



MARCUS VINICIUS CORRÊA DOS SANTOS

**SELEÇÃO *IN SILICO* DE GENES ALTERADOS PELA EXPOSIÇÃO AO BENZENO  
E AVALIAÇÃO DO PADRÃO DE METILAÇÃO DE LINE-1 EM TRABALHADORES  
DE POSTOS DE COMBÚSTIVEIS NA ZONA OESTE DO RIO DE JANEIRO/RJ**

Rio de Janeiro

2018

MARCUS VINICIUS CORRÊA DOS SANTOS

**SELEÇÃO *IN SILICO* DE GENES ALTERADOS PELA EXPOSIÇÃO AO BENZENO  
E AVALIAÇÃO DO PADRÃO DE METILAÇÃO DE LINE-1 EM TRABALHADORES  
DE POSTOS DE COMBÚSTIVEIS NA ZONA OESTE DO RIO DE JANEIRO/RJ**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Saúde Pública e Meio ambiente, da Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca, na Fundação Oswaldo Cruz, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências na Área Saúde pública e Meio Ambiente e subárea de concentração em Toxicologia:

Orientador(a): Ariane Leites Larentis

Coorientador(a): Jamila Alessandra Perini e  
Rita de Cássia Oliveira da Costa Mattos

Rio de Janeiro

2018

Catálogo na fonte  
Fundação Oswaldo Cruz  
Instituto de Comunicação e Informação Científica e Tecnológica em Saúde  
Biblioteca de Saúde Pública

S237s Santos, Marcus Vinicius Corrêa dos.  
Seleção *in silico* de genes alterados pela exposição ao benzeno e avaliação do padrão de metilação de LINE-1 em trabalhadores de postos de combustíveis na zona oeste do Rio de Janeiro/RJ / Marcus Vinicius Corrêa dos Santos. -- 2018.  
94 f. : il. color. ; tab.

Orientadora: Ariane Leites Larentis.  
Coorientadoras: Jamila Alessandra Perini e Rita de Cássia Oliveira da Costa Mattos.

Dissertação (mestrado) – Fundação Oswaldo Cruz, Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca, Rio de Janeiro, 2018.

1. Benzeno - toxicidade. 2. Epigenômica. 3. Biologia de Sistemas. 4. Saúde do Trabalhador. 5. Metilação de DNA. 6. Trabalhadores. 7. Posto de Combustível. I. Título.

CDD – 23.ed. – 363.11098153

MARCUS VINICIUS CORRÊA DOS SANTOS

**SELEÇÃO *IN SILICO* DE GENES ALTERADOS PELA EXPOSIÇÃO AO BENZENO  
E AVALIAÇÃO DO PADRÃO DE METILAÇÃO DE LINE-1 EM TRABALHADORES  
DE POSTOS DE COMBÚSTIVEIS NA ZONA OESTE DO RIO DE JANEIRO/RJ**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Saúde Pública e Meio ambiente, da Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca, na Fundação Oswaldo Cruz, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências na Área Saúde pública e Meio Ambiente e subárea de concentração em Toxicologia.

Aprovado em: 25 de Abril de 2018

BANCA EXAMINADORA:

---

DR<sup>a</sup> LILIANE REIS TEIXEIRA (ENSP)

---

DR<sup>a</sup> NATHALIA DE OLIVEIRA MEIRELES DA COSTA (INCA)

---

DR<sup>a</sup> ARIANE LEITES LARENTIS - ORIENTADORA

## *AGRADECIMENTOS*

*Agradecer é reconhecer que a produção do conhecimento é sempre um processo coletivo e contínuo.*

*Aos meus professores, meus mestres que me guiaram na formação no campo da Saúde do Trabalhador, na Saúde Coletiva.*

*Às minhas orientadoras Dr<sup>a</sup> Ariane Leites Larentis, Dr<sup>a</sup> Jamila Alessandra Perini Machado e a Dr<sup>a</sup> Rita de Cássia Oliveira da Costa Mattos, que me orientaram e proporcionaram que fosse viável a efetividade desse estudo, e a Dr<sup>a</sup> Sheila Coelho Soares Lima e Monique Lopes, que me acompanharam em todas as tentativas e etapas da análise de metilação, cujas dedicações ultrapassaram suas horas de trabalho e a quem guardo o reconhecimento pela dedicação e compromisso com ciência, a qualidade e rigor na formação. Certamente, todas marcaram positivamente esse período da minha formação.*

*Ao Programa de Saúde Pública e Meio Ambiente da ENSP/Fiocruz, pelo suporte das secretarias e professores, ao Laboratório de Toxicologia do CESTEH/ENSP/Fiocruz e às instituições parceiras, por meio dos laboratórios analíticos e suas equipes da Instituição de Ensino e Pesquisa da UEZO e do laboratório de Carcinogênese Molecular do INCA que contribuíram com o desenvolvimento e verificação das análises do estudo.*

*Aos meus colegas e amigos, Paulo (PUCRS), Leandro, Isabele, Victor, Angelica (CESTEH), Karina (UEZO/ENSP) que suportaram longas conversas, resultado do entusiasmo exagerado de quem gosta do que faz e sempre acredita que o trabalho que está fazendo é o melhor do mundo. Especialmente à Mariana Macedo Senna, que me acompanhou ao longo das análises, durante sua iniciação científica, da qual participei na orientação.*

*Aos membros da banca DR<sup>a</sup> Liliane Reis Teixeira, DR<sup>a</sup> Nathalia de Oliveira, DR<sup>a</sup> Elíne Simões e DR<sup>a</sup> Sheila Coelho Soares pelo apoio e por terem que ler esta dissertação em tempo recorde.*

*A minha mãe Juliana, meu padrasto Stênio, meu irmão Maurícus e minha avó Lina que sempre me apoiaram e ouviram minhas descobertas, respeitando e acreditando nos meus sonhos, desejos e construções no caminho do conhecimento da ciência biológica e agora na Saúde Coletiva.*

*A FAPERJ pelo apoio financeiro à bolsa de mestrado nota 10 e a emoção de nunca se saber quando ela “caí em conta” e ao programa Papes VII pelo apoio à pesquisa.*

*E, por fim, aos trabalhadores, em especial aos frentistas, sujeitos centrais desse estudo, os quais devem ser sempre prioridade de uma ciência ética, humana que empreenda esforços para que estes não continuem adoecendo de causas evitáveis, como as doenças do trabalho.*

*A todos, meu carinho e minha profunda gratidão!*

*“Ser biólogo não é um trabalho, é um modo de vida”*

**ERNST WALTER MAYR**

## RESUMO

Trabalhadores de postos de combustíveis estão expostos há diversas substâncias químicas presentes no ambiente de trabalho, destacando-se entre elas o benzeno, por ser comprovadamente cancerígeno para seres humanos. O objetivo deste trabalho foi avaliar as alterações nos padrões de metilação do DNA de uma população exposta ocupacionalmente ao benzeno, em Postos de revenda de combustíveis (PRC) na Zona Oeste do município do Rio de Janeiro, como um possível biomarcador precoce a esta exposição, com intuito de estabelecer medidas de promoção à saúde dos trabalhadores e de redução dos níveis de benzeno no ar. Para tanto, foi utilizada metodologia para seleção de genes por meio de bioinformática com análises de dados em larga escala e foram desenvolvidas e padronizadas metodologia analíticas (como extração de DNA por salting out, eletroforese em gel de agarose, amplificação por PCR e conversão de DNA por bissulfato de sódio) para avaliar o padrão de metilação de DNA por pirosequenciamento no gene selecionado por bioinformática, no retrotransposon LINE-1 e no gene *CDKN2B*. Com o uso dos softwares de bioinformática, foi possível selecionar três possíveis biomarcadores (*KLF6*, *JUN*, *KLF4*) e dentre os três o gene *KLF6* foi escolhido para este estudo. Participaram do estudo 88 trabalhadores, sendo 52 oriundos de 7 postos de combustíveis localizados nos bairros de Santa Cruz, Paciência e Sepetiba da AP5.3 e 35 trabalhadores expostos ambientalmente, pertencentes as portarias da fiocruz, dos quais apenas 12 (devidos as perdas ao longo das análises) trabalhadores (9 de postos de combustíveis e 3 das portarias) tiveram seus níveis de metilação mensurados. Neste trabalho só foi possível avaliar metilação para o retrotransposon LINE-1, para o qual os níveis médios de metilação para este gene, entre os trabalhadores, foram de 67,7 para os trabalhadores de postos de combustíveis e 68,4. As alterações que foram observadas nas populações estudadas são pequenas em valores, mas representam uma alteração precoce induzida pela exposição aos padrões normais de metilação demonstrando o potencial desta abordagem para contribuir na identificação de um biomarcador precoce de exposição à baixas doses de benzeno (precoce em relação aos desfechos à saúde relacionados ao metabolismo do benzeno, como alterações em leucócitos), impactando no estabelecimento de medidas de promoção a saúde dos trabalhadores.

Palavras-chave: Benzeno, Epigenética, Biologia de sistemas, Saúde do Trabalhador

## ABSTRACT

Fuel station workers are exposed to several chemical substances present in the work environment, among them benzene, because it is proven carcinogenic to humans. The objective of this work was to evaluate the changes in DNA methylation patterns of an occupationally exposed population to benzene at the Fuel Resale Station (PRC) in the West Zone of the city of Rio de Janeiro, as a possible early biomarker for this exposure, with the aim of establishing measures to promote the health of workers and reduce the levels of benzene in the air. For this purpose, a methodology was used to select genes through bioinformatics with large scale analyzes of data and analytical methodology was developed and standardized (such as DNA extraction by salting out, agarose gel electrophoresis, PCR amplification and DNA conversion by sodium bisulfite) to evaluate the methylation pattern of DNA by pyrosequencing in the genes induced by bioinformatics and in the LINE-1 and CDKN2B genes. With the use of bioinformatics software, it was possible to select three possible biomarkers (KLF6, JUN, KLF4) and among the three the KLF6 gene was chosen for this study. 88 workers participated in the study, of which 52 were from 7 gas stations located in the districts of Santa Cruz, Paciência and Sepetiba of AP5.3 and 35 workers exposed to the environment, belonging to the orders of fiocruz, of which only 12 (due to losses over of the analyzes) workers (9 of the fuel stations and 3 of the ordinances) had their methylation levels measured. In this work it was only possible to evaluate methylation for the LINE-1 gene, for which the average levels of methylation for this gene among workers were 67.7 for workers at gas stations and 68.4. The changes that were observed in the studied populations are small in values but represent an early alteration induced by exposure to normal methylation patterns demonstrating the potential of this approach to contribute to the identification of an early biomarker of exposure to low doses of benzene (early in relation to health outcomes related to benzene metabolism, such as changes in leukocytes), impacting the establishment of measures to promote the health of workers.

Keywords: Benzene, Epigenetics, Systems biology, Occupational health

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 Esquema metabólico do benzeno simplificado, demonstrando suas principais vias.	23
Figura 2 Provável mecanismo que benzeno induz à leucemia .....	24
Figura 3 Esquema ilustrativo resumido da diferenciação hematopoiética.....	25
Figura 4 Enzimas envolvidas na metilação do DNA.....	29
Figura 5 Esquema do processo de manutenção da metilação pelas DNMTs.....	30
Figura 6 Mecanismos direto (A) e indireto (B) da inativação da expressão por metilação.....	31
Figura 7 Atividade de L1 em células normais vs células neoplásicas .....	34
Figura 8 Em azul a localização da AP 5 no município do Rio de Janeiro .....	38
Figura 9 Esquema de conversão química.....	46
Figura 10 Visão geral da rede separada por clusters e suas interconexões .....	51
Figura 11 Centralidade do clister 2, demonstrando os três genes ( <i>KLF6</i> , <i>KL4</i> e <i>JUN</i> ) como os nós mais interconectados da rede .....	52
Figura 12 Absorbâncias das amostras de extração de DNA de trabalhadores obtidas em Nanodrop.....	54
Figura 13 Eletroforese em gel de agarose para avaliar integridade das extrações de DNA das amostras.....	55
Figura 14 Confirmação de amplificação de LINE-1 para DNA convertido .....	55
Figura 15 Níveis de metilação relacionados à idade e ocupação das populações estudadas de trabalhadores ocupacionalmente expostos a benzeno em PCRs da Zona Oeste do Rio de Janeiro e trabalhadores ambientalmente expostos a benzeno nas portarias da Fiocruz.....	58

## LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1 Regiões administrativas e bairros da AP 5 (RIO DE JANEIRO, 2011).....	39
Quadro 2 Representação esquemática das publicações analisadas no banco de dados de co-expressão do GeneMANIA.....	42
Quadro 3 Absorbâncias das amostras utilizadas no estudo com incubação em isopropanol por 2horas.....	85
Quadro 4 Absorbâncias das amostras utilizadas no estudo com incubação em isopropanol por 10minutos.....	87
Tabela 1 Lista de genes e seus estudos.....	41
Tabela 2 Primers e condições da PCR.....	48
Tabela 3 Características sócio-demográficas das populações do estudo.....	53
Tabela 4 Características sócio-demográficas dos trabalhadores cujas amostras tiveram seu DNA apto para a avaliação do padrão de metilação neste estudo.....	56
Tabela 5 Níveis de metilação do DNA no retrotransposon LINE-1 nos grupos expostos ocupacional e ambientalmente.....	57

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

<	Menor que
>	Maior que
°C	Graus Célsius
%	Porcentagem
©	Direitos Autorais
µl	micro litros
p	p valor
5meC	5-metil-citosina
ACGIH	American Conference of Governmental Industrial Hygienists
ADH	Álcool desidrogenase
ALDH	Aldeído Desidrogenase
ANP	Agência Nacional do Petróleo
AP	Área programática
ATSDR	Agency for Toxic Substances and Disease Registry
ATTM	Ácido Trans,Trans-Mucônico
BETEX	Benzeno, Tolueno, Etilbenzeno, Xileno
c	Citocina
CAT	Catalase
	Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 2B (Inibidor de Quinase Dependente de Ciclina 2B)
CDKN2B	
CESTEH	Centro de Estudos da Saúde do Trabalhador e Ecologia Humana
cm <sup>2</sup>	centimetro quadrado
CNPBZ	Comissão nacional Permanente do benzeno
CpG	Pares de Citosina-fosfato-Guanina
CYP2E1	Citocromo P450 2e1
DHDD	Diidrodiol Desidrigenase
DNA	Deoxyribonucleic Acid (Ácido Desoxirribonucléico)
DNMT	DNA Metiltransferase
EBP	Estrutura Brasileira de Projetos
EH	Hidrolase
ENSP	Escola nacional de saúde pública Sergio Arouca

EPC	Equipamento de proteção coletiva
EPI	Equipamento de proteção individual
ET	Elemento Transponível
FE	Ferro
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
G	guanina
GSH	Glutathiona
GST	Glutathiona S-Transferase
HDACs	Histone Deacetylase (Desacetilases de Histonas)
HMTase	Histona Metiltransferase
HSC	Human Stem Cell (Célula-tronco Humana)
IARC	International Agency for Research on Cancer (Agência Internacional para Pesquisa em Câncer)
INCA	Instituto Nacional do Câncer
L1	LINE-1
LINE-1	Long interspersed nuclear element 1
LLA	Leucemia Linfóide Aguda
LLC	Leucemia Linfóide Crônica
LMA	Leucemia Mielóide Aguda
LMC	Leucemia Mielóide Crônica
LSC	Leukemic Stem Cell (Células-tronco Leucêmicas)
MBD	Methylation Binding Domain (Domínio de ligação da metilação)
MBP	Methyl Binding Protein (Proteína de domínio de ligação de metilação)
MDA	Malondialdeído
MeCP	Methyl-CpG binding Protein (Proteína de ligação a Metil-CpG)
ml	mili litro
mol/l	mol por litro
MPO	Mieloperoxidase
MTE	Ministério do Trabalho e Emprego
NIOSH	National Institute for Occupational Safety and Health (US)
NQO1	NAD (P) H: quinona oxidoreductase-1
OEHHA	Office of Environmental Health Hazard Assessment
OSHA	Occupational Safety & Health Administration
p15	promotor 15
pb	pares de base
PCR	do inglês: Polymerase Chain Reaction (Reação em Cadeia da Polime-

	rase)
ppm	parte por milhão
PRC	Postos de Revenda de Combustíveis Veiculares
RA	região administrativa
SAH	S-Adenosil Homocisteina
SAM	S-Adenosil Metionina
SINE	Short Interspersed Nuclear Element
Sinpospetro-	Sindicato dos Empregados em Postos de Serviços de Combustíveis e
RJ	Derivados de Petróleo do Estado do Rio de Janeiro
SMD	Síndromes Mielodisplásicas
SNC	Sistema Nervoso Central
sod	Superóxido Desmutase
T	Timina
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
U	Uracila
	United State Enviromental Protection Agency (Agência de Proteção
U.S EPA	Ambiental americana)
WHO	World Health Organization

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>16</b>
<b>2. REFERENCIAL TEÓRICO</b>	<b>18</b>
2.1 EXPOSIÇÃO A COMBUSTÍVEIS	18
2.2 BENZENO	19
2.2.1 <i>Exposição e saúde humana</i>	19
2.2.2 <i>Rotas de absorção do benzeno</i>	20
2.3 MECANISMOS E VIAS METABÓLICAS DE INTOXICAÇÃO DO BENZENO	22
2.4 LEUCEMIA	25
2.5 ABORDAGENS PARA AVALIAÇÃO DA GENOTOXICIDADE DO BENZENO EM HUMANOS	26
2.6 EPIGENÉTICA	27
2.6.1 <i>Metilação do DNA</i>	27
2.7 EPIGENÉTICA NA EXPOSIÇÃO AO BENZENO	32
2.8 GENES CANDIDATOS RELACIONADOS À EXPOSIÇÃO AO BENZENO	33
2.8.1 <i>Retrotransposon LINE-1</i>	33
2.8.2 <i>Gene CDKN2B</i>	34
<b>3. JUSTIFICATIVA</b>	<b>36</b>
<b>4. OBJETIVOS</b>	<b>37</b>
<b>5. MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>38</b>
5.1 DESENHO DO ESTUDO	38
5.2 A REGIÃO DA AP 5.3	38
5.3 SELEÇÃO DOS ELEMENTOS DA AMOSTRA	39
5.4 DADOS SOCIODEMOGRÁFICOS E PROCESSO DE TRABALHO	39
5.5 SELEÇÃO DE GENES	40
5.5.1 <i>Dados de microarray e análise da rede de interação estendida</i>	41
5.5.2 <i>Análise funcional</i>	43
5.6 AVALIAÇÃO DO PADRÃO DE METILAÇÃO	43
5.6.1 <i>Separação de linfócitos e extração de DNA</i>	43
5.6.2 <i>Tratamento do DNA com bissulfito de sódio</i>	45
5.6.3 <i>PCR e Sequenciamento</i>	47
5.7 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	48
<b>6 ASPECTOS ÉTICOS</b>	<b>49</b>
<b>7 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>49</b>
7.1 SELEÇÃO DE GENES	49
7.2 AVALIAÇÃO BIOLÓGICA	52
7.2.1 <i>Avaliação da metilação</i>	53
<b>8 CONSIDERAÇÕES FINAIS</b>	<b>59</b>
<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>62</b>
<b>ANEXO I (TCLE)</b>	<b>77</b>
<b>ANEXO II (TCLE)</b>	<b>81</b>
<b>APÊNDICE I (QUADRO 2)</b>	<b>85</b>
<b>APÊNDICE II (QUADRO 3)</b>	<b>87</b>
<b>APÊNDICE III (PUBLICAÇÃO: NOTA TÉCNICA)</b>	<b>91</b>
<b>APÊNDICE IV (ARTIGO REVISÃO)</b>	<b>92</b>
<b>APÊNDICE V (VIII EMMSB 2016)</b>	<b>93</b>
<b>APÊNDICE VI (ICOH 2018)</b>	<b>95</b>



## 1. INTRODUÇÃO

A gasolina possui em sua composição mistura de hidrocarbonetos, entre eles o benzeno, um aromático volátil, um dos poluentes mais comuns. Tem rápida absorção por inalação em curto prazo e um dos produtos químicos mais amplamente utilizados no mundo (EGEGHY; TORNERO-VELEZ; RAPPAPORT, 2000). O benzeno tem efeito genotóxico e carcinogênico (MTE, 1995; IARC, 2012; ATSDR, 2007; LOOMIS *et al.*, 2017). O benzeno é um poluente ambiental reconhecido por induzir hematotoxicidade, anemia aplástica e leucemia (IRONS *et al.*, 2013; LAGORIO *et al.*, 2013; LI; YIN, 2006; SNYDER, ROBERT, 2012). Considerado a sexta substância de maior perigo a saúde humana (ATSDR, 2015), sendo objeto de vigilância mundial devido ao seu caráter carcinogênico e por essa exposição não possuir concentrações ou doses consideradas seguras a sua exposição (MENDES *et al.*, 2017; WHO, 2002). Visto que este agente causa hematotoxicidade mesmo em níveis relativamente baixos de concentração no ar (SWAEN *et al.*, 2010).

Trabalhadores de postos de revenda de combustíveis são expostos diariamente ao benzeno, não estando, na maioria das vezes, cientes da gravidade dessa exposição, apesar dos efeitos sobre a saúde estarem bem definidos (ATSDR, 2007). Além disso, evidências sugerem efeitos sobre a saúde em concentrações abaixo de 1 ppm o que se torna uma das principais preocupações para a saúde ocupacional destes trabalhadores (GLASS *et al.*, 2003; LAN *et al.*, 2004; PESATORI *et al.*, 2009; SWAEN *et al.*, 2010). Porém os mecanismos da hematotoxicidade envolvidos com a exposição ao benzeno permanecem pouco claros e estudos, especialmente na área da toxicogenômica, são fundamentais para que se possa conhecer e definir biomarcadores de exposição, efeito precoce e suscetibilidade, afim de que os trabalhadores não adoeçam de causas evitáveis (MCHALE; SMITH; ZHANG, 2016; SHEN *et al.*, 2008; SMITH, 2010; VALENTE *et al.*, 2017). Entretanto, o avanço da investigação molecular sugere que avaliar unicamente os fatores genéticos possa ser insuficiente para explicar os processos quanto à etiologia das doenças. Nesse cenário, a epigenética juntamente com fatores genéticos, parece atuar nos mecanismos de base responsáveis pelos efeitos biológicos observados em várias classes de exposições ambientais (VALENTE *et al.*, 2017). E a capacidade de benzeno e/ou seus metabólitos para induzir mudanças epigenéticas relacionadas com o desenvolvimento de leucemia têm se tornado uma abordagem cada vez mais relevante (IARC, 2012; LOOMIS *et al.*, 2017).

Portanto, este trabalho tem como objetivo avaliar as alterações nos padrões de metilação do DNA de uma população exposta ocupacionalmente ao benzeno, em Postos de revenda de combustíveis (PRC) na Zona Oeste do município do Rio de Janeiro, como um possível biomarcador precoce a esta exposição, com intuito de estabelecer medidas de promoção à saúde dos trabalhadores e de redução dos níveis de benzeno no ar.

## 2. REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Exposição a combustíveis

No Brasil a exposição ocupacional aos solventes orgânicos em postos de combustíveis é um problema de saúde pública, sem notificação e negligenciado pelos administradores de postos de combustíveis (CERQUEIRA, *et al.*, 2010; MENDES, *et al.*, 2017; MOURA-CORREA, *et al.*, 2014; SANTOS, *et al.*, 2017). Compostos químicos, como solventes orgânicos, estão presentes em diversas áreas e podem acarretar danos à saúde do trabalhador, pois têm características tóxicas variadas, que podem causar câncer, dermatite, leucemia e ototoxicidade (TOCHETTO; QUEVEDO; SIQUEIRA, 2012).

Os solventes orgânicos são produtos químicos que contêm pelo menos um átomo de carbono e um átomo de hidrogênio, são lipofílicos e tem uma elevada afinidade com os tecidos ricos em lipídios, como o tecido cerebral. Eles são conhecidos por serem compostos neurotóxicos prejudiciais ao sistema nervoso central (SNC), causando danos ao tronco encefálico, cerebelo e córtex cerebral (MÖLLER *et al.*, 1990).

Dentre os solventes orgânicos encontramos o benzeno, o principal componente da gasolina e outros combustíveis, o qual geralmente está presente simultaneamente no local de trabalho e no meio ambiente. Várias atividades usam benzeno em seu processo de produção, levando este composto aos trabalhadores expostos. Trabalhadores de PRC compõem um grupo de potencial exposição ao benzeno, assim como outras substâncias originárias da queima e evaporação de combustíveis (IARC, 2012; MOURA-CORRÊA, 2014).

Os vapores de benzeno são normalmente gerados na cadeia produtiva da gasolina, desde o refino do petróleo ao seu uso, bem como em outros processos químicos industriais ((INCA, 2005). Apesar de a gasolina apresentar concentrações de benzeno menores do que em outros produtos acabados, sua relevância deve-se ao fato que os PRCs estão disseminados em várias áreas geográficas, rurais e urbanas, em que as emissões de vapores dos postos e veículos atingem uma grande extensão de ambientes e de trabalhadores. Por isso, a gasolina é considerada uma das principais fontes de exposição humana ao benzeno (MOURA-CORRÊA, 2007).

## 2.2 Benzeno

O benzeno, também conhecido como benzol, pertence ao grupo dos hidrocarbonetos aromáticos. É um líquido incolor com odor doce, evapora para a atmosfera muito rapidamente e dissolve-se ligeiramente em água. O benzeno é altamente volátil e inflamável (ATSDR, 2007), sendo considerado a sexta substância de maior risco para a saúde humana (ATSDR, 2015).

Foi inicialmente descoberto por Faraday (1826 apud NEWELL, 1926) e isolado a partir de um óleo obtido como subproduto na fabricação do gás de iluminação utilizado na época, em Londres, sendo hoje obtido principalmente a partir do petróleo (ATSDR, 2007). Várias indústrias usam benzeno como principal matéria-prima dos produtos como plásticos, resinas, fibras sintéticas, tintas, detergentes, drogas, pesticidas, alguns tipos de borrachas, lubrificantes, corantes e é um componente do óleo cru, gasolina e fumaça de cigarro (COSTA-AMARAL, 2017). Além da exposição no trabalho, esta substância também pode ser absorvida por meio de fontes naturais de emissões no meio ambiente das queimadas de florestas, vulcões e fontes ambientais, geradas pela vida moderna, onde se destacam as emissões industriais, gases da exaustão de automóveis e abastecimento de veículos automotores (ATSDR, 2007; WHO, 2002). Pode ser encontrado no ar, água e solo e nesses sofrer uma série de transformações e reações de degradação no meio ambiente (ATSDR, 2007).

Os vapores de benzeno são normalmente gerados na cadeia produtiva da gasolina, desde o refino do petróleo ao seu uso, bem como em outros processos químicos industriais. A gasolina é uma das principais fontes de exposição humana ao benzeno. O aumento das concentrações de benzeno no ar está relacionado com os PRCs. E é considerado que viver perto de PRCs ou locais de resíduos perigosos aumenta a exposição ao benzeno (ATSDR, 2007; SANTOS, *et al.*, 2013).

### 2.2.1 Exposição e saúde humana

O benzeno, um composto químico onipresente, é uma das causas comprovadas de leucemia mieloide aguda (LMA), síndromes mielodisplásicas (SMD), e leucemias linfocíticas em seres humanos (GLASS *et al.*, 2003; SMITH; JONES; SMITH, 2007). E obteve sua toxicidade detectada logo após o início do seu uso industrial. Os efeitos hematotóxicos do benzeno foram documentados em estudos de Selling (1914) e Weiskotten (1920; 1916).

Em estudo com 217 sapateiros Aksoy e colaboradores (1971) descreveram anormalidades hematológicas atribuídas a uma exposição crônica ao benzeno, tais como leucopenia, trombocitopenia, leucocitose, linfocitose, eosinofilia, basofilia, entre outras e mais tarde (1972), as mu-

danças sanguíneas em pacientes com pancitopenia associada a uma exposição de longo prazo ao benzeno. Em 1982, a Agência Internacional para Pesquisa sobre Câncer (IARC, 1982) declarou: "Há provas suficientes de que o benzeno é cancerígeno para o homem", e quando um novo sistema de classificação da IARC foi criada em 1987, o benzeno foi imediatamente colocado na categoria de cancerígeno pertencente ao Grupo um<sup>1</sup> (IARC, 1987). Outros casos de leucemia associados à exposição ao benzeno foram notificados entre 1960 e 1990 (VIGLIANI; SAITA, 1964; GOLDSTEIN, 1988). E desde então, estudos realizados na china, têm demonstrado que o benzeno causa uma diminuição significativa em quase todas as contagens de células sanguíneas, tais como glóbulos brancos, granulócitos, linfócitos e plaquetas em trabalhadores expostos ao benzeno, mesmo em exposições abaixo de 1 ppm que é o atual padrão ocupacional "aceitável", demonstrando que não há evidência de um limiar de exposição segura (LAN *et al.*, 2004; QU *et al.*, 2002).

Sua exposição ocupacional no mundo inteiro é, por vezes, muito elevada pela sua presença constante em solventes industriais e colas. Trabalhadores sofrem exposição a níveis potencialmente elevados de benzeno na indústria química, em refinarias de petróleo, em oleodutos, PRCs, navios petroleiros, em oficinas e nas garagens de ônibus (FAZI *et al.*, 2005). A maioria das pessoas que se expõe ao benzeno pode percebê-lo, através do olfato, quando este atinge uma concentração de 100 ppm (ATSDR, 2007). A equivalência de uma parte por milhão é aproximadamente igual a 3,19 mg/m<sup>3</sup> (para benzeno) Este composto, reconhecidamente carcinogênica (MTE, 1995; IARC, 2012), se constitui na exposição mais comum em todo o mundo.

## 2.2.2 Rotas de absorção do benzeno

A maioria dos dados de absorção de benzeno está focada na inalação como a via predominante de exposição. O benzeno é detectado em sangue de fumantes, bombeiros, mecânicos e indivíduos com ocupações que produzem ou utilizam benzeno, demonstrando inalação de benzeno como uma via importante de exposição (ARNOLD *et al.*, 2013). Evidências indicam que o benzeno é rapidamente absorvido pelos seres humanos após exposição por inalação. Resultados de um estudo em 23 indivíduos que inalaram 47-110 ppm benzeno por 2-3 horas mostra-

---

<sup>1</sup> **Classificação IARC:** **Grupo 1** - Carcinogênico a humanos (evidências suficiente). -**Grupo 2A** - Provavelmente carcinogênico a humanos (evidências suficientes para animais, mas insuficiente ou inexistente para humanos). - **Grupo 2B** - Possivelmente carcinogênico a humanos (evidências insuficiente ou inexistente, mas com dados relevantes de sua carcinogenicidade). -**Grupo 3** - Não classificado como carcinogênico a humanos (evidências não são adequadas para afirmar carcinogenicidade ou quando não se encaixa em outro grupo). -**Grupo 4** - Provavelmente não é carcinogênico (falta evidências de seu potencial carcinogênico).

ram que a absorção foi maior nos primeiros minutos de exposição, mas diminuiu rapidamente depois (SRBOVA; TEISINGER; SKRAMOVSKY, 1950). Nos primeiros 5 minutos de exposição, a absorção foi de 70-80%, depois de 1 hora ela foi reduzida para aproximadamente 50% (intervalo de 20-60%). A Absorção respiratória (a quantidade de benzeno absorvido a partir dos pulmões após a inalação dos vapores) em seis voluntários expostos a 52-62 ppm de benzeno durante 4 horas, foi determinada como sendo aproximadamente 47% (NOMIYAMA; NOMIYAMA, 1974). Em um estudo similar, três voluntários não fumantes saudáveis foram expostos ao benzeno em níveis de 1,6 ou 9,4 ppm durante 4 horas (PEKARI *et al.*, 1992). A quantidade de benzeno absorvida foi estimada a partir da diferença entre a concentração de inalação e a concentração exalada. As estimativas eram de 48% para a dose alta e 52% para a dose baixa, apoiando a evidência de Nomiyama e Nomiyama (1974).

Casos de intoxicação acidental ou intencional por ingestão indicam que o benzeno é absorvido sistemicamente devido à toxicidade que se desenvolveu nos indivíduos expostos (THIENES; HALEY, 1972). O benzeno administrado por gavagem<sup>2</sup> em milho ou azeite para animais é rapidamente absorvido (SABOURIN *et al.*, 1987). E é geralmente aceito que a extensão da absorção do benzeno através da via oral é de 100% (U.S. EPA, 2002).

O benzeno também pode ser absorvido através da pele. Modjtahedi e Maibach (2008) relataram que, em voluntários humanos, de 0,07% e 0,13% da dose aplicada de benzeno (0,1 ml, dose área de 25,8 cm<sup>2</sup>) foi absorvida após a aplicação direta no antebraço e palma, respectivamente. Na absorção cutânea, *in vitro*, em macaco e mini porco foi de 0,19% e 0,23% da dose (5 ml/cm<sup>2</sup>), respectivamente (FRANZ, 1984). Foi também relatado que vapores de benzeno podem penetrar na pele de outros animais (TSURUTA, 1989; MCDOUGAL *et al.*, 1990), dessa forma, esse tipo de absorção deve ser considerada em avaliações da exposição ocupacional ao benzeno.

---

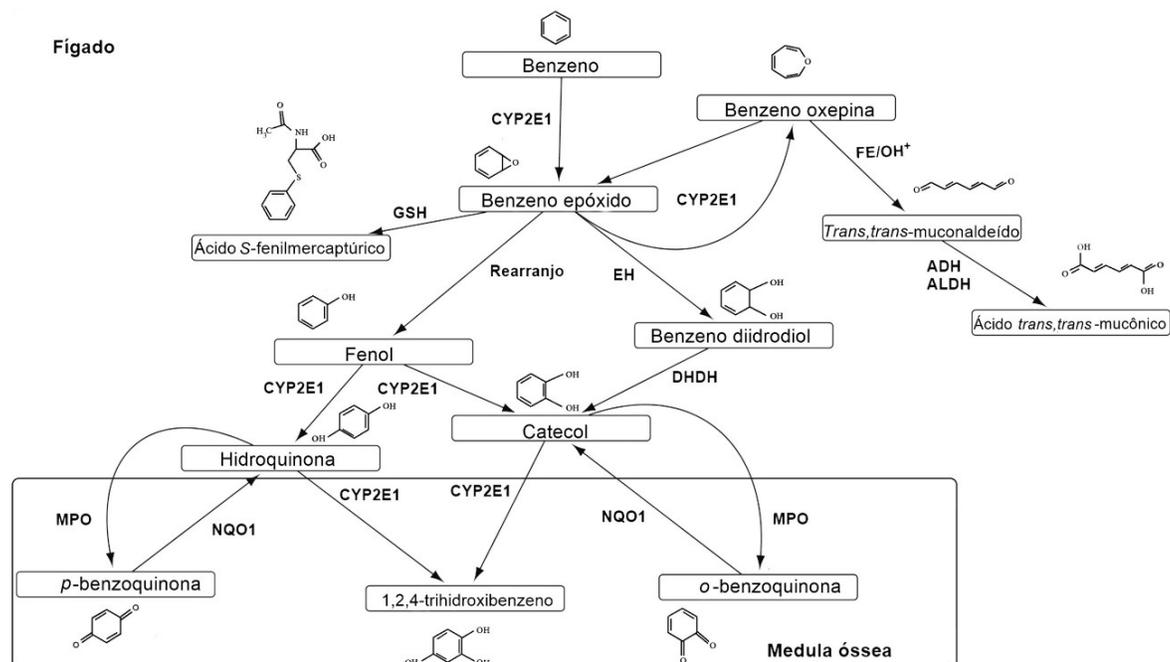
<sup>2</sup> Termo utilizado para se referir à alimentação forçada de líquidos utilizando sonda, pela boca ou nariz até o estômago, usando a gravidade.

### 2.3 Mecanismos e vias metabólicas de intoxicação do benzeno

O benzeno deve ser metabolizado para se tornar cancerígeno (SMITH *et al.*, 2011). O primeiro passo no metabolismo do benzeno é a formação de óxido de benzeno, catalisada pelo citocromo P450 2E1 (CYP2E1), que coexiste em equilíbrio com o seu tautômero<sup>3</sup> oxepino. Entre as várias vias que estão envolvidas no metabolismo de óxido de benzeno, a via predominante envolve rearranjo não enzimático para formar o fenol. O fenol é oxidado na presença de CYP2E1 para catecol ou hidroquinona, que são oxidados, através da mieloperoxidase, para os metabolitos reativos de 1,2- e 1,4-benzoquinona, respectivamente. A reação inversa (redução de 1,2- e 1,4-benzoquinona em catecol e hidroquinona) é catalisada por NAD (P) H: quinona oxidoreductase-1 (NQO1). Ambos, catecol e hidroquinona, podem ser convertidos para o metabolito 1,2,4-trihidroxibenzeno, através de catálise pela CYP2E1. Alternativamente, o óxido de benzeno pode sofrer conversão, catalisada por hidrolase, a dihidrodiol benzeno e conversão, catalisada por dihidrodiol desidrogenase, subsequente ao catecol. Outras vias de metabolismo de óxido de benzeno incluem reação com glutathione para formar o ácido S-fenilmercaptúrico (NEBERT *et al.*, 2002; ATSDR, 2007), e oxepino sofre uma reação de abertura do anel, catalisada por ferro, formando trans, trans-muconaldeído com subsequente metabolização de ácido trans, trans-mucônico (U.S. EPA, 2002; ATSDR, 2007), conforme ilustrado na Figura 1 (SANTOS *et al.*, 2017).

---

<sup>3</sup> Tautômeros têm formas estruturais diferentes e coexistem em equilíbrio químico



**Figura 1** Esquema metabólico do benzeno simplificado, demonstrando suas principais vias (SANTOS *et al.*, 2017)

ADH = Álcool desidrogenase; ALDH = Aldeído desidrogenase; CYP2E1 = Citocromo P450 2E1; FE = Ferro;  
 DHDH = Dihidrodíol desidrogenase; EH = Hidrolase; GSH = Glutaciona; MPO = Mieloperoxidase;  
 NQO1 = NAD (P) H: quinona oxidorreductase-1

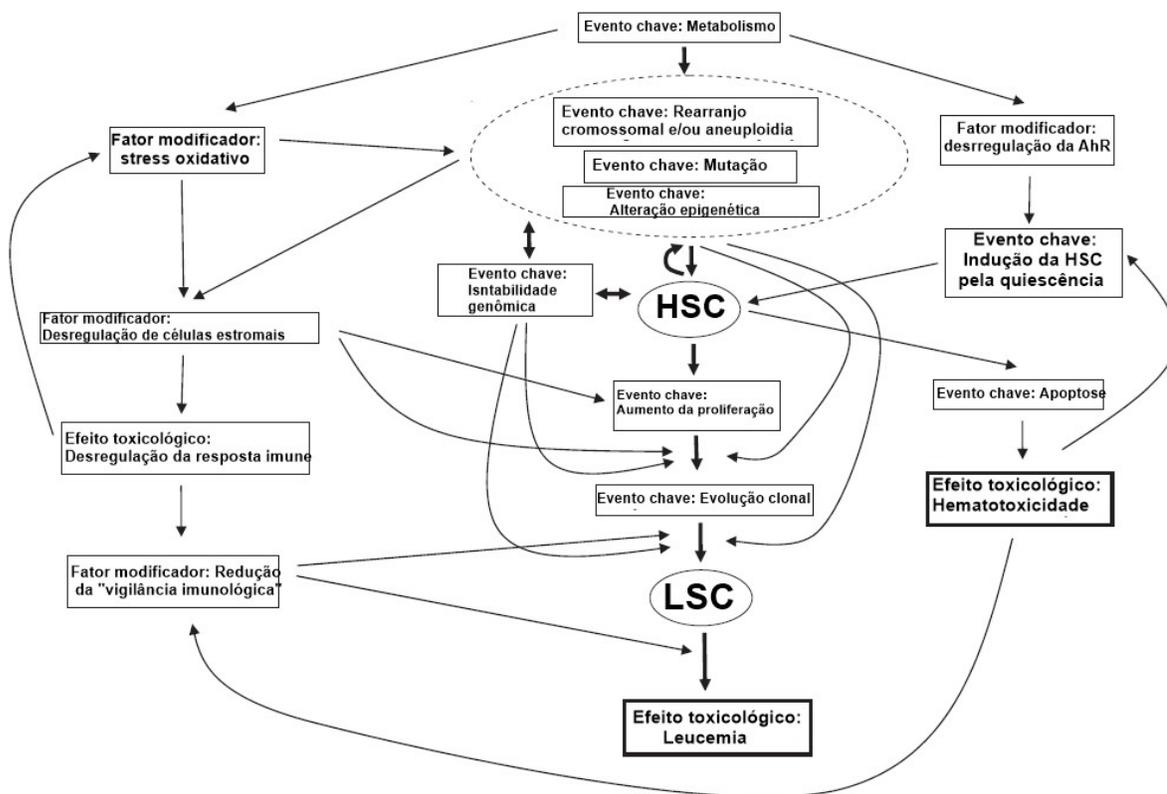
A produção de metabólitos de benzeno iniciais (oxidação primária) ocorre principalmente no fígado, via CYP2E1, e no pulmão (CYP2E1, CYP2F1 e CYP2A13); no entanto, o metabolismo para os compostos com efeitos de toxicidade ao benzeno ocorre nos tecidos alvos e, principalmente, provocando hematotoxicidade e mielotoxicidade na medula óssea (SNYDER, R.; HEDLI, 1996). Evidências sugerem que o metabolismo secundário em medula óssea seja necessário para a expressão da toxicidade do benzeno (SUBRAHMANYAM *et al.*, 1990; 1991). Uma hipótese alternativa é que o metabolismo de benzeno, em metabólitos tóxicos, pode ocorrer na própria medula óssea (SMITH *et al.*, 2011).

As exposições humanas ao benzeno em concentrações de ar, entre 0,1 e 10 ppm, resultam em perfis de metabólitos urinários, com 70-85 % fenol, 5-10% de cada de hidroquinona, ácido trans, trans-mucônico e catecol, e menos de 1% do ácido S-fenilmercapturico (KIM *et al.*, 2006; QU *et al.*, 2003).

O benzeno é reconhecido, por suas características hematotóxicas e carcinogênicas (IARC, 2012; LOOMIS *et al.*, 2017). Devido a seus efeitos mielotóxicos, pode provocar alterações nas

células sanguíneas que resultam em redução de plaquetas, leucócitos e eosinófilos (IARC, 2012; ABRAHAM, 1996; AKSOY, MUZAFFER, 1989).

Apesar da importante redução dos limites aceitáveis de exposição ao benzeno no trabalho de 10 ppm para 1 ppm, de 1980 para 1990 (CAPLETON; LEVY, 2005; MENDES *et al.*, 2017), da legislação do Canadá que definiu que a gasolina não deve exceder a 1,0% de benzeno em volume (no processo), a venda e fornecimento não deve exceder a 1,5% em volume nas áreas de abastecimento do Canadá (CANADA, 2012) e do conjunto regulamentário da U.S. EPA (United State Enviromental protection Agency) que visou reduzir o teor de benzeno na gasolina que é normalmente de 1% para 0.62% em 2011, a presença deste composto tóxico no organismo é considerado perigoso em qualquer grau de exposição. Estudos fornecem evidências de que o benzeno é hematotóxico em níveis > 1 ppm (RAPPAPORT *et al.*, 2009) e sugerem que o mecanismo de intoxicação (Figura 2) do benzeno e o risco associado de leucemia podem ser substancialmente maior do que é atualmente preconizado pelas agências reguladoras.



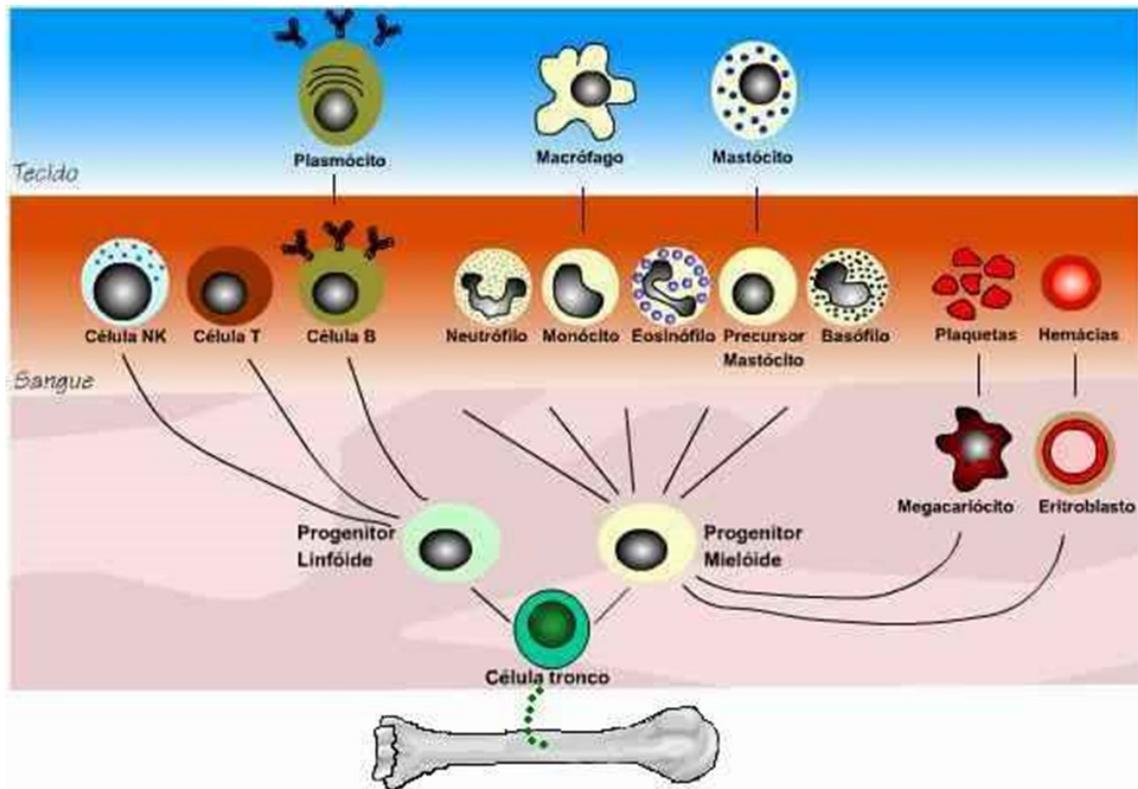
**Figura 2** Provável mecanismo que benzeno induz à leucemia (adaptado de SMITH *et al.*, 2011)

LSC = Células tronco leucêmicas. HSC = Células Tronco Hematopoiéticas

## 2.4 Leucemia

A exposição ao benzeno bloqueia a produção normal de células da medula, plaquetas e de células brancas no sangue. A deficiência de células vermelhas leva à anemia aplástica; a de plaquetas resulta em deficiência na coagulação; e a de células brancas aumenta o risco de infecções (BAIN, 2010).

As leucemias fazem parte de um grupo de neoplasias malignas resultantes de alterações genéticas nas células hematopoiéticas em desenvolvimento na medula óssea (Figura 3) e que se distribuem pelo sangue periférico e outros órgãos (AKSOY, MUZAFFER, 1988). Estas alterações não são hereditárias e causam proliferação exagerada e acúmulo de mieloblastos ou “blastos leucêmicos” (APPELBAUM, 2009), que deixam de funcionar como células sanguíneas normais. As leucemias são classificadas segundo o tipo celular especificado (linfóide, mielóide ou monocítica) e pela diferenciação das células (aguda, crônica ou subaguda), sendo divididas em quatro tipos principais: leucemia linfóide aguda (LLA), leucemia linfóide crônica (LLC), leucemia mielóide aguda (LMA), leucemia mielóide crônica (LMC) (STRACHAN; READ, 2013; BAIN, 2010).



**Figura 3** Esquema ilustrativo resumido da diferenciação hematopoiética (SÁ, 2012)

## 2.5 Abordagens para avaliação da genotoxicidade do benzeno em humanos

A investigação de alterações genéticas é considerada uma das ferramentas fundamentais na avaliação da exposição humana a xenobióticos, como é o caso do benzeno. No entanto o avanço da pesquisa molecular sugere que apenas avaliar fatores genéticos pode não ser suficiente para explicar satisfatoriamente muitos processos na etiologia das doenças (VALENTE *et al.*, 2017).

No Brasil, estudos sobre genotoxicidade com trabalhadores de PRCs foram realizados demonstrando a correlação dos efeitos genotóxicos com a exposição ao benzeno em PRC (BENITES *et al.*, 2006; LACERDA *et al.*, 2015; MITRI *et al.*, 2015; MORO *et al.*, 2013; ROSA *et al.*, 2013; SANTIAGO *et al.*, 2014; TREVISAN *et al.*, 2014). Moro *et al.* (2013) avaliaram a exposição ao BTEX (Benzeno, Tolueno, Etilbenzeno, Xileno) empregando ensaio cometa, micronúcleo e indicadores de estresse oxidativo glutatona (GSH), catalase (CAT), glutatona S-transferase (GST) e superóxido desmutase (SOD), tendo sido encontrado danos no material genético maiores em trabalhadores expostos quando comparados ao grupo controle. Costa-Amaral *et al.* (2017) utilizaram ensaio cometa e indicadores de estresse oxidativo CAT, GST, SOD, grupamento tiol (TIOL) e malondialdeído (MDA), com diferentes concentrações ambientais relacionados à exposição ocupacional ao BTEX em PRCs na Zona Norte do Rio de Janeiro. Neste trabalho foi encontrada uma correlação significativa entre o variável tempo de trabalho e os indicadores ensaio cometa, GST, MDA e TIOL, relacionados com os efeitos tanto genotóxicos quanto citotóxicos causados pela exposição ao BTEX no ar atmosférico. Mitri *et al.* (2015) avaliou diferentes polimorfismos nesta mesma população.

A exposição à carcinógenos genotóxicos, além de seus efeitos genéticos, pode envolver uma variedade de efeitos não genotóxicos em células (TRYNDYAK *et al.*, 2006). Esses efeitos não genotóxicos podem desempenhar um papel importante no desenvolvimento do câncer (NAKAYAMA *et al.*, 2006). Evidências sugerem que alterações não genotóxicas em células, como por exemplo, alterações no epigenoma celular, podem resultar no aparecimento de células epigeneticamente reprogramadas, apresentando um perfil epigenético semelhante ao frequentemente observado em células cancerosas, tais como padrões aberrantes de modificação de histona, hipometilação de elementos repetitivos de DNA e proto-oncogenes e hipermetilação de genes supressores tumorais (BOLLATI; BACCARELLI, 2010).

## 2.6 Epigenética

Assim, modificações herdáveis pela mitose e ao longo das gerações e que podem afetar a expressão de um gene ou as propriedades de seu produto, observadas na genética, mas que não alteram as sequências de bases nucleotídicas da molécula de DNA são a base da epi-genética (GENTER *et al.*, 2006), e estão relacionadas a sinais intrínsecos e ambientais (EGGER *et al.*, 2004; STRACHAN; READ, 2013).

Bollati e Baccarelli (2010) argumentam que os efeitos da saúde gerados pela exposição ambiental devem ser entendidos a partir da interação entre processos genéticos e epigenéticos. Os principais mecanismos epigenéticos descritos são as modificações das histonas, através de interações moleculares distintas; a regulação de genes pós-transcrição feita pela expressão de RNA não codificante e a metilação de sítios de DNA, especialmente ilhas CpG onde 50-60% dos promotores de genes estão localizados, sendo o mecanismo epigenético mais estudado e melhor entendido (BOLLATI; BACCARELLI, 2010; DUCASSE; BROWN, 2006; ESTELLER, 2011).

Existem algumas características que distinguem a epigenética dos mecanismos da genética convencional: a reversibilidade, os efeitos de posicionamento e a habilidade de agirem em distâncias maiores do que um único gene (FEINBERG, 2001). Os padrões epigenéticos são sensíveis a modificações ambientais que podem causar mudanças fenotípicas que serão transmitidas aos descendentes (PEMBREY *et al.*, 2014; PRAY, 2004; TOBI *et al.*, 2014).

Os mecanismos epigenéticos chave descritos são as modificações de histonas; a regulação pós transcricional feita por RNAs não codificante, comumente denominado microR-NA (miR-NA); e a metilação de DNA, sendo este último o mecanismo epigenético mais estudado e melhor compreendido (BOLLATI; BACCARELLI, 2010; DUCASSE; BROWN, 2006; ESTELLER, 2011).

### 2.6.1 Metilação do DNA

A metilação no DNA é estabelecida nos dinucleotídeos CpGs (pares de citosina-fosfato-guanina) por uma família de enzimas, as DNA metiltransferases (DNMTs), que reconhecem os dinucleotídeos CpG hemimetilados depois da replicação do DNA (LISTER *et al.*, 2009). Os dinucleotídeos CpG aparecem esparsos pelos genomas eucarióticos ou agrupados em regiões definidas como ilhas CpG, regiões onde estão localizados 50-60% dos promotores gênicos. A

maioria dos dinucleotídeos CpG esparsos está metilada, ao contrário das ilhas CpG que estão demetiladas. Essas ilhas são frequentes em regiões promotoras de certos genes, incluindo genes constitutivos (*housekeeping*<sup>4</sup>) (MORGAN et al., 2004) e apresentam tamanho igual ou superior à 200 pares de bases (pb) sendo que há pelo menos 10 vezes mais metilação nessa região do que em outras regiões do genoma com CpG (RAZIN; CEDAR, 1977).

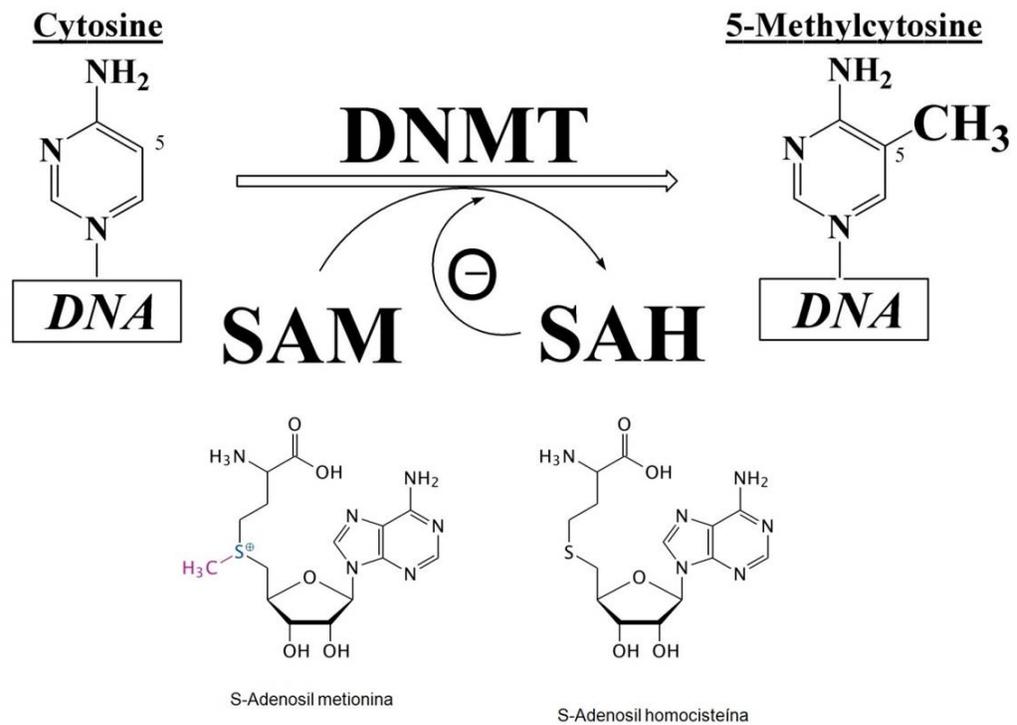
A metilação do DNA é uma modificação covalente do grupamento metil no carbono 5 da citosina, também nos dinucleotídeos CpG e em uma porção menor no CpNpG (N = qualquer nucleotídeo) (BIRD, 1992). É herdada por células somáticas após a divisão celular, no qual as DMTs (DMT1) catalisam e transferem o grupamento metil da S-adenosilmetionina para as bases de citosina na molécula de DNA, mantendo o padrão da metilação da “célula mãe” (GARINIS *et al.*, 2002; SZYF, 1991) conforme Figura 4.

A metilação do DNA é indispensável para as funções do genoma dos vertebrados e está relacionada com processos de regulação gênica, estabilidade cromossômica e *imprinting* parental<sup>5</sup> (BIRD, 2002; JABLONKA; LAMB, 2010). A metilação do DNA também desempenha um papel importante na manutenção da integridade do genoma por silenciamento transcricional de sequências de DNA repetitivas e transposons endógenos (BESTOR, 1998; HEDGES; DEININGER, 2007).

---

<sup>4</sup> Gene de manutenção necessário para manter a função celular básica, tipicamente expresso em todos os tipos celulares de um organismo.

<sup>5</sup> Mecanismo de regulação da expressão gênica que permite apenas a expressão de um dos alelos parentais

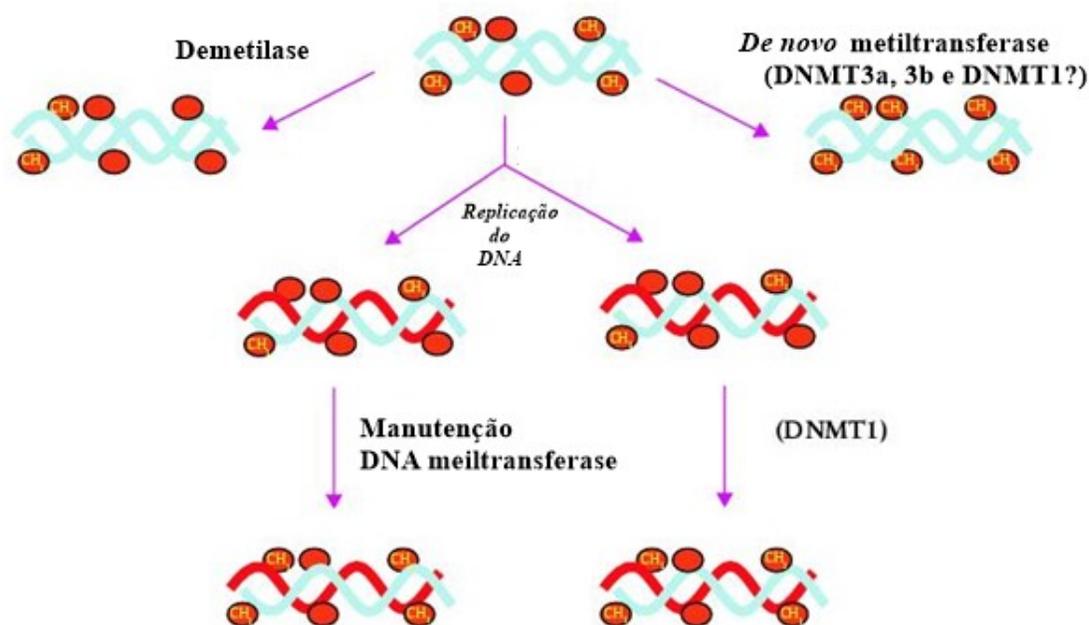


**Figura 4** Enzimas envolvidas na metilação do DNA (adaptado de LEE; ZHU, 2006)

SAM = S-Adenosil Metionina. SAH = S-Adenosil Homocisteína

Existe uma forte correlação entre a cromatina inativa (heterocromatina) com a metilação do DNA (RAZIN; CEDAR, 1977), ou seja, a metilação silencia a expressão dos genes. Quando o DNA estiver hipometilado, a cromatina estará ativa (eucromatina), permitindo a transcrição dos genes. Porém, quando o DNA estiver hipermetilado a cromatina estará inativa, impedindo a expressão dos genes (D'ALESSIO; SZYF, 2006).

Esse processo de metilação é mediado pelas DNA metiltransferase que se dividem em duas classes de representantes: aquelas envolvidas na metilação de fitas hemimetiladas do DNA (fitas de DNA em processo de replicação), conhecidas como metilases de manutenção como a DNMT1; e outro grupo, responsável pela maioria dos processos de metilação de novo, que ocorre em sítios com nenhum tipo de indicação de metilação (Figura 5), ou seja, sem a presença de metilação prévia, como as DNMT3a e DNMT3b (SZYF, 2007), que catalisam e transferem o grupamento metil da S-adenosilmetionina para as bases de citosina na molécula de DNA (GARINIS *et al.*, 2002), conforme Figura 5.

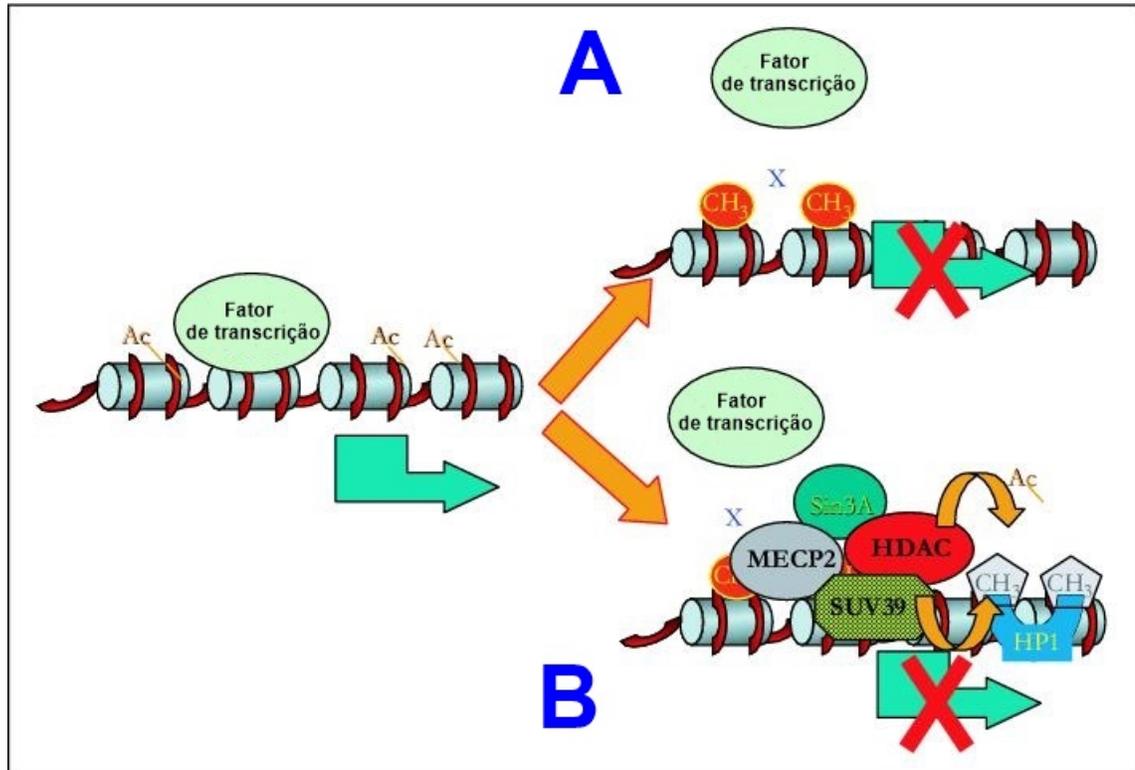


**Figura 5** Esquema do processo de manutenção da metilação pelas DNMTs (adaptado de SZYF, 2005)

Acredita-se que os padrões de metilação do DNA são relativamente baixos durante o desenvolvimento da célula e são realizados pelas DNMT3a e DNMT3b, que catalisam a metilação *de novo*, principalmente nas ilhas CpG (OKANO *et al.*, 1999). Esses padrões são mantidos nas células somáticas ao serem copiados para as células-filhas pela DNMT1, que replica os padrões de metilação de gerações parentais metiladas para as gerações seguintes ainda não metiladas (RAZIN; SZYF, 1984).

A metilação do DNA interfere na expressão dos genes por meio de mecanismos diretos e indiretos. Primeiro, a metilação de ilhas CpG presentes nas regiões promotoras dos genes impede diretamente, através de uma barreira física, o seu reconhecimento pelos fatores de transcrição, resultando na inativação do gene (COMB; GOODMAN, 1990; PRENDERGAST; LAWE; ZIFF, 1991). Segundo, a metilação ocorre em uma região que apresenta domínios de ligação para a metilação (MBD), que se localiza ao redor de um sítio de regulação da transcrição e atrai de forma indireta as proteínas de domínio de ligação de metilação (MBP), que tem afinidade pelo grupo metil e se ligam a dinucleotídeos CpG localizados nas regiões promotoras e impedem o acesso dos fatores de transcrição aos seus sítios. Essa família de proteínas é composta por pelo menos cinco membros, sendo que as mais estudadas são a MeCP1 e MeCP2 (Proteína de ligação a metil-CpG). A MeCP1 necessita de múltiplos sítios CpGs próximos para se ligar ao grupo metil, promovendo assim, a condensação da cromatina para a forma inativa. Já a MeCP2 necessita apenas de um simples sítio CpG para fazer a ligação, promovendo altera-

ções na cromatina semelhantes as promovidas pela proteína MeCP (ATTWOOD; YUNG; RICHARDSON, 2002), que recrutam co-repressores e desacetilases de histonas (HDACs), inativando a configuração da cromatina ao redor do gene, desligando-o (Figura 5) (NAN *et al.*, 1998; NAN; CROSS; BIRD, 1998).



**Figura 6** Mecanismos direto (A) e indireto (B) da inativação da expressão por metilação (adaptado de SZYF, 2006)

Tipicamente, as regiões não metiladas dos pares CpG são localizadas em genes de tecido-específico e em genes essenciais, como os de manutenção, que estão envolvidos na preservação da “rotina” celular e são expressos na maioria dos tecidos (RODENHISER; MANN, 2006). Em contraste, as regiões CpG metiladas são geralmente associadas ao DNA silenciado, pois apresentam as regiões MBD, que podem bloquear as proteínas sensíveis à metilação (RODENHISER; MANN, 2006). A metilação do DNA também é controlada pela cromatina, através de uma interação bidirecional entre ambas (RAZIN; CEDAR, 1977).

Estudos descrevem uma repressão de genes supressores de tumor, envolvidos em várias vias celulares (ciclo celular, apoptose ou manutenção do genoma) durante a carcinogênese, por hipermetilação no DNA em seus promotores. Paradoxalmente, células cancerosas exibem uma hipometilação do genoma global que leva a uma instabilidade genômica e expressão de genes

silenciados anteriormente (DELPU *et al.*, 2013; STEIN, 2012). Portanto, o estado epigenético alterado confere instabilidade do genoma e perda de sinais de crescimento controlado nas células cancerosas (STEIN, 2012; DELPU *et al.*, 2013).

Os padrões aberrantes da metilação do DNA são descritos em diferentes tipos de câncer, principalmente na leucemogênese (ISSA; BAYLIN; HERMAN, 1997; SHARMA; KELLY; JONES, 2010). Não somente a metilação do DNA de diferentes genes esta associada ao risco de leucemia (CONWAY O'BRIEN; PRIDEAUX; CHEVASSUT, 2014; JIANG *et al.*, 2014), como também a metilação de um gene esta associada a diferentes subtipos de leucemias (JIANG *et al.*, 2016). Que por sua vez, os genes supressores de tumor têm sua relevância por apresentar padrão aberrante de metilação no desenvolvimento de quase todo câncer (STRUHL, 2014), inclusive na LMA que é o principal desfecho da exposição ao benzeno (BOLLATI *et al.*, 2007; LIMA *et al.*, 2008; SMITH *et al.*, 2011).

## 2.7 Epigenética na exposição ao benzeno

Smith *et al.* (2011) demonstraram que alterações epigenéticas são um importante mecanismo no processo que leva à indução da leucemia desencadeada por exposição ao benzeno (Figura 2). Em um primeiro estudo para relacionar os baixos níveis de um cancerígeno comum ao ambiente para mudanças epigenéticas em cânceres humanos, Bollati *et al.* (2007) examinaram agentes de trânsito da polícia e atendentes de postos de combustíveis de Milão, na Itália, e demonstraram que em trabalhadores submetidos a baixos níveis de exposição ao benzeno no ar, comuns nos países ocidentais, ocorre uma hipometilação dose-dependente global no DNA. Além disso, as autoras descreveram hipermetilação em promotor específico p15 (+ 0,35%;  $P = 0,018$ ) e hipometilação do gene MAGE-1 (que codifica o antígeno do melanoma humano) (-0,49%;  $P = 0,049$ ).

Lima *et al.* (2008) ao examinarem paciente com LMA, LMC e LLA no Brasil, demonstrando hipermetilação de CDNK2B e correlacionaram o aumento da metilação do gene com a ausência de expressão no mesmo. Não encontrando, até o presente momento, dados publicados sobre alterações epigenéticas na exposição ocupacional ao benzeno para o Brasil.

## 2.8 Genes candidatos relacionados à exposição ao benzeno

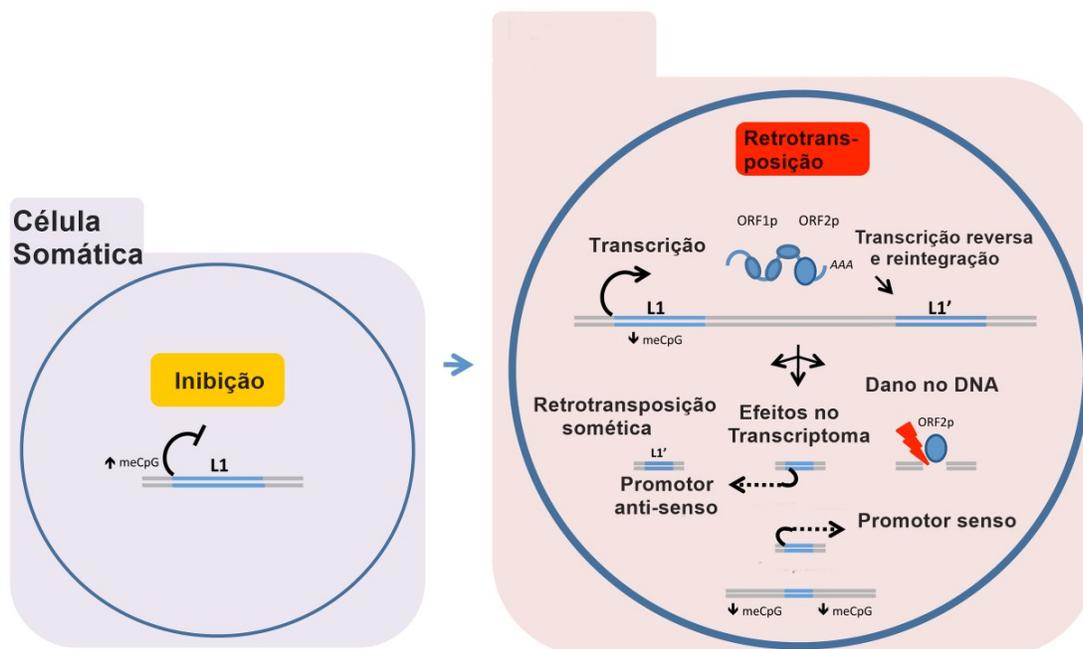
Com base em evidências científicas descritas em estudos sobre o estado de metilação alterado ao longo da leucemogênese, os genes “inibidor de quinase dependente de ciclina 2B” (CDKN2B) e o elementos nuclear intercalados longo-1 (LINE-1) foram incluídos no estudo como marcadores para avaliação de perfil de metilação gene específico gene global (respectivamente) (BODOOR *et al.*, 2014; BOLLATI *et al.*, 2007; FABRIS *et al.*, 2011; JIANG *et al.*, 2016).

### 2.8.1 Retrotransposon LINE-1

Os retrotransposons elementos nuclear intercalados longo-1 (LINE-1) são elementos transponíveis (ET) repetitivos que são amplamente distribuídos no genoma (GRAHAM; BOISSINOT, 2006), sendo, responsáveis pela amplificação de elementos intercalados curtos (SINEs) e pseudogenes (DEWANNIEUX; ESNAULT; HEIDMANN, 2003; ESNAULT; MAESTRE; HEIDMANN, 2000). Existe ~0,5 milhões de cópias de LINE-1 (L1) no genoma humano, o que constitui 17-25% do genoma humano (KAZAZIAN, 2004; LANDER *et al.*, 2001).

Os elementos de LINE-1 são moderadamente ricos em CpG e, normalmente, fortemente metilados (HOFFMANN; SCHULZ, 2005; YANG, 2004). Uma vez que as sequências de LINE-1 são frequentemente repetidas e os retrotransposons humanos amplamente intercalados, o seu nível de metilação pode servir como um marcador da metilação do DNA genômico global (CHOWDHURY *et al.*, 2011). A hipometilação na região promotora de LINE-1 provoca a ativação transcricional do elemento LINE-1, o que causa a transposição do retroelemento e a alteração cromossômica, podendo reprimir a expressão genética em todo o genoma (FIGURA 6) (APORNTEWAN *et al.*, 2011; RODÍĆ; BURNS, 2013; SAITO *et al.*, 2010).

A redução dos níveis de metilação de LINE-1, reflete a hipometilação global, em vários tipos de câncer (KITKUMTHORN; MUTIRANGURA, 2011), assim como há indícios de estar associada com a exposição ao benzeno (BOLLATI *et al.*, 2007; FUSTINONI *et al.*, 2012)



**Figura 7** Atividade de L1 em células normais vs células neoplásicas (adaptado de RODIĆ; BURNS, 2013)

Expressão de LINE-1 inibida por metilação em células somáticas normais (imagem esquerda). Hipometilação ativa Line-1 (imagem direita). A retrotransposição (da esquerda para a direita) se dá por transcrição, montagem de ORF1p e ORF2p com RNA de L1, e inserção de uma nova sequência L1 (L1'). Efeitos tumorais relacionados são conceitualmente mostrados como (I) Retrotransposição somática de L1; (II) alterações transcricionais induzidas por promotores codificados por L1 (em sentido anti-senso e senso) ou impactos na metilação da área; E (III) quebras de DNA geradas por L1 ORF2p.

### 2.8.2 Gene CDKN2B

O gene CDKN2B (também conhecido como p15) codifica o membro da família INK4 de inibidores de quinase dependente de ciclina (CDK) p15<sup>INK4B</sup>. Uma função das CDKs é a indução da parada do ciclo celular em resposta a diferentes estímulos (mais precisamente o controle da progressão da fase G1 para fase S) (Figura 7). Sendo expresso seletivamente durante a diferenciação celular melodie e megacariocítica, mas não na eritróide (Figura 3) (RAJ *et al.*, 2007; ROBSON *et al.*, 1999; TEOFILI, 2001; TEOFILI *et al.*, 2000).

O fator de crescimento transformante (TGF-β1) induz um aumento progressivo de P15<sup>INK4B</sup>, que, por sua vez, interage com p27<sup>Kip1</sup> (p27) e p21<sup>WAF1</sup> (p21), ligando-se e inibindo os complexos de ciclina, resultando no bloqueio das células na fase G1 do ciclo celular (TEOFILI *et al.*, 2000). O silenciamento do gene p15 proporciona uma vantagem para as células tumorais, principalmente por desregulação do ciclo celular e da via TGF-β (MATSUNO *et al.*, 2005).

A repressão transcricional por hipermetilação do gene p15 é observada em todos os tipos de leucemia (BODOOR *et al.*, 2014; LIMA *et al.*, 2008), sendo frequentemente observada na SMD e pode desempenhar papel na progressão da SMD para LMA (AGGERHOLM, ANNI *et al.*, 2006; APPELBAUM, 2009; CECHOVA *et al.*, 2012). A metilação da CDKN2B também se correlaciona com a percentagem de blastos na medula óssea e perda ou supressão cromossomal (AGGERHOLM, A. *et al.*, 1999; TIEN *et al.*, 2001). Bollati *et al.* (2007) e Xing *et al.* (2010) descrevem alteração da metilação/expressão do gene CDKN2B em indivíduos com baixa exposição ao benzeno.

### 3. JUSTIFICATIVA

Pelo mundo e no Brasil há vários estudos visando à prevenção, vigilância e identificação de biomarcadores para avaliar a exposição ocupacional ao benzeno/gasolina. Porém, ainda permanecem dificuldades no estabelecimento de medidas eficazes de proteção à saúde, pois os trabalhadores continuam adoecendo (MOURA-CORREA *et al.*, 2014). E justamente por ser um carcinógeno, não há um limite seguro de exposição ao benzeno (IARC, 2012; LOOMIS *et al.*, 2017). Portanto, mesmo em baixas concentrações, como é o caso dos postos de combustíveis, o benzeno pode provocar alterações hematológicas (MENDES *et al.*, 2017). Outra questão que fundamenta a prioridade de contínuos estudos para identificação cada vez mais precoce das alterações pela exposição ao benzeno é que diferente de outros carcinogênicos em que há substitutivos de matéria prima para o processo produtivo, como o amianto, não perspectiva de banimento para o benzeno. E para efetiva proteção à saúde dos trabalhadores, biomarcadores precoces e preditivos de efeito têm sido estudados/investigados para identificar alterações pré-cancerígenas, tendo enfoque nos biomarcadores de genotoxicidade, diferenças no padrão de metilação no DNA.

## 4. OBJETIVOS

### 4.1 Objetivo geral

Avaliar os padrões de metilação do DNA de uma população de trabalhadores de postos de combustível da Zona Oeste do Rio de Janeiro/RJ.

### 4.2 Objetivos específicos

- Selecionar genes correlacionados à leucemia mielóide aguda e marcadores para análise de metilação global do DNA, como o retrotransposon LINE-1;
- Avaliar os padrões de metilação dos genes selecionados *KLF6*, *CDKN2B* e do retrotransposon LINE-1 em um grupo de trabalhadores de sete postos de combustíveis da Zona Oeste do Rio de Janeiro/RJ;
- Avaliar os padrões de metilação destes genes em um grupo de trabalhadores expostos ambientalmente ao benzeno;
- Comparar os padrões de metilação entre o grupo exposto ocupacionalmente e o grupo exposto ambientalmente.

## 5. MATERIAIS E MÉTODOS

### 5.1 Desenho do estudo

Este é um estudo observacional do tipo transversal que avaliou o padrão de metilação de genes envolvidos no desenvolvimento da LMA no DNA de indivíduos expostos ocupacionalmente na região da AP 5.3, localizada no Município do Rio de Janeiro, aos vapores de combustível, em especial o benzeno.

### 5.2 A região da AP 5.3

Considerando a divisão das regiões administrativas do Rio de Janeiro, a área de planejamento cinco (AP 5) fica situada no extremo Oeste do Município do Rio de Janeiro (Figura 8).



**Figura 8** Em azul a localização da AP 5 no município do Rio de Janeiro (EBP, 2011)

Segundo dados do Governo do Rio de Janeiro, nesta região localizam-se os Distritos Industriais de Campo Grande, Palmares, Paciência e Santa Cruz. Com destaque a Companhia Siderúrgica do Atlântico (TKCSA, do grupo Thyssen-Krupp), a Gerdau, usinas termelétricas, além de possuir os principais corredores de transporte de massas como AV. Brasil e rede ferroviária (ramal de cargas e passageiros) (CODIN, 2014). De acordo com a Prefeitura do Rio de Janeiro (RIO DE JANEIRO, 2011), a AP5 é subdividida em três áreas compostas por cinco Regiões Administrativas (RA): AP 5.1 - Bangu (RA XVII) e Realengo (RA XXXIII), AP 5.2 - Campo Grande (RA XXVIII) e AP 5.3 - Guaratiba (RA XXVI) e Santa Cruz (RA XIX) (Quadro 1). A região envolvida no presente estudo está localizada na RA XIX, compreendendo os bairros de Paciência, Santa Cruz e Sepetiba.

área AP 5	Região Administrativa	Bairros
AP 5.1	XVII BANGU	Bangu
		Gericinó
		Padre Miguel
		Senador Camará
	XXXIII REALENGO	Campo dos Afonsos
		Deodoro
		Jardim Sulacap
		Magalhães Bastos
		Realengo
		Vila Militar
AP 5.2	XVIII CAMPO GRANDE	Campo Grande
		Cosmos
		Inhoaíba
		Santíssimo
		Senador Vasconcelos
AP 5.3	XXVI GUARATIBA	Barra de Guaratiba
		Guaratiba
		Pedra de Guaratiba
	XIX SANTA CRUZ	Paciência
		Santa Cruz
		Sepeitiba

Fonte: IPP, Armazém dos Dados

**Quadro 1** Regiões administrativas e bairros da AP 5 (RIO DE JANEIRO, 2011)

### 5.3 Seleção dos elementos da amostra

Foram selecionados como população do estudo homens e mulheres (exceto grávidas), com idade superior a 18 anos, que trabalhavam em Postos de Revenda de Combustíveis (PRC) por ao menos um ano.

Os postos de combustível da região do estudo foram selecionados em parceria com o Sindicato dos Empregados em Postos de Serviços de Combustíveis e Derivados de Petróleo do Estado do Rio de Janeiro (Sinpospetro-RJ) e todos os trabalhadores desses postos, que se enquadraram nos critérios de inclusão, foram convidados a participar do estudo. Todos os indivíduos receberam as devidas informações sobre a pesquisa e, os que concordaram em participar, assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE).

Os dados biológicos foram comparados com um grupo de vigilantes (seguranças de patrimônio) da Fiocruz, trabalhadores com menores níveis de exposição ao benzeno volatilizado da gasolina, mais ainda sim com exposição a fumaça de escapamento de veículos

### 5.4 Dados sociodemográficos e processo de trabalho

Para a coleta dos dados sociodemográficos, das condições de trabalho e de perfil e histórico de saúde dos sujeitos da pesquisa foram utilizados dois questionários, Individual e Clínico, já validados pela Comissão Nacional Permanente do Benzeno (CNPBz), e que vem sendo utili-

zado em inquéritos epidemiológicos e estudos-piloto sobre a exposição ao benzeno em todo o país, como o realizado pelo CESTEH/ENSP/Fiocruz (VALENTE, 2015). Antes da aplicação do questionário, foi lido para cada trabalhador o termo de consentimento livre e esclarecido, ao final do qual houve concordância em participar do projeto, via assinatura, ambiente reservado para garantir a privacidade, e evitar o constrangimento dos sujeitos da pesquisa. Estes abordam, de forma sumarizada:- dados sociodemográficos dos trabalhadores; os procedimentos operacionais (etapas) realizados pelos frentistas, quanto aos agentes de riscos inerentes ao benzeno; uso dos Equipamentos de Proteção Individual (EPI) e Coletivo (EPC) pelos frentistas; fatores de riscos e agravos à saúde decorrentes da exposição ao benzeno; hábito dos trabalhadores, identificando outras possíveis via de exposição; condições e o ambiente de trabalho quanto a agentes de risco inerentes ao benzeno; possível exposição múltipla a diferentes substâncias; histórico familiar de doenças, correlatas ou não com possíveis desfechos de sua exposição; condições gerais de saúde.

Além desses dois questionários, coletas de sangue e urina foram realizadas para o levantamento de dados biológicos.

### 5.5 Seleção de genes

Com base no objetivo específico: “*Selecionar genes relacionados à leucemia mielóide aguda (LMA) e marcadores para análise de metilação global do DNA, como o retrotransposon LINE-1*” foi desenvolvida uma metodologia para seleção de genes em rede de interação biológicas.

A metodologia se deu por meio da teoria de que qualquer dado gera uma informação e essa informação pode ser analisada em rede de interação. A análise foi realizada usando dados de artigos de microarray para criação de rede de interação biológica utilizando software próprio (MONTJOJO *et al.*, 2010), ao qual a lista de genes foi aplicada no algoritmo de rede de associação múltipla (GeneMANIA) para criação de rede de interação biológica e prever a função de genes. As propriedades topológicas da rede foram calculadas pelo MCODE (para separação em clusters), BINGO (análise de ontologia genética<sup>6</sup>) e Centiscape (para centralidade).

---

<sup>6</sup> A Ontologia Genética define o universo de conceitos relacionados às funções gênicas ("termos GO") e como essas funções estão relacionadas umas às outras ("relações"). O termo GO descreve a função com relação a três aspectos: função molecular, componente celular e processo biológico. Estes conceitos e suas associações a genes e a produtos gênicos são geradas e gerenciadas pelo Consórcio de Ontologia Gênica. (DECS, BVS e Gene Ontology Consortium)

### 5.5.1 Dados de microarray e análise da rede de interação estendida

Foram selecionados 96 genes através de busca bibliográfica, pelo NCBI, para artigos entre os anos de 2010-2014, completos, com dados quantitativos de microarray, para exposição ambiental e ocupacional ao benzeno, utilizando as palavras-chave: “benzene gene expression”, “benzene microarray”, “Benzene expression” e “benzene poisoning” (Tabela 1). GeneMANIA ampliou a lista com genes funcionalmente similares, ou que possuem propriedades compartilhadas com os genes da consulta inicial e a partir de dados genômicos e proteômicos disponíveis, relatou pesos que indicam o valor preditivo de cada conjunto de dados para uma consulta selecionada e exibiu uma rede interativa de associação funcional, ilustrando as relações entre os genes e os conjuntos de dados de acordo com os seus dados de co-expressão do Omnibus de expressão de genes (GEO), dados de interação físicos e genéticos derivados de BioGRID, previsão de dados de interação de proteína com base em ortologia de I2D, co-localização, domínio de proteína compartilhada e função (Figura 1).

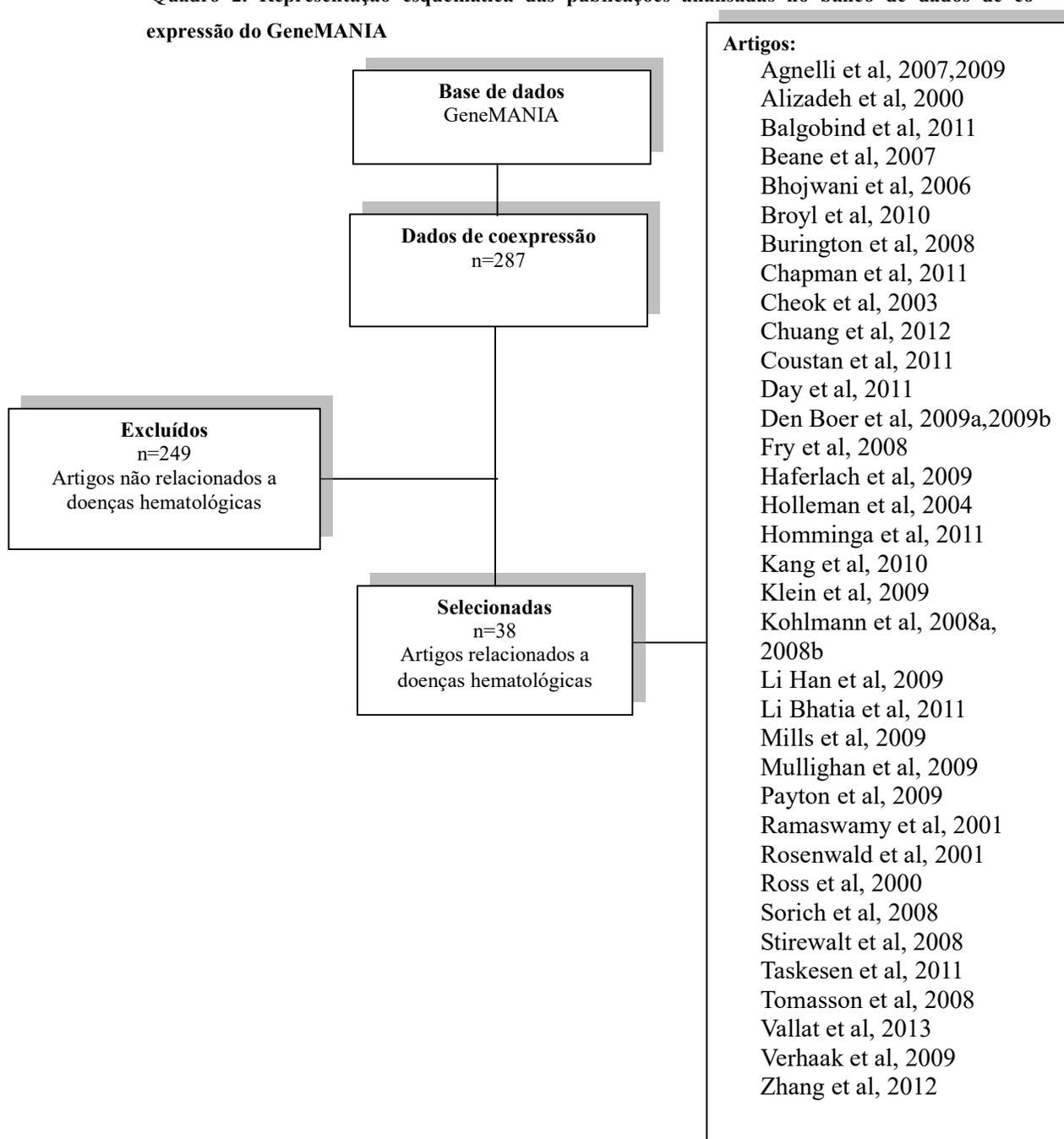
**Tabela 1 Lista de genes e seus estudos**

Reference	Method	Cases	Controls	Results
McHale et al.[45]	Microarray	83 cases of benzene exposure ranging from <<1 to >10ppm.	42	Top 16 genes with high expression ( <i>SERPINB2</i> , <i>TNFAIP6</i> , <i>IL1A</i> , <i>KCNJ2</i> , <i>PTX3</i> , <i>F3</i> , <i>CD44</i> , <i>CCL20</i> , <i>ACSL1</i> , <i>PTGS2</i> , <i>CLEC5A</i> , <i>IL1RN</i> , <i>PRG2</i> , <i>SLC2A6</i> , <i>GPRI32</i> , <i>PLAUR</i> ).
Bi et al.[46]	cDNAmicroarray	7 women diagnosed with benzene poisoning.	7	Top 40 genes with altered expression ( <i>PTGS2</i> , <i>BAI3</i> , <i>GCL</i> , <i>CYP4F3</i> , <i>MYO47</i> , <i>TRA@</i> , <i>AD022</i> , <i>PRKCH</i> , <i>RASGRP1</i> , <i>FPR1</i> , <i>TGFBR3</i> , <i>GRO1</i> , <i>SEL1L</i> , <i>CSF2RB</i> , <i>IFITM1</i> , <i>STAT4</i> , <i>IFITM2</i> , <i>ABLIM</i> , <i>KIAA1382</i> , <i>SPTBN1</i> , <i>HBB</i> , <i>PRKDC</i> , <i>S100A10</i> , <i>ITGB2</i> , <i>TKT</i> , <i>VAMP8</i> , <i>FOSB</i> , <i>ASAH1</i> , <i>CDC37</i> , <i>SLC25A6</i> , <i>CLN2</i> , <i>ACTA2</i> , <i>CST3</i> , <i>HLA-DMB</i> , <i>ALDH2</i> , <i>LGALS2</i> , <i>LGALS1</i> , <i>ARHB</i> , <i>KLF4</i> , <i>ATF3</i> ).
Xing et al.[47]	Microarray (RTPCR)	11	People in the same sector with no symptoms of benzene poisoning.	Decrease in the expression of p15 ( <i>CDKN2B</i> ) and p16 ( <i>CDKN2A</i> ).
Sarma et al.[48]	Microarray	Culture of HL-60 cells treated with IC <sub>50</sub> concentrations of benzene, hydroquinone and benzoquinone	Culture of HL-60 cells treated with Dimethyl sulfoxide	Alteration in expression of 27 genes ( <i>CCL2</i> , <i>EGR1</i> , <i>GCLM</i> , <i>PMAIP1</i> , <i>SESN2</i> , <i>CD69</i> , <i>HERPUD1</i> , <i>HSPA8</i> , <i>RIT1</i> , <i>SERTAD1</i> , <i>SLC38A2</i> , <i>SLC7A11</i> , <i>DNAJB4</i> , <i>ANKFY1</i> , <i>ANLN</i> , <i>AR</i> , <i>ARHGAP19</i> , <i>CDCA2</i> , <i>DEPDC1</i> , <i>ELK1</i> , <i>FBXW9</i> , <i>HERC2</i> , <i>HTR5A</i> , <i>KIF20A</i> , <i>MKI67</i> , <i>MT1G</i> , <i>MTLX</i> ).

Gao et al.[49]	<b>cDNAmicrorray</b>	4 people diagnosed with benzene poisoning and 3 people from the same factory exposed but presenting no symptoms.	3	Top 14 significant genes with altered expression ( <i>PIK3R1</i> , <i>PIK3CG</i> , <i>PIK3R2</i> , <i>GNAI3</i> , <i>SYK</i> , <i>PTPN6</i> , <i>KRAS</i> , <i>NRAS</i> , <i>PLCG2</i> , <i>NFKB1</i> , <i>LYN</i> , <i>SOCS4</i> , <i>HLA-DMA</i> , <i>HLA-DMB</i> ).
----------------	----------------------	--	---	--

Em GeneMANIA, os nós representam os genes e as linhas as interações. Para análise deste trabalho, foram utilizadas as configurações padrão de 20, que são os genes que têm o maior número de interações e configurações avançadas para interações físicas, genéticas e caminhos interligados, alterando-se apenas os dados de co-expressão (Quadro 1)..

**Quadro 2. Representação esquemática das publicações analisadas no banco de dados de co-expressão do GeneMANIA**



### **5.5.2 Análise funcional**

A rede de interação foi utilizada para análise funcional e de ontologia genética (GO) em cluster utilizado o algoritmo de Detecção de Complexos Moleculares (MCODE), um método automatizado para encontrar clusters (regiões altamente interconectadas) e a ferramenta para análise de ontologia genética de redes biológicas (BiNGO) (BADER; HOGUE, 2003). E por último utilizou-se o plug-in do Centiscape 2.2 para análise de centralidade. Centiscape calcula parâmetros de centralidade específicos, descrevendo a topologia da rede e auxilia na identificação dos nós mais importantes em uma rede complexa (SCARDONI; PETTERLINI; LAUDANNA, 2009). De acordo com a conectividade de cada nó de medição de grau, interação e vetor próprio, a média aritmética de cada parâmetro de centralidade foi definida para obter os nós mais conectados. Para análise do MCODE, os parâmetros padrão foram mantidos (degree-cutoff = 2, limite de pontos = 0,2, K = núcleo = 2 e profundidade máxima = 100). Em BiNGO a distribuição hipergeométrica foi utilizada para os processos biológicos e funções moleculares das categorias de super-representação funcional. Apenas as categorias GO super-representadas foram consideradas significativas (com valor de  $p < 0,05$ ).

## **5.6 Avaliação do padrão de metilação**

Com base nos objetivos específicos para avaliar os padrões de metilação dos genes selecionados em grupos de trabalhadores expostos ocupacionalmente e grupo de trabalhadores exposto ambientalmente ao benzeno, com comparação entre os grupos, foram realizadas estas análises no Laboratório de Carcinogênese Molecular do Centro de Pesquisa do Instituto Nacional de Câncer (INCA).

### **5.6.1 Separação de linfócitos e extração de DNA**

O sangue total coletado passou por um processo de isolamento de linfócitos, segundo o protocolo de “criopreservação de sangue total e isolamento de linfócitos do sangue total em -80°C”, já validado no Laboratório de Toxicologia do Centro de Estudos da Saúde do Trabalhador e Ecologia Humana (CESTEH/Ensp/Fiocruz).

Resumidamente, o sangue total foi diluído com PBS estéril em proporção 1/1. E adicionou-se 10 mL de Ficoll-Paque Plus em um tubo de centrifuga (a proporção entre Ficoll e sangue foi de 1/3 e 2/3, respectivamente). Após centrifugação a 1600 rpm (400 x g) por 30-40 min a 18-20 °C, retirou-se a camada superior usando uma pipeta Pasteur, deixando a camada de linfócitos imperturbada.

A camada de linfócitos foi colhida em um tubo de centrifuga limpo usando pontas de pipeta estéreis sem tocar na camada de Ficoll e na camada de sobrenadante. Já que a remoção do excesso de Ficoll-Paque Plus causa contaminação por granulócitos e a remoção do excesso de sobrenadante resulta na contaminação por plaquetas. A lavagem se deu adicionando pelo menos 6ml de PBS aos linfócitos com resuspensão das células por pipetagem. Após de centrifugação a 250 x g durante 10 min a 18–20 °C e descarte do sobrenadante, a lavagem foi repetida mais duas vezes. Após os procedimentos de lavagem, os linfócitos foram suspensos em meio contendo 1,5 mL de RPMI com 10% de soro fetal bovino e 10% de DMSO. Por fim, as amostras foram alíquotas em criotubos contendo 500 µL de linfócitos + meio (1,5 mL de RPMI com 10% de soro fetal bovino e 10% de DMSO).

Posteriormente, parte dos linfócitos foi destinada à extração e purificação do DNA genômico.

A extração de DNA foi realizada utilizando o método de *Salting-Out* com precipitação salina, segundo metodologia utilizada no INCA (modificada para extração de “*buffy coat*” humano). Neste método, alíquotas contendo cerca de 500 µL das amostras foram adicionadas em tubos de microcentrifuga de 1,5 mL e passaram por uma pré-lavagem para retirada do DMSO antes da etapa de extração. A lavagem ocorreu por meio de centrifugação a 13000 rpm (8000 x g) durante 10 minutos, seguido por descarte de sobrenadante e ressuspensão do “*pellet*” em 1 mL de PBS. Posteriormente, com nova centrifugação a 13k rpm durante 10 minutos, seguido por descarte do sobrenadante e ressuspensão do “*pellet*” seguindo o protocolo de extração de DNA. Em seguida, as amostras foram submetidas à lise celular e ruptura da membrana nuclear através de adição de 500 µL de solução de digestão [Tris-HCl 50 mM (pH 8,0), EDTA 100 mM, NaCl 100 mM, SDS 1%], 10 µL de proteinase K e após mistura em vortex, as amostras foram incubadas a 56 °C por 60 minutos. As proteínas foram removidas por precipitação salina pela adição de 200 µl NaCl 6M. O DNA presente no sobrenadante foi isolado e purificado por precipitação, transferindo-o para tubos do tipo “*ependorfs*” contendo 500 µL de isopropanol já previamente identificados e armazenados a -20°C antes da etapa de pré-lavagem. A incubação em isopropanol se deu por 10 minutos a temperatura ambiente, substituindo uma

etapa de incubação de 2 horas a 16 horas. As amostras foram lavadas duas vezes com etanol 70% e o DNA obtido foi ressuscitado com 30  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}$  de injeção.

As amostras de cada participante foram armazenadas em tubos de microcentrifuga de 1,5 mL, devidamente etiquetados com o código interno de cada trabalhador. A quantificação de DNA foi realizada por espectrofotometria a 260 nm, a pureza do DNA determinada pela relação  $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$  e a interferência dos químicos utilizados determinada pela relação  $A_{260\text{nm}}/A_{230\text{nm}}$  utilizando o espectrofotômetro Nanodrop 200.

A integridade das amostras extraídas foi avaliada em produtos de PCR de B-actina por eletroforese em gel de agarose (2%), sendo que foi utilizado eletroforese em gel com tampão TAE 1X. A separação eletroforética foi realizada durante 30 minutos, a 90 V, 60 mA, em cuba de eletroforese submersa. Foram aplicadas alíquotas de 7  $\mu\text{L}$  das amostras com 2,4  $\mu\text{L}$  de mix contendo 1,2  $\mu\text{L}$  de tampão de amostra de DNA (azul de bromofenol) e 1,2  $\mu\text{L}$  de gel red (como corante) e as bandas foram visualizadas sob luz UV, tendo por referência um marcador de tamanho de DNA de 100 pb (pares de base) e dois controles positivos para B-actina.

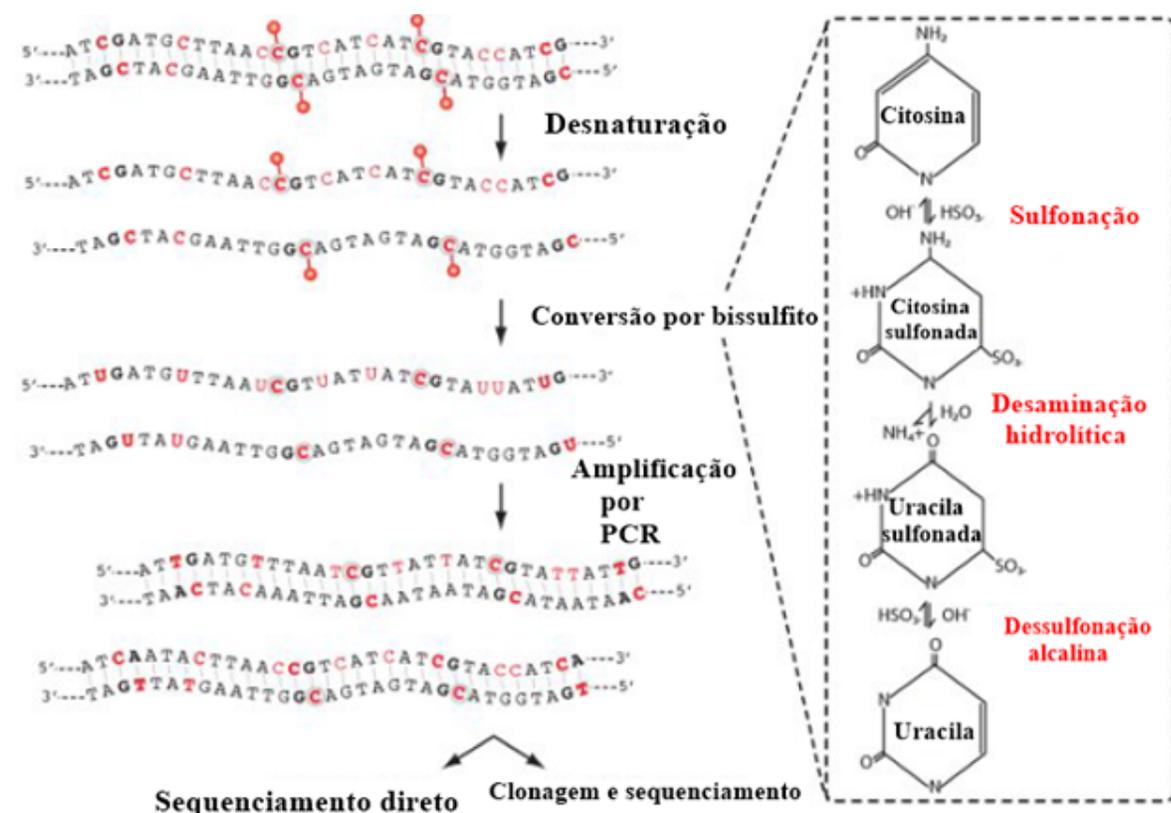
### 5.6.2 Tratamento do DNA com bissulfito de sódio

O tratamento das amostras de DNA extraído a partir de linfócitos do sangue total e que demonstraram quantificações satisfatórias, com confirmação da integridade do DNA (APENDICÊS 1 e 2), foi conduzido utilizando a técnica quantitativa de análise por modificação de bissulfito de sódio descrita por Pattersson *et al* (2011). Utilizando o kit para conversão “EZ DNA Methylation Kit, 200 rxns” da ZYMO RESEARCH (Irvine/EUA), número catalogo: D5002, conforme procedimentos recomendados pelo fabricante.

Em resumo, entre 500-1000 ng/ $\mu\text{L}$  o DNA genômico foi incubado (37°C por 15 minutos) em um tubo de microcentrifuga contendo uma solução de 5 uL de tampão de diluição, em volume total de 50  $\mu\text{L}$ , para conversão máxima de bissulfito. Este procedimento foi seguido por desnaturação em 100  $\mu\text{L}$  de reagente de conversão e mistura em vótex, com posterior incubação em termociclador com parâmetros de (95 °C por 30 s, 50 °C por 60 min.) x 16 ciclos na função “aguardar” ( $\infty$ ) a 4°C, e imediata transição do volume a coluna spin (2mL) contendo 400 uL de tampão de ligação adicionados previamente, seguido de centrifugação em velocidade máxima (>10.000 x g) por 1 minuto. Descartado o sobrenadante, adicionou-se 100  $\mu\text{L}$  da solução de limpeza à coluna e centrifugação durante 1 minuto. A seguir, 200  $\mu\text{L}$  da solução de desulfonação foi adicionado ao fundo da coluna e incubado durante 20 minutos em temperatura ambiente. Após incubação, as amostras foram centrifugadas durante 1 minuto e descartado o

que passou pela coluna. Um volume de 200  $\mu\text{L}$  da solução de limpeza foi adicionado e, após centrifugação, outros 200  $\mu\text{L}$  da solução de limpeza foram adicionados à coluna com posterior centrifugação. Por fim, colocou-se a coluna em um tubo de microcentrífuga de 1,5  $\mu\text{L}$ . E adicionou-se 20-40  $\mu\text{L}$  de Solução de Eluição ao DNA convertido e centrifugou-se durante 1 minuto, descartando a coluna. O DNA convertido foi armazenado em freezer ( $-20^{\circ}\text{C}$ ).

O tratamento por bissulfito resulta numa conversão completa (99,5-99,7%) de citosinas (C) não metiladas em uracilas (U) de quase todas as sequências de DNA alvo, em que as uracilas são convertidas em timinas durante a reação de amplificação (Figura 11). As amostras de cada participante foram colocadas em tubos de microcentrífuga de 1,5  $\mu\text{L}$ , devidamente etiquetados com o código interno de cada trabalhador avaliado e armazenadas a  $-20^{\circ}\text{C}$  até a etapa de reação em cadeia da polimerase (PCR).



**Figura 9** Esquema de conversão química. A análise de metilação do DNA inclui quatro etapas principais, como mostrado; desnaturação, conversão por bissulfito, amplificação por PCR e análise por sequenciamento. No painel da direita, é demonstrado as modificações que a molécula de citosina sofre durante a conversão de bissulfito.

### 5.6.3 PCR e Sequenciamento

A amplificação de  $\beta$ -actina, para avaliação da integridade das amostras extraídas, foi realizada em um volume total de 25  $\mu$ L contendo 2,5  $\mu$ L de Tampão 10x (PCR Invitrogen), 0,5  $\mu$ L de dNTPs (10 nM), 0,5  $\mu$ L de cada um dos *primers* (100 M), 0,75  $\mu$ L de  $MgCl_2$  (50 nM), 0,2  $\mu$ L de *Platinum<sup>®</sup> Taq DNA Polimerase (Invitrogen)*, e 18,55  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O ultra pura para 2  $\mu$ L de DNA.

E a reação de amplificação de LINE-1, para amplificação de DNA convertido, foi realizada em um volume total de 50  $\mu$ L contendo 5  $\mu$ L de Tampão 10x (PCR Invitrogen), 1  $\mu$ L de dNTPs (10 nM), 1  $\mu$ L de cada um dos *primers* (100 M), 1,5  $\mu$ L de  $MgCl_2$  (50nM), 0,25  $\mu$ L de *Platinum<sup>®</sup> Taq DNA Polimerase (Invitrogen)*, e 39,25  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O ultra pura para 1  $\mu$ L de DNA convertido por bissulfito de sódio. Neste processo, as uracilas (U) foram amplificadas em timinas (T) e citosinas metiladas (5meC) em citocinas (C) (Figura 9).

As sequências dos primers e sondas para B-actina, LINE-1, KLF6 e CDKN2B foram obtidos utilizando o software *Pyromarker<sup>®</sup> assay design* (Qiagem). Para localização das sequências dos primers, bem como para visualização das ilhas CpG também foram utilizadas ferramentas do Genome Browser (<http://genome.ucsc.edu/>). Os primers de PCR são apresentados na Tabela 1.

**Tabela 2** Primers e condições da PCR

ID	Forward Primer (5'→3')	Reverse Primer (5'→3')	Primer de se- quenciamento (5'→3')	Condições da PCR
LINE-1	Biotin-TAGGGAGTG TTAGATAGTGG	AACTCCCTA ACCCCTTAC	AACTCCCTA ACCCCTTAC	95°C por 15min; 95°C por 40s, 56°C por 40s, 72 °C por 40s (50 ciclos); 72 °C por 10min.
ACTB (β-actin)	CCAGTGGCTTCC CCAGTGT	ATGAGGTAG TCAGTCAGG TCCC		95°C por 5min; 95 °C por 30s, 56°C por 45s, 72°C por 30s (50 ciclos); 72 °C por 10min.
CDKN2B	GAGGGTTAGATAAGA TAAAGAAAAAATGT	Biotin-CAAAC CCTACCACTCTCAC	GTTTGTAGGTT TATAGGTTTT	
KLF6	AGGTAGAGTAAGTTG GTTTTTATGATAAGT	Biotin- ACTCC CCATATACAACATC TTC	GGGTTTGAAT TTTAAATAG	

Utilizou-se um primer marcado com biotina para purificar o produto final de PCR no pirosequenciamento. Por último, o grau de metilação foi obtido utilizando o equipamento *Pyro-marker*® Q96 (Qiagen) e seguindo protocolo conforme indicado pelo fabricante, e o grau de metilação é expresso como o percentual de citosinas metiladas sobre a soma de citosinas metiladas e não metiladas ( $\% = C \times 100 / C + T$ ), podendo usar os não-CpG resíduos de citosina como controle interno para verificar a conversão de bissulfito.

### 5.7 Análises Estatísticas

Para as análises em abordagens de biologia de sistemas para a seleção de genes, a maioria dos softwares são o próprio teste ou algoritmo. Como MCODE, que calcula um “k core”, e Centiscape que calcula resultados de acordo com a conectividade dos nós da rede. E na análise de ontologia (BINGO) a distribuição hipergeométrica foi utilizada para as categorias de processos biológicos e funções moleculares de sobre representação funcional. Somente as categorias GO super-representadas foram consideradas significativas

Para todas as análises, foram considerados  $p < 0,05$ .

## 6 ASPECTOS ÉTICOS

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em 21/12/2014, sob o título de "*Avaliação do padrão de metilação do DNA em trabalhadores de postos de combustível da Zona Oeste do Rio de Janeiro expostos ocupacionalmente*" e o número de aprovação CAAE: 38643014.7.0000.5240, com financiamento do programa jovens cientistas PAPES VII/Fiocruz/CNPq (Processo número 401865/2015-0). O projeto seguiu todos os preceitos da ética em pesquisa com seres humanos (Conselho Nacional de Saúde – CONEP 466/2012). Todos os indivíduos que formaram a amostra leram, concordaram e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (ANEXOS 1 e 2). Foram adotados procedimentos potenciais a riscos. Assim como, utilizadas medidas referentes à privacidade, anonimato e confidencialidade dos dados.

## 7 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 7.1 Seleção de genes

A análise de interações biológicas revelou uma rede com 114 genes e 2415 interações e a análise de agrupamento identificou cinco clusters menores (Figura 10), classificados com base no nível de conectividade dos nós (score).

Após análise funcional, o cluster 2 (Figura 11) foi selecionado para análise de centralidade utilizando Centiscape. De acordo com a conectividade de cada nó de medição de grau, interação e vetor próprio, a média aritmética de cada parâmetro de centralidade ( $\bar{X}_{\text{grau}} = 12,625$ ;  $\bar{X}_{\text{interação}} = 5,25$ ;  $\bar{X}_{\text{vetor}} = 0,23$ ) foi definida para obter os nós mais conectados. A centralidade do grau indica o número de nós adjacentes conectados a um nó exclusivo. Esse nó é classificado como um hub e os hubs em redes interativas tendem a ser essenciais, pois sua exclusão reduz a conectividade da rede global. Betweenness é definido pelo número de caminhos mais curtos entre dois nós que passam por um nó de interesse (NEWMAN, 2005; SCARDONI; PETTERLINI; LAUDANNA, 2009). Os nós com o maior controle Betweenness compreendem a maior parte do fluxo de informações na rede, representando pontos críticos na rede. O eigenvector define o nó "prestígio" de uma rede, isto é, um nó em uma rede é mais central se estiver conectado a muitos nós centrais (VILELA *et al.*, 2008).

Como resultado da análise de centralidade, três genes (KLF4, KLF6 e JUN) se mostraram com valores médios superiores para os três parâmetros, o que indica que eles têm alta probabilidade de serem os mais conectados na rede, ocupando posições centrais e, assim, podendo constituir o núcleo da rede. Com KLF6, KLF4 e JUN sendo os nós mais interconectados, eles foram considerados como genes biomarcadores putativos em que a exclusão de um nó poderia produzir uma forte perturbação na rede de sinalização (Figura 11). E, dentre os três, KLF6 foi selecionado para avaliação de metilação no projeto, junto com o retrotransposon LINE1 e o supressor de tumor CDKN2B.

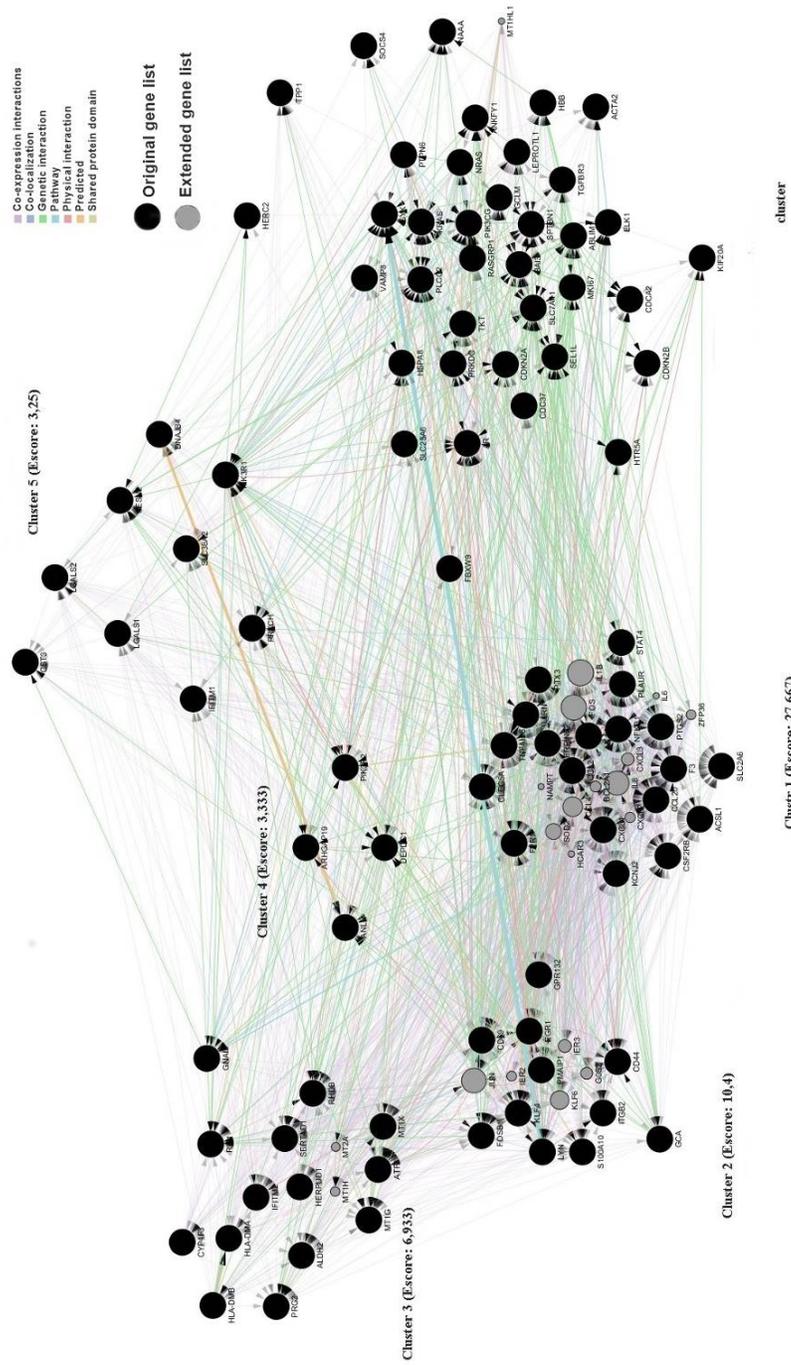
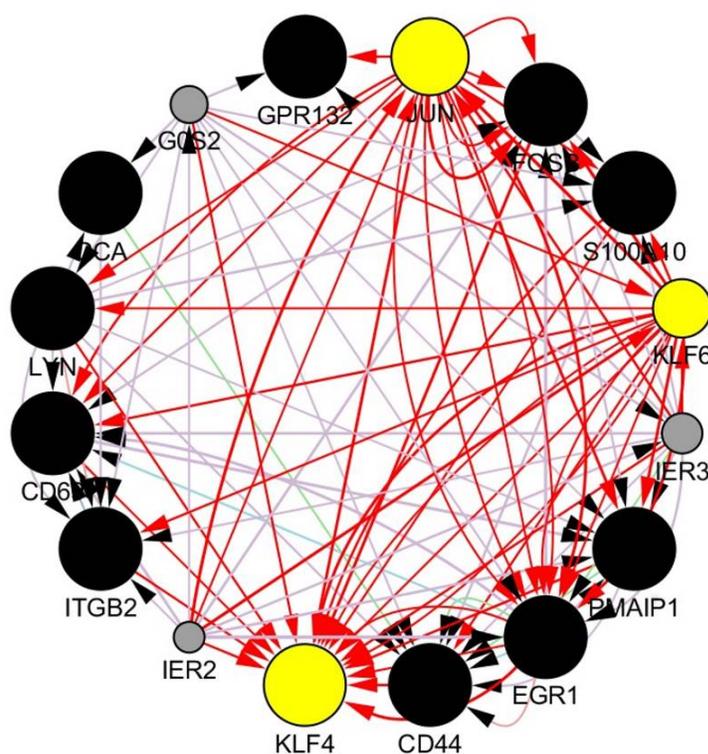


Figura 10 Visão geral da rede separada por clusters e suas interconexões



**Figura 11** Centralidade do clister 2, demonstrando os três genes (*KLF6*, *KL4* e *JUN*) como os nós mais interconectados da rede

## 7.2 Avaliação biológica

Participaram do estudo 87 trabalhadores, sendo 52 trabalhadores de 7 postos de combustíveis localizados nos bairros de Santa Cruz, Paciência e Sepetiba da AP 5.3 e 35 trabalhadores, vigilantes das portarias da Fiocruz.

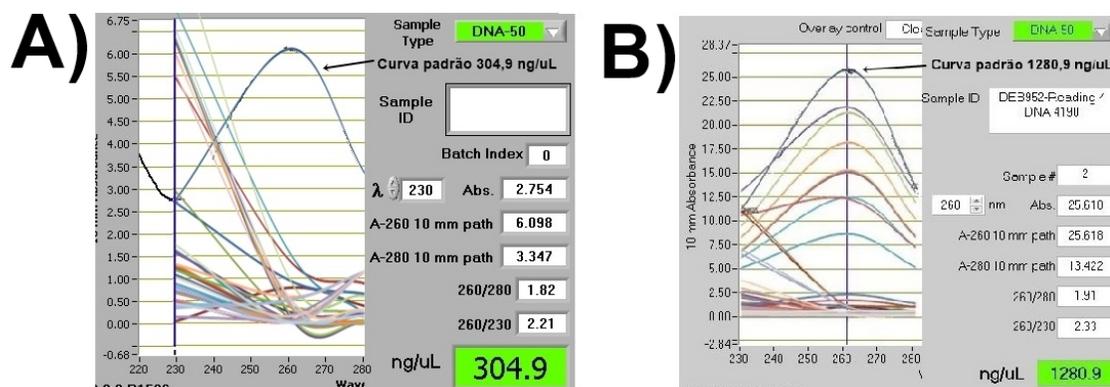
As características dos trabalhadores estão apresentadas na Tabela 2. A população de trabalhadores de PRCs, exposta aos vapores da gasolina, foi composta por 82,7% de homens e 17,3% de mulheres, com idade média de 36 anos, 19,2% de fumantes e 69,2% que faziam uso de bebida alcoólica. Enquanto os trabalhadores das portarias da Fiocruz foi formada por 83% de homens e 17% de mulheres, 17% de fumantes e 40% que faziam uso de bebida alcoólica.

**Tabela 3** Características sócio-demográficas das populações do estudo

	Trabalhadores de PRCs	Trabalhadores das Portarias
	(Ocupacionalmente expostos)	(ambientalmente expostos)
	<i>n</i> = 52	<i>n</i> = 35
Idade média (mín-máx)	36 (18-62)	44 (22-59)
<b>Gênero, <i>n</i> (%)</b>		
Masculino	43 (82,7%)	29 (82,9%)
Feminino	9 (17,3%)	6 (17,1%)
Tempo médio na ocupação em anos (min-máx)	11 (1-46)	12 (1-29)
<b>Tabagismo, <i>n</i> (%)</b>		
Tabagista	10 (19,2%)	6 (17,14 %)
Ex-tabagista	9 (17,3%)	6 (17,1,4 %)
Nunca fumou	31 (59,6%)	16 (45,7 %)
<b>Etilismo, <i>n</i> (%)</b>		
Bebe	36 (69,2%)	14 (40 %)
Bebia	3 (5,8%)	3 (8,57 %)
Nunca bebeu	12 (23,1%)	11 (31,43 %)

### 7.2.1 Avaliação da metilação

Com base na curva de absorvância de cada uma das amostras de DNA extraída dos trabalhadores, houve diferença significativa no rendimento das extrações após mudança de parâmetros do protocolo de extração (Figura 12). Demonstrando nos quadros 1 e 2 (APÊNDICE 1 e 2) que não apenas a observação das razões de absorvância devem ser levadas em conta (como usualmente é aceito), mas também o modo como a curva da reação se comporta (WATTS, 2017).

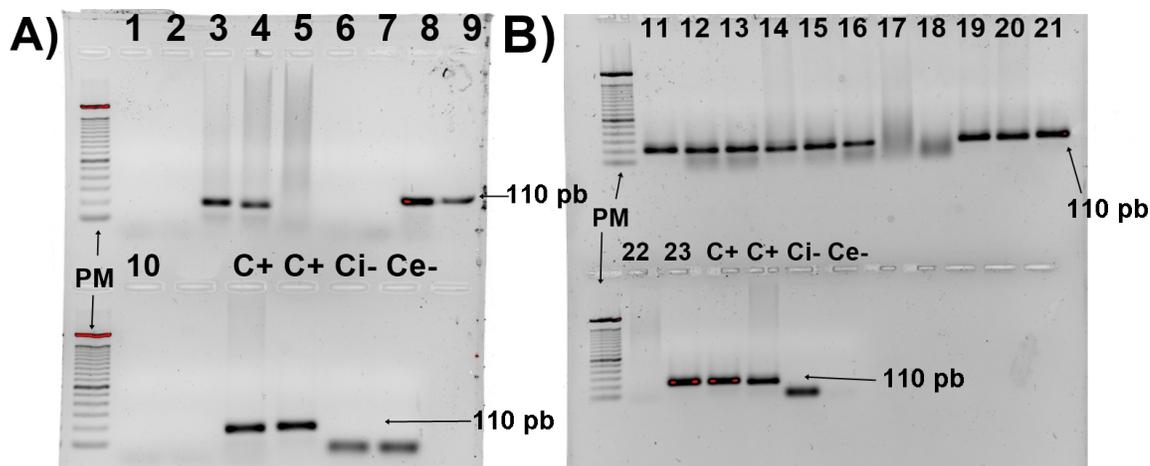


**Figura 12** Absorbâncias das amostras de extração de DNA de trabalhadores obtidas em Nanodrop (A) com incubação em isopropanol por 2 horas e (B) após modificação de protocolo com incubação em isopropanol por 10 minutos.

Por conta do desenvolvimento da metodologia, houve perdas ao longo das análises. Das 88 amostras, 25 tiveram rendimentos mínimos aceitáveis após extração (Figura 12), com concentrações de DNA suficientes para seguir as análises (APÊNDICE 1 e 2) e destas, 12 permaneceram com resultados íntegros na eletroforese de B-actina (Figura 13). Esta perda pode estar relacionada a um ou vários destes fatores: método de armazenamento não próprio para análises com extração de DNA, pelo emprego de DMSO para armazenamento das amostras de sangue coletadas dos trabalhadores, que, ao mesmo tempo em que é usado para as células permanecerem íntegras, também é tóxico para as células; volume de tampão utilizado no armazenamento, o que para aliquotar diminui a concentração de células por alíquota e/ou por terem sido utilizados heparina como anti-coagulante, conhecido por interferir na reação de PCR (YOKOTA *et al.*, 1999).

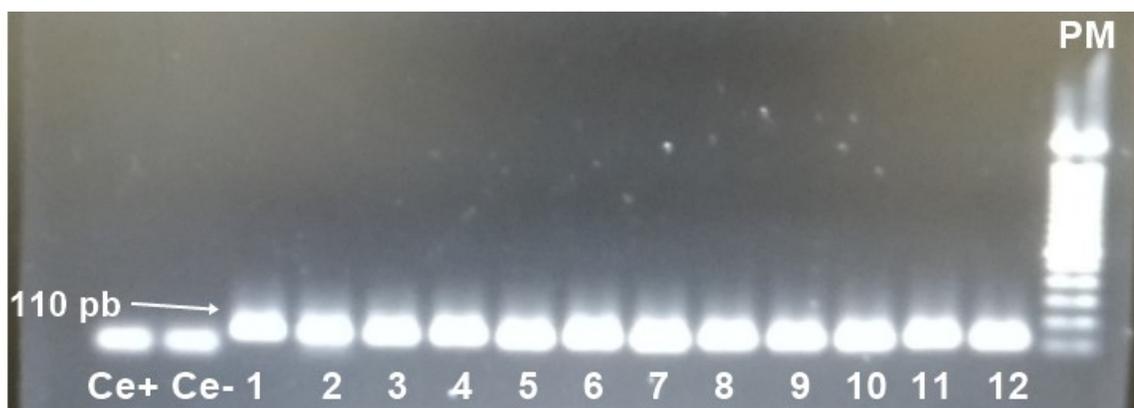
Após a análise de integridade das amostras verificada em gel de agarose demonstrada na Figura 13. Das 23 amostras que tiveram bons rendimentos na quantificação, 12 amostras (9 de trabalhadores de PRCs ocupacionalmente expostos a benzeno e 3 trabalhadores das portarias da Fiocruz ambientalmente expostos), se mostraram íntegras em gel de agarose e “aptas” a seguir para a fase de conversão de DNA por bissulfito de sódio (amostras como as indicadas pelos números 11 a 16 no gel B da Figura 13, que mostram uma banda em torno de 90 pares de base) e 11 amostras não estavam íntegras demonstrando um perfil difuso de bandas ou nenhuma banda (como as amostras indicadas pelos números 17 e 2, respectivamente, nos géis da Figura 13). Todas amostras permaneceram íntegras após conversão de DNA por bissulfito de sódio e amplificação de LINE-1, mantendo ótimos rendimentos e adequados para a análise de

metilação em pirosequenciamento por demonstrarem uma banda consistente de 110 pares de base em gel de agarose (Figura 14).



**Figura 13** Eletroforese em gel de agarose para avaliar integridade das extrações de DNA das amostras

PM= padrão de peso molecular em escala de 100 pb; Sendo (A - números 1-10) produtos de amplificação por PCR de B-actinadas extrações com incubação a 2 horas em isopropanol e referente as amostras marcadas como \* no APÊNDICE 1; Sendo (B - números 11-23) produtos de amplificação por PCR de B-actina das extrações com incubação a 10 minutos em isopropanol e referente as amostras marcadas como \* no APÊndice 2; C+ (Controle positivo); Ci- e Ce- (Controle negativo interno e externo, respectivamente).



**Figura 14** Confirmação de amplificação de LINE-1 para DNA convertido

PM= padrão de peso molecular em escala de 100 pb.

Dos DNAs cuja integridade das amostras foram confirmadas, as características sócio-demográficas dos 12 trabalhadores (9 de trabalhadores de PRCs ocupacionalmente expostos a benzeno e 3 trabalhadores das portarias da Fiocruz ambientalmente expostos) estão apresentadas na Tabela 3. A população de trabalhadores de PRCs, trabalhadores expostos aos vapores da

gasolina, foi composta por 556% de homens e 444% de mulheres, com idade média de 0anos, Com tempo médio na ocupação em postos de combustíveis de 12 anos. Enquanto os trabalhadores das portarias da Fiocruz foi formada por % de homens e % de mulheres, Com tempo médio na ocupação como vigilante de 11 anos.

**Tabela 4** Características sócio-demográficas dos trabalhadores cujas amostras tiveram seu DNA apto para a avaliação do padrão de metilação neste estudo

	Trabalhadores de PRCs (Ocupacionalmente expostos)	Trabalhadores das Portarias (ambientalmente expostos)
	<i>n</i> = 9	<i>n</i> =3
Idade média	30	45
<b>Gênero, <i>n</i> (%)</b>		
Masculino	5 (55,6%)	3 (100%)
Feminino	4 (44,4%)	0 (0%)
Tempo médio na ocupação em anos	12	11

As análises de metilação do DNA de LINE-1 foram empregadas para avaliar a metilação global, e não houve tempo hábil até o momento para a validação das condições de PCR e sequenciamento para os outros dois genes selecionados.

Das amostras que passaram para a última etapa, o percentual médio de metilação em citocinas do DNA por grupos ocupacionais de LINE-1 foi um pouco inferior (67,7%; Desvio Padrão = 0,6) nos trabalhadores de PRCs (*n* = 9), expostos ocupacionalmente ao benzeno em comparação com o percentual de metilação em citocinas (68,4%; Desvio Padrão = 1,45) nos trabalhadores das portarias da Fiocruz (*n*=3) (Tabela 4).

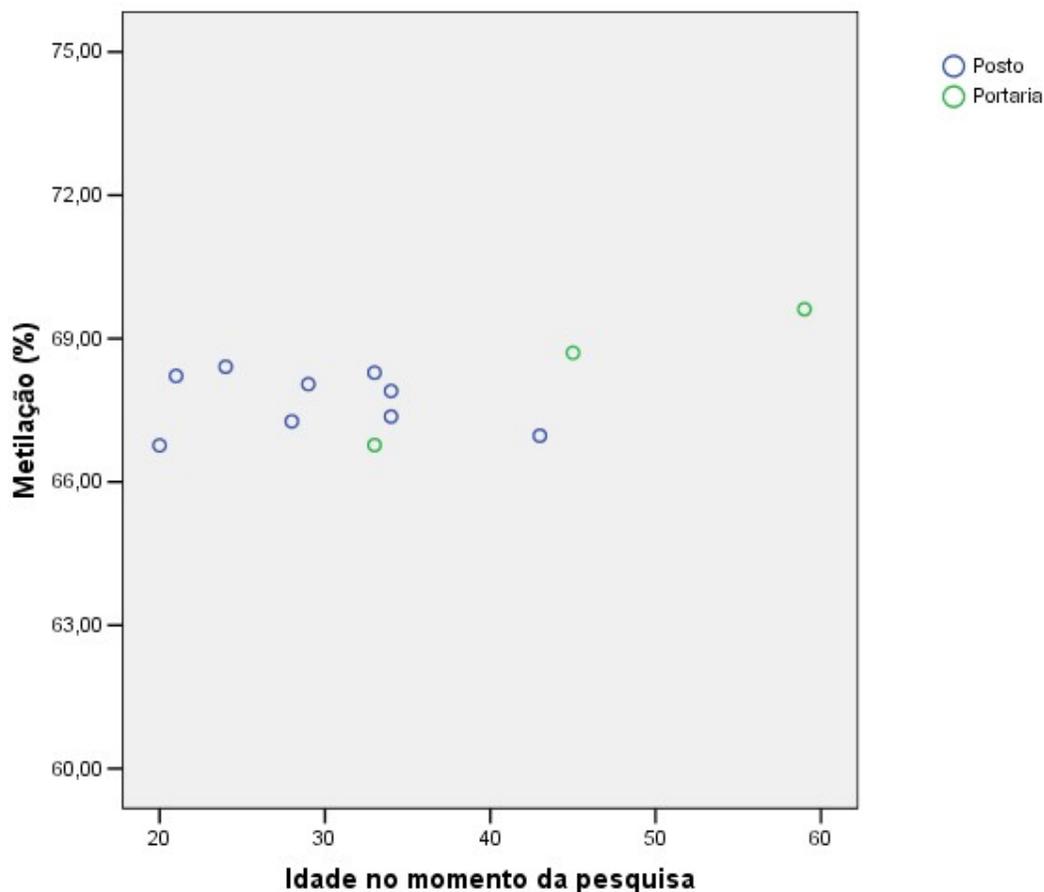
**Tabela 5** Níveis de metilação do DNA no retrotransposon LINE-1 nos grupos expostos ocupacional e ambientalmente

	Trabalhadores de PRCs (Ocupacionalmente expostos)		Trabalhadores das Portarias (ambientalmente expostos)	
	<i>n</i>	Média (DP)	<i>n</i>	Média (DP)
Line-1 (5meC %)	9	67,7 (0,6)	3	68,4 (1,45)

DP = Desvio padrão; 5meC % = Percentual de citocinas metiladas

A média da metilação do DNA de LINE-1 se mostrou menor nos trabalhadores de postos de combustíveis ao considerar a idade e tempo na ocupação (Figura 15). Apesar de não haver significância estatística, por causa do valor baixo de amostras de DNA íntegro que foi possível avaliar, ou seja,  $n = 12$  (9 trabalhadores PRCs e 3 trabalhadores das portarias da Fiocruz), os resultados foram menores que o esperado para exposição ao benzeno para populações de indústrias (teoricamente com níveis de benzeno maiores) e mantiveram a proporção esperada entre as populações em comparação com dados internacionais para exposição ao benzeno em postos de combustíveis e trabalhadores que trabalham perto de vias de trânsito (BOLLATI *et al.*, 2007; FENGA; GANGEMI; COSTA, 2016).

Além disso, os percentuais de metilação dos vigilantes das portarias (trabalhadores mais velhos e com maior tempo de trabalho em profissão com exposição ao benzeno) foi maior que os percentuais dos trabalhadores de postos de combustíveis (trabalhadores mais jovens e com tempo médio de trabalho em profissão com exposição ao benzeno menor que os vigilantes), enquanto o esperado seria que os percentuais de metilação fossem menores enquanto a idade avança como demonstrado por Cho *et al.* (2015). Apesar de ser um achado potencial que pode ser explorado, não podemos inferir seu significado com segurança devido ao número baixo de trabalhadores que foi possível analisar.



**Figura 15** Níveis de metilação relacionados à idade e ocupação das populações estudadas de trabalhadores ocupacionalmente expostos a benzeno em PCRs da Zona Oeste do Rio de Janeiro e trabalhadores ambientalmente expostos a benzeno nas portarias da Fiocruz

A metilação de elementos repetitivos pode detectar diminuições na metilação do DNA e servem como um substituto para a metilação global (YANG, 2004). Nossos resultados mostraram uma maior diminuição para metilação de LINE-1 nos trabalhadores de PCRs apesar da idade avançada dos trabalhadores das portarias, quando o esperado seria que quanto mais avançada a idade, menos os níveis de metilação em LINE-1 (CHO *et al.*, 2015). Essa observação é consistente com a hipometilação frequentemente observada na LMA e em outras células, que tem sido associada a maior instabilidade cromossômica e ativação de genes aberrantes (SCHOOF; BERDEL; MÜLLER-TIDOW, 2014). As alterações que foram observadas nas populações estudadas são pequenas em valores, mas representam uma alteração precoce induzida pela exposição aos padrões normais de metilação de 0,8 e condiz ao encontrados por outras pesquisas em outros países (YOKOTA *et al.*, 1999).

Na mesma população de trabalhadores de PRCs na Zona Oeste do Rio de Janeiro foram avaliados bioindicadores individuais como ácido *trans,trans*-mucônico (ATM) como produto do metabolismo do benzeno (como mostrado na Figura 1); biomarcadores de estresse oxidativo como catalase, glutathione S-transferase (GST), superóxido dismutase (SOD), grupo TIOL e malondialdeído (MDA); biomarcadores de genotoxicidade como ensaio cometa tradicional e usando a enzima DNA-formamidopiridina glicosilase (FPG) e aberrações cromossômicas, além da metilação de LINE-1 como biomarcador epigenético. Costa-Amaral (2017) identificou concentrações de benzeno no ar atmosférico nas bombas de PRCs da Zona Oeste ( $\leq$  limite de detecção até  $564 \mu\text{g}\cdot\text{m}^{-3}$ ), com uma oscilações nas concentrações de benzeno em postos de combustíveis devido ao processo de trabalho, identificando maiores exposições nos processos de descarregamento de caminhões-tanque, por exemplo (MOURA-CORREA; LARENTIS, 2017). Para os biomarcadores TIOL, MDA e ensaio cometa, foram identificadas diferenças entre os trabalhadores expostos ao benzeno de 3 postos de combustíveis. Além disso, uma maior frequência de aberrações cromossômicas, identificadas por Valente (2017), foi observada em comparação com a população não exposta descrita na literatura, caracterizando um maior risco de doença devido à exposição ao benzeno, mesmo em baixas doses como é o caso de PRCs e exposições ambientais. Apesar dos biomarcadores de ensaio cometa, aberrações cromossômicas, GST e MDA terem sido relacionados aos efeitos genotóxicos e citotóxico causado pela exposição ao benzeno nesta população (SANTOS. *et al.*, 2018, aceito), não foi possível realizar correlação das alterações epigenéticas e esses biomarcadores devido ao *n* muito baixo de amostras de trabalhadores em que foi possível avaliar as alterações de metilação, como discutido anteriormente.

## 8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Pelo nosso conhecimento, não existem estudos brasileiros que avaliem as alterações nos padrões de metilação do DNA de trabalhadores expostos ocupacionalmente a benzeno, especialmente em postos de combustíveis, assim como são poucos os estudos mundiais (principalmente em trabalhadores de PRCs). Esta abordagem pode contribuir para identificação de um biomarcador precoce de exposição à baixas doses de benzeno (precoce em relação aos desfechos à saúde relacionados ao metabolismo do benzeno, como alterações em leucócitos), impactando no estabelecimento de medidas de promoção a saúde dos trabalhadores.

A avaliação das alterações epigenéticas, através da identificação dos padrões de metilação, tem o potencial de agregar conhecimento à avaliação de biomarcadores já em desenvolvimento no Laboratório de Toxicologia do CESTEH/ENSP/Fiocruz, sendo crescente sua utilização de forma complementar aos biomarcadores de exposição clássicos, como indicador precoce de alterações relacionadas com exposição a benzeno.

Neste trabalho, foi empregada para seleção de genes visando avaliação de padrões de metilação uma abordagem por previsão em rede de interação biológica, que apresentou probabilidades de interações entre genes e proteínas, com recursos e aplicação ágil de bases de dados disponíveis em larga escala, confirmando os estudos que apontam sua viabilidade operacional pelo uso da tecnologia para uma variedade complexa de dados biológicos e suas interações. Esta abordagem confirmou o uso da bioinformática como uma importante ferramenta na tomada de decisão para alvos biológicos, devido ao potencial aplicável para prever as funções dos genes conhecidos e desconhecidos em eventos/processos biológicos definidos. Esta abordagem, aliada a estratégias de metilômica, em desenvolvimento no Laboratório de Carcinogênese Molecular do Centro de Pesquisa do INCA, são potenciais para aprofundamento da busca por novos indicadores precoces de exposição a benzeno, assim como outros compostos.

Diante dos resultados obtidos neste trabalho, foi possível validar e aprender com relação às etapas da metodologia de análise na avaliação deste novo indicador, com recomendação que para as próximas avaliações com trabalhadores expostos a ser realizada, a melhor forma de coletar e armazenar as amostras seja com EDTA como anti-coagulante e a camada linfocitária ou sangue total armazenada apenas com o anti-coagulante, como medida para reduzir as perdas de amostras e adequar à metodologia de extração de DNA, necessária para avaliação do padrão de metilação dos trabalhadores.

### **Lista de publicações e trabalhos gerados durante o projeto**

Publicação RBSO nota técnica (Apêndice III)

SANTOS, MVC. et al. Aspectos toxicológicos do benzeno, biomarcadores de exposição e conflitos de interesses. Revista Brasileira de Saúde Ocupacional, v. 42, n. suppl 1, 2017.

Publicação RBSO artigo (Apêndice IV)

VALENTE. et al. Utilização de biomarcadores de genotoxicidade e expressão gênica na avaliação de trabalhadores de postos de combustíveis expostos a vapores de gasolina. Revista Brasileira de Saúde Ocupacional, v. 42, n. suppl 1, 2017.

Resumo apresentado em evento nacional (Apêndice V)

SANTOS, MVC; COSTA-AMARAL, I. C; LARENTIS, AL. Análise de uma rede de interação proteína-proteína a partir da relação Ahr/benzeno: uma abordagem em toxicologia de sistemas. Apresentado na 8ª Escola de Modelagem Molecular em Sistemas Biológicos (VIII EMMSB 2016).

Resumo aceito para apresentação em evento internacional e a ser publicado pela Occupational Environmental Medicine (Apêndice VI)

Santos, MVC; Perini, JA; Larentis, AL. Prediction and characterization of biomarker network for benzene exposure. Aceito para apresentação no International Congress on Occupational Health (ICOH 2018).

Resumo aceito para apresentação em evento (Apêndice VII)

Santos, MVC et al. Evaluation of environmental, genotoxic and epigenetic biomarkers related to occupational exposure to low doses of benzene in filling station workers. Aceito para apresentação no Congresso Latino-Americano de Toxicologia Clínica e Laboratorial (Toxi-Latin 2018).

## REFERÊNCIAS

ABRAHAM, N. G. Hematopoietic effects of benzene inhalation assessed by long-term bone marrow culture. *Environmental Health Perspectives*, v. 104 Suppl 6, p. 1277–1282, dez. 1996.

AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY (ATSDR). *2015 PRIORITY LIST OF HAZARDOUS SUBSTANCE*. Atlanta, U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, 2015.

AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY (ATSDR). *Toxicological profile for Benzene*. Atlanta, U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, 2007.

AGGERHOLM, A. *et al.* Extensive intra- and interindividual heterogeneity of p15INK4B methylation in acute myeloid leukemia. *Cancer Research*, v. 59, n. 2, p. 436–441, 1999.

AGGERHOLM, ANNI *et al.* Promoter hypermethylation of p15INK4B, HIC1, CDH1, and ER is frequent in myelodysplastic syndrome and predicts poor prognosis in early-stage patients. *European Journal of Haematology*, v. 76, n. 1, p. 23–32, 2006.

AKSOY, M. *et al.* Details of blood changes in 32 patients with pancytopenia associated with long-term exposure to benzene. *British Journal of Industrial Medicine*, v. 29, n. 1, p. 56–64, 1972.

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

AKSOY, MUZAFFER. Benzene hematotoxicity. In: AKSOY, MUZAFFER (Org.). *Benzene carcinogenicity*. Boca Raton, Fla: CRC Press, 1988. .

AKSOY, MUZAFFER. Hematotoxicity and Carcinogenicity of Benzene. *Environmental Health Perspectives*, v. 82, p. 193, 1989.

APORNTIEWAN, C. *et al.* Hypomethylation of Intragenic LINE-1 Represses Transcription in Cancer Cells through AGO2. *PLoS ONE*, v. 6, n. 3, p. e17934, 2011.

APPELBAUM, F. R. Leucemias agudas. In: GOLDMAN, L.; AUSIELLO, D. A. (Org.). *Cecil: tratado de medicina interna*. 23. ed. Barcelona: Elsevier España, 2009.

ARNOLD, S. M. *et al.* The use of biomonitoring data in exposure and human health risk assessment: benzene case study. *Critical Reviews in Toxicology*, v. 43, n. 2, p. 119–153, fev. 2013.

ATTWOOD, J. T.; YUNG, R. L.; RICHARDSON, B. C. DNA methylation and the regulation of gene transcription. *Cellular and molecular life sciences: CMLS*, v. 59, n. 2, p. 241–257, 2002.

BADER, G. D.; HOGUE, C. W. V. An automated method for finding molecular complexes in large protein interaction networks. *BMC bioinformatics*, v. 4, p. 2, 2003.

BAIN, B. J. *Leukaemia diagnosis*. 4. ed. Oxford [u.a.: Wiley-Blackwell, 2010.

BENITES, C. I. *et al.* Micronucleus test on gas station attendants. *Genetics and molecular research: GMR*, v. 5, n. 1, p. 45–54, 2006.

BESTOR, T. H. The host defence function of genomic methylation patterns. *Novartis Foundation Symposium*, v. 214, p. 187–195, 1998.

BIRD, A. DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes & Development*, v. 16, n. 1, p. 6–21, 2002.

BIRD, A. The essentials of DNA methylation. *Cell*, v. 70, n. 1, p. 5–8, 1992.

BODOOR, K. *et al.* DNA hypermethylation of cell cycle (p15 and p16) and apoptotic (p14, p53, DAPK and TMS1) genes in peripheral blood of leukemia patients. *Asian Pacific journal of cancer prevention: APJCP*, v. 15, n. 1, p. 75–84, 2014.

BOLLATI, V. *et al.* Changes in DNA Methylation Patterns in Subjects Exposed to Low-Dose Benzene. *Cancer Research*, v. 67, n. 3, p. 876–880, 2007.

BOLLATI, V.; BACCARELLI, A. Environmental epigenetics. *Heredity*, v. 105, n. 1, p. 105–112, 2010.

BI, Y. *et al.* Gene expression in benzene-exposed workers by microarray analysis of peripheral mononuclear blood cells: Induction and silencing of CYP4F3A and regulation of DNA-dependent protein kinase catalytic subunit in DNA double strand break repair. *Chemico-Biological Interactions*, v. 184, n. 1–2, p. 207–211, 2010.

CANADIAN. ENVIRONMENTAL PROTECTION ACT. *Benzene in Canadian Gasoline: Effect of the Benzene in Gasoline Regulations, 2010-2012 Triennial Report*. . [S.l: s.n.], 2012.

CAPLETON, A. C.; LEVY, L. S. An overview of occupational benzene exposures and occupational exposure limits in Europe and North America. *Chemico-Biological Interactions*, v. 153–154, p. 43–53, 2005.

CECHOVA, H. *et al.* Monitoring of methylation changes in 9p21 region in patients with myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia. *Neoplasma*, v. 59, n. 2, p. 168–174, 2012.

CERQUEIRA, G. S. *et al.* Exposição ocupacional: um estudo com trabalhadores de postos de combustíveis do sertão paraibano. *Revista Saúde & Ciência*, v. 1, n. 2, p. 57–66, 2010.

CHO, Y. H. *et al.* The Association of LINE-1 Hypomethylation with Age and Centromere Positive Micronuclei in Human Lymphocytes. *PLOS ONE*, v. 10, n. 7, p. e0133909, 2015.

CHOWDHURY, S. *et al.* Maternal DNA hypomethylation and congenital heart defects. *Birth Defects Research Part A: Clinical and Molecular Teratology*, v. 91, n. 2, p. 69–76, 2011.

COMB, M.; GOODMAN, H. M. CpG methylation inhibits proenkephalin gene expression and binding of the transcription factor AP-2. *Nucleic Acids Research*, v. 18, n. 13, p. 3975–3982, 1990.

COMPANHIA DE DESENVOLVIMENTO INDUSTRIAL DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO (CODIN). *Distritos Industriais*. Disponível em: <<http://www.codin.rj.gov.br/Paginas/ApoioInvestidor/AlternativaLocalizacao/DistritoSantaCruz.aspx>>. Acesso em: 5 ago. 2014.

CONWAY O'BRIEN, E.; PRIDEAUX, S.; CHEVASSUT, T. The Epigenetic Landscape of Acute Myeloid Leukemia. *Advances in Hematology*, v. 2014, p. 1–15, 2014.

COSTA-AMARAL, I. C. *et al.* Avaliação ambiental de BTEX (benzeno, tolueno, etilbenzeno, xilenos) e biomarcadores de genotoxicidade em trabalhadores de postos de combustíveis. *Revista Brasileira de Saúde Ocupacional*, v. 42, n. suppl 1, 2017.

COSTA-AMARAL, I. C. *Estudo da genotoxicidade da exposição ocupacional em baixas doses ao benzeno em postos de combustíveis na Zona Oeste do município do Rio de Janeiro*. 2017. Tese de doutorado – ENSP/FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brasil, 2017.

D’ALESSIO, A. C.; SZYF, M. Epigenetic tête-à-tête: the bilateral relationship between chromatin modifications and DNA methylation. *Biochemistry and Cell Biology = Biochimie Et Biologie Cellulaire*, v. 84, n. 4, p. 463–476, 2006.

DELPU, Y. *et al.* DNA methylation and cancer diagnosis. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 14, n. 7, p. 15029–15058, 2013.

DEWANNIEUX, M.; ESNAULT, C.; HEIDMANN, T. LINE-mediated retrotransposition of marked Alu sequences. *Nature Genetics*, v. 35, n. 1, p. 41–48, 2003.

DUCASSE, M.; BROWN, M. A. Epigenetic aberrations and cancer. *Molecular Cancer*, v. 5, p. 60, 2006.

EGEGHY, P. P.; TORNERO-VELEZ, R.; RAPPAPORT, S. M. Environmental and biological monitoring of benzene during self-service automobile refueling. *Environmental Health Perspectives*, v. 108, n. 12, p. 1195–1202, 2000.

EGGER, G. *et al.* Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. *Nature*, v. 429, n. 6990, p. 457–463, 2004.

ESNAULT, C.; MAESTRE, J.; HEIDMANN, T. Human LINE retrotransposons generate processed pseudogenes. *Nature Genetics*, v. 24, n. 4, p. 363–367, 2000.

ESTELLER, M. Epigenetic changes in cancer. *F1000 Biology Reports*, v. 3, p. 9, 2011.

ESTRUTURA BRASILEIRA DE PROJETOS (EBP). *Estudo para estruturação de concessão do serviço de esgotamento sanitário da região referente à Área de Planejamento 5 (AP5) da cidade do Rio de Janeiro*. Rio de Janeiro, 2011.

FABRIS, S. *et al.* Biological and clinical relevance of quantitative global methylation of repetitive DNA sequences in chronic lymphocytic leukemia. *Epigenetics*, v. 6, n. 2, p. 188–194, 2011.

FAZI, F. *et al.* A minicircuitry comprised of microRNA-223 and transcription factors NFI-A and C/EBPalpha regulates human granulopoiesis. *Cell*, v. 123, n. 5, p. 819–831, 2005.

FEINBERG, A. P. Cancer epigenetics takes center stage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 98, n. 2, p. 392–394, 2001.

FENGA, C.; GANGEMI, S.; COSTA, C. Benzene exposure is associated with epigenetic changes (Review). *Molecular Medicine Reports*, v. 13, n. 4, p. 3401–3405, 2016.

FRANZ, T. Percutaneous absorption of benzene. In: MACFARLAND, H. N. (Org.). . *Applied toxicology of petroleum hydrocarbons (Advances in modern environmental toxicology)*. Princeton: Princeton scientific Publ., 1984. .

FUSTINONI, S. *et al.* Global DNA methylation and low-level exposure to benzene. *La Medicina Del Lavoro*, v. 103, n. 2, p. 84–95, 2012.

GAO, A. *et al.* Differential gene expression profiling analysis in workers occupationally exposed to benzene. *Science of The Total Environment*, v. 472, p. 872–879, 2014.

GARINIS, G. A. *et al.* DNA hypermethylation: when tumour suppressor genes go silent. *Human Genetics*, v. 111, n. 2, p. 115–127, 2002.

GENTER, M. B. *et al.* Naphthalene toxicity in mice and aryl hydrocarbon receptor-mediated CYPs. *Biochemical and biophysical research communications*, v. 348, n. 1, p. 120–123, 2006.

GLASS, D. C. *et al.* Leukemia risk associated with low-level benzene exposure. *Epidemiology (Cambridge, Mass.)*, v. 14, n. 5, p. 569–577, 2003.

GOLDSTEIN, B. D. Benzene toxicity. *Occupational Medicine (Philadelphia, Pa.)*, v. 3, n. 3, p. 541–554, 1988.

GRAHAM, T.; BOISSINOT, S. The Genomic Distribution of L1 Elements: The Role of Insertion Bias and Natural Selection. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, v. 2006, p. 1–5, 2006.

HEDGES, D. J.; DEININGER, P. L. Inviting instability: Transposable elements, double-strand breaks, and the maintenance of genome integrity. *Mutation Research*, v. 616, n. 1–2, p. 46–59. 2007.

HOFFMANN, M. J.; SCHULZ, W. A. Causes and consequences of DNA hypomethylation in human cancer. *Biochemistry and Cell Biology*, v. 83, n. 3, p. 296–321, 2005.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (INCA) (Org.). *Vigilância do câncer ocupacional e ambiental*. Rio de Janeiro, RJ: Ministério da Saúde, Instituto Nacional de Câncer - INCA : Coordenação de Prevenção e Vigilância, 2005.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER (IARC). *Chemical Agents and Related Occupations*, 2012.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER (IARC). *Overall evaluations of carcinogenicity: an updating of IARC monographs vols. 1–4*, 1987.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER (IARC). *Some Industrial Chemicals and Dyestuffs*. 1982.

IRONS, R. D. *et al.* Acute myeloid leukemia following exposure to benzene more closely resembles de novo than therapy related-disease. *Genes, Chromosomes & Cancer*, v. 52, n. 10, p. 887–894, 2013.

ISSA, J. P.; BAYLIN, S. B.; HERMAN, J. G. DNA methylation changes in hematologic malignancies: biologic and clinical implications. *Leukemia*, v. 11 Suppl 1, p. S7-11, 1997.

JABLONKA, E.; LAMB, M. J. *Evolução em quatro dimensões: DNA, comportamento e a história da vida*. São Paulo (SP): Companhia das Letras : Schwarcz, 2010.

JIANG, D. *et al.* DNA methylation and leukemia susceptibility in China: Evidence from an updated meta-analysis. *Molecular and Clinical Oncology*, v. 5, n. 3, p. 193–207, 2016.

JIANG, D. *et al.* The Diagnostic Value of DNA Methylation in Leukemia: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS ONE*, v. 9, n. 5, p. e96822, 2014.

KAZAZIAN, H. H. Mobile Elements: Drivers of Genome Evolution. *Science*, v. 303, n. 5664, p. 1626–1632, 2004.

KIM, S. *et al.* Modeling Human Metabolism of Benzene Following Occupational and Environmental Exposures. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, v. 15, n. 11, p. 2246–2252, 2006.

KITKUMTHORN, N.; MUTIRANGURA, A. Long interspersed nuclear element-1 hypomethylation in cancer: biology and clinical applications. *Clinical Epigenetics*, v. 2, n. 2, p. 315–330, 2011.

LACERDA, L. P. *et al.* Occupational toxicology study emphasizing the cytotoxic and mutagenic activity among workers exposed to gasoline. *Biotemas*, v. 28, n. 3, p. 135, 2015.

LAGORIO, S. *et al.* Exposure to benzene and childhood leukaemia: a pilot case-control study. *BMJ open*, v. 3, n. 2, p. 1–11, 2013.

LAN, Q. *et al.* Hematotoxicity in workers exposed to low levels of benzene. *Science (New York, N.Y.)*, v. 306, n. 5702, p. 1774–1776, 2004.

LANDER, E. S. *et al.* Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*, v. 409, n. 6822, p. 860–921, 2001.

LEE, W. J.; ZHU, B. T. Inhibition of DNA methylation by caffeic acid and chlorogenic acid, two common catechol-containing coffee polyphenols. *Carcinogenesis*, v. 27, n. 2, p. 269–277, 2006.

LI, G.; YIN, S. Progress of epidemiological and molecular epidemiological studies on benzene in China. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 1076, p. 800–809, 2006.

LIMA, P. S. P. *et al.* DNA methylation analysis of the tumor suppressor gene CDKN2B in Brazilian leukemia patients. *Genetics and Molecular Biology*, v. 31, n. 3, p. 632–638, 2008.

LISTER, R. *et al.* Human DNA methylomes at base resolution show widespread epigenomic differences. *Nature*, v. 462, n. 7271, p. 315–322, 19 nov. 2009.

LOOMIS, D. *et al.* Carcinogenicity of benzene. *The Lancet Oncology*, v. 18, n. 12, p. 1574–1575, dez. 2017.

MATSUNO, N. *et al.* p15 mRNA expression detected by real-time quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction correlates with the methylation density of the gene in adult acute leukemia. *Leukemia Research*, v. 29, n. 5, p. 557–564, 2005.

MCDUGAL, J. N. *et al.* Dermal absorption of organic chemical vapors in rats and humans. *Fundamental and Applied Toxicology: Official Journal of the Society of Toxicology*, v. 14, n. 2, p. 299–308, 1990.

MCHALE, C. M. *et al.* Global Gene Expression Profiling of a Population Exposed to a Range of Benzene Levels. *Environmental Health Perspectives*, v. 119, n. 5, p. 628–634, 13 2010.

MCHALE, C. M.; SMITH, M. T.; ZHANG, L. *Application of Transcriptomics in Exposed Human Populations: Benzene as an Example. In Toxicogenomics in predictive carcinogenicity.* Cambridge, UK: Royal Society of Chemistry, 2016. (Issues in toxicology, no. 28).

MENDES, M. *et al.* Normas ocupacionais do benzeno: Uma abordagem sobre o risco e exposição nos postos de revenda de combustíveis. *Revista Brasileira de Saúde Ocupacional*, v. 42, n. suppl 1, 2017.

MINISTÉRIO DO TRABALHO E EMPREGO (MTE). SECRETÁRIA DE SEGURANÇA E SAÚDE NO TRABALHO. *Instrução Normativa n° 02, de 20 de dezembro de 1995.* Brasil, 1995.

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.

MODJTAHEDI, B. S.; MAIBACH, H. I. In vivo percutaneous absorption of benzene in man: forearm and palm. *Food and Chemical Toxicology: An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association*, v. 46, n. 3, p. 1171–1174, 2008.

MÖLLER, C. *et al.* Otoneurological findings in workers exposed to styrene. *Scandinavian Journal of Work, Environment & Health*, v. 16, n. 3, p. 189–194, 1990.

MONTOJO, J. *et al.* GeneMANIA Cytoscape plugin: fast gene function predictions on the desktop. *Bioinformatics*, v. 26, n. 22, p. 2927–2928, 2010.

MORGAN, H. D. *et al.* Activation-induced cytidine deaminase deaminates 5-methylcytosine in DNA and is expressed in pluripotent tissues: implications for epigenetic reprogramming. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 279, n. 50, p. 52353–52360, 2004.

MORO, A. M. *et al.* Genotoxicity and oxidative stress in gasoline station attendants. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, v. 754, n. 1–2, p. 63–70, 2013.

MOURA-CORRÊA, M. J. *A construção social do silêncio epidemiológico do benzenismo: uma história negada*. 2007. Dissertação de Mestrado – PUCRS, Porto Alegre, Brasil, 2007.

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 & Saúde Coletiva*, v. 19, n. 12, p. 4637–4648, 2014.

MOURA-CORRÊA, M. J. *PREVALÊNCIA DA EXPOSIÇÃO OCUPACIONAL AO BENZENO E MORTALIDADE POR LEUCEMIA ENTRE OS EXPOSTOS: ESTIMATIVAS PARA O BRASIL*. 2014. Tese de doutorado – UFBA, Bahia, Brasil, 2014.

MOURA-CORREA, M. J.; LARENTIS, A. L. Exposição ao benzeno no trabalho e seus efeitos à saúde. *Revista Brasileira de Saúde Ocupacional*, v. 42, n. suppl 1, 2017.

NAKAYAMA, K. *et al.* Differences in gene expression profiles in the liver between carcinogenic and non-carcinogenic isomers of compounds given to rats in a 28-day repeat-dose toxicity study. *Toxicology and Applied Pharmacology*, v. 217, n. 3, p. 299–307, 2006.

NAN, X. *et al.* Transcriptional repression by the methyl-CpG-binding protein MeCP2 involves a histone deacetylase complex. *Nature*, v. 393, n. 6683, p. 386–389, 1998.

NAN, X.; CROSS, S.; BIRD, A. Gene silencing by methyl-CpG-binding proteins. *Novartis Foundation Symposium*, v. 214, p. 6- 16; discussion 16-21, 46–50, 1998.

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.

NEWELL, L. C. Faraday's discovery of benzene. *Journal of Chemical Education*, v. 3, n. 11, p. 1248, 1926.

NEWMAN, M. E. J. A measure of betweenness centrality based on random walks. *Social Networks*, v. 27, n. 1, p. 39–54, 2005.

NOMIYAMA, K.; NOMIYAMA, H. Respiratory elimination of organic solvents in man: Benzene, toluene, n-hexane, trichloroethylene, acetone, ethyl acetate and ethyl alcohol. *Internationales Archiv for Arbeitsmedizin*, v. 32, n. 1–2, p. 85–91, 1974.

OKANO, M. *et al.* DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell*, v. 99, n. 3, p. 247–257, 1999.

PATTERSON, K. *et al.* DNA Methylation: Bisulphite Modification and Analysis. *Journal of Visualized Experiments*, n. 56, 21, 2011.

PEKARI, K. *et al.* Biological monitoring of occupational exposure to low levels of benzene. *Scandinavian Journal of Work, Environment & Health*, v. 18, n. 5, p. 317–322, 1992.

PEMBREY, M. *et al.* Human transgenerational responses to early-life experience: potential impact on development, health and biomedical research. *Journal of Medical Genetics*, v. 51, n. 9, p. 563–572, 2014.

PESATORI, A. C. *et al.* Early effects of low benzene exposure on blood cell counts in Bulgarian petrochemical workers. *La Medicina Del Lavoro*, v. 100, n. 2, p. 83–90, 2009.

PRAY, L. *Epigenetics: Genome, Meet Your Environment. The Scientist*. [S.l: s.n.]. Disponível em: <<http://www.the-scientist.com/?articles.view/articleNo/15772/title/Epigenetics--Genome--Meet-Your-Environment/>>.

PRENDERGAST, G. C.; LAWE, D.; ZIFF, E. B. Association of Myn, the murine homolog of max, with c-Myc stimulates methylation-sensitive DNA binding and ras cotransformation. *Cell*, v. 65, n. 3, p. 395–407, 1991.

QU, Q. *et al.* Hematological changes among Chinese workers with a broad range of benzene exposures. *American Journal of Industrial Medicine*, v. 42, n. 4, p. 275–285, 2002.

QU, Q. *et al.* Validation and evaluation of biomarkers in workers exposed to benzene in China. *Research Report (Health Effects Institute)*, n. 115, p. 1- 72; discussion 73-87, 2003.

RAJ, K. *et al.* CDKN2B methylation status and isolated chromosome 7 abnormalities predict responses to treatment with 5-azacytidine. *Leukemia*, v. 21, n. 9, p. 1937–1944, 2007.

RAPPAPORT, S. M. *et al.* Evidence that humans metabolize benzene via two pathways. *Environmental Health Perspectives*, v. 117, n. 6, p. 946–952, 2009.

RAZIN, A.; CEDAR, H. Distribution of 5-methylcytosine in chromatin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 74, n. 7, p. 2725–2728, 1977.

RAZIN, A.; SZYF, M. DNA methylation patterns. Formation and function. *Biochimica Et Biophysica Acta*, v. 782, n. 4, p. 331–342, 1984.

RIO DE JANEIRO. *Anexo VI Descrição e Mapa da Area de Planejamento 5* [S.l: s.n.]. Disponível em: <<http://www.rio.rj.gov.br/dlstatic/10112/4290214/4105682/06.AnexoVIDescricaoeMapadaAreadePlanejamento5.pdf>>.

ROBSON, C. N. *et al.* Transforming growth factor-beta1 up-regulates p15, p21 and p27 and blocks cell cycling in G1 in human prostate epithelium. *The Journal of Endocrinology*, v. 160, n. 2, p. 257–266, 1999.

RODENHISER, D.; MANN, M. Epigenetics and human disease: translating basic biology into clinical applications. *Canadian Medical Association Journal*, v. 174, n. 3, p. 341–348, 2006.

RODIĆ, N.; BURNS, K. H. Long Interspersed Element–1 (LINE-1): Passenger or Driver in Human Neoplasms? *PLoS Genetics*, v. 9, n. 3, p. e1003402, 2013.

ROSA, J. C. F. *et al.* Cytogenetic evaluation and the association with polymorphisms of the CPY1A1 and NR1I3 genes in individuals exposed to BTEX. *Environmental Monitoring and Assessment*, v. 185, n. 7, p. 5883–5890, 2013.

SÁ, J. *Hematopoiese. O mundo da patologia.* [S.l: s.n.]. Disponível em: <<http://omundodapatologiaclinica.blogspot.com.br/2012/09/hematopoiese.html>>, 2012

SABOURIN, P. J. *et al.* Effect of dose on the absorption and excretion of [14C]benzene administered orally or by inhalation in rats and mice. *Toxicology and Applied Pharmacology*, v. 87, n. 2, p. 325–336, 1987.

SAITO, K. *et al.* Long Interspersed Nuclear Element 1 Hypomethylation Is a Marker of Poor Prognosis in Stage IA Non-Small Cell Lung Cancer. *Clinical Cancer Research*, v. 16, n. 8, p. 2418–2426, 2010.

SANTIAGO, F. *et al.* Monitoring of gas station attendants exposure to benzene, toluene, xylene (BTX) using three-color chromosome painting. *Molecular Cytogenetics*, v. 7, n. 1, p. 15, 2014.

SANTOS, M. A. *et al.* Human risk assessment of benzene after a gasoline station fuel leak. *Revista de Saúde Pública*, v. 47, n. 2, p. 335–344, 2013.

SANTOS, M. V. C. *et al.* Aspectos toxicológicos do benzeno, indicadores de exposição e conflitos de interesses na sua avaliação. *Revista Brasileira de Saúde Ocupacional*, v. 42, n. suppl 1, 2017.

SARMA, S. N.; KIM, Y.-J.; RYU, J.-C. Differential gene expression profiles of human leukemia cell lines exposed to benzene and its metabolites. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, v. 32, n. 2, p. 285–295, 2011.

SCARDONI, G.; PETTERLINI, M.; LAUDANNA, C. Analyzing biological network parameters with CentiScaPe. *Bioinformatics*, v. 25, n. 21, p. 2857–2859, 2009.

SCHOOFS, T.; BERDEL, W. E.; MÜLLER-TIDOW, C. Origins of aberrant DNA methylation in acute myeloid leukemia. *Leukemia*, v. 28, n. 1, p. 1–14, 2014.

SELLING, L. Benzol as a Leucotoxin. Studies on the Degeneration and Regeneration of the Blood and Hematopoietic Organs. *Journal of the American Medical Association*, v. LXII, n. 25, p. 1984, 1914.

SHARMA, S.; KELLY, T. K.; JONES, P. A. Epigenetics in cancer. *Carcinogenesis*, v. 31, n. 1, p. 27–36, 2010.

SHEN, M. *et al.* Association between mitochondrial DNA copy number, blood cell counts, and occupational benzene exposure. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, v. 49, n. 6, p. 453–457, 2008.

SMITH, M. T. Advances in understanding benzene health effects and susceptibility. *Annual Review of Public Health*, v. 31, p. 133–148 2 p following 148, 2010.

SMITH, M. T. *et al.* Benzene, the exposome and future investigations of leukemia etiology. *Chemico-Biological Interactions*, v. 192, n. 1–2, p. 155–159, 2011.

SMITH, M. T.; JONES, R. M.; SMITH, A. H. Benzene exposure and risk of non-Hodgkin lymphoma. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention: A Publication of the American Association for Cancer Research, Cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*, v. 16, n. 3, p. 385–391, 2007.

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

SNYDER, ROBERT. Leukemia and Benzene. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, v. 9, n. 12, p. 2875–2893, 2012.

SRBOVA, J.; TEISINGER, J.; SKRAMOVSKY, S. Absorption and elimination of inhaled benzene in man. *Archives of Industrial Hygiene and Occupational Medicine*, v. 2, n. 1, p. 1–8, 1950.

STEIN, R. A. Epigenetics and environmental exposures. *Journal of Epidemiology and Community Health*, v. 66, n. 1, p. 8–13, 2012.

STRACHAN, T.; READ, A. *Genética molecular humana*. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2013.

STRUHL, K. Is DNA methylation of tumour suppressor genes epigenetic? *eLife*, v. 3, 12 mar. 2014.

SUBRAHMANYAM, V. V. *et al.* Phenol-induced stimulation of hydroquinone bioactivation in mouse bone marrow in vivo: possible implications in benzene myelotoxicity. *Toxicology*, v. 62, n. 1, p. 107–116, 1990.

SUBRAHMANYAM, V. V.; KOLACHANA, P.; SMITH, M. T. Hydroxylation of phenol to hydroquinone catalyzed by a human myeloperoxidase-superoxide complex: possible implications in benzene-induced myelotoxicity. *Free Radical Research Communications*, v. 15, n. 5, p. 285–296, 1991.

SWAEN, G. M. H. *et al.* Low level occupational benzene exposure and hematological parameters. *Chemico-Biological Interactions*, v. 184, n. 1–2, p. 94–100, 2010.

SZYF, M. DNA Methylation and Demethylation as Targets for Anticancer Therapy. *Biochemistry (Moscow)*, v. 70, n. 5, p. 533–549, 2005.

SZYF, M. DNA methylation patterns: an additional level of information? *Biochemistry and Cell Biology = Biochimie Et Biologie Cellulaire*, v. 69, n. 12, p. 764–767, 1991.

SZYF, M. The Dynamic Epigenome and its Implications in Toxicology. *Toxicological Sciences*, v. 100, n. 1, p. 7–23, 2007.

TEOFILI, L. *et al.* Expression of cyclin-dependent kinase inhibitor p15(INK4B) during normal and leukemic myeloid differentiation. *Experimental Hematology*, v. 28, n. 5, p. 519–526, 2000.

TEOFILI, L. Expression of p15ink4b gene during megakaryocytic differentiation of normal and myelodysplastic hematopoietic progenitors. *Blood*, v. 98, n. 2, p. 495–497, 2001.

THIENES, C. H.; HALEY, T. J. *Clinical toxicology*. 5. ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1972.

TIEN, H. F. *et al.* Methylation of the p15(INK4B) gene in myelodysplastic syndrome: it can be detected early at diagnosis or during disease progression and is highly associated with leukaemic transformation. *British Journal of Haematology*, v. 112, n. 1, p. 148–154, 2001.

TOBI, E. W. *et al.* DNA methylation signatures link prenatal famine exposure to growth and metabolism. *Nature Communications*, v. 5, p. 5592, 2014.

TOCHETTO, T. M.; QUEVEDO, L. DA S.; SIQUEIRA, M. DO A. Condição auditiva de frentistas. *Rev CEFAC.[periódico na Internet]*, v. 15, n. 5, p. 10, 2012.

TREVISAN, P. *et al.* Evaluation of genotoxic effects of benzene and its derivatives in workers of gas stations. *Environmental Monitoring and Assessment*, v. 186, n. 4, p. 2195–2204, 2014.

TRYNDYAK, V. P. *et al.* Effect of long-term tamoxifen exposure on genotoxic and epigenetic changes in rat liver: implications for tamoxifen-induced hepatocarcinogenesis. *Carcinogenesis*, v. 27, n. 8, p. 1713–1720, 2006.

TSURUTA, H. Skin absorption of organic solvent vapors in nude mice in vivo. *Industrial Health*, v. 27, n. 2, p. 37–47, 1989.

U.S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY ( U.S. EPA). *IRIS Toxicological Review of Benzene (Noncancer Effects)*. Washington, DC, 2002.

VALENTE, D. Avaliação de aberrações cromossômicas em trabalhadores de postos de gasolina da Zona Oeste do Rio de Janeiro. 2015. Dissertação de Mestrado – ENSP/FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brasil, 2015.

VALENTE, D. *et al.* Utilização de biomarcadores de genotoxicidade e expressão gênica na avaliação de trabalhadores de postos de combustíveis expostos a vapores de gasolina. *Revista Brasileira de Saúde Ocupacional*, v. 42, n. suppl 1, 2017.

VIGLIANI, E. C.; SAITA, G. Benzene and Leukemia. *New England Journal of Medicine*, v. 271, n. 17, p. 872–876, 1964.

VILELA, M. *et al.* Parameter optimization in S-system models. *BMC Systems Biology*, v. 2, n. 1, p. 35, 2008.

WATTS, G. S. *Interpreting Nanodrop (Spectrophotometric) Results*. University of Arizona (EUA), 2017.

WEISKOTTEN, H. G. *et al.* The Action of Benzol : VI. Benzol Vapor Leucopenia (Rabbit). *The Journal of Medical Research*, v. 41, n. 4, p. 425–438, 1920.

WEISKOTTEN, H. G.; SCHWARTZ, S. C.; STEENSLAND, H. S. The Action of Benzol : II. The Deuterophase of the Diphasic Leucopenia and Antigen-Antibody Reaction. *The Journal of Medical Research*, v. 35, n. 1, p. 63–69, 1916.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). *The world health report 2002 - Reducing Risks, Promoting Healthy Life*. Geneva, 2002.

XING, C. *et al.* Methylation and expression analysis of tumor suppressor genes p15 and p16 in benzene poisoning. *Chemico-Biological Interactions*, v. 184, n. 1–2, p. 306–309, 2010.

YANG, A. S. A simple method for estimating global DNA methylation using bisulfite PCR of repetitive DNA elements. *Nucleic Acids Research*, v. 32, n. 3, p. 38e–38, 2004.

YOKOTA, M. *et al.* Effects of heparin on polymerase chain reaction for blood white cells. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, v. 13, n. 3, p. 133–140, 1999.

## ANEXO I (TCLE)

### **TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)**

#### **População exposta ao benzeno**

Senhor (a) Participante,

Você está sendo convidado (a) para participar da Pesquisa “Avaliação da Exposição Ocupacional ao Benzeno em Postos de Combustíveis no município do Rio de Janeiro: uma abordagem integrada para as ações de vigilância em saúde”, a ser desenvolvida por um grupo de pesquisadores do Centro de Estudos da Saúde do Trabalhador e Ecologia Humana (Cesteh), da Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca (Ensp), uma das Unidades Técnico-Científicas da Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz), Instituição vinculada ao Ministério da Saúde, sob a Coordenação de Paula de Novaes Sarcinelli e Vice-coordenação de Rita de Cássia Oliveira da Costa Mattos.

O objetivo da pesquisa é avaliar a exposição ocupacional ao benzeno em postos de combustíveis no município do Rio de Janeiro, localizados em Paciência, Santa Cruz e Sepetiba e você está sendo convidado para participar devido à exposição ao benzeno no seu ambiente de trabalho. O benzeno é uma substância tóxica presente nos combustíveis, que pode produzir efeitos graves no seu organismo como o câncer, além de efeitos no sistema nervoso e alterações no sistema hematológico. Serão avaliadas as condições do posto de combustível com relação às instalações físicas e obediência às normas de segurança e os níveis dos solventes benzeno, tolueno e xileno presentes no ar (em torno das bombas).

Informo que sua participação na pesquisa é voluntária, não havendo qualquer forma de pagamento, tendo plena liberdade para decidir se deseja ou não participar, desistir a qualquer momento de participar, retirando inclusive o seu consentimento, sem que sua recusa traga para

você nenhuma penalidade ou prejuízo em sua relação com a pesquisadora ou com a instituição.

Se você concordar em participar deste estudo responderá a perguntas de dois questionários, um sobre a exposição individual e outro clínico, sobre seu histórico de saúde, estilo de vida e seu histórico de saúde familiar, aplicado por um médico. A duração da entrevista será de cerca de 30 minutos. Fará um exame clínico realizado por um médico capacitado e concordará em doar uma amostra de urina e cerca de 20 ml de sangue. Serão avaliadas as concentrações de benzeno no seu organismo através da dosagem de um indicador (ácido trans-trans mucônico) na urina, e no sangue as seguintes análises serão realizadas com o objetivo de detectar alterações em casos de intoxicação por benzeno:

1-Hemograma completo;

2-Avaliação da função hepática (fígado) através da avaliação dos níveis de transaminases, gama glutaril transferase, bilirrubinas totais e frações e LDH;

3-Provas de atividade reumática ou inflamatórias: VHS, proteína C reativa e FAN; Estes exames serão realizados somente se houver alteração nos exames: marcadores de hepatite B e C (anti-HBS Ag, anti-HBc-IgM e anti-HCV);

4-Anti-HIV. A importância deste exame é descartar os sintomas próprios de infecção por HIV dos sintomas de benzenismo (diagnóstico diferencial de intoxicação crônica ao benzeno).

Na coleta de sangue, uma parte será destinada a análise de indicadores de genotoxicidade e de susceptibilidade. Essas análises são importantes, pois permitirão investigar se o indivíduo tem uma maior predisposição a apresentar os efeitos tóxicos do benzeno e se a exposição ao benzeno produziu algum tipo de dano ao material genético.

Este estudo não oferece nenhum risco para você, porque a coleta de sangue e urina não irão ocasionar nenhum dano, no máximo, poderá sentir um desconforto. O responsável pelo posto de combustível também assinou um termo de consentimento que autoriza esse projeto e vai facilitar sua participação no horário de trabalho. Cabe destacar que apenas você vai receber os resultados dos exames clínicos e laboratoriais. No caso de detecção de problema de saúde, você será encaminhado (a) para atendimento pela Equipe de Profissionais de Saúde do Ambulatório do Cesteh/Ensp/Fiocruz – MS e, se necessário, o encaminharão para um serviço de referência. Os questionários serão aplicados em local reservado.

Os benefícios diretos relacionados à sua participação são saber como está sua saúde e se está contaminado, como pode ter se contaminado e aprender a se proteger para diminuir essa

contaminação e também os efeitos que possa apresentar. Você será acompanhado pela Equipe de Profissionais de Saúde do Ambulatório do Cesteh/Ensp/Fiocruz – MS, durante toda a pesquisa. Quanto aos benefícios indiretos as informações e dados obtidos alimentarão um banco de dados sobre o assunto, o qual fornecerá subsídios para ações estratégicas do Ministério da Saúde em Vigilância em Saúde do Trabalhador na atuação do Sistema Único de Saúde (SUS). Esse estudo está sendo realizado em todo país e os resultados serão úteis para que sejam adotadas medidas de redução e controle da exposição a agentes tóxicos presentes nos combustíveis em todo país.

As informações obtidas através dessa pesquisa serão confidenciais e asseguramos o sigilo sobre sua participação. Ninguém, além de você, vai ficar sabendo dos resultados dos seus exames. Seu nome não vai aparecer em nenhum lugar, porque será transformado em código. Os dados não serão divulgados de forma a possibilitar sua identificação. Depois da análise do sangue e da urina, todo material será jogado fora e os resultados serão usados em relatórios e artigos científicos. Esses dados ficarão sob a guarda da coordenadora do projeto por cinco anos, e depois serão destruídos.

Você receberá uma das duas vias deste Termo, cujas páginas deverão ser rubricadas e a última página assinada. E, para garantir o seu direito a receber todo e qualquer tipo de esclarecimento sobre a sua participação na pesquisa, desde o seu recrutamento até após a finalização, seguem, abaixo, os meus meios de contato:

<i><b>Paula de Novaes Sarcinelli</b></i>	
<b>Assinatura da Pesquisadora Responsável</b>	
<b>Local:</b>	<b>Data:</b>
<b>E-mail:</b>	<a href="mailto:paula@ensp.fiocruz.br">paula@ensp.fiocruz.br</a>
<b>Endereço Funcional:</b>	Centro de Estudos da Saúde do Trabalhador e Ecologia Humana (Cesteh) Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca (Ensp) Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz) – Ministério da Saúde Rua Leopoldo Bulhões, 1480 – Prédio Primeiro de Maio
<b>Telefones para contato:</b>	Telefone: (0xx) (21) 2598-2434

Declaro que entendi os objetivos, riscos e benefícios da minha participação na Pesquisa e que concordo em participar.

<b>Nome do Participante da Pesquisa</b> (por extenso)			
<b>Assinatura do Participante da Pesquisa</b>			
<b>Local:</b>		<b>Data:</b>	
<b>E-mail do Participante da Pesquisa:</b>			
<b>Telefones para contato:</b>			

Em caso de dúvida quanto à condução ética do estudo entre em contato com o: Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) Ensp/Fiocruz – MS, localizado na Rua Leopoldo Bulhões, 1480 – Pavilhão Ernani Braga – Térreo – Manguinhos - Telefax: (0xx) (21) 2598-2863 - E-mail: cep@ensp.fiocruz.br - Site: <http://www.ensp.fiocruz.br/ética>

## ANEXO II (TCLE)

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

Senhor (a) Participante,

Você está sendo convidado (a) para participar da Pesquisa “Avaliação da Exposição Ocupacional ao Benzeno em Postos de Combustíveis no município do Rio de Janeiro: uma abordagem integrada para as ações de vigilância em saúde”, a ser desenvolvida por um grupo de pesquisadores do Centro de Estudos da Saúde do Trabalhador e Ecologia Humana (Cesteh), da Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca (Ensp), uma das Unidades Técnico-Científicas da Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz), Instituição vinculada ao Ministério da Saúde, sob a Coordenação de Paula de Novaes Sarcinelli e Vice-coordenação de Rita de Cássia Oliveira da Costa Mattos.

O objetivo da pesquisa é avaliar a exposição ocupacional ao benzeno em postos de combustíveis no município do Rio de Janeiro, localizados em Paciência, Santa Cruz e Sepetiba. Os indivíduos que trabalham e/ou residem próximos a postos de combustíveis são expostos ao benzeno, entretanto, é necessária a participação na pesquisa de indivíduos não exposto para que se possa comparar os resultados e estimar qual o nível de contaminação daqueles que estão em contato com o benzeno. Você está sendo convidado para participar da pesquisa porque não trabalha nem reside em posto de combustível localizado em um destes bairros. O benzeno é uma substância tóxica presente nos combustíveis, que pode produzir efeitos graves no organismo como o câncer, além de efeitos no sistema nervoso e alterações no sistema hematológico. Serão avaliadas as condições do posto de combustível com relação às instalações físicas e obediência às normas de segurança e os níveis dos solventes benzeno, tolueno e xileno presentes no ar (em torno das bombas).

Informo que sua participação na pesquisa é voluntária, não havendo qualquer forma de pagamento, tendo plena liberdade para decidir se deseja ou não participar, desistir a qualquer momento de participar, retirando inclusive o seu consentimento, sem que sua recusa traga para você nenhuma penalidade ou prejuízo em sua relação com a pesquisadora ou com a instituição.

Se você concordar em participar deste estudo responderá a perguntas de dois questionários, um sobre seu histórico ocupacional e outro clínico, sobre seu histórico de saúde, estilo de vida e seu histórico de saúde familiar, aplicado por um médico. A duração da entrevista será de cerca de 30 minutos e será feita em local reservado. Você fará um exame clínico realizado por um médico capacitado e concordará em doar uma amostra de urina e cerca de 20 ml de sangue. A coleta de sangue será feita por um profissional experiente, habilitado a utilizar os procedimentos adequados para não haver riscos para você. Entretanto, há a possibilidade de ocorrerem riscos e desconfortos relacionados à coleta venosa, ainda que raros e passageiros, como dor localizada, hematoma e desmaio. Se algum destes eventos acontecer você receberá imediatamente o atendimento adequado.

Serão avaliadas as concentrações de benzeno no seu organismo através da dosagem de um indicador (ácido trans-trans mucônico) na urina, e no sangue as seguintes análises serão realizadas com o objetivo de detectar alterações em casos de intoxicação por benzeno:

1-Hemograma completo;

2-Avaliação da função hepática (fígado) através da avaliação dos níveis de transaminases, gama glutaril transferase, bilirrubinas totais e frações e LDH;

3-Provas de atividade reumática ou inflamatórias: VHS, proteína C reativa e FAN; Estes exames serão realizados somente se houver alteração nos exames: marcadores de hepatite B e C (anti-HBS Ag, anti-HBc-IgM e anti-HCV);

Os exames clínicos e laboratoriais poderão indicar a necessidade de realizar análise para detectar se há infecção por HIV, o vírus causador de AIDS. Neste caso, o exame será solicitado pelo médico responsável pelo Ambulatório do CESTE/ Fiocruz, e você será encaminhado para o laboratório do Instituto de Pesquisa Evandro Chagas, também da Fiocruz, para a coleta e análise de sangue. O laudo será entregue primeiro ao médico que solicitou o exame, que irá conversar com você, explicar o resultado e encaminhá-lo para atendimento.

Na coleta de sangue, uma parte será destinada a análise de indicadores de genotoxicidade e de susceptibilidade. Essas análises são importantes, pois permitirão investigar se o indivíduo tem uma maior predisposição a apresentar os efeitos tóxicos do benzeno.

Os resultados dos exames clínicos e laboratoriais serão entregues diretamente a você em envelope lacrado. No caso de detecção de problema de saúde, você será encaminhado (a) para atendimento pela Equipe de Profissionais de Saúde do Ambulatório do Cesteh/Ensp/Fiocruz – MS e, se necessário, o encaminharão para um serviço de referência.

Os benefícios diretos relacionados à sua participação são saber como está sua saúde. Você será acompanhado pela Equipe de Profissionais de Saúde do Ambulatório do Cesteh/Ensp/Fiocruz – MS, durante toda a pesquisa. A sua contribuição será muito importante para a produção de conhecimento no campo da saúde pública. Os benefícios indiretos referem-se à construção de um banco de dados sobre o assunto, o qual fornecerá subsídios para ações estratégicas do Ministério da Saúde em Vigilância em Saúde do Trabalhador, na atuação do Sistema Único de Saúde (SUS). Esse estudo está sendo realizado em todo país e os resultados serão úteis para que sejam adotadas medidas de redução e controle da exposição a agentes tóxicos presentes nos combustíveis em todo país.

As informações obtidas através dessa pesquisa serão confidenciais e asseguramos o sigilo sobre sua participação. Os dados não serão divulgados de forma a possibilitar sua identificação. Seu nome e endereço serão transformados em um código de identificação único. As informações coletadas nas entrevistas e nas amostras de sangue e urina serão identificadas apenas através deste código. Após as análises, as amostras de sangue e urina que não foram utilizadas serão descartadas segundo as normas de biossegurança. Os resultados serão usados em relatórios de pesquisa e artigos científicos. Os questionários e os termos de consentimento serão mantidos em total segurança, e apenas a coordenação e a equipe de pesquisa terão acesso a essas informações.

Você receberá uma das duas vias deste Termo, cujas páginas deverão ser rubricadas e a última página assinada. E, para garantir o seu direito a receber todo e qualquer tipo de esclarecimento sobre a sua participação na pesquisa, desde o seu recrutamento até após a finalização, seguem, abaixo, os meus meios de contato:

<b><i>Paula de Novaes Sarcinelli</i></b>			
<b>Assinatura da Pesquisadora Responsável</b>			
<b>Local:</b>		<b>Data:</b>	
<b>E-mail:</b>	<a href="mailto:paula@ensp.fiocruz.br">paula@ensp.fiocruz.br</a>		

<b>Endereço Funcional:</b>	Centro de Estudos da Saúde do Trabalhador e Ecologia Humana (Cesteh) Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca (Ensp) Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz) – Ministério da Saúde Rua Leopoldo Bulhões, 1480 – Prédio Primeiro de Maio
<b>Telefones para contato:</b>	Telefone: (0xx) (21) 2598-2434

Declaro que entendi os objetivos, riscos e benefícios da minha participação na Pesquisa e que concordo em participar.

<b>Nome do Participante da Pesquisa</b> (por extenso)			
<b>Assinatura do Participante da Pesquisa</b>			
<b>Local:</b>		<b>Data:</b>	
<b>E-mail do Participante da Pesquisa:</b>			
<b>Telefones para contato:</b>			

Em caso de dúvida quanto à condução ética do estudo entre em contato com o: Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) Ensp/Fiocruz – MS, localizado na Rua Leopoldo Bulhões, 1480 – Pavilhão Ernani Braga – Térreo – Mangueiros - Telefax: (0xx) (21) 2598-2863 - E-mail: cep@ensp.fiocruz.br - Site: <http://www.ensp.fiocruz.br/ética>

### APÊNDICE I (Quadro 3)

**Quadro 3** Absorbâncias das amostras de extração de DNA dos trabalhadores utilizadas no estudo com incubação em isopropanol por 2 horas (obtidas em Nanodrop)

Código Inter- no do traba- lhador	Concentração de DNA (ng/μL)	Absorbância (230nm)	Absorbância (260nm)	Absorbância (280nm)	Razão 260/280	Razão 260/230
9907 <sup>+</sup>	104,10	1,34	0,60	1,17	0,56	0,45
9903*	98,00	0,15	0,19	1,17	1,77	1,29
10363*	83,50	1,04	0,17	1,17	1,42	0,16
9909*	77,30	0,35	0,53	1,17	1,76	1,50
9904*	73,40	0,42	0,53	1,17	1,73	1,26
14*	57,60	7,09	1,63	0,23	1,63	0,23
10*	53,50	5,54	1,44	0,91	1,67	0,26
9902*	51,70	8,62	1,03	0,62	1,66	0,12
499*	19,80	1,21	0,39	0,27	1,45	0,32
507*	45,00	0,48	0,05	1,17	1,74	0,11
10267*	30,10	6,03	0,60	0,31	1,93	0,10
10157	26,60	6,64	0,53	0,27	1,95	0,08
500	25,60	6,40	0,51	0,23	2,18	0,08
10345	22,50	0,45	0,03	0,19	2,36	0,06
504	21,30	6,07	0,43	0,16	2,60	0,07
9	15,40	2,73	0,98	0,67	1,28	0,36
6	13,60	1,60	0,27	0,21	1,28	0,17

511	13,40	1,63	0,10	0,03	2,67	0,06
509	12,90	6,45	0,26	0,05	5,64	0,04
13	9,50	6,33	0,19	0,03	7,47	0,03
9945	8,40	1,77	0,05	1,17	12,14	0,03
11	7,40	2,98	0,15	0,07	2,18	0,05
506	4,90	0,83	0,03	0,00	3,57	0,04
9911	4,80	5,63	0,45	1,17	3,12	0,08
497	3,80	1,23	0,07	0,02	3,75	0,06

**Quadro 3** Absorbâncias das amostras utilizadas no estudo com incubação em isopropanol por 2 horas (final)

Código Inter- no do traba- lhador	Concentração de DNA (ng/ $\mu$ L)	Absorbância (230nm)	Absorbância (260nm)	Absorbância (280nm)	Razão 260/280	Razão 260/230
498	3,70	1,23	0,07	0,02	4,22	0,06
502	3,70	1,65	0,07	1,17	4,90	0,04
4	3,30	1,27	0,08	0,02	3,50	0,06
7	3,30	1,10	0,07	0,03	2,73	0,06
9900	2,80	0,53	0,05	1,17	2,03	0,10
8	2,80	0,70	0,06	0,05	1,16	0,08
513	2,60	0,73	0,05	0,02	1,58	0,07
512	2,30	0,90	0,05	0,02	3,00	0,05
496	1,80	1,32	0,07	0,02	3,49	0,05
515	1,60	0,74	0,07	1,17	2,79	0,10
9949	1,40	0,84	0,04	1,17	2,16	0,05

Sendo \* referente às 10 amostras com maiores concentrações de DNA a maiores rendimentos para a razão de absorbância 260/230 ( $260/230 > 0,1$ ) e <sup>+</sup> referente a amostra que apesar da concentração e razão de absorbância 260/230, o gráfico no Nanodrop não apresentou uma curva como deveria.

## APÊNDICE II (Quadro 4)

**Quadro 4** Absorbâncias das amostras de extração de DNA dos trabalhadores utilizadas no estudo com incubação em isopropanol por 10 minutos (obtidas em Nanodrop)

Código Inter- no do traba- lhador	Concentração de DNA (ng/μL)	Absorbância (230nm)	Absorbância (260nm)	Absorbância (280nm)	Razão 260/280	Razão 260/230
9907*	1056,60	9,27	21,13	11,77	1,80	2,28
9908*	745,00	6,65	14,90	8,14	1,83	2,24
9910*	755,00	6,74	15,10	8,29	1,82	2,24
9904*	901,00	8,08	18,02	10,02	1,80	2,23
9905*	106,10	1,02	2,12	1,20	1,77	2,08
9909*	619,20	5,99	12,28	7,12	1,74	2,05
507 <sup>□</sup>	1,70	0,02	0,03	0,01	3,33	2,02
9906*	77,40	0,85	1,55	0,86	1,80	1,83
9903*	423,40	4,92	8,47	4,98	1,70	1,72
9902*	1086,10	12,93	21,72	12,85	1,69	1,68
10411*	31,90	0,26	0,37	0,36	1,78	1,41
9912*	608,50	10,40	12,17	7,07	1,72	1,17
4*	49,70	1,26	1,00	0,85	1,18	0,79
9944	5,50	0,14	0,10	0,08	1,35	0,73
10410	1,40	0,05	0,03	0,02	1,16	0,51
9901	2,40	0,10	0,05	0,04	1,33	0,48
10160	2,10	0,09	0,04	0,04	0,95	0,45
5	1,60	0,08	0,03	0,02	1,47	0,40
512	2,30	0,12	0,05	0,04	1,17	0,39
499	2,40	0,13	0,05	0,04	1,28	0,38
9962	1,70	0,09	0,03	0,02	1,98	0,37
3	1,50	0,09	0,03	0,02	1,57	0,34
9949	9,60	0,58	0,19	0,16	1,21	0,33
9900	3,80	0,25	0,08	0,05	1,71	0,31
9960	0,50	0,04	0,01	0,01	0,93	0,31

**Quadro 2** Absorbâncias das amostras utilizadas no estudo com incubação em isopropanol por 10 minutos (continuação)

Código Inter- no do traba- lhador	Concentração de DNA (ng/ $\mu$ L)	Absorbância (230nm)	Absorbância (260nm)	Absorbância (280nm)	Razão 260/280	Razão 260/230
10346	2,70	0,17	0,05	0,04	1,22	0,31
8	2,00	0,14	0,04	0,03	1,33	0,30
9911*	36,90	2,46	0,74	0,41	1,82	0,30
9948	2,40	0,16	0,05	0,04	1,22	0,30
509	2,60	0,19	0,05	0,04	1,24	0,28
10268	2,80	0,21	0,06	0,04	1,46	0,27
10153	6,60	0,51	0,13	0,08	1,51	0,26
511	4,60	0,37	0,09	0,96	1,51	0,25
9957	0,80	0,06	0,02	0,01	2,22	0,25
10159	1,80	0,15	0,04	0,02	1,50	0,24
10408	1,30	0,11	0,03	0,02	1,65	0,24
515	3,30	0,29	0,07	0,05	1,39	0,23
10409	2,80	0,24	0,06	0,04	1,54	0,23
504	0,20	0,02	0,00	0,00	9,21	0,22
9961	1,00	0,09	0,02	-0,01	-4,09	0,22
10157	3,50	0,32	0,07	0,04	1,59	0,22
10347	2,20	0,21	0,04	0,03	1,34	0,21
10364	0,40	0,03	0,01	0,01	1,03	0,21
9	0,70	0,07	0,01	0,01	1,68	0,19
10155	2,80	0,29	0,06	0,04	1,28	0,19
10363	2,00	0,21	0,04	0,03	1,37	0,19
10	3,10	0,34	0,06	0,05	1,18	0,18
10154	5,90	0,66	0,12	0,07	1,72	0,18
14	2,50	0,29	0,05	0,04	1,39	0,17
505	3,30	0,39	0,07	0,06	1,20	0,17

**Quadro 3** Absorbâncias das amostras utilizadas no estudo com incubação em isopropanol por 10 minutos (continuação)

Código Inter- no do traba- lhador	Concentração de DNA (ng/ $\mu$ L)	Absorbância (230nm)	Absorbância (260nm)	Absorbância (280nm)	Razão 260/280	Razão 260/230
10151	3,90	0,45	0,08	0,07	1,16	0,17
10345	2,30	0,27	0,05	0,04	1,16	0,17
1	3,00	0,37	0,06	0,04	1,36	0,16
13	3,40	0,38	0,06	0,05	1,27	0,16
9958	6,70	0,83	0,13	0,10	1,37	0,16
15	13,70	1,83	0,27	0,18	1,54	0,15
9959	2,80	6,37	0,96	0,04	1,41	0,15
10265	3,10	6,88	0,96	0,04	1,50	0,14
501	4,80	0,74	0,10	0,07	1,42	0,13
514	6,40	0,98	0,13	0,08	1,55	0,13
2	6,00	1,01	0,12	0,07	1,68	0,12
502	1,40	0,23	0,03	0,02	1,46	0,12
503	2,90	0,52	0,06	0,03	1,87	0,11
10156	2,90	0,90	0,10	0,04	1,37	0,11
10264	1,90	0,35	0,04	0,03	1,39	0,11
497	0,70	0,14	0,01	0,01	2,13	0,10
513	3,10	0,62	0,06	0,04	1,60	0,10
10152	1,80	0,36	0,04	0,02	1,71	0,10
6	4,90	10,89	0,98	0,06	1,76	0,09
498	1,80	0,41	0,04	0,02	2,03	0,09
506	0,10	0,03	0,00	0,00	0,66	0,09
10158	1,20	0,27	0,02	0,00	5,40	0,09
10266	2,00	0,44	0,04	0,03	1,35	0,09
11	4,30	1,09	0,09	0,04	2,03	0,08
496	0,90	11,46	0,92	0,01	2,50	0,08

**Quadro 4** Absorbâncias das amostras utilizadas no estudo com incubação em isopropanol por 10 minutos (final)

Código Inter- no do traba- lhador	Concentração de DNA (ng/ $\mu$ L)	Absorbância (230nm)	Absorbância (260nm)	Absorbância (280nm)	Razão 260/280	Razão 260/230
9946	2,20	0,55	0,04	0,03	1,51	0,08
9950	0,90	0,23	0,02	0,01	3,28	0,08
500	0,20	0,07	0,01	0,00	2,59	0,07
508	4,00	1,33	0,08	0,05	1,72	0,06
9956	4,80	1,94	0,10	0,03	3,48	0,05
510	4,30	2,15	0,09	0,02	4,56	0,04
9947	5,70	2,83	0,11	0,03	3,03	0,04
10267	7,30	3,65	0,15	0,04	3,66	0,04
10361	0,20	0,10	0,00	0,00	1,06	0,04
10362	0,50	0,37	0,01	0,00	2,50	0,03
9945	-0,60	-0,05	0,01	-0,02	0,53	-0,21
12	-0,50	0,04	-0,01	-0,02	0,46	-0,24
7	-0,70	0,03	-0,01	-0,02	0,02	-0,48

Sendo \* referente as 13 amostras com maiores concentrações de DNA a melhores rendimentos para a razão de absorbância 260/230 ( $260/230 > 0,3$ ) e  $\square$  referente a amostra que apesar da de bom rendimento para a razão de absorbância 260/230, a concentração de DNA foi muito baixa.

## APÊNDICE III (Publicação: Nota Técnica)

Artigo Publicado no dossiê “EXPOSIÇÃO OCUPACIONAL AO BENZENO NA CADEIA DE DISTRIBUIÇÃO E REVENDA DE COMBUSTÍVEIS NO BRASIL” da Revista Brasileira de Saúde Ocupacional (RBSO)

**RBSO** Revista Brasileira de Saúde Ocupacional  
ISSN: 2317-6369 (online)  
<http://dx.doi.org/10.1590/2317-6369NOTA00017>

Dossiê: Benzeno em Postos de Combustíveis



Nota

Marcus Vinicius Corrêa dos Santos<sup>a\*</sup>  
Victor Oliva Figueiredo<sup>a</sup>  
Arline Sydneia Abel Arcuri<sup>b</sup>  
Isabele Campos Costa-Amaral<sup>a</sup>  
Eline Simões Gonçalves<sup>a</sup>  
Ariane Leites Larentis<sup>a</sup>

### Aspectos toxicológicos do benzeno, biomarcadores de exposição e conflitos de interesses

*Toxicological aspects of benzene, biomarkers of exposure and conflicts of interest*

<sup>a</sup>Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz), Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca (ENSP), Centro de Estudos da Saúde do Trabalhador e Ecologia Humana (CESTEH). Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

<sup>b</sup>Fundação Jorge Duprat Figueiredo de Segurança e Medicina do Trabalho (Fundacentro). São Paulo, SP, Brasil.

\* Bolsista nota 10 da FAPERJ

#### Contato:

Marcus Vinicius Corrêa dos Santos  
E-mail:  
[m.vinicius\\_csantos@yahoo.com.br](mailto:m.vinicius_csantos@yahoo.com.br)

Os autores afirmam não haver conflitos de interesses.

Apoio financeiro de Projeto de Pesquisa PAPER VII (Jovem Cientista – Fiocruz)/CNPq (Processo 401865/2015-0)

A despeito do extenso conhecimento produzido sobre a exposição ao benzeno e seus efeitos à saúde, ainda persistem lacunas referentes à sua biotransformação e aos mecanismos que levam à toxicidade por sua ação mutagênica e carcinogênica no organismo.

A absorção do benzeno pelo corpo pode ocorrer através da inalação, do contato dérmico e da ingestão. Após a absorção, o benzeno é metabolizado principalmente no fígado (metabolismo primário), com subsequente metabolização na medula óssea (metabolismo secundário)<sup>1</sup>, conforme representado na **Figura 1**. Os metabólitos produzidos ao final desse processo são excretados pela urina.

Na primeira etapa do metabolismo do benzeno ocorre a formação de um intermediário eletrofílico reativo, o benzeno epóxido, sendo catalisada pela enzima citocromo P450 2E1 (CYP2E1), que coexiste em equilíbrio com o seu tautômero<sup>c</sup> oxepina. Entre as vias que estão envolvidas no metabolismo do óxido de benzeno, a via predominante envolve rearranjo não enzimático para formar fenol. Este é oxidado na presença da enzima CYP2E1, formando catecol e hidroquinona, que, por sua vez, são oxidados na medula óssea, via ação da enzima mieloperoxidase aos metabólitos reativos *o*- e *p*-benzoquinona, respectivamente. A reação inversa (redução de *o*- e *p*-benzoquinona em catecol e hidroquinona) é catalisada pela enzima NAD(P)H quinona oxidoredutase-1 (NQO1). O catecol e a hidroquinona podem ser convertidos para o metabólito 1,2,4-trihidroxibenzeno, através de catálise pela enzima CYP2E1. Alternativamente, o benzeno epóxido pode ser convertido a dihidrodiol benzeno e, em seguida, a catecol, sendo essas reações de conversão catalisadas pelas enzimas hidrolase e dihidrodiol desidrogenase, respectivamente. Outras vias metabólicas incluem as reações do benzeno epóxido com a glutatona, formando o ácido *S*-fenilmercaptúrico<sup>2,3</sup>; e com a CYP2E1, formando a oxepina, a qual sofre reação de abertura do anel, catalisada pelo ferro, produzindo o *trans,trans*-muconaldeído com subsequente metabolização a ácido *trans,trans*-mucônico<sup>3,4</sup>. A produção de metabólitos de benzeno primários ocorre principalmente no fígado, via metabolização pela enzima CYP2E1, e também nos pulmões, via reações enzimáticas de CYP2E1, CYP2F1 e CYP2A13. No entanto, reações metabólicas importantes também ocorrem em tecidos-alvo formando compostos altamente reativos como *o*- e *p*-benzoquinona, os quais são os possíveis responsáveis pela hematotoxicidade e mielotoxicidade na medula óssea<sup>5</sup>.

Recebido: 01/09/2017

Aprovado: 28/09/2017

c Tautômeros têm formas estruturais diferentes e coexistem em equilíbrio químico.

## APÊNDICE IV (Artigo revisão)

Artigo Publicado no dossiê “EXPOSIÇÃO OCUPACIONAL AO BENZENO NA CADEIA DE DISTRIBUIÇÃO E REVENDA DE COMBUSTÍVEIS NO BRASIL” da Revista Brasileira de Saúde Ocupacional (RBSO).

**RBSO**

Revista Brasileira de Saúde Ocupacional  
ISSN: 2317-6369 (online)  
<http://dx.doi.org/10.1590/2317-6369000124415>

Dossiê: Benzeno em Postos de Combustíveis



Revisão

Daniel Valente <sup>a,\*</sup>  
Isabele Campos Costa-Amaral <sup>a,\*</sup>  
Leandro Vargas Barreto de Carvalho <sup>a,\*</sup>  
Marcus Vinicius Corrêa dos Santos <sup>a,\*</sup>  
Vinício Soares de Castro <sup>a</sup>  
Daniela del Rosário Flores Rodrigues <sup>a,\*</sup>  
Anna De Falco <sup>b,\*</sup>  
Cristiane Barata Silva <sup>a,\*</sup>  
Simone Mitri Nogueira <sup>a</sup>  
Elaine Simões Gonçalves <sup>a,\*</sup>  
Josino Costa Moreira <sup>a</sup>  
Leiliane Coelho André <sup>c</sup>  
Liliane Reis Teixeira <sup>a</sup>  
Paula de Novaes Sarcinelli <sup>a,\*</sup>  
Herbert Ary Sisenando <sup>d,\*</sup>  
Monica Stuck de Oliveira <sup>e,\*</sup>  
Jamila Alessandra Perini <sup>a,f,g</sup>  
Rita de Cássia Oliveira da Costa Mattos <sup>a,\*</sup>  
Ariane Leites Larentis <sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz), Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca (ENSP), Centro de Estudos da Saúde do Trabalhador e Ecologia Humana (CESTEH), Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

<sup>b</sup> Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro (PUC-Rio), Departamento de Química, Laboratório de Síntese Orgânica e Química de Coordenação Aplicada a Sistemas Biológicos (LABSO-BIO), Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

<sup>c</sup> Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Faculdade de Farmácia, Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Belo Horizonte, MG, Brasil.

<sup>d</sup> Universidade Federal Fluminense (UFF), Centro de Ciências Médicas, Faculdade de Farmácia, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

<sup>e</sup> Comissão Nacional de Energia Nuclear (CNEEN), Instituto de Radioproteção e Dosimetria (IRD), Divisão de Dosimetria Externa, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

<sup>f</sup> Laboratório de Pesquisa de Ciências Farmacêuticas, Unidade de Farmácia, Centro Universitário Estadual da Zona Oeste, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

<sup>g</sup> Docentes e pós-graduandos no curso de Toxicogenômica do Programa de Pós-Graduação em Saúde Pública e Meio Ambiente da ENSP/Fiocruz (ENSP.90.184.1).

Contato:

Daniel Valente

E-mail:

dvalentebio@gmail.com

Os autores declaram que não há conflitos de interesses e que o trabalho não é baseado em tese e não foi apresentado em reunião científica.

Este artigo recebeu auxílio do Programa Inova-Ensp (Edital 2013 do Programa de Apoio à Pesquisa, Desenvolvimento e Inovação em Saúde Pública da Ensp/Fiocruz), do Edital Sediadas FAPERJ nº32/2013 (Processo E-26/111.732/2013) e da SVS/MS (Chamamento Público nº 05/2014 - Iniciativas Educacionais Aplicadas à Vigilância em Saúde da Secretaria de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde).

Recebido: 11/09/2015

Revisado: 16/03/2016

Aprovado: 16/03/2016

### Utilização de biomarcadores de genotoxicidade e expressão gênica na avaliação de trabalhadores de postos de combustíveis expostos a vapores de gasolina

*Use of genotoxicity biomarkers and gene expression on the evaluation of gas station attendants exposed to gasoline fumes*

#### Resumo

**Introdução:** a avaliação de uma exposição mensura sua intensidade, frequência e duração, podendo detectar danos precoces que, se ignorados, podem evoluir para um quadro nocivo. Nos campos da saúde ambiental e ocupacional, os biomarcadores de genotoxicidade tem sido largamente utilizados para essa avaliação. **Objetivo:** identificar, descrever e discutir os principais bioindicadores de genotoxicidade e seu uso conjunto com técnicas de avaliação de expressão gênica em estudos de exposição ocupacional ao benzeno em postos de revenda de combustíveis (PRC). **Métodos:** revisão bibliográfica de trabalhos publicados entre 1995 e 2015. **Resultados:** as técnicas identificadas foram: ensaio cometa, estresse oxidativo, micronúcleos, aberrações cromossômicas, polimorfismos, adutos de DNA e proteínas, fatores epigenéticos e expressão gênica. Foi observado que testes de danos genéticos e epigenéticos são utilizados em frentistas de PRC que participam de programas de saúde do trabalhador ou de pesquisas, embora um baixo número de publicações sobre o tema tenha sido identificado. Esse fato talvez possa ser explicado pelos poucos países onde a profissão persiste e pelas limitações para o desenvolvimento de pesquisas nesses países. **Conclusão:** os bioindicadores de genotoxicidade e as técnicas de expressão gênica são úteis na detecção de dano precoce desta exposição ocupacional e devem ser avaliados em conjunto.

**Palavras-chave:** estresse oxidativo; expressão gênica; exposição ocupacional; benzeno.

#### Abstract

**Introduction:** an exposure evaluation measures its intensity, frequency and duration, detecting premature damage that, if ignored, might develop into a harmful framework. On environmental and occupational health fields, genotoxicity biomarkers have been widely used for this evaluation. **Objective:** to identify, describe and discuss main genotoxicity biomarkers and their use together with gene expression evaluation techniques in studies concerning occupational exposure to benzene in gas stations (GS). **Methods:** bibliographical review of studies published between 1995 and 2015. **Results:** the following techniques were identified: comet assay, oxidative stress, micronuclei, chromosomal aberrations, polymorphisms, DNA and protein adducts, epigenetic factors and gene expression. We observed that genetic and epigenetic damage tests are used in gas station attendants who participate in worker's health programs or in researches, although a short number of publications on the theme have been identified. This can be explained by the small number of countries where such job still exists and by the limitations for developing research in such countries. **Conclusion:** genotoxicity biomarkers and gene expression techniques are useful for detecting the premature damage resulting from this occupational exposure and must be jointly evaluated.

**Keywords:** oxidative stress; genic expression; occupational exposure; benzene.

## APÊNDICE V (VIII EMMSB 2016)

### RESUMO ACEITOS EM CONGRESSO

Modalidade do trabalho: Resumo apresentado em formato de pôster

Evento: 8º Escola de Modelagem Molecular em Sistemas Biológicos (VIII EMMSB 2016)

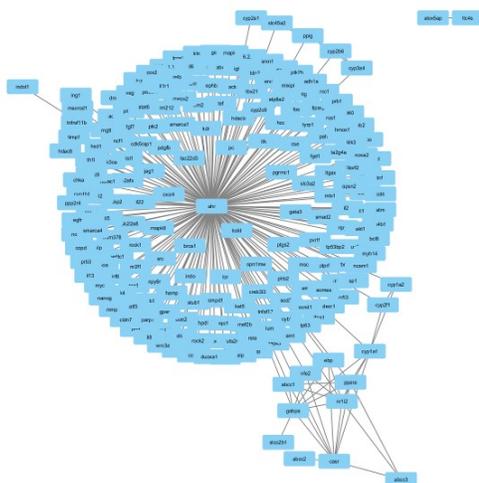
Análise de uma rede de interação proteína-proteína a partir da relação Ahr/benzeno: uma abordagem em toxicologia de sistemas

Marcus Vinicius Corrêa dos Santos<sup>1</sup>, Isabele Campos Costa Amaral<sup>1</sup>, Ariane Leites Larentis<sup>1</sup>  
<sup>1</sup>Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz), Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca (ENSP), Centro de Estudos da Saúde do Trabalhador e Ecologia Humana (CESTEH). Rio de Janeiro (RJ)

Introdução: Embora o receptor de hidrocarbonetos de arila (AHR) tenha um papel reconhecido na hematotoxicidade induzida por benzeno e seja um mediador da toxicidade de certos xenobióticos, os mecanismos pelos quais isto ocorre não são bem compreendidos. AhR regula a expressão de várias enzimas envolvidas no metabolismo de benzeno e intermediários biologicamente ativos. No entanto, alguns dados sugerem que a expressão do gene é regulada sob condições que controlam a proliferação e regulam células-tronco hematopoiéticas (HSCs). Assim, os objetivos deste estudo foram examinar as interações proteína-proteína e verificar os processos biológicos e funções moleculares predominantes, associadas à intoxicação por benzeno. Materiais e métodos: Para projetar a rede de interação foi utilizado o mecanismo de meta-busca para a prospecção de rede com agilent literature search 3.1.1 e STRING 10.0, os softwares permitem a visualização das ligações físicas entre proteínas em redes de interação que foram combinadas em uma rede única usando o Cytoscape 3.4.0. Para o cluster, ontologia genica e análises de centralidade foram utilizados os plugins MCODE, bingo e CentisCape, respectivamente. Resultados e discussão: Os resultados mostraram uma rede composta por 210 nós diferentes, conectadas por 241 bordas (interações). AHR está relacionada com diferentes processos regulatórios envolvidos na resposta a estímulos químicos, regulação positiva do processo biológico, regulação positiva de processos celulares, resposta a drogas, regulação positiva de processos metabólicos, regulação da proliferação celular, ligação de oxigênio, ligação heme, atividade oxidore-

dutase e atividade reguladora de transcrição. A definição dos mecanismos moleculares pelos quais estes eventos ocorrem podem levar à identificação de funções anteriormente não definidas deste fator em doenças humanas, particularmente as causadas ou afetadas por xenobióticos. Destaca-se que a AhR pode levar a desregulação em HSCs exacerbando os efeitos hematotóxicos do benzeno por condições que promovam as células-tronco a sofrer proliferação e diferenciação anormal. Assim, qualquer desregulação da AHR pode promover condições que poderiam ter efeito aditivo ou sinérgico em exposições ao benzeno. Exemplo disso seria a potencial diminuição da expressão do gene AHR por hipermetilação que pode ocasionar o crescimento celular descontrolado e sua proliferação ser permissiva para os efeitos leucemogênicos. Assim como, os metabólitos reativos do benzeno podem alterar a expressão e/ou atividade da AHR, alteram o equilíbrio entre a HSC e a quiescência e proliferação, promovendo desta forma hematotoxicidade e ou evento leucomogênico. Conclusão: Observa-se que as principais alterações estão associadas a mecanismos de regulação e que as alterações nesses mecanismos podem promover o desenvolvimento de doenças crônicas, como por exemplo, doenças do sistema hematopoiético, distúrbios reprodutivos, hormonais, alterações no desenvolvimento/envelhecimento e câncer. Além disso, é importante definir as funções da AHR devido as suas implicações para a compreensão dos mecanismos subjacentes a toxicidade induzida por benzeno e também para conhecer os processos que regulam e preservam a função HSC durante toda a vida de um organismo.

Palavras-chave: BENZENO, AHR, BIOINFORMÁTICA.



## APÊNDICE VI (ICOH 2018)

Modalidade do trabalho: Resumo aceito em formato de pôster (número 1500)

<http://dx.doi.org/10.1136/oemed-2018-ICOHabstracts.1174>

[Home](#) / [Archive](#) / [Volume 75, Issue Suppl 2](#)

 Article Text

Article menu



Occupational Toxicology

## 1500 Prediction and characterisation of biomarker network for benzene exposure

PDF

FREE

MVC Santos<sup>1</sup>, AL Larentis<sup>1</sup>, JA Perini<sup>2</sup>

Author affiliations 

1. National School of Public Health (ENSP/FIOCRUZ), Rio de Janeiro, RJ, Brazil

2. University of the Western Zone (UEZO). Rio de Janeiro, RJ, Brazil, RJ, Brazil

### Abstract

**Introduction** Benzene is identified as a carcinogen. Long-term exposure to benzene causes haematological alterations, including an increased risk of acute myeloid leukaemia. However, the molecular mechanisms of Benzene systems effects remain poorly understood. Hence, a better understanding of the molecular mechanisms involved in this condition is a priority. Here, we employed a joint the integration of molecular networks, a gene–gene interaction database, biological processes analysis and functional annotation analysis to explore system effects for prioritising candidate genes to biomarkers to evaluate benzene exposure.

**Methods** We selected 96 genes targets with altered expression in occupational exposed to benzene (2009 to 2014). The analysis was performed using the multiple association network integration algorithm for predicting gene function, which identifies known gene-gene interactions among a genes list and provides additional genes. Topological properties of network were calculated by MCODE, BINGO and Centiscape,

**Results** A network of 114 genes and 2415 interactions were obtained. After topological analysis, a minor network composed by 16 nodes was identified, which is composed by most relevant nodes of major network. In this sub-network, KLF6, KLF4 and JUN are the most interconnected nodes, they being been considered a putative biomarker in which the exclusion of one node could produce a strong perturbation in the signalling network.

**Conclusion** The biological interaction network method presented probabilities of interactions between genes, demonstrating the potential of the use and application of the multiple association network integration algorithms for predicting gene function and for the observation of multiple genes in the system, using theoretical data to building clusters for identification of possible genes as biomarker.

[https://oem.bmj.com/content/75/Suppl\\_2/A411.1#article-bottom](https://oem.bmj.com/content/75/Suppl_2/A411.1#article-bottom)

## APÊNDICE VII (Toxi-Latin 2018)

Modalidade do trabalho: Resumo aceito em formato de pôster

Evento: Congresso Latino-Americano de Toxicologia Clínica e Laboratorial (Toxi-Latin 2018)

### EVALUATION OF ENVIRONMENTAL, GENOTOXIC AND EPIGENETIC BIOMARKERS RELATED TO OCCUPATIONAL EXPOSURE TO LOW DOSES OF BENZENE IN FILLING STATION WORKERS

Santos MVC<sup>1</sup>; Pereira AC<sup>1</sup>; Senna MM<sup>1</sup>; Carvalho LVB<sup>1</sup>; Figueiredo VO<sup>1</sup>; Borges RM<sup>1</sup>; Valente D<sup>1</sup>; Moura-Correa MJ<sup>1,2</sup>; Rabello AS<sup>1</sup>; Gonçalves ES<sup>1</sup>; Teixeira LR<sup>1</sup>; Menezes MA<sup>1</sup>; Perini JA<sup>3</sup>; Mattos RCOC<sup>1</sup>; Sarcinelli PN<sup>1</sup>; Larentis AL<sup>1</sup>; Costa-Amaral IC<sup>1</sup>

1 Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz), Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca (ENSP), Centro de Estudos da Saúde do Trabalhador e Ecologia Humana (CESTEH). Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

2 Secretaria Municipal de Saúde. Porto Alegre, RS, Brasil.

3 Laboratório de Pesquisa de Ciências Farmacêuticas, Unidade de Farmácia, Centro Universitário Estadual da Zona Oeste. Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

Introduction: Environmental and occupational exposure to benzene present in gasoline and other fuels are a major concern of international and national authorities, since benzene is proven to be carcinogenic to humans. Objective: The objective of this work was to evaluate the environmental, genotoxic and epigenetic effects related to occupational and environmental chronic exposure to benzene in workers from filling stations in the West Zone of the Municipality of Rio de Janeiro. Method: The occupational history of the workers was evaluated, including the working time in the current occupation in the filling stations, possible confounding factors, clinical and sociodemographic assessment. Environmental exposure was evaluated to determine the concentration of benzene in atmospheric air and individual biomarker trans,trans-muconic acid (ATTM); biomarkers of oxidative stress were measured by catalase (CAT), glutathione S-transferase (GST), superoxide dismutase (SOD), thiol group (TIOL) and malondialdehyde

(MDA); biomarkers of genotoxicity were measured by comet assay using the enzyme DNA-formamidopyridine glycosylase (CA-FPG) and chromosomal aberrations (CA) and methylation of LINE-1 was used as epigenetic biomarker. Results: A total of 51 workers were evaluated from 7 filling stations. Environmental assessments identified benzene concentrations in atmospheric air ( $\leq$ limit of detection until  $564 \mu\text{g.m}^{-3}$ ) and this exposure is characterized by a greater oscillation of concentrations of benzene in filling stations, because of the working process. However, ATTM was not sensitive to this differences, demonstrating that all workers had similar benzene exposures. No clinical differences were found among the workers, but 6 workers had leukocyte results lower than  $4.500 \text{ cells/mm}^3$ . The biomarkers TIOL, MDA and CA showed differences between the workers exposed to benzene at low concentrations from 3 filling stations, and a higher frequency of CA was observed in comparison to unexposed population described in the literature, characterizing a higher risk of illness due to the exposure. The CA-FPG showed differences between the filling station workers, but it was not sensitive in the differentiation of the different filling stations. The results for LINE-1 methylation were lower than the values presented in the literature for an unexposed population. Conclusion: A significant relationship between the working time in the current occupation in the filling station and the biomarkers CA-FPG, CA, GST and MDA were related to the genotoxic and cytotoxic effects caused by benzene exposure. All exposed workers from filling stations should be continually monitored, since there is no safe limit for exposure to a carcinogen as benzene, at least every 6 months, as indicated in recent Brazilian legislation approved for filling stations