 min; 59 °C for 1 min; 71 °C for 1 min	<i>AciI</i> , 3h at 37 °C	PCR: 350 GG: 169, 120, 61 GA: 289, 169, 120, 61 AA: 289, 61
GSTM1	F: 5'-GAACTCCCTGAAAAGCTAAAGC-3' R: 5'-GTTGGGCTCAAATATACGGTG-3'	35 cycles: 94 °C for 2 min; 61 °C for 1 min; 72 °C for 2 min		PCR: 215
GSTT1	F: 5'-TTCCTTACTGGTCCTCACATCTC-3' R: 5'-TCACCGGATCATGGCCAGCA-3'	35 cycles: 94 °C for 2 min; 61 °C for 1 min; 72 °C for 2 min		PCR: 480
β-globin	F: 5'-CAACTTCATCCACGTTCCACC-3' R: 5'-GAAGAGCCAAGGACAGGTAC-3'	35 cycles: 94 °C for 2 min; 61 °C for 1 min; 72 °C for 2 min		PCR: 268

## 2.5. Statistical Analysis

Statistical analysis was carried out using the SPSS statistical software package 17.0. (Chicago, IL, USA). The normality of the distributions was assessed in accordance with the Kolmogorov–Smirnov test. The t-test,  $\chi^2$ -test and the Mann–Whitney U-test were used to analyze

differences between the groups. The relationships between several variables, mainly genetic polymorphisms with BP were verified by Spearman correlation analysis. The impacts of genotypes and other analyzed variables on BP were tested using multivariate logistic regression. Deviation from Hardy-Weinberg equilibrium was assessed by a  $\chi^2$ -test. The significance level for all tests was  $p \leq 0.05$ .

### 3. Results

#### 3.1. Clinical Evaluation and Characteristics of the Studied Population

In accordance with the presence of clinical and laboratory changes that can evolve into BP and with alterations suggestive of BP, subjects were divided into two groups: No Clinical Findings (NCF) and Clinical Findings (CF). From a total of 114 workers, 63.2 % (n = 72) were classified into the CF group, and about 80% of them were male, as shown in Table 2. This table has other information about the workers, such as their basic demographic and occupational characteristics.

**Table 2.** Demographic and occupational characteristics of the study population (114 subjects).

Variables	NCF (n = 42) n (%).	CF (n = 72) n (%)
Sex		
Male	35 (83.3)	52 (72.2)
Female	7 (16.7)	20 (27.8)
Ethnic background/Skin color		
White	13 (33.3)	27 (39.1)
Black	6 (15.4)	6 (8.7)
Mulatto	17 (43.6)	33 (47.8)
Asian	2 (5.1)	1 (1.4)
Indigenous	1 (2.6)	2 (2.9)
Education level		
Illiterate	-	1 (1.5)
Elementary school	11 (28.9)	24 (35.3)
Middle school	11 (28.9)	24 (25.3)
High school	16 (42.2)	18 (26.5)
>High school	-	1 (1.5)
Family income (R\$)		
Mean	1,483.14 ± 114.38	1,558.22 ± 111.82
Min	600.00	500.00
Max	3,500.00	6,000.00
Age (years)		
Mean	35	38.4
Min	20	19
Max	61	82

**Table 2.**Cont.

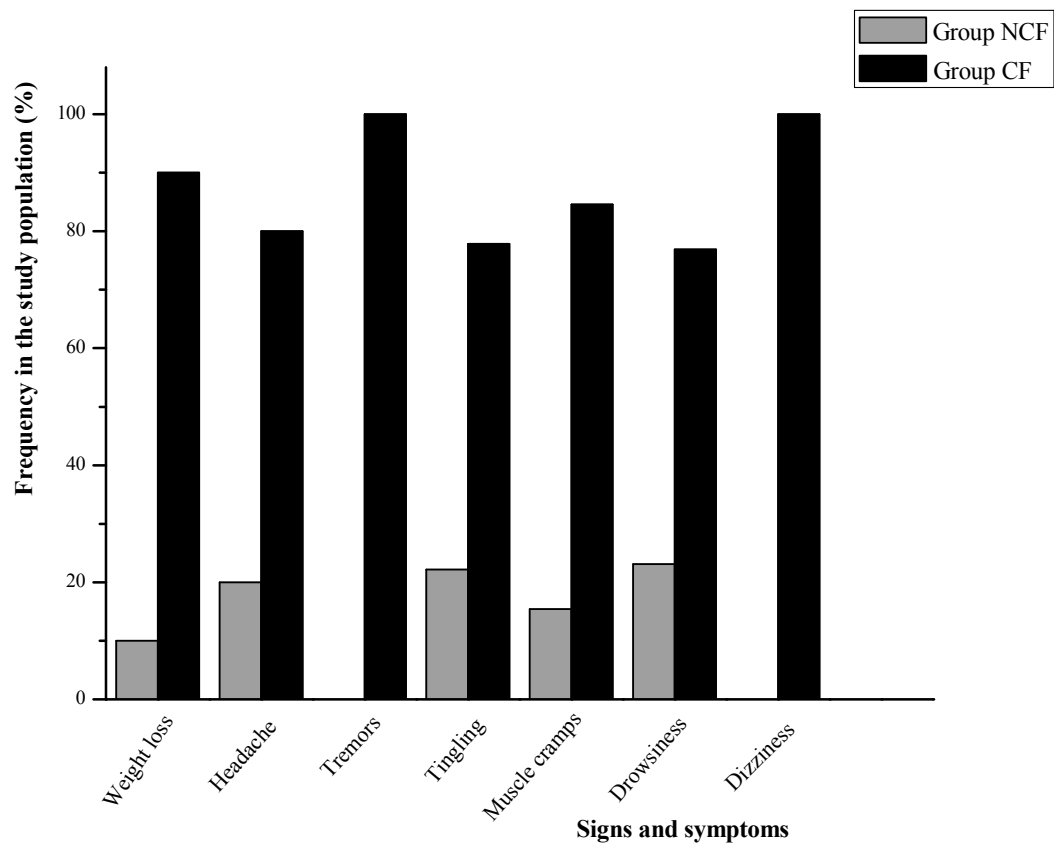
Variables	NCF (n = 42) n (%)	CF (n = 72) n (%)
Smoking consumption		
Yes	10 (24,4)	13 (18,3)
No	31 (75,6)	58 (81,7)
Alcohol consumption		
Yes	27 (65.9)	55 (77.5)
No	14 (34.1)	16 (22.2)
Exposure duration (years)		
Mean	13 ± 1.97	15.2 ± 1.38
Min	-	-
Max	42	52

The data presented in Table 3 represent the differences in hematological indices between the groups. The CF group showed lower values than NCF, except to lymphocytes and Mean corpuscular volume (MCV). We found an association between neutrophil and BP (OR= 1.130, 95% CI= 1.035–1.234).

**Table 3.** Hematological values observed in NCF and CF.

Variables	NCF	CF	<i>p</i> -value
	Mean ± SD	Mean ± SD	
Red Blood Cell (million/mL)	4.90 (±0.3318)	4.77 (±0.5513)	0.139
Hemoglobin(g/dL)	14.02 (±1.195)	14.00 (±1.698)	0.940
Hematocrit (%)	41.33 (±3.070)	41.00 (±4.595)	0.673
MCV (fL)	84.49 ±0.63	86.13 ± 0.80	0.005
WBC (cells/μL)	7,830 (±2,115)	7,260 (±1,628)	0.125
Neutrophil (%)	58.53 (±5.883)	53.97 (±9.537)	0.003
Lymphocyte (%)	30.93 (±5.555)	34.20 (±8.757)	0.019
Platelet (billion/L)	252.10 (±57.901)	243.52 (±63.108)	0.487

The principal somatic symptoms reported by the subjects are illustrated in Figure 1. The graph shows that the CF group recorded higher frequencies of headaches (80% vs. 20%;  $p = 0.023$ ), muscle cramps (84.6% vs. 15.4%;  $p = 0.009$ ), tingling (77.8% vs. 22.2%;  $p = 0.161$ ), drowsiness (76.9% vs. 23.1%;  $p = 0.243$ ), dizziness (75% vs. 25%;  $p = 0.369$ ), weight loss (90% vs. 10%; borderline  $p = 0.065$ ), and recurrent infections (0 vs. 100%;  $p = 0.037$ ).



**Figure 1.** Comparison of somatic symptoms of BP between groups (\*SD, weight loss:  $\pm 0.15$  (NCF) and  $\pm 0.33$  (CF); headache:  $\pm 0.47$  (NCF) and  $\pm 0.49$  (CF); tremors:  $\pm 1.39$  (NCF) and  $\pm 0.26$  (CF); tingling: muscle cramps:  $\pm 0.28$  (NCF) and  $\pm 0.47$  (CF); drowsiness:  $\pm 0.40$  (NCF) and  $\pm 0.35$  (CF); dizziness:  $\pm 0.26$  (NCF) and  $\pm 0.33$  (CF).

### 3.2. Genetic Analysis

The following genotype frequencies of each polymorphism in the population were found: GSTM1-68.7% (positive) and 31.3% (null); GSTT1-75.8% (positive) and 24.2% (null); NQO1-64.1% (TC), 30.4% (TC), 5.4% (TT); MPO-43.2% (GG), 49.5% (GA), 7.4% (AA); CYP2E1 *RsaI*-77% (CC), 13.8% (CT), 9.2% (TT) and; CYP2E1 *DraI*-82.1% (TT), 16.8% (TA), and 1.1% (AA).

The variant allele frequencies among NCF and CF groups are summarized in Table 4. The CF group presented higher frequencies of variant for CYP2E1 7632T > A; null alleles for GSTM1 and GSTT1. However, although there were lower frequencies for NQO1 and CYP2E1 1053C > T than in the NCF group, there was no statistical difference between them. For GSTM1, the frequency null genotype was 0.26 and 0.34 for the NCF and the CF groups, respectively. In regard to the GSTT1 gene, the groups presented frequencies of 0.20 (NCF) and 0.26 (CF). The T allele of CYP2E1 1053C > T showed 0.21 (14.3% homozygous and 14.3% heterozygous) and 0.14 (6.8% homozygous and 13.6% heterozygous) for NCF and CF, respectively. For CYP2E1 7632T > A were found 0.06 (12.1% of heterozygous and no one homozygous) in NCF, and 0.11 (19.4% heterozygous and 1.6% homozygous) in CF. NQO1 showed 0.32 (38.7% of heterozygous and 6.5% of homozygous) in NCF and 0.18 (26.2% heterozygous and 4.9% homozygous) in CF. MPO polymorphism, whose variant allele is not

related to susceptibility but to protection, presented 0.30 (48.5% heterozygous and 9.1% homozygous) in NCF, and 0.31 (50% heterozygous and 6.5% homozygous) in CF group. The genotype distributions were in accordance with Hardy-Weinberg, except for GSTM1, GSTT1 and CYP2E1 1053C > T.

**Table 4.** Variant allele frequencies in NCF and CF.

Polymorphisms	Variant allele	NCF	CF	p-value
<i>NQO1</i>	T <sup>a</sup>	0.32	0.18	0.233
CYP2E1 1053C > T	C <sup>a</sup>	0.21	0.14	0.394
CYP2E17632T > A	A <sup>a</sup>	0.06	0.11	0.284
GSTM1	null <sup>a</sup>	0.26	0.34	0.452
GSTT1	null <sup>a</sup>	0.20	0.26	0.539
MPO	A <sup>b</sup>	0.30	0.31	0.639

<sup>a</sup> alleles related to risk; <sup>b</sup> alleles related to protection.

According to the literature, the alleles presented in Table 4 are related to benzene exposure and its effects on health [4,19,21,22,28,29]. The number of alleles related to risk showed associations with the presence of clinical findings of BP (Spearman Chi-Square = 0.196; *p*-value = 0.024). Logistic regression showed that GSTM1 null genotype had an impact on the changes related to BP (OR = 5.131, 95% CI = 1.137–23.151). No significant influence of the other polymorphisms was observed in the changes related to BP (results not shown).

#### 4. Discussion

We evaluated alterations related to BP and benzene metabolic polymorphisms in gas-station workers in Rio de Janeiro, Brazil since this professional category has been occupationally exposed to benzene. Studies have shown that gas-station service workers are exposed to levels of tens to hundreds of ppb [14,36,37]. However, there have been few studies carried out of individual genetic susceptibility in gas-station workers.

In the present study, most of the workers showed clinical and laboratory changes that can evolve into BP, 63.2%. Diagnosis of BP from occupational exposure is predominantly clinical and epidemiological, based on medical history, laboratory data and clinical symptoms [17]. BP is considered when the individual presents a set of signs and symptoms after exposure to benzene. Common symptoms are asthenia, headache, myalgia, drowsiness, dizziness, tremor and recurrent infections [15,16,38], and the most relevant hematological data are a decrease in blood cells and macrocytosis[39,16,40,41].

We found that although the difference was not significant, the CF group showed a reduced blood cell count in comparison with the NCF one. Neutrophil and MCV (indicative of macrocytosis) showed a significant difference between groups, and the percentage of neutrophil was the hematological variable with the greatest impact on the alterations suggestive of BP. These results were consistent with previous studies. The study of Quet *et al.* (2002) [42] observed a decrease in red and white cell counts, especially neutrophils, in Chinese workers exposed to benzene. Lan *et al.* (2004) [4] also found a decrease in almost all blood cells in an occupationally exposed population, which highlights that the broad action of benzene on various subtypes of blood cells seems to provide strong evidence of its toxicity in the progenitor cells of the bone marrow cells.

In relation to symptoms, we observed higher frequencies of headaches, recurrent infections, muscle cramps, tingling, drowsiness, dizziness and weight loss in the CF group, although not all with statistical significance. D'Alascio *et al.* (2014) [38] reported similar symptoms in Brazilian gas-station workers with a higher prevalence of fatigue, headache, tremor, insomnia, and drowsiness.

Six polymorphisms in benzene metabolizing genes were analyzed to verify the presence of genetic susceptibility in these workers. The frequencies of alleles related to risk were higher in the CF group for GSTM1, GSTT1, CYP2E1 7632T > A, but lower for NQO1 and CYP2E1 1053C > T polymorphisms. The MPO variant allele showed no difference. Except for GSTM1 and CYP2E1 1053C > T, the allele frequencies were similar to the findings of most other studies [43–50]. Chen *et al.* (2007) [28] investigated the relationship between the same polymorphisms and BP in workers exposed to benzene, and they found an association with NQO1 and GSTT1, but not with CYP2E1, GSTM1, and MPO. Study of Wan *et al.* (2002) [22] also found association between GSTT1 null genotype and significant increase in risk of BP, however the studies of Sun *et al.* (2008) [51] and Lanet *et al.* (2004) [4] reported no association. We did not observe association between clinical findings related to BP and NQO1, MPO, CYP2E1 and GSTT1 polymorphisms, but we found an association with GSTM1.

The literature also has reported the influence of gene–gene interaction on benzene toxicity. Several studies have shown that combinations of high CYP2E1 and MPO activities and low or negligible NQO1, GSTM1 and GSTT1 activities (high bioactivation combined with low detoxification), may increase the risk of benzene-induced toxicity [12,28,32,52–56]. We observed an association between subjects carrying more alleles related to risk and clinical changes related to benzene poisoning, which may suggest that interactions of multi-genes in benzene metabolism may contribute to the development of these changes.

In conclusion, our findings suggest that the GSTM1 null genotype may play a role in the development of clinical alterations related to BP. However, further studies with larger sample sizes will be needed to confirm these findings. Although the literature data on genetic susceptibility to BP have so far been inconclusive, it is generally accepted that variations in benzene metabolizing genes may modify benzene toxicity and should be taken into consideration when carrying out risk assessments for exposed workers.

## Acknowledgments

The authors thank Sinpospetro Union for their collaboration with the gas-station attendants. This study was supported by CNPq, FAPERJ and Oswaldo Cruz Foundation.

## Author Contributions

Simone Mitri performed genetic analysis; Marianne Medeiros Tabalipa and Ubirani Barros Otero conducted clinical analysis; Antônio Sérgio Almeida Fonseca interpreted clinical outcomes; Josino Costa Moreira and Paula de Novaes Sarcinelli participated in the conception and coordination of the study. All authors discussed the final version of the manuscript and approved it.



## Conflicts of Interest

The authors declare no conflict of interests.

## References

1. Mendes, R. Benzenism: subsidy for identifying occupational groups subject to higher risk of exposure. *Boll. da SBHH* **1987**, *144*, 135–151. (In Portuguese)
2. Augusto, L.G.S. Estudo longitudinal e morfológico (medula óssea) em pacientes com neutropenia secundária à exposição ocupacional crônica ao benzeno. Dissertação de mestrado, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, Brazil, 1991.
3. Snyder, R. Overview of the toxicology of benzene. *J. Toxicol. Environ. Health Amer.* **2000**, *61*, 5–6.
4. Lan, Q.; Zhang, L.; Li, G.; Vermeulen, R.; Weinberg, R.S.; Dosemeci, M.; Rappaport, S.M.; Shen, M.; Alter, B.P.; Wu, Y.; Kopp, W.; Waidyanatha, S.; Rabkin C.; Guo, W.; Chanock, S.; Hayes, R.B.; Linet, M.; Kim, S.; Yin, S.; Rothman, N.; Smith, M.T. Hematotoxicity in workers exposed to low levels of benzene. *Science* **2004**, *306*, 1774–1776.
5. Rappaport, S.M.; Kim, S.; Lan, Q.; Li, G.; Vermeulen, R.; Waidyanatha, S.; Zhang, L.; Yin, S.; Smith, M.T.; Rothman N. Human benzene metabolism following occupational and environmental Exposures. *Chem. Biol. Interact.* **2010**, *184*, 189–195.
6. McHale, C.M.; Smith, M.T.; Zhang, L. Application of toxicogenomic profiling to evaluate effects of benzene and formaldehyde: From yeast to human. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **2014**, *1310*, 74–83.
7. Krieg, J.E.F.; Mathias, P.I.; Toennis, C.A.; Clark, J.C.; Marlow, K.L.; B'hymer, C.; Singh N.P.; Gibson, R.L.; Butler, M.A.. Detection of DNA damage in workers exposed to JP-8 jet fuel. *Mutat. Res.* **2012**, *747*, 218–227.
8. Coutrim, M.X.; Carvalho, L.R.F.; Arcuri, A.S.A. Avaliação dos Métodos analíticos para a determinação de metabólitos do benzeno como potenciais biomarcadores de exposição humana ao benzeno no ar. *Quím. Nova* **2000**, *23*, 653–663.
9. Lin, Y.S.; Vermeulen, R.; Tsai, C.H.; Waidyanatha, S.; Lan, Q.; Rothman, N.; Smith, M.T.; Zhang, L.; Shen, M.; Li, G.; Yin, S.; Kim, S.; Rappaport, S.M. Albumin adducts of electrophilic benzene metabolites in benzene-exposed and control workers. *Environ. Health Perspect.* **2007**, *115*, 28–34.
10. Steinmaus, C.; Smith, A.H.; Jones, R.M.; Smith, M.T. Meta-analysis of benzene exposure and non-Hodgkin lymphoma: Biases could mask an important association. *Occup. Environ. Med.* **2008**, *65*, 371–378.
11. Smith, M.T. Advances in Understanding Benzene Health Effects and Susceptibility. *Annu. Rev. Public Health* **2010**, *31*, 133–148.
12. Carrieri, M.; Bonfiglio, E.; Escapellato, M.L.; Maccà, I.; Tranfo, G.; Faranda, P.; Paci, E.; Bartolucci, G.B. Comparison of exposure assessment methods in occupational exposure to benzene in gasolina filling-station attendants. *Toxicol. Lett.* **2006**, *162*, 146–152.

13. Kim, Y.J.; Choi, J.Y.; Paek, D.; Chung, H.W. Association of the NQO1, MPO, and XRCC1 polymorphisms and chromosome damage among workers at a petroleum refinery. *J. Toxicol. Environ. Health Amer.* **2008**, *71*, 333–341.
14. Moura-Correa, M.J.; Jacobina, A.J.R.; Santos, A.S.; Pinheiro, R.D.C.; Menezes, M.A.C.; Tavares, A.M.; Pinto, N.F. Benzene exposure of workers of Petrol Stations in Brazil. *Ciência. Saúde Coletiva* **2014**, *19*, 4637–4648. (In Portuguese)
15. Ruiz, M.A. O problema da leucopenia em Cubatão. *Bol. Soc. Bras. Hematol. Hemoter.* **1985**, *7*, 171–172.
16. Ruiz, M.A.; Vassallo, J.; Souza, C.A. Alterações hematológicas em pacientes expostos cronicamente ao benzeno. *Rev. Saúde Pública* **1993**, *27*, 145–151.
17. Ministério da Saúde. *Chemical Risk: Attention to the Health of Workers Exposed to Benzene. Workers Health Protocols Series A*; Secretaria de Atenção à Saúde Departamento de Ações Programáticas Estratégicas: Brasília, Brazil, 2006. (In Portuguese)
18. Ross, D. The role of metabolism and specific metabolites in benzene-induced toxicity: Evidence and issues. *J. Toxicol. Environ. Health Amer.* **2000**, *6*, 357–372.
19. Snyder, R. Xenobiotic metabolism and the mechanism(s) of benzene toxicity. *Drug Metab. Rev.* **2004**, *36*, 531–547.
20. Zhang, G.H.; Ye, L.L.; Wang, J.W.; Ren, J.C.; Xu, X.W.; Feng, N.N.; Zhou, L.F.; Ru, J.G.; Hao, Y.H.; Tian, W.; Sun, P.; Au, W.W.; Christiani, D.C.; Xia, Z.L. Effect of polymorphic metabolizing genes on micronucleus frequencies among benzene-exposed shoe workers in China. *Int. J. Hyg. Environ. Health* **2014**, *217*, 726–732.
21. Rothman, N.; Smith, M.T.; Hayes, R.B.; Traver, R.D.; Hoener, B.; Campleman, S.; Li, G.L.; Dosemeci, M.; Linet, M.; Zhang, L.; Xi, L.; Wacholder, S.; Lu, W.; Meyer, K.B.; Holland, N.T.; Stewart, J.T.; Yin, S.; Ross, D. Benzene poisoning, a risk factor for hematological malignancy, is associated with the NQO1 609C→T mutation and rapid fractional excretion of chlorzoxazone. *Cancer Res.* **1997**, *57*, 2839–2842.
22. Wan, J.; Shi, J.; Hui, L.; Wu, D.; Jin, X.; Zhao, N.; Huang, W.; Xia, Z. Association of genetic polymorphisms in CYP2E1, MPO, NQO1, GSTM1, and GSTT1 genes with benzene poisoning. *Environ. Health Perspect.* **2002**, *110*, 1213–1218.
23. Carrieri, M.; Bartolucci, G.B.; Scapellato, M.L.; Spataro, G.; Sapienza, D.; Soleo, L. Influence of glutathione S-transferases polymorphisms on biological monitoring of exposure to low doses of benzene. *Toxicol. Lett.* **2012**, *213*, 63–68.
24. Kelly, R.S.; Vineis, P. Biomarkers of susceptibility to chemical carcinogens: The example of non-Hodgkin lymphomas. *Bras. Med. Bull.* **2014**, *111*, 89–100.
25. Rossi, A.M.; Guarnieri, C.; Rovesti, S.; Gobba, F.; Ghittori, S.; Vivoli, G.; Barale, R. Genetic polymorphisms influence variability in benzene metabolism in humans. *Pharmacogenetics* **1999**, *9*, 445–451.
26. Pavanello, S.; Clonfero, E. Biological indicators of genotoxic risk and metabolic polymorphisms. *Mutat. Res.* **2000**, *463*, 285–308.

27. Kim, S.; Lan, Q.; Waidyanatha, S.; Chanock, S.; Johnson, B.A.; Vermeulen, R.; Smith, M.T.; Zhang, L.; Li, G.; Shen, M.; Yin, S.; Rothman, N.; Rappaport, S.M. Genetic polymorphisms and benzene metabolism in humans exposed to a wide Range of air concentrations. *Pharmacogenet. Genomics* **2007**, *17*, 789–801.
28. Chen, Y.; Li, G.; Yin, S.; Xu, J.; Ji, Z.; Xiu, X.; Liu, L. Genetic polymorphisms involved in toxicant-metabolizing enzymes and the risk of chronic benzene poisoning in Chinese occupationally exposed populations. *Xenobiotica* **2007**, *37*, 103–112.
29. Dougherty, D.; Garte, S.; Barshowsky, A.; Zmuda, J.; Taioli, E. NQO1, MPO, CYP2E1, GSTT1 and GSTM1 polymorphisms and biological effects of benzene exposure: A literature review. *Toxicol. Lett.* **2008**, *182*, 7–17.
30. Hoet, P.; De Smedt, E.; Ferrari, M.; Imbriani, M.; Maestri, L.; Negri, S.; De Wilde, P.; Lison, D.; Haufroid, V. Evaluation of urinary biomarkers of exposure to benzene: Correlation with blood benzene and influence of confounding factors. *Int. Arch. Occup. Environ. Health* **2009**, *82*, 985–995.
31. Neafsey, P.; Ginsberg, G.; Hattis, D.; Johns, D.O.; Guyton, K.Z.; Sonawane, B. Genetic polymorphism in CYP2E1: Population distribution of CYP2E1 activity. *J. Toxicol. Environ. Health B. Crit. Rev.* **2009**, *12*, 362–388.
32. Manini, P.; De Palma, G.; Andreoli, R.; Mozzoni, P.; Poli, D.; Goldoni, M.; Petyx, M.; Apostoli, P.; Mutti, A. Occupational exposure to low levels of benzene: Biomarkers of exposure and nucleic acid oxidation and their modulation by polymorphic xenobiotic metabolizing enzymes. *Toxicol. Lett.* **2010**, *193*, 229–235.
33. Piccoli, P.; Carrieri, M.; Padovano, L.; Di Mare, M.; Bartolucci, G.B.; Fracasso, M.E.; Lepera, J.S.; Manno, M. In vivo CYP2E1 phenotyping as a new potential biomarker of occupational and experimental exposure to benzene. *Toxicol. Lett.* **2010**, *192*, 29–33.
34. Hollins, D.M.; Kerger, B.D.; Unice, K.M.; Knutsen, J.S.; Madl, A.K.; Sahmel, J.E.; Paustenbach, D.J. Airborne benzene exposures from cleaning metal surfaces with small volumes of petroleum solvents. *Int. J. Hyg. Environ. Health* **2013**, *216*, 324–332.
35. Arcuri, A.; Costa, D.; Machado, J.; Cardoso, L.; Magrini, R.; Marra, V. *Surveillance of the Chemical Risk of Benzene*; Secretaria de Atenção à Saúde Departamento de Ações Programáticas Estratégicas: Brasília, Brazil, 2005. (In Portuguese)
36. Navasumrit, P.; Chanvaivit, S.; Intarasunanont, P.; Arayasiri, M.; Lauhareungpanya, N.; Parnlob, V.; Settachan, D.; Ruchirawat, M. Environmental and occupational exposure to benzene in Thailand. *Chem. Biol. Interact.* **2005**, *153–154*, 75–83.
37. Weisel, C.P. Benzene exposure: An overview of monitoring methods and their findings. *Chem. Biol. Interact.* **2010**, *184*, 58–66.
38. D’Alascio, R.G.; Menegali, M.; Bornelli, A.S.; Magajewski, F. Sintomas relacionados à exposição ocupacional ao benzeno e hábitos ocupacionais em trabalhadores de postos de revenda de combustíveis a varejo na região sul de Santa Catarina. *Rev. Bras. Med. Trab.* **2014**, *12*, 21–29.
39. Ruiz, M.A. Alterações hematológicas do benzenismo. *Bol. Soc. Bras. Hematol. Hemoter.* **1987**, *9*, 129–134.

40. Ruiz, M.A.; Augusto, L.G.; Vassallo, J.; Vigorito, A.C.; Lorand-Metze, I.; Souza, C.A. Bone marrow morphology in patients with neutropenia due to chronic exposure to organic solvents (benzene): Early lesions. *Pathol. Res. Pract.* **1994**, *190*, 151–154.
41. De Palma, G.; Manno, M. Metabolic polymorphisms and biomarkers of effect in the biomonitoring of occupational exposure to low-levels of benzene: State of the art. *Toxicol. Lett.* **2014**, *231*, 194–204.
42. Qu, Q.; Shore, R.; Li, G.; Jin, X.; Chen, L.C.; Cohen, B.; Melikian, A.A.; Eastmond, D.; Rappaport, S.M.; Yin, S.; Li, H.; Waidyanatha, S.; Li, Y.; Mu, R.; Zhang, X.; Li, K. Hematological changes among Chinese workers with a broad range of benzene exposures. *Amer. J. Ind. Med.* **2002**, *42*, 275–285.
43. Gattás, G.J.; Soares-Vieira, J.A. Cytochrome P450-2E1 and glutathione S-transferase mu polymorphisms among Caucasians and mulattoes from Brazil. *Occup. Med.* **2000**, *50*, 508–511.
44. Rossini, A.; Rapozo, D.C.M.; Amorim, L.M.F.; Macedo, J.M.B.; Medina, R.; Neto, J.F.N.; Gallo, C.V.M.; Pinto, L.F.R. Frequencies of GSTM1, GSTT1, and GSTP1 polymorphisms in a Brazilian population. *Genet. Mol. Res.* **2002**, *3*, 233–240.
45. Canalle, R.; Burim, R.V.; Tone, L.G.; Takahashi, C.S. Genetic polymorphisms and susceptibility to childhood acute lymphoblastic leukemia. *Environ. Mol. Mutagen.* **2004**, *4*, 100–109.
46. Rossini, A.; Lima, S.S.; Rapozo, D.C.M.; Faria, M.; Albano, R.M.; Pinto, L.R.F. CYP2A6 and CYP2E1 polymorphisms in a Brazilian population living in Rio de Janeiro. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **2006**, *39*, 195–201.
47. Maciel, M.E.; Oliveira, F.K.; Propst, G.B.; Bicalho, M.G.; Cavalli, I.J.; Ribeiro, E.M.S.F. Population analysis of xenobiotic metabolizing genes in South Brazilian Euro and Afro-descendants. *Genet. Mol. Biol.* **2009**, *32*, 723–728.
48. Silva, J.; Moraes, C.R.; Heuser, V.D.; Andrade, V.M.; Silva, F.R.; Kvitko, K.; Emmel, V.; Rohr, P.; Bordin, D.L.; Andrezza, A.C.; Salvador, M.; Henriques, J.A.P.; Erdtmann, B. Evaluation of genetic damage in a Brazilian population occupationally exposed to pesticides and its correlation with polymorphisms in metabolizing genes. *Mutagenesis* **2008**, *23*, 415–422.
49. Silveira, V.S.; Canalle, R.; Scrideli, C.A.; Queiroz, R.G.; Tone, L.G. Role of the CYP2D6, EPHX1, MPO, and NQO1 genes in the susceptibility to acute lymphoblastic leukemia in Brazilian children. *Environ. Mol. Mutagen.* **2010**, *51*, 48–56.
50. Pinheiro, D.S.; Rocha Filho C.R.; Mundim, C.A.; Júnior, P.M.; Ulhoa, C.J.; Reis, A.A.; Ghedini, P.C. Evaluation of glutathione S-transferase GSTM1 and GSTT1 deletion polymorphisms on type-2 diabetes mellitus risk. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e76262.
51. Sun, P.; Qian, J.; Zhang, Z.B.; Wan, J.X.; Wu, F.; Jin, X.P.; Fan, W.W.; Lu, D.R.; Zhao, N.Q.; Christiani, D.C.; Xia, Z.L. Polymorphisms in phase I and phase II metabolism genes and risk of chronic benzene poisoning in a Chinese occupational population. *Carcinogenesis* **2008**, *29*, 2325–2329.
52. Sørensen, M.; Poole, J.; Autrup, H.; Muzyka, V.; Jensen, A.; Loft, S.; Knudsen, L.E. Benzene exposure assessed by metabolite excretion in Estonian oil shale mineworkers: Influence of glutathione s-transferase polymorphisms. *Cancer Epidem. Biomarker Prev.* **2004**, *13*, 1729–1735.
53. Johnson, E.S.; Langard, S.; Lin, Y.S. A critique of benzene exposure in the general population. *Sci. Total Environ.* **2007**, *374*, 183–198.

54. Angelini, S.; Kumar, R.; Bermejo, J.L.; Maffei, F.; Barbieri, A.; Graziosi, F.; Carbone, F.; Cantelli-Forti, G.; Violante, F.S.; Hemminki, K.; Hrelia, P. Exposure to low environmental levels of benzene: Evaluation of micronucleus frequencies and S-phenylmercapturic acid excretion in relation to polymorphisms in genes encoding metabolic enzymes. *Mutat. Res.* **2011**, *719*, 7–13.
55. Mansi, A.; Bruni, R.; Capone, P.; Paci, E.; Pigini, D.; Simeoni, C.; Gnerre, R.; Papacchini, M.; Tranfo, G. Low occupational exposure to benzene in a petrochemical plant: Modulating effect of genetic polymorphisms and smoking habit on the urinary t, t-MA/SPMA ratio. *Toxicollett* **2012**, *213*, 57–62.
56. Carbonari, D.; Proietto, A.; Fioretti, M.; Tranfo, G.; Paci, E.; Papacchini, M.; Mansi, A. Influence of genetic polymorphism on t, t-MA/S-PMA ratio in 301 benzene exposed subjects. *Toxicol. Lett.* **2014**, *231*, 205–212.

© 2015 by the authors; licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).