



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

^aFundação 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.

^bPontifícia 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.

^cUniversidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Faculdade de Farmácia, Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas. Belo Horizonte, MG, Brasil.

^dUniversidade Federal Fluminense (UFF), Centro de Ciências Médicas, Faculdade de Farmácia. Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

^eComissão Nacional de Energia Nuclear (CENEN), Instituto de Radioproteção e Dosimetria (IRD), Divisão de Dosimetria Externa. Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

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

^gDocentes 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.

Introdução

A detecção precoce da exposição a uma ou mais substâncias pode diminuir significativamente a ocorrência de efeitos adversos à saúde, já que as informações provenientes da avaliação da exposição possibilitam a tomada de medidas de prevenção e controle dos agentes causadores¹. O objetivo da avaliação da exposição é a mensuração da intensidade, da frequência e da duração da exposição humana a um agente presente no ambiente. Na sua forma mais complexa descreve a magnitude, a duração, a via de exposição, o tamanho, a natureza, a classe da população exposta, e as incertezas desse processo².

Vários são os parâmetros biológicos que podem ser alterados como consequência da interação entre um agente externo (químico, físico ou biológico) e o organismo. Entretanto, a determinação quantitativa dos parâmetros usados como indicadores biológicos de exposição, também chamados de biomarcadores, só é possível se existir correlação com a intensidade da exposição e/ou o efeito biológico decorrente da substância em questão. Dessa forma, um biomarcador compreende toda substância ou seu produto de biotransformação, assim como qualquer alteração bioquímica precoce, cuja determinação nos fluídos biológicos, tecidos ou ar exalado, expresse a intensidade da exposição e/ou o seu potencial risco à saúde³.

Quando a avaliação biológica é baseada na determinação da substância química ou do seu metabólito no organismo, torna-se essencial o conhecimento da toxicocinética, ou seja, de como a substância é absorvida, distribuída, biotransformada e eliminada. Se a avaliação se baseia na medida da interação da substância com o seu sítio de ação, é necessário conhecer a toxicodinâmica, o mecanismo de ação da substância, para identificar quais são os efeitos decorrentes daquela interação. Ainda assim, indivíduos podem ter exposições similares com diferentes níveis de resposta tóxica, em decorrência da variabilidade genética (que pode conferir maior ou menor susceptibilidade individual), resultando em diferenças na toxicocinética e/ou toxicodinâmica de uma substância¹.

Os biomarcadores (ou indicadores) têm características passíveis de avaliação e de medida, indicadores de processos biológicos normais ou patogênicos, exposições ocupacionais e ambientais, ou resposta farmacológica a uma intervenção terapêutica. O biomarcador ideal deve reunir as seguintes características: alta especificidade para o efeito de interesse; refletir o efeito desde o início; ser passível de determinação; ser analisado por técnica não invasiva; ter alta sensibilidade no fluído/matriz biológico escolhido. Além disso, deve existir uma relação bem estabelecida entre a concentração do biomarcador e a exposição ao agente, o

dano induzido e a susceptibilidade pesquisada⁴. Um biomarcador pode ser útil na prevenção e na detecção precoce da doença ou no diagnóstico da intoxicação, uma vez que seus níveis vão sendo alterados proporcionalmente à intensidade da exposição ou efeito². Dessa forma, quanto mais sensível o biomarcador, mais cedo pode ser detectada alguma alteração metabólica e conseqüentemente será possível interferir na evolução dos efeitos, podendo evitar o surgimento de um quadro clínico desfavorável. Contudo, é difícil somente um biomarcador ter todas essas características.

Assim, a estratégia empregada pelos pesquisadores tem sido a de utilizar vários biomarcadores de forma complementar.

Os indicadores de genotoxicidade permitem avaliar os efeitos de exposições ao material genético por meio da avaliação de mutação gênica, dano cromossômico ou lesão no DNA. Alguns ensaios de avaliação de genotoxicidade compreendem aberrações cromossômicas (ACs), troca de cromátides irmãs – *sister chromatid exchange* (SCE), mutações pontuais e oncogênicas, micronúcleos (MN) e o ensaio cometa, sendo este último utilizado para avaliar lesões no DNA⁵⁻⁸. As enzimas relacionadas ao estresse oxidativo estão envolvidas no metabolismo de espécies reativas, que podem gerar dano celular, inclusive no material genético. Portanto, a análise desses indicadores de genotoxicidade tem uma relação direta na avaliação do potencial de dano causado por determinada exposição. A variabilidade genética interindividual pode ser caracterizada pelas análises de polimorfismo e servir como indicador de suscetibilidade. Por fim, como a maioria dos compostos genotóxicos não induz diretamente quebras no DNA, mas sim formam adutos de DNA ou alterações de base⁹, é importante avaliar tanto sua formação quanto o resultado final de todas essas alterações, por meio da avaliação da expressão gênica, que pode incluir avaliações genéticas e epigenéticas¹⁰.

Nesse contexto, surge a necessidade de encontrar biomarcadores que possam sinalizar a presença de compostos tóxicos no ambiente e no organismo e, conseqüentemente, auxiliar na identificação dos mesmos. Dentre os ambientes que apresentam risco à saúde do trabalhador, destacam-se os postos de revenda de combustíveis veiculares (PRCV), devido à exposição múltipla a substâncias químicas, em especial a fração volátil BTEX (benzeno, tolueno, etilbenzeno e xileno) da gasolina, que é uma mistura complexa de diversos hidrocarbonetos, dentre os quais se encontram os compostos aromáticos BTEX e outros alquilbenzenos. Do ponto de vista toxicológico, e considerando os componentes principais da gasolina, o benzeno merece destaque por ser comprovadamente genotóxico e carcinogênico¹¹⁻¹⁴, sendo objeto de controle no âmbito mundial dada sua característica de contaminante universal e seus potenciais efeitos à saúde humana. Segundo os

critérios do programa das Nações Unidas de segurança química, o benzeno é considerado a quinta substância de maior risco¹⁵. O benzeno é considerado não mutagênico em sistemas bacterianos e em sistemas testes de células de mamíferos *in vitro*. Entretanto, o benzeno é descrito como genotóxico quando avaliado em sistemas de células de mamíferos *in vivo* e há evidências que ele induz quebras nas fitas do DNA em linfócitos de humanos expostos ao benzeno^{16,17}.

Para a exposição ao benzeno que ocorre, sobretudo, pela via respiratória, a avaliação da exposição pode ser realizada no ar, no sangue e na urina, que são matrizes ideais para avaliação de indicadores biológicos de dose interna. Além disso, os metabólitos do benzeno, ácido trans-trans-mucônico (tt-MA) e ácido S-fenilmercaptúrico (S-MA), também podem ser utilizados como indicadores biológicos de exposição de dose interna, utilizando-se a urina como matriz biológica¹⁸. Apesar dos indicadores biológicos de exposição de dose interna serem químico-específicos, eles podem não traduzir o potencial tóxico das substâncias químicas, pois substâncias genotóxicas e/ou carcinogênicas podem exercer danos ao material genético mesmos em doses muito baixas, não tendo exposição segura para as mesmas^{14,19}, como é o caso do benzeno presente na gasolina. Por isso, é crescente a utilização, complementar aos indicadores de exposição clássicos, de indicadores de efeito, tanto relacionados ao estresse oxidativo quanto aos efeitos genotóxicos^{8,20-25}.

O objetivo desta revisão é identificar, descrever e discutir os principais indicadores de genotoxicidade utilizados na avaliação da exposição ocupacional em postos de combustíveis, bem como seu uso conjunto com técnicas de avaliação da expressão gênica, utilizadas para identificar os efeitos da exposição ao benzeno.

Métodos

Para a descrição das metodologias e a discussão em torno do uso das técnicas, artigos originais descrevendo

a aplicabilidade dos indicadores de genotoxicidade, artigos atuais de revisão e capítulos de livros sobre as técnicas foram utilizados. Para a referência do uso dessas técnicas foi realizado levantamento bibliográfico nas bases PubMed, SciELO e Lilacs com o termo MeSH “*gas station*” AND “*toxicity*”. Dos artigos encontrados na busca, foram selecionados trabalhos originais que realizaram quaisquer dos testes de genotoxicidade e estresse oxidativo citados nessa revisão em trabalhadores de postos de combustíveis, com objetivo de quantificar o dano da supracitada exposição, publicados nos últimos 20 anos (1995-2015). Após a aplicação dos critérios de elegibilidade supracitados, sem critérios de exclusão, 20 artigos foram selecionados para referenciar o uso das técnicas na população de estudo.

Resultados e discussão

Os principais ensaios de avaliação de genotoxicidade descritos na literatura e empregados na avaliação de exposições ocupacionais e ambientais, como é o caso da exposição ao benzeno e vapores em postos de gasolina, são: ensaio cometa, micronúcleo, aberrações cromossômicas e formação de adutos, que, em conjunto com os ensaios utilizados para avaliação de indicadores de estresse oxidativo e polimorfismos, permitem avaliar os efeitos de exposições sofridas pelo material genético. Em conjunto com as alterações genéticas, recentemente avaliações epigenéticas e de expressão gênica têm sido também utilizadas como indicadores nas populações expostas ao benzeno, de forma a se ter um quadro mais realista das consequências dessa exposição. Cada um desses indicadores e técnicas está descrito neste trabalho, assim como suas aplicações recentes na exposição ocupacional em postos de gasolina. As aplicações de vários biomarcadores de forma complementar pelos diferentes grupos de pesquisa estão sistematizadas na **Tabela 1**, conforme verificado nos artigos publicados nos últimos 20 anos empregando testes de genotoxicidade para avaliação de exposição ocupacional de trabalhadores de postos de combustíveis.

Tabela 1 Artigos identificados nas bases PubMed, SciELO e Lilacs empregando testes de genotoxicidade para avaliação de exposição ocupacional de trabalhadores de postos de combustíveis, publicados no período 1995-2015

Autor	Ano	Técnica	Matriz	Conclusão
Carere A et al.	1995	Aberrações cromossômicas Micronúcleo Troca de Cromátides Irmãs	Linfócitos de sangue periférico	Aumento na frequência de ACs, MN e SCE entre os expostos em relação com os não expostos.
Andreoli C et al.	1997	Ensaio Cometa	Linfócitos de sangue periférico	Maiores números de células danificadas e extensão do dano entre os expostos em comparação com não expostos.
Carere A et al.	1998	FISH Micronúcleo	Linfócitos de sangue periférico	Nenhuma relação identificada entre os indicadores e a exposição.

(Continua)

Tabela 1 Continuação...

<i>Autor</i>	<i>Ano</i>	<i>Técnica</i>	<i>Matriz</i>	<i>Conclusão</i>
Bukvic N et al.	1998	Troca de Cromátides Irmãs Micronúcleo	Linfócitos de sangue periférico	Identificada relação entre micronúcleo e o tempo de emprego. SCE com relação positiva com idade e fumo.
Çelik A et al.	2003	Micronúcleo	Células da mucosa bucal	Relação entre exposição e frequência de MN.
Çelik A et al.	2005	Aberrações cromossômicas Troca de Cromátides Irmãs	Linfócitos de sangue periférico	Não foi identificada relação entre exposição e ACs. Frequência de SCE maior entre frentistas em relação aos não expostos.
Benites CI et al.	2006	Micronúcleo	Células da mucosa bucal	Relação entre exposição e frequência de MN.
Bollati V et al.	2007	Metilação	Linfócitos de sangue periférico	Relação entre a exposição e hipometilação dos genes <i>LINE-1</i> , <i>Alu1</i> e <i>MAGE1</i> . Também identificada relação com hipermetilação do gene <i>p15</i> .
Hallare AV et al.	2009	Micronúcleo	Células da mucosa bucal	Maior frequência de micronúcleos entre os expostos em relação com não expostos.
Fracasso ME et al.	2010	Aberrações cromossômicas Estresse oxidativo Ensaio Cometa	Linfócitos de sangue periférico	Identificada relação entre cometa, GSH (correlação negativa) e exposição. Não foi identificada relação entre ACs e exposição.
Rekhadevi PV et al.	2010	Estresse oxidativo Ensaio Cometa Micronúcleo	Linfócitos de sangue periférico	Relação entre exposição, comprimento da cauda do cometa e frequência de micronúcleo. Grupo exposto tem menor concentração de SOD e GPx e aumento em CAT e MDA em comparação com não expostos.
Sellappa S et al.	2010	Micronúcleo	Células da mucosa bucal	Relação entre exposição e frequência de MN.
Tunsaringkarn T et al.	2011	Troca de Cromátides Irmãs	Linfócitos de sangue periférico	Relação entre exposição e frequência de SCE.
Moro AM et al.	2013	Ensaio Cometa Micronúcleo Estresse oxidativo	Linfócitos de sangue periférico	Maior frequência de células com dano e com micronúcleos entre os expostos em relação aos não expostos. Concentração de enzimas GSH, SOD, CAT e GST é menor entre os expostos.
Rosa JCF et al.	2013	Micronúcleo Polimorfismo	Células da mucosa bucal	Relação entre exposição e frequência de MN. Associação entre polimorfismo 3798T>C e frequência de MN.
Lovreglio P et al.	2014	Aberrações cromossômicas Micronúcleo	Linfócitos de sangue periférico	Relação entre exposição e frequência de MN. Não foi identificada relação entre exposição e frequência de ACs.
Trevisan P et al.	2014	Aberrações cromossômicas Troca de Cromátides Irmãs	Linfócitos de sangue periférico	Correlação entre SCE e tempo de trabalho. Sem diferenças em ACs entre os grupos.
Santiago F et al.	2014	FISH	Linfócitos de sangue periférico	Relação entre exposição e frequência de ACs.
Mitri S et al.	2015	Polimorfismo	Sangue total	Frequência dos alelos GSTM1, GSTT1, CYP2E1 7632T>. A maior entre trabalhadores com quadro clínico de intoxicação por benzeno; Associação entre GSTM1 <i>null</i> e alterações relacionadas com intoxicação por benzeno.
Lacerda LP et al.	2015	Micronúcleo	Células da mucosa bucal	Maior frequência de células com micronúcleos entre os expostos em relação aos não expostos.

ACs: aberrações cromossômicas

MN: micronúcleo

SCE: *sister chromatid exchange* (troca de cromátides irmãs)

Ensaio cometa

O ensaio cometa, também conhecido como *Single-Cell Gel (SCG)* ou *Single-Cell Gel Eletrophoresis (SCGE)*, foi descrito pela primeira vez por Östling e Johanson em 1984, como uma técnica microeletroforética para visualização direta de danos no DNA em células individuais. Posteriormente, Singh et al.²⁶ introduziram condições alcalinas ($\text{pH} > 13$) na etapa eletroforética aumentando a sensibilidade de detecção à presença de quebras de fita única de DNA e de lesões sítios álcali lábeis e, desde então, o ensaio cometa vem sendo muito utilizado em estudos de toxicogenética²⁶.

Dessa forma, o ensaio cometa é uma técnica eletroforética, de alta sensibilidade, reprodutibilidade simples e rápida para avaliação de dano e de reparo do DNA em células proliferantes e não proliferantes, em nível individual, podendo ser empregado em amostras celulares extremamente pequenas²⁷. O princípio da técnica consiste de uma eletroforese do material genético de células individualizadas, embebidas em agarose. Em função do tratamento aplicado, as células têm suas membranas lisadas e suas proteínas de matriz celular extraídas por solução salina adstringente. Consequentemente, o DNA que estava compactado no núcleo celular ocupará o espaço no gel que antes estava sendo ocupado por toda estrutura celular íntegra, formando o nucleóide. Durante a eletroforese em condições alcalinas ($\text{pH} > 13$) como descrito por Singh et al.²⁶, o DNA íntegro permanecerá no nucleóide formado, enquanto o DNA fragmentado

será carregado em direção ao anodo da cuba de eletroforese formando uma “cauda de cometa”. Após a coloração, essa cauda poderá ser visualizada no microscópio. A visualização final das lâminas pode ser realizada tanto em microscópio de fluorescência quanto no de luz visível, dependendo do tipo de coloração utilizada. Brometo de etídeo e *sybr green* são exemplos de corantes usados na microscopia de fluorescência, enquanto na microscopia óptica comum é utilizada a impregnação do material com prata.

A etapa final do teste de SCGE é a avaliação do grau de migração do DNA visualizado nos cometas presentes nas lâminas, sendo essa migração classificada em categorias (0, 1, 2, 3 e 4), de acordo com o tamanho do nucleóide e da cauda formados, como apresentado na **Figura 1**. O grau de migração do DNA pode ser expresso em unidades arbitrárias (UA), porcentagem de células com dano (%), comprimento da cauda (*tail length*), intensidade da cabeça (*head intensity*), intensidade da cauda (*tail intensity*), momento da cauda (*tail moment*) e razão entre o comprimento da cauda e o diâmetro da cabeça/nucleóide. Em análises por *visual score*, são avaliadas duas lâminas por amostragem, sendo lidos 50 nucleóides por lâmina, completando um total de 100 células avaliadas para cada amostra. Os resultados desse tipo de análise são expressos em unidades arbitrárias (UA), que corresponde à soma ponderada dos cometas lidos, ou em porcentagem de dano (%). Já o comprimento da cauda e o momento de cauda também são usados como medidas da extensão de dano no DNA, onde as células são analisadas em software^{26,28,29}.

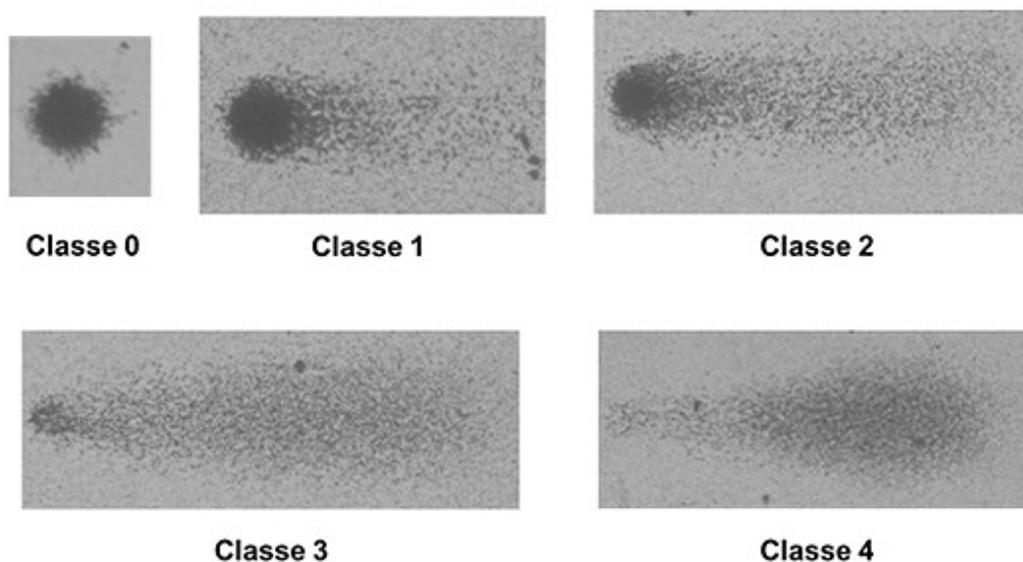


Figura 1 Classificação da migração do DNA de acordo com o nucleóide e cauda formados. Imagem visualizada em microscópio visível por coloração com prata

Fonte: imagens elaboradas pelos autores deste artigo

Uma vez que condições ambientais durante a realização da técnica podem interferir na qualidade das imagens visualizadas em microscópio, o teste deve ser realizado em ambiente com umidade controlada para que a adesão da agarose ocorra corretamente e não interfira nas outras etapas da técnica. Além disso, outro fator importante é a temperatura ambiente no momento da realização das etapas de tratamento alcalino e de eletroforese das lâminas. Speit et al.³⁰ realizaram um estudo comparando a influência da temperatura ambiente (4 e 20°C) durante o tratamento alcalino e a eletroforese e observaram que o aumento da temperatura melhora significativamente a migração dos fragmentos de DNA.

Por meio do teste de ensaio cometa é possível observar lesões genômicas, que, após serem processadas pelo aparato enzimático celular, podem iniciar o processo de reparo ou darem origem a mutações e danos cromossômicos, como quebras, dicêntricos e micronúcleos. As lesões genômicas detectadas fornecem informações importantes sobre a cinética e o tipo de lesão que ocorrem previamente a diversos tipos de desfechos relacionados a danos celulares e, conseqüentemente, à saúde dos seres que as sofrem. Sendo assim, o ensaio cometa tem amplas aplicações na toxicologia genética tais como: em teste de genotoxicidade *in vitro*, *in vivo*; no biomonitoramento ambiental e no monitoramento populacional humano⁵.

Outra aplicação comum é a avaliação da capacidade antioxidante das células pela sua resistência a danos causados por espécies reativas de oxigênio, como o H₂O₂, por exemplo³¹. Estudos sugerem que as espécies reativas de oxigênio (ERO's), por intermédio de danos oxidativos no DNA (quebras, adutos), estejam associadas ao aparecimento de várias doenças. Portanto, é importante considerar a aplicabilidade de indicadores sensíveis, como o ensaio cometa, no monitoramento populacional. Um bom grau de eficácia permite o uso do teste para avaliar o nível dos efeitos sobre o DNA provocados por exposição ambiental e ocupacional a agentes de risco; estudar os efeitos ou fatores que contribuem para o aparecimento de doenças; investigar variações individuais, como por exemplo, a capacidade de reparação do DNA e a resistência antioxidante; ou monitorar mudanças decorrentes de intervenção dietética, como por exemplo, uso de micronutrientes antioxidantes³².

É possível encontrar na bibliografia várias pesquisas que se referem ao aumento estatisticamente significativo de dano à molécula de DNA em células sanguíneas coletadas junto a trabalhadores de postos de combustíveis através do emprego do ensaio cometa em comparação com grupos controles, em países onde esta profissão ainda persiste, tais como Itália/Roma³³, Índia²³ e Brasil⁸, evidenciando a ocorrência de uma exposição ocupacional.

Uma abordagem elucidativa e confiável do ensaio cometa é empregar endonucleases específicas para bases oxidadas. Estas enzimas provocam quebras na molécula de DNA que foi oxidada e, em seguida, pode-se avaliar as quebras utilizando o ensaio cometa. As duas enzimas mais comumente empregadas são a DNA formamidopirimidina glicosilase (FPG), que detecta principalmente 8-oxo-7,8-dihidroguanina (8-oxoGua), e a endonuclease III, que reconhece pirimidinas oxidadas³⁴. A inclusão de enzimas específicas que lesionam o DNA em locais de bases oxidadas amplia ainda mais a sua sensibilidade³⁴. A digestão com endonucleases é aplicada aos nucleóides, formados na lise das células embebidas em agarose. Paralelamente, uma digestão apenas com tampão de enzima é realizada. A diferença de danos à molécula de DNA (sítios álcali lábeis) indica a frequência das redes locais sensíveis à enzima³². Outras enzimas também têm sido utilizadas, como a enzima T4 endonuclease V (para pirimidinas dimerizadas induzida por UV), AlkA (aumenta drasticamente o rendimento de quebras de DNA em células tratadas com metilmetanesulfonato – MMS) e a 8-oxoguanina glicosilase (OGG1, homóloga à FPG de mamíferos, porém com uma maior especificidade para 8-oxoguanina)²⁷.

Indicadores de estresse oxidativo

A produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), de nitrogênio (ERNs), entre outras espécies reativas, é parte integrante do metabolismo humano e é observada em diversas condições fisiológicas. Espécies reativas têm importante função biológica, porém, quando sua produção é exacerbada, o organismo dispõe de um eficiente sistema antioxidante que consegue controlar e restabelecer o equilíbrio. O estresse oxidativo resulta do desequilíbrio entre o sistema pró e antioxidante, com predomínio dos oxidantes, e com conseqüente dano celular⁴.

A produção elevada e contínua de EROs ou sua inadequada remoção pode suprimir o sistema de defesa antioxidante e resultar no estresse oxidativo, devido a um desequilíbrio entre os antioxidantes e oxidantes, em favor dos oxidantes³⁵. Produtos de peroxidação lipídica, muito provavelmente, estão envolvidos na produção de placas arteriais, que causam ou contribuem para acidentes vasculares cerebrais, doença cardíaca coronariana, trombose e outras doenças vasculares³⁶. Outros possíveis exemplos são a glicosilação de lipoproteína de baixa densidade em diabéticos, que contribui para um maior risco de aterosclerose nestes doentes, e a catarata, que pode resultar de danos oxidativos causados ao cristalino por luz UV da luz solar^{37,38}.

Além disso, muitas doenças têm um componente inflamatório e essa resposta inflamatória envolve a produção de espécies reativas de oxigênio por macrófagos. Enquanto macrófagos ativados desempenham

um papel essencial na defesa do organismo, há efeitos colaterais danosos e inevitáveis produzidos por essas espécies liberadas. No caso do câncer, também há fortes evidências circunstanciais associadas ao dano oxidativo. Bases oxidadas, tais como 8-oxoguanina (8-oxoGua) são potencialmente mutagênicas, por meio de uma alteração nas propriedades de emparelhamento (8-oxoGua tendendo a emparelhar com adenina), além de mutações somáticas em genes críticos serem a causa da maioria dos cânceres³⁹. Sendo assim, como causa ou efeito, o estresse oxidativo parece ser um fator comum em muitas doenças crônicas degenerativas, sendo a técnica de ensaio cometa utilizada em diversos estudos para avaliar estes danos ao DNA, incluindo monitoramento à saúde humana⁴⁰.

As enzimas catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD) atuam na degradação de espécies reativas de oxigênio (EROs). A enzima glutatona S-transferase (GST) está envolvida no metabolismo de fase II e conjugua a glutatona na molécula do benzeno, pela ligação com grupamento tiol (Tiol), para eliminar o benzeno do organismo. O malondialdeído (MDA) é um produto da peroxidação lipídica, processo que está ligado ao estresse oxidativo. Espécies reativas podem gerar dano celular, inclusive no material genético, portanto, os indicadores de estresse oxidativo e o ensaio cometa têm uma relação direta na avaliação do potencial de dano derivado deste tipo de exposição^{2,4,8}.

A análise de SOD, CAT, GST e Tiol representa uma avaliação de fatores de proteção para o estresse oxidativo, enquanto a análise de MDA exprime um fator causador de dano. Esses biomarcadores podem ser considerados indicadores biológicos de efeito.

Dados da literatura demonstram que, ao contrário das outras enzimas do estresse oxidativo, a GST apresenta uma depleção de sua atividade no início da exposição e, posteriormente, essa atividade aumenta atingindo níveis normais de atividade. Estudo realizado com mineradores altamente expostos à poeira de carvão avaliou as mudanças na atividade da GST e um decréscimo de atividade foi encontrado em trabalhadores manifestando as fases iniciais de pneumoconiose quando comparados com o grupo controle. E em trabalhadores apresentando a progressão da doença, a atividade da GST não exibiu diferença relativamente ao grupo controle⁴¹.

Estudos recentes têm apontado uma relação entre a atividade enzimática antioxidante e a exposição de trabalhadores de postos de gasolina aos vapores de combustíveis. Rekhadevi et al.²³, Moro et al.⁸ e seus colaboradores descrevem em seus estudos a relação da redução da atividade das enzimas com ação antioxidativa (GSH, SOD, CAT e GST) e os níveis dos BTEX aos quais os trabalhadores são expostos. A pesquisa de Moro et al.⁸ ainda apresenta uma relação negativa entre a concentração de um antioxidante exógeno (vitamina C) e danos ao material genético avaliado por ensaio

cometa. Outros antioxidantes não apresentaram relação neste estudo (vitaminas A e E, licopeno e β -caroteno).

Formação dos micronúcleos

O micronúcleo é um tipo de dano cromossômico ou anomalia mitótica que tem sua origem a partir de fragmentos de cromossomos ou cromossomos inteiros. Durante a fase da anáfase da mitose eles não são capazes de interagir com o eixo formado na citocinese e, portanto, não são incorporados aos núcleos filhos (**Figura 2**)^{42,43}. Os micronúcleos podem ser analisados em células tratadas ou não com bloqueio do processo de citocinese.

Em 1990 foi criado o ensaio CBMN (*cytokinesis-block micronucleus* – micronúcleo com bloqueio da citocinese) usando FISH e sondas pan-centroméricas para visualização dos centrômeros. Esse método permitiu a discriminação entre micronúcleos contendo fragmentos acêntricos e aqueles contendo cromossomos. O emprego desse método aumentou de forma expressiva a sensibilidade do ensaio CBMN para as faixas de doses mais baixas dos agentes genotóxicos.

Uma nova versão do ensaio CBMN foi desenvolvida e validada, denominada CBMN-Cit (ensaio citômico de micronúcleos com bloqueio de citocinese). Essa nova versão de ensaio permite contabilizar brotos nucleares (BNUC) em células binucleadas (BN) que são respectivamente biomarcadores de cromossomas dicêntricos⁴⁴ e de amplificação gênica⁴⁵ (FENECH, 2007). Além disso, no ensaio CBMN-Cit a proporção de células mono, di e multinucleadas, assim como de células apoptóticas e necróticas, é contabilizada, o que permite a avaliação de proliferação e morte celular. Os procedimentos de marcação e hibridação podem ser usados também quando há um aumento na formação de micronúcleos e o investigador pretende determinar se esse aumento é resultado de eventos clastogênicos ou aneugênicos. São dados que enriquecem enormemente a dosimetria biológica^{42,46}.

O uso da metodologia de MN em ensaios *in vitro* e de toxicologia genética, biodosimetria das radiações ionizantes e biomonitoramento de populações tem aumentado ao longo das últimas duas décadas. A metodologia de CBMN, facilitando uma maior formação de micronúcleos, é recomendada pela Agência Internacional de Energia Atômica, AIEA, como uma forma de biodosimetria a ser usada no monitoramento da exposição às radiações ionizantes⁴⁷ e pela OCDE (Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico) para testes *in vitro* de toxicologia genética⁴⁸. A análise da frequência de MN aplicando a metodologia CBMN em linfócitos humanos também pode auxiliar em exames preditivos para problemas na gravidez, risco de câncer e mortalidade por doença cardiovascular⁴⁹⁻⁵¹. Trata-se de um bioindicador importante na avaliação de risco.

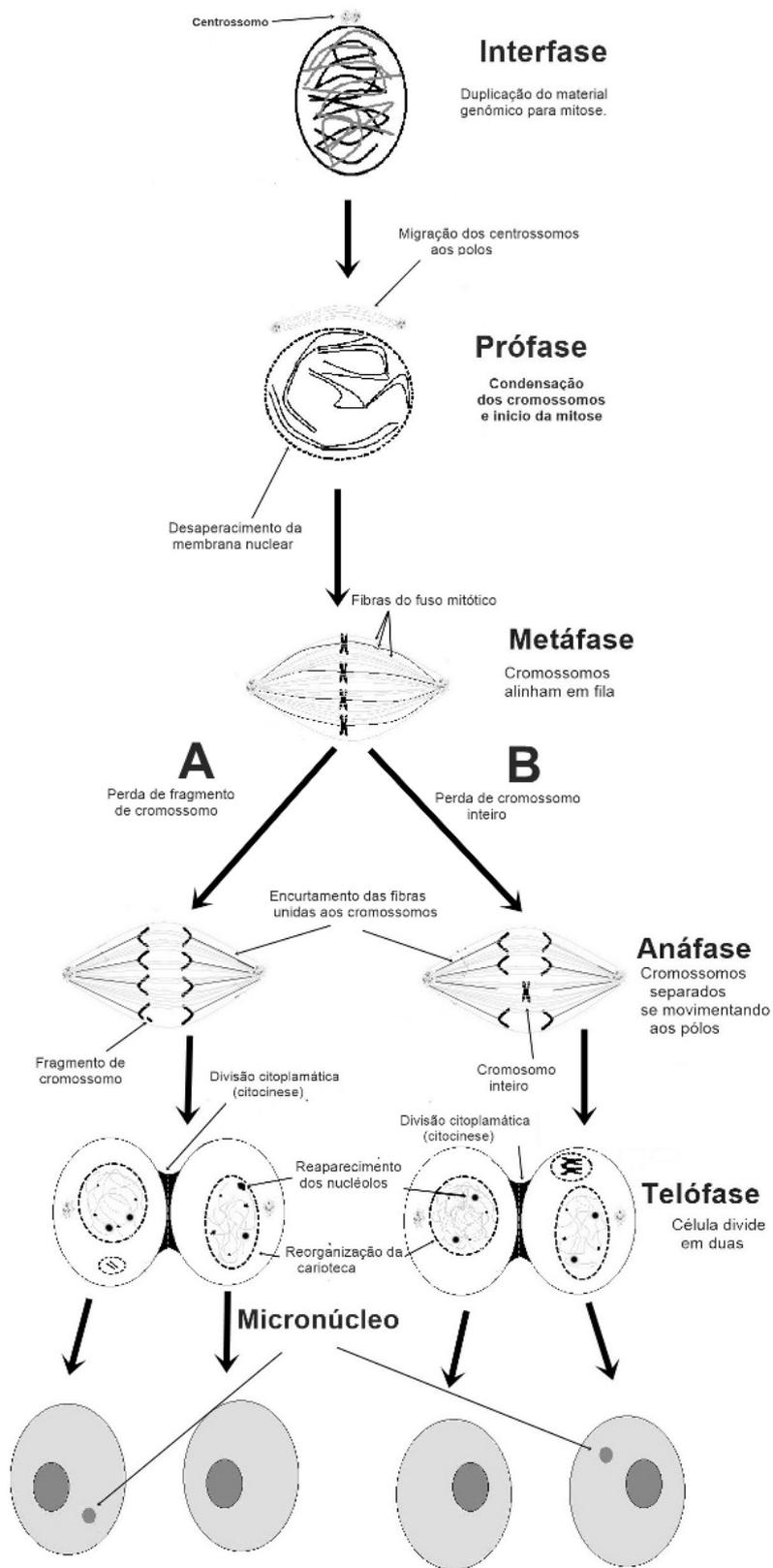


Figura 2 Esquema de formação de micronúcleos sem bloqueio da citocinese
 Fonte: Elaborada pelos autores

Os micronúcleos são normalmente observados em células imediatamente após a divisão nuclear, em telófase, sob a forma de células binucleadas que podem ser acumuladas por meio do bloqueio de citocinese com o uso de *citocalasina B* (CtB)⁴⁵.

No caso de pesquisas que utilizam células primárias, os micronúcleos formados *in vivo* podem também ser avaliados. É o que ocorre no caso de linfócitos primários não cultivados e de células epiteliais recolhidas das regiões bucal, nasal ou mucosa urotelial^{43,52-54}.

Para células que normalmente apresentam um baixo índice mitótico, os danos nos cromossomos só podem ser razoavelmente expressos na forma de micronúcleos se as células forem estimuladas a se dividir. No entanto, alguns tecidos apresentam uma alta capacidade de regeneração e, portanto, possuem células com alto índice mitótico. Nesse caso, a identificação dos micronúcleos e o cálculo de sua frequência podem ser feitos a partir das células primárias coletadas sem necessidade de induzi-las a se dividir. As células na mucosa bucal são um exemplo desse tipo de modelo com alta taxa de divisão. Além disso, trata-se de tecido acessível para amostragem de uma forma minimamente invasiva. Este método de amostragem é cada vez mais utilizado em estudos epidemiológicos moleculares para investigar o impacto da nutrição, estilo de vida e exposição a agentes estressores⁴².

As células binucleadas ocasionalmente apresentam pontes nucleoplásmicas (PNP) entre os núcleos. Estes são provavelmente cromossomas dicêntricos em que os dois centrômeros foram deslocados para polos opostos da célula⁴².

O teste para avaliação da ocorrência de micronúcleos é largamente utilizado em estudos de exposição a vapores de gasolina. Em 1998, Bukvic et al. avaliaram sua frequência num grupo de frentistas e seus resultados mostraram uma relação direta do tempo de exposição (avaliado pelos anos na função) com a frequência de micronúcleos. Estudos recentes realizados por outros grupos reforçam tais resultados, validando a utilização desse indicador por sua sensibilidade à exposição aos vapores de gasolina^{8,25,55}.

Teste de aberrações cromossômicas

As aberrações cromossômicas se dividem em numéricas e estruturais, e o aumento de sua ocorrência indica a presença de fatores estressantes sobre um determinado tecido, órgão ou organismo. E por essa característica, a ocorrência de aberrações cromossômicas (ACs) representa um importante biomarcador de efeito quando se busca prevenir um processo de doença, já que o aumento na frequência de ACs ainda não caracteriza um desfecho nocivo ao indivíduo⁵⁶⁻⁵⁸.

Um dos métodos diretos de avaliação da genotoxicidade em populações expostas de forma ambiental ou ocupacional, acidental ou intencionalmente, é a avaliação das mudanças ocorridas no DNA, visualizadas ao microscópio óptico através dos cromossomos de células em metáfase. Essa avaliação é realizada por meio do teste denominado “teste de avaliação cromossômica”. Esse teste consiste em preparar uma cultura de linfócitos T a partir de uma amostra de sangue, interromper sua atividade na metáfase – etapa do processo de mitose onde os cromossomos encontram-se sob a forma mais espiralada e, portanto, bem definidos – observar e quantificar, ao microscópio (ampliação de 1000 vezes), a ocorrência de alterações estruturais nos cromossomos. Trata-se de uma metodologia bem estabelecida e validada^{22,23,59-61}.

As alterações cromossômicas numéricas incluem aneuploidia e euploidia. Aneuploidia é resultado de uma não disjunção mitótica, quando os cromossomos se desprendem do fuso mitótico no processo de divisão da célula-mãe, o que gera então duas células-filhas com número incorreto de cromossomos, normalmente um par a mais ou a menos (trissomia e monossomia, respectivamente).

Alguns estudos relacionaram a trissomia do cromossomo 21 a um estágio de “pré-leucemia”, tendo visto que pacientes com este câncer têm alta incidência dessa alteração em nível celular⁶²⁻⁶⁴. Euploidia é o fenômeno onde uma célula apresenta um valor múltiplo do número de cromossomos haplóides (n). A sobrevivência de humanos nessa condição é inviável, resultando em abortos espontâneos ou natimortos. Entretanto, essa condição é comum, por exemplo, entre espécies vegetais⁶⁵. Tal fenômeno pode ter origem em: falhas do processo de meiose dos gametas, que passam por divisões incompletas; fertilização do ovócito por dois espermatozoides; ou por falha mitótica durante o processo embrionário^{65,66}.

As alterações cromossômicas estruturais incluem quebras, deleções, formação de anéis, translocações e inversões⁶⁷⁻⁷². O dano sobre as ligações fosfodiéster entre os nucleotídeos que formam as fitas de DNA se reflete também sobre sua forma mais condensada. A quebra do DNA pode ter dois desfechos: com a quebra de dupla fita sem correção, são observadas as aberrações cromossômicas, gerando cromossomos incompletos (que podem se tornar acêntricos ou tomar formato de anéis) e fragmentos cromossômicos; e com uma quebra reparada, podem ocorrer translocações do DNA, ou seja, quando um fragmento de um cromossomo se une a outro. Em ambos os casos, os efeitos, quando da leitura dessas fitas, são variados, e vão desde a não expressão de um gene à expressão de um oncogene que, em sua posição original, era regulado. As quebras, sejam elas simples ou duplas, representam um dano recorrente,

fruto dos processos naturais do organismo ou de exposições a agentes genotóxicos, definidos clastogênicos (xenobióticos que quebram cromossomos). Os mecanismos de correção se encarregam de impedir que esses erros tenham maiores consequências,

reparando-os. No entanto, o processo de correção de quebras pode ocorrer de forma incorreta, resultando em outras aberrações cromossômicas estruturais, como deleções, formação de anéis, translocações e inversões, conforme mostrado na **Figura 3**⁷³.

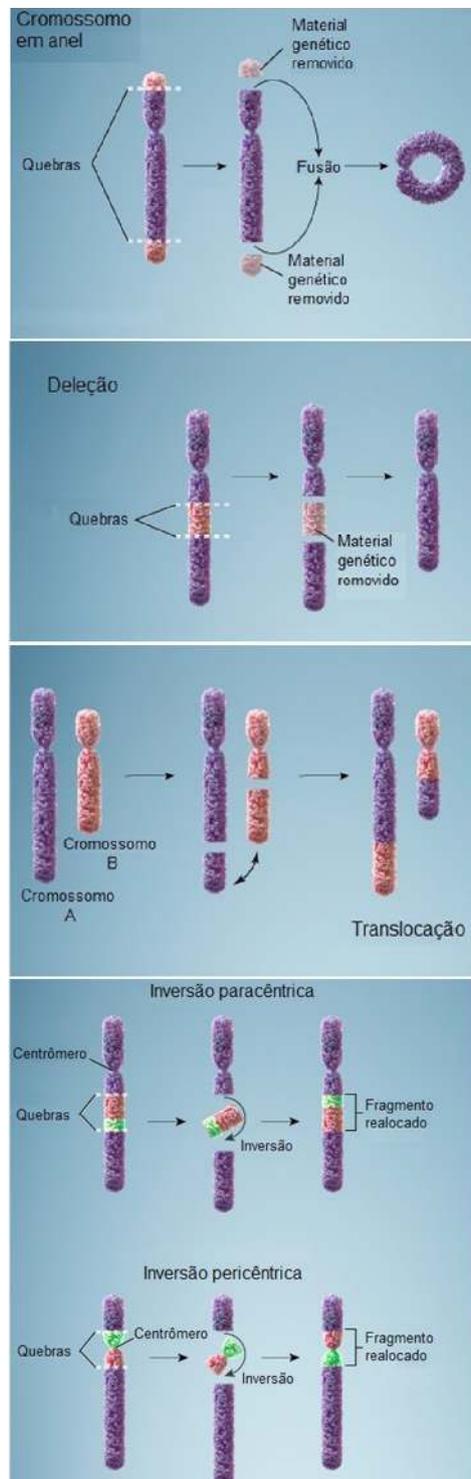


Figura 3 Esquemas de aberrações cromossômicas. A) formação de anel cromossômico; B) deleção; C) translocação; D) inversão paracêntrica; E) inversão pericêntrica

Fonte: adaptado de Lister Hill National Center for Biomedical Communications⁷³

No processo de deleção ocorre a perda de um fragmento do cromossomo. Deleções podem ser terminais, quando o cromossomo perde o final de um de seus braços, ou intersticiais, quando a deleção ocorre no meio do braço e a parte terminal deste se une a ele. A formação de anéis ocorre quando um cromossomo perde suas terminações dos braços p (braço curto) ou q (braço longo), com posterior junção de seus braços. A translocação é o processo de transferência de um fragmento do cromossomo para outro, não homólogo, enquanto na inversão um fragmento do cromossomo é formado e realocado no mesmo cromossomo, mas invertido. Uma inversão pode ser pericêntrica, incluindo seu centrômero no fragmento invertido, ou paracêntrica, quando o centrômero não está incluído no fragmento invertido. Na análise visual do cariótipo, como nos testes de aberrações cromossômicas, as inversões e translocações só são visíveis caso a forma dos cromossomos difira substancialmente da configuração normal. Entretanto, quebras e formações de anéis são visíveis em microscópio óptico⁷⁴, como mostra a visualização de uma amostra na **Figura 4**.

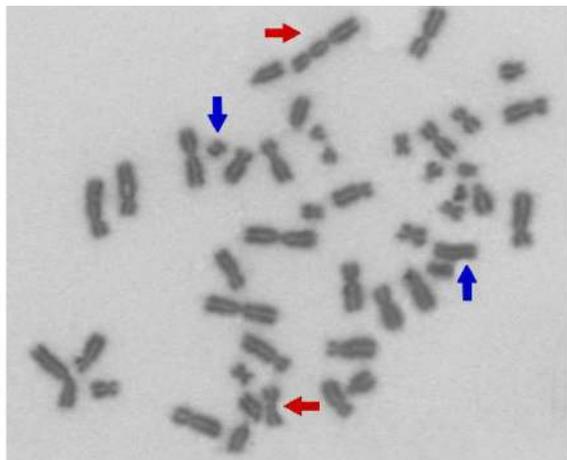


Figura 4 Aberrações cromossômicas visualizadas ao microscópio óptico, com ampliação de 1000 vezes. As setas vermelhas mostram cromossomos dicêntricos, e as azuis, fragmentos

Fonte: Elaborada pelos autores

Linfócitos T de sangue periférico são uma matriz bem estabelecida para a realização do teste de avaliação cromossômica em casos de exposição ambiental ou ocupacional a agentes genotóxicos, e têm sido cada vez mais usados em estudos de exposição por constituir um grupo celular que se encontra predominantemente em estágio pré-sintético de DNA, com atividades bioquímicas e fisiológicas mínimas, assim como pela sua capacidade de permear por diversos órgãos^{56,67,75,76}.

Mais de um teste pode ser usado para a avaliação de aberrações cromossômicas. O teste de avaliação cromossômica quantifica quebras, *gaps* (sendo esses dois primeiros os mais comumente encontrados em

exposições por frentistas), formação de fragmentos e anéis, e tem sido utilizado por grupos de pesquisa no Brasil e em outros países onde a profissão de frentista persiste^{22,25,77,78}.

Uma segunda forma de avaliação de aberrações cromossômicas se dá pela análise da troca de cromátides irmãs, onde dois (ou mais) cromossomos trocam uma de suas cromátides por outra de outro cromossomo. De 1998²¹ a 2014⁷⁸ grupos de estudos utilizaram essa técnica para avaliar o efeito de uma exposição ocupacional a vapores de combustíveis.

Uma terceira técnica também tem sido utilizada nesse âmbito. A Hibridização Fluorescente *in situ* (FISH) marca, com o auxílio de sondas, *loci* específicos nos cromossomos de interesse para observar translocações, inversões e outras aberrações. Carere et al.²⁰, Santiago et al.⁷⁹ e seus colaboradores publicaram artigos sobre a avaliação de dano causado por exposição a vapores de combustíveis usando FISH, tendo translocações e deleções como as aberrações mais comuns.

O trabalho de Santos-Mello e Cavalcante⁸⁰ foi um dos primeiros artigos brasileiros a avaliar aberrações cromossômicas em atendentes de postos de gasolina, tendo encontrado relação entre a exposição e a ocorrência de deleções cromossômicas num grupo de 49 frentistas, com ocorrência neste grupo 11 vezes maior em comparação a um grupo controle de 24 sujeitos. O estudo de Çelik e Akbas⁷⁷, que avalia através de ACs e *sister chromatid exchange* (SCE) o efeito da exposição ocupacional a vapores de combustíveis em um grupo de 30 frentistas (15 desses fumantes) e 30 sujeitos não expostos ocupacionalmente (também composto por 15 fumantes), mostra que a exposição sofrida pelos trabalhadores, somada ao hábito de fumar, é responsável por um aumento significativo nas taxas de ocorrência de aberrações cromossômicas e troca de cromátides irmãs, evidenciando o efeito da exposição sobre o sistema hematopoiético. Entretanto, nos últimos 5 anos, estudos com o mesmo objetivo (avaliar o impacto genotóxico de uma exposição ocupacional a vapores de combustíveis) foram publicados^{22,25,78}, e, apesar de todos apontarem para um impacto negativo da exposição sobre o material genético dos trabalhadores, os três estudos supracitados concordam que o teste de aberrações cromossômicas não é sensível o suficiente para captar os efeitos da exposição a baixas doses de benzeno, tendo visto alterações significativas (em comparação a grupos não ocupacionalmente expostos pareados por idade) em outros testes de genotoxicidade, como ensaio cometa, troca de cromátides irmãs e micronúcleo.

Identificação de polimorfismos genéticos

A molécula de DNA é altamente estável e se replica com enorme precisão, fidelidade e velocidade, já que a integridade do genoma é importante para manter as

características da espécie e estas serem transmitidas para as novas gerações. Contudo, surgem novos alelos em todos os organismos, alguns espontaneamente, outros induzidos como resultado da exposição à radiação e substâncias químicas no ambiente. Os polimorfismos são caracterizados pela ocorrência simultânea em uma mesma população de duas ou mais formas distintas de um gene (alelos), que se caracterizam por variações nas sequências de nucleotídeos, tais como deleções, inserções ou substituições de nucleotídeos, e duplicação ou deleção de genes. As consequências moleculares causadas pelas mutações e/ou polimorfismos irão depender do local em que elas ocorrem no genoma. A diferença entre mutações e polimorfismos está na frequência com que eles ocorrem na população. Assim, um gene é considerado polimórfico quando o alelo menos frequente ocorre na população com uma frequência de pelo menos 1%, enquanto a mutação ocorre em menor frequência⁸¹.

A ocorrência de apenas duas possibilidades de nucleotídeos na sequência do DNA é denominada substituição de um único nucleotídeo (*single nucleotide polymorphism* - SNP). Os SNPs são altamente frequentes no genoma humano e ocorrem cerca de uma vez a cada 1.000 pares de bases. No SNP, a partir das combinações geradas pelos dois alelos de um mesmo gene é possível formar três genótipos diferentes (homozigoto selvagem, heterozigoto e homozigoto variante), que podem ou não diferir em fenótipos⁸².

As variações alélicas podem resultar em alteração da expressão ou da funcionalidade dos seus produtos gênicos podendo interferir tanto na toxicocinética quanto na toxicodinâmica de uma substância tóxica. Assim, a identificação de polimorfismos em vias envolvidas com a toxicidade de agentes potencialmente tóxicos no ambiente de trabalho impõe que a exposição seja avaliada e monitorada de forma individual.

Os polimorfismos em genes que codificam enzimas metabólicas têm sido cada vez mais utilizados a fim de tornar os estudos de exposição a substâncias tóxicas mais abrangentes com capacidade de identificar subgrupos susceptíveis à exposição⁸³. A partir do metabolismo de solventes, especialmente do benzeno, podemos destacar alguns polimorfismos como indicadores de susceptibilidade genética à exposição. Diversos estudos têm mostrado que indivíduos expostos ao benzeno apresentam uma larga faixa de variação nos níveis de biomarcadores de exposição, o que sugere que os polimorfismos metabólicos podem influenciar na susceptibilidade à toxicidade do benzeno⁸⁴.

O metabolismo do benzeno e de outros xenobióticos em metabólitos mais hidrofílicos são fundamentais para a eliminação desses compostos

e, conseqüentemente, o término da sua atividade biológica. Essa conversão do benzeno em metabólitos mais polares e inativos, geralmente é de natureza enzimática, e esses sistemas enzimáticos estão localizados, principalmente, no fígado, embora qualquer tecido examinado tenha alguma atividade metabólica. O benzeno é metabolizado, a princípio, no fígado, gerando metabólitos como fenol, hidroquinona (HQ), catecol, ácido trans-trans-mucônico (tt-MA) e ácido s-fenil mercaptúrico (s-PMA), sendo alguns deles ainda mais tóxicos que o próprio benzeno. Alguns desses metabólitos alcançam a medula óssea, e são convertidos por oxidação em aquinonas tóxicas. Estas, por sua vez, geram espécies reativas do oxigênio (ROS), as quais promovem dano celular⁸⁵.

Dentre os polimorfismos de interesse destacam-se os presentes nos genes: citocromo P450 2E1 (CYP2E1), glutatona S-transferase T1 (GSTT1), glutatona S-transferase M1 (GSTM1), mieloperoxidase (MPO) e NAD(P)H quinina oxireductase-1 (NQO1), pois são considerados pela literatura científica como fatores de susceptibilidade genética à exposição a solventes encontrados na gasolina (principalmente o benzeno), isto é, que podem tornar o indivíduo mais sensível aos efeitos destas substâncias no organismo^{83,86,87}.

As GSTs são enzimas de grande importância na desintoxicação do óxido de benzeno, sendo um fator de risco a identificação de polimorfismo nulo (ausência do gene que codifica a enzima). A NQO1 também é uma enzima de desintoxicação e sua atividade pode ser diminuída decorrente da variação nos alelos. Indivíduos homozigotos portadores dos alelos TT e heterozigotos portadores de apenas um alelo T tem sua atividade enzimática diminuída, aumentando assim o risco na intoxicação. A MPO é uma enzima de primeira fase no metabolismo de substâncias químicas e forma metabólitos ainda mais tóxicos. Dessa forma, a variação do genótipo em que se encontra o alelo G no lugar do alelo A é considerado um fator de defesa, logo, quando o alelo A está presente indica uma vulnerabilidade genética. Da mesma forma, as CYPs2E1 em suas formas selvagens são consideradas fatores de risco, por também produzirem metabólitos tóxicos, suas variantes genótípicas são representadas pelos números 1 e 2 (1 para a variante selvagem da CYP2E1 *DraI* e 2 para variante selvagem da CYP2E1 *RsaI*)^{83,87}.

Atualmente, existem diferentes métodos de identificação de polimorfismos envolvidos com a susceptibilidade à exposição a diferentes agentes tóxicos. Dentre as principais técnicas de detecção de polimorfismos destacam-se: a reação em cadeia da polimerase (PCR) e suas variações, como por exemplo, o PCR de Polimorfismo de Comprimento dos Fragmentos de Restrição (RFLP), o sequenciamento,

o PCR em tempo real e cromatografia líquida desnatante de alta performance (DHPLC)^{85,86,88-95}.

Existe uma discussão em torno da bioética em relação às análises dos polimorfismos, já que eles podem ser indicadores de um indivíduo mais sensível àquela exposição ocupacional. Considerando que o ambiente de trabalho deve ser adaptado ao trabalhador e não o contrário, a melhor forma de divulgação dos dados é utilizando-se de resultados populacionais e não individuais, preservando assim a identidade, saúde e o emprego do profissional⁹⁶.

Adutos de DNA e adutos de proteína

No processo de metabolização hepática do benzeno catalisado pela CYP450 2E1 são gerados diversos metabólitos, sendo que alguns, como o óxido benzeno, 1,2 e 1,4-benzoquinonas são considerados reativos, pois estes têm a propriedade de se conjugar a grupos-SH (cisteínas) livres das macromoléculas (proteínas ou DNA) formando adutos^{97,98}; Estes adutos foram classificados como pré-cancerígenos⁹⁹. Os adutos formados por reação desses intermediários reativos com macromoléculas, como por exemplo, a albumina ou a hemoglobina, podem ser utilizados como biomarcadores de dose biologicamente efetiva, ou seja, agem como um indicador biológico que permite inferir uma correlação entre a intensidade da exposição e/ou o efeito biológico do benzeno sobre o ser humano¹.

Os diversos metabólitos do benzeno possuem diferentes potenciais toxicológicos, sendo a hidroquinona e a p-benzoquinona (pBQ) os principais metabólitos apontados como sendo responsáveis pela sua ação hematotóxica¹⁰⁰. Estudos *in vitro* sugerem que a pBQ seja altamente reativa com o DNA e leve a formação de anéis benzenos exocíclicos, sendo um de base pirimidínica, 3, N4-benzeteno-2'-dC (pBQ-dC), e dois de bases purínicas, 1, N6-benzeteno-2'-dA (pBQ-dA) e 1, N2-benzeteno-2'-dG (pBQ-dG)⁹. A formação desses adutos de DNA é claramente prejudicial à integridade genômica, e supõe-se ter um papel central na carcinogênese química⁹.

Os adutos de DNA são caracterizados como produtos de reações químicas que resultam na adição de grupos químicos ao DNA e podem gerar diversas consequências, desde mutações proto-oncogenes ou formação de genes supressores de tumor até a iniciação de um processo de carcinogênese¹⁰¹. A base do DNA mais suscetível a sofrer essa adição é a guanina, devido à sua conformação estrutural, porém já existem estudos que evidenciaram adutos formados com as demais bases¹⁰².

Os adutos de DNA podem ser utilizados como biomarcadores de exposição, uma vez que sua formação está diretamente relacionada com a carga de exposição que o indivíduo está submetido, e sua

detecção e quantificação se torna essencial para promover a vigilância em saúde do indivíduo exposto. Os métodos mais comumente utilizados para a detecção e quantificação desse biomarcador são os imunoenaios, marcação com fósforo radioativo (*32P- Postlabelling*) e HPLC/MS/MS¹⁰³.

Os adutos de proteína são formados pela reação das proteínas presentes no sangue, como a hemoglobina e a albumina, com substâncias eletrofílicas, como o óxido de etileno, ou com metabólitos eletrofílicos produzidos nos processos de biotransformação, como a 1,2-benzoquinona obtida da biotransformação do benzeno. Os adutos são formados por mecanismos de reação distintos com os centros nucleofílicos disponíveis nos aminoácidos que constituem a proteína¹⁰⁴. Os sítios nucleofílicos da hemoglobina e da albumina são variáveis conforme o aminoácido, isto é, cada aminoácido possui um grupo reator, como o grupamento tiol livre da cisteína (Cys), o grupamento amina da histidina (His), triptofano (Trp), lisina (Lys) e o N-terminal, grupamento hidroxila da serina (Ser) e tirosina (Tyr) e o grupamento ácido carboxílico do ácido aspártico (Asp) e glutâmico (Glu) e o C-terminal¹⁰⁵. Além disso, o local de formação do aduto de proteína depende essencialmente da estrutura do xenobiótico e do seu metabólito. O tempo de permanência de cada aduto de proteína no organismo é estabelecido pelo tempo médio de residência dessas proteínas no organismo, que no caso da albumina são 28 dias, e da hemoglobina 63 dias em seres humanos^{106,107}.

Para a detecção e quantificação dos adutos de proteína, a técnica mais comumente empregada é a cromatografia gasosa ou líquida acoplada à espectrometria de massa, sendo o princípio o mesmo descrito para adutos de DNA, em que o tempo de retenção, relação massa/carga (m/z) e informações sobre a abundância dos íons da fragmentação das substâncias são comparados com uma coleção de informação contida na biblioteca do software ou com o padrão isotópico adicionado durante o preparo da amostra para a elucidação do aduto presente na amostra¹⁰⁸.

Após a formação dos adutos de proteína, o organismo não possui a capacidade de promover o reparo dessa alteração, como é possível observar nos adutos de DNA. Além disso, os adutos formados com proteínas são muito mais abundantes do que os formados com o DNA, devido à quantidade relativa de cada uma presente no sangue, isto é, 1ml de sangue contém cerca de 150 mg de hemoglobina, 30 mg de albumina que está presente no soro e de 0,003 a 0,008 mg de DNA¹⁰⁴. Sendo assim, a quantificação de adutos de proteína em uma amostra sanguínea pode ser correlacionada diretamente com a dose do xenobiótico que o indivíduo está exposto, sendo, dessa forma, denominados como indicadores de dose interna

utilizados para avaliação da exposição e relacionados com efeitos tardios à saúde¹⁰³.

Epigenética

A investigação de alterações genéticas está sendo considerada uma das ferramentas fundamentais na avaliação da exposição humana a xenobióticos. O avanço da investigação molecular sugere que avaliar unicamente os fatores genéticos possa não ser suficiente para explicar satisfatoriamente muitos processos quanto à etiologia das doenças. Nesse cenário, modificações epigenéticas, definidas como modificações que podem afetar a expressão de um gene ou as propriedades de seu produto, mas que não alteram suas sequências de bases nucleotídicas, juntamente com fatores genéticos, parecem atuar nos mecanismos de base responsáveis pelos efeitos biológicos observados em várias classes de exposições ambientais, tornando testes genéticos insuficientes ao lidar com expressão gênica. A epigenética trata do estudo das alterações de expressão gênica que ocorrem sem alteração na sequência de DNA¹⁰⁹ e que estão relacionadas a sinais intrínsecos e ambientais¹¹⁰. Os mecanismos epigenéticos chave descritos são as modificações de histonas, por meio de interações moleculares distintas; a regulação gênica pós transcricional, feita pela expressão de RNA não codificante, comumente denominado microRNA (miRNA) e a metilação covalente de sítios de DNA, sobretudo de ilhas CpG (citosina-fosfato-guanina), regiões onde estão localizados 50-60% dos promotores gênicos, sendo este o mecanismo epigenético mais estudado e melhor compreendido¹¹¹⁻¹¹³.

Bollati e Baccarelli¹¹² discutem que os efeitos sobre a saúde gerados pela exposição ambiental devem ser compreendidos a partir da interação entre processos genéticos e epigenéticos. Nas interações gene-ambiente, os polimorfismos genéticos que modificam os efeitos das exposições ambientais são transmitidos transgeracionalmente de acordo com a genética mendeliana (dominante, codominante, recessivo) para determinar os níveis de expressão ou função de determinada proteína codificada pelo *locus* do gene envolvido. Um segundo processo bem estabelecido de interação inclui os efeitos diretos de exposições ambientais sobre o genoma, por exemplo, danos ao DNA e/ou mutações. De forma similar às modificações de efeito mostradas/postuladas para os polimorfismos genéticos, as diferenças epigenéticas, que determinam os riscos a determinada doença, poderiam tornar os indivíduos mais ou menos vulneráveis aos agentes agressores ambientais. No entanto, um conceito formal de interação epigene-ambiente ainda não foi desenvolvido e os autores desconhecem exemplos de interações epigene-ambiente nos estudos de saúde ambiental ou de toxicologia. Em estudos ambientais, a flexibilidade de estados epigenéticos tem gerado um

interesse crescente na avaliação das alterações diretas que as exposições ambientais podem produzir nos estados epigenéticos, incluindo mudanças na metilação do DNA e modificações das histonas¹¹².

Além de indicadores de genotoxicidade, a avaliação de alterações epigenéticas no DNA é importante para a identificação dos mecanismos de ocorrência dos desfechos desencadeados pela exposição ao benzeno, como leucemia¹¹⁴. Bollati et al.¹¹⁵ avaliaram agentes de trânsito e atendentes de postos de gasolina de Milão, na Itália, e demonstraram que em trabalhadores submetidos a baixos níveis de exposição ao benzeno no ar ocorre uma hipometilação dose-dependente global no DNA, i.e., os autores verificaram que a metilação diminui nos elementos repetitivos (LINE-1 e Alu I). Smith et al.¹¹² demonstraram que alterações epigenéticas são um importante mecanismo no processo que leva à indução da leucemia desencadeada por exposição ao benzeno.

Dentre todos os avanços na análise de metilação de DNA, a maioria dos métodos, em locais específicos, baseia-se na abordagem de modificação do DNA com bissulfito de sódio para converter citosinas não metiladas em uracila, deixando inalteradas as citosinas metiladas¹¹⁶. Permitindo distinguir entre DNA metilado e não metilado por meio de amplificação por PCR e análise dos produtos do PCR. Que durante a amplificação as citosinas não metiladas (agora uracilas) amplificam como timina e as citosinas metiladas amplificam como citosina.

Expressão gênica/proteômica

Nas últimas décadas, o estudo das ciências ômicas, tais como Genômica, Transcriptômica, Proteômica, Metabolômica, Interatômica, Epigenômica, entre outras, está ganhando importância em todas as áreas do conhecimento biológico, incluindo a toxicologia, principalmente a fim de obter diagnósticos precoces, antes do aparecimento de sintomas clínicos causados por exposições ambientais e ocupacionais. A proteômica é uma das mais importantes destas ciências e pode ser considerada como eixo de conexão entre as diferentes ciências ômicas, uma vez que permite avaliar de forma direta os efeitos sobre as moléculas de DNA, RNA, por meio da análise do produto final dos eventos moleculares, as proteínas. Isso é possível por meio da avaliação dos perfis proteicos, ou seja, da análise dos conjuntos de proteínas resultantes dos processos de replicação, transição e tradução, sendo assim o perfil proteômico avalia as alterações expressas por meio do resultado desses processos, que é a expressão proteica. Estudos proteômicos tendem a ser mais complexos se comparados a estudos genômicos, uma vez que o genoma de uma célula é aproximadamente constante, enquanto o proteoma

é diferente entre células diferentes do mesmo organismo, e entre as mesmas células em momentos diferentes do ciclo celular, por exemplo, durante exposições a agentes tóxicos, ou em caso de doenças¹¹⁷. O proteoma é resultante de modificações que podem ocorrer mesmo sem alterações na sequência genômica, como metilação, fosforilação, acetilação ou outras modificações epigenéticas, que alteram a expressão gênica e, portanto, o perfil proteômico.

Inicialmente, abordagens desse tipo foram utilizadas em estudos de susceptibilidade genética a diferentes doenças. Nos últimos anos, o alvo das pesquisas começou a se ampliar, abrangendo um cenário maior, e inserindo nesse contexto estudos de perfis mais complicados e cuja direta ligação biológica ainda não está bem esclarecida, além de estudos sobre exposição a alguns agentes químicos, como o

benzeno^{114,118-120}, embora ainda se encontrem poucos trabalhos na literatura com essa abordagem.

Esse tipo de análise de perfis proteômicos com técnicas de proteômica e de genômica permite olhar pela resposta proteica completa e complexa e evitar analisá-la de maneira fracionada, o que pode levar a compreensões equivocadas desses processos. Diversas são as técnicas empregadas na avaliação dos perfis proteômicos, entre as quais as principais são Eletroforese Bidimensional, *Western blot*, *Microarray*, *Peptide Mass Fingerprinting*, Espectrometria de Massa e PCR Quantitativo em Tempo Real¹¹⁹⁻¹²⁵. Trabalhos na literatura (**Tabela 2**) mostram que essas técnicas podem ser empregadas para a identificação de potenciais novos biomarcadores específicos para avaliar a exposição a agentes químicos, como o benzeno.

Tabela 2 Artigos identificados na base PubMed empregando técnicas de proteômica em diferentes populações de trabalhadores expostos ao benzeno, publicados no período 2000-2010

<i>Autor</i>	<i>Ano</i>	<i>Técnica</i>	<i>Matriz</i>	<i>População</i>	<i>Conclusão</i>
Joo WA et al.	2003	Eletroforese Bidimensional Espectrometria de Massa <i>Western blot</i>	Proteínas plasmáticas/ Plasma	Trabalhadores de uma companhia de impressão expostos ao benzeno	Perfis proteômicos significativamente diferentes entre os expostos e os não expostos. TCR beta no plasma pode ser utilizado para a detecção precoce da exposição ao benzeno.
Joo WA et al.	2004	Eletroforese Bidimensional Ensaio Cometa Espectrometria de Massa	Proteínas plasmáticas/ Plasma	Trabalhadores de uma companhia de impressão expostos ao benzeno	Dano do DNA significativamente mais elevado nos expostos do que nos controles. TCR beta no plasma pode ser utilizado para a detecção precoce da exposição ao benzeno.
Forrest MS et al.	2005	PCR Quantitativo em Tempo Real <i>Microarray</i>	PBMC	Trabalhadores expostos de uma fábrica de sapatos	Os genes CXCL16, ZNF331, JUN, e PF4 são os mais afetados por exposição ao benzeno, podendo ser considerados potenciais biomarcadores para a exposição.
Vermeulen R et al.	2005	<i>Protein Chip Array</i> Espectrometria de Massa	Proteínas do soro/Soro	Trabalhadores expostos de uma fábrica de sapatos	A expressão reduzida das proteínas PF4 e CTAP-III é um potencial biomarcador dos efeitos biológicos iniciais da exposição ao benzeno, podendo desempenhar um papel nos efeitos de imunossupressão do benzeno.
Zhang L et al.	2010	Espectrometria de Massa <i>Microarray</i>	Sangue e urina	Diferentes populações expostas a níveis de benzeno altos (> 10ppm) e baixos (< 1ppm)	Genes e rotas alteradas com a exposição foram identificados com potencial para identificação de biomarcadores. Redução significativa na contagem de todas as células sanguíneas como o principal efeito fenotípico da exposição ao benzeno mesmo abaixo de 1 ppm.

TCR beta: *T cell receptor beta*

PBMC: *peripheral blood mononuclear cell* (células mononucleares do sangue periférico)

Oh et al.¹²³, empregaram proteoma total de urina para a análise de eletroforese bidimensional combinada com LC-MS/MS; Joo et al.^{120,122} identificaram que TCR beta no plasma pode ser utilizado para a detecção precoce da exposição ao benzeno; Forrest et al.¹²⁴ e Vermeulen et al.¹²⁵ identificaram, respectivamente, genes e proteínas mais afetados por exposição ao benzeno, podendo ser considerados potenciais biomarcadores; Zhang et al.¹²⁰ avaliaram exposição ao benzeno em concentrações altas (>10 ppm) e baixas (<1 ppm) empregando Espectrometria de Massa e *Microarray* em sangue e urina. Estes autores identificaram redução significativa na contagem de todas as células sanguíneas na exposição ao benzeno mesmo abaixo de 1 ppm e na formação de colônias progenitoras de células-tronco da medula óssea; sendo as células progenitoras mais sensíveis aos efeitos de benzeno do que as células sanguíneas maduras, a exposição é tida como provável causa da hematotoxicidade observada¹²⁰.

Conclusões

Os biomarcadores de genotoxicidade para avaliação da exposição ocupacional em postos de gasolina mostram potencial, em conjunto com os indicadores de exposição, para identificar precocemente danos associados à exposição.

Apesar dos indicadores de exposição serem químico-específicos, eles podem não traduzir o amplo potencial tóxico das substâncias químicas, pois substâncias genotóxicas e/ou carcinogênicas podem exercer danos ao material genético mesmos em doses muito baixas, não tendo exposição segura para as mesmas. Por isso, a crescente utilização de biomarcadores de efeito genotóxico ou de genotoxicidade, os quais podem avaliar os danos causados ao material genético. Essas lesões genômicas, após serem processadas pelo aparato enzimático celular de reparo do DNA, podem ser corrigidas ou levadas a mutações e danos cromossômicos, como por exemplo, à formação de aberrações cromossômicas e micronúcleos. Por isso, técnicas como de avaliação de aberrações cromossômicas e micronúcleo são muito utilizadas em estudos citogenéticos e mutagênicos^{16,54,58}.

Uma vez que danos no DNA são frequentemente célula e tecidos específicos, uma técnica como a do ensaio cometa, que permite a detecção de danos e seu reparo em uma única célula, e conseqüentemente, em determinada subpopulação celular, é de extrema relevância para a avaliação de compostos genotóxicos. Sendo assim, o teste de ensaio cometa não é utilizado para detectar mutações, mas sim lesões genômicas que, após serem processadas, podem resultar em mutações. Diferente das mutações, as

lesões detectadas podem ser também utilizadas em estudos de reparo do DNA, trazendo informações importantes sobre a cinética e o tipo de lesão reparada, embora não possibilite inferir sobre a fidelidade do processo de reparo^{32,40}.

Por sua vez, os adutos de DNA ou de proteína formados devido à exposição ocupacional podem ser utilizados tanto como biomarcadores de dose interna, assim como de efeito, ou seja, permitem inferir uma correlação entre a intensidade da exposição e/ou o efeito biológico do benzeno sobre o ser humano, sendo de grande relevância no biomonitoramento de populações expostas aos solventes presentes na gasolina¹.

Além disso, a avaliação da susceptibilidade individual, inicialmente realizada por análise de polimorfismos genéticos, mostrou-se ser insuficiente na explicação dos processos de desenvolvimento das diversas doenças. Nesse contexto, estudos epigenéticos e proteômicos surgiram com importantes e promissores testes que permitem avaliar de forma direta os efeitos sobre as moléculas de DNA, RNA, proteína e expressão gênica que parecem atuar nos mecanismos de base responsáveis pelos efeitos biológicos observados em várias classes de exposições ambientais¹¹².

Entretanto, como observado nessa revisão, nos últimos 20 anos, poucos foram os artigos usando estas técnicas para exposição ocupacional em postos de gasolina^{8,20-25,33,55,77-79,87,115,126}, provavelmente pelo limitado número de países que ainda têm atendentes de postos (como Brasil, Itália, Índia, Turquia, Tailândia e Filipinas), e pela dificuldade e incipiência de uso pelos grupos de pesquisa nestes países, além da alta flutuação da população de trabalhadores nos postos e dificuldades de estabelecimento de populações controle não expostas. Também podemos apontar a dificuldade de realização desses indicadores, cuja significância dos resultados exige um elevado número de participantes avaliados, e que muitas vezes resultam em dados contraditórios ou não esperados.

Como os indicadores de genotoxicidade são não específicos, porém sensíveis, eles podem responder a qualquer xenobiótico²³ e a avaliação deve ser feita por fatores concomitantes, buscando sua associação com indicadores de dose interna. Os estudos analisados indicam que a exposição ocupacional aos vapores de gasolina induz danos ao DNA, mostrados pelo aumento nos indicadores de genotoxicidade como ensaio cometa, aberrações cromossômicas e frequência de micronúcleos^{8,23}, associados aos metabólitos do benzeno quando avaliados, como os níveis de t,t-MA. Os resultados evidenciam que se os danos no DNA causados pela exposição não forem reparados,

podem se expressar na formação de micronúcleos. O que, posteriormente, aumenta o risco de reações nocivas ao organismo⁸.

Por sua vez, a avaliação dos mecanismos epigenéticos, em conjunto com a avaliação das alterações no DNA, se faz necessária para uma compreensão mais ampla e realista das exposições a diferentes agentes químicos. A aplicação de técnicas proteômicas pode ampliar o ponto de vista da pesquisa, permitindo estudar possíveis correlações entre indicadores de dose interna, indicadores de genotoxicidade, polimorfismos

responsáveis pela maior suscetibilidade individual, facilitando o entendimento das possíveis correlações desses fatores com o perfil proteômico.

Portanto, o biomonitoramento com a utilização de diversas técnicas de avaliação dos efeitos genotóxicos, epigenéticos, de susceptibilidade e proteômicos, juntamente com a utilização de indicadores de exposição, parece ser um caminho promissor para uma ampla mensuração e interpretação da relação dose-efeito na avaliação da exposição e do risco de populações expostas ocupacionalmente em postos de combustíveis.

Contribuições de autoria

Valente D, Costa-Amaral IC, Carvalho LVB, Santos MVC, Silva CB, Rodrigues DRF, De Falco A, Teixeira LR, Oliveira MS, Perini JA, Larentis AL contribuíram substancialmente no projeto e delineamento, no levantamento de dados ou na sua análise e interpretação, elaboração do manuscrito ou tiveram contribuição importante na sua revisão crítica e aprovação final da versão publicada. Gonçalves ES, André LC, Sarcinelli PN, Sisenando HA, Mattos RCOC contribuíram substancialmente no projeto e delineamento, no levantamento de dados ou na sua análise e interpretação e aprovação final da versão publicada. Castro VS, Nogueira SM, Moreira JC contribuíram na elaboração do manuscrito e tiveram contribuição importante na sua revisão crítica e aprovação final da versão publicada.

Referências

1. Amorim LCA. O uso de biomarcadores na avaliação da exposição ocupacional a substâncias químicas. *Rev Bras Med Trab.* 2003; 1(2):124-32.
2. Oga S, Camargo MMA, Batistuzzo JAO, editores. *Fundamentos de Toxicologia.* 3. ed. São Paulo: Atheneu; 2008.
3. World Health Organization. *Biological Monitoring of Chemical Exposure in the Workplace Guidelines.* Genebra: Suíça; 1996;1:214 p.
4. Vasconcelos SML, Goulart MOF, Moura JBF, Manfredini V, Benfato MS, Kubota LT. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. *Quím Nova.* 2007; 30(5):1323-38.
5. Ribeiro LR, Salvadori DMF, Marques EE, editores. *Mutagênese Ambiental.* 1. ed. Canoas: ULBRA; 2003.
6. Collins AR, Azqueta A. DNA repair as a biomarker in human biomonitoring studies; further applications of the comet assay. *Mutat Res.* 2012;736(1-2):122-9.
7. Hays SM, Pyatt DW, Kirman CR, Aylward LL. Biomonitoring Equivalents for benzene. *Regul Toxicol Pharmacol.* 2012;62(1):62-73.
8. Moro AM, Charão MF, Brucker N, Durgante J, Baierle M, Bubols G, et al. Genotoxicity and oxidative stress in gasoline station attendants. *Mutat Res.* 2013; 754(1-2):63-70.
9. Guliaev AB, Hang B, Singer B. Structural insights by molecular dynamics simulations into specificity of the major human AP endonuclease toward the benzene-derived DNA adduct, pBQ C. *Nucleic Acids Res.* 2004;32(9):2844-52.
10. Jablonka E, Lamb MJ. *Evolução em quatro dimensões: DNA, comportamento e a história da vida.* São Paulo: Companhia das Letras; 2010.
11. International Agency for Research on Cancer. *Some Industrial Chemicals and DyeStuffs.* Monogr. Eval. Carcinogen. Risk Chem. Hum. 1982;29:1-398.
12. International Agency for Research on Cancer. *Benzene.* In: IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Lyon, France; 2012.
13. American Conference of Governmental Industrial Hygienists. *Threshold Limit Values for Chemicals Substances and Physical Agents and Biological Exposure Indices.* Cincinnati: OH; 2003.
14. World Health Organization. *Environmental Health Criteria 155. Biomarkers and Risk Assessment concept and Principles.* ICPS: Geneva; 1993.
15. Barale R. Genotossità del benzene. In: Minoia C, Apostoli P, Bartolucci GB, editores. *Il benzene: tossicologia, ambienti di vita e di lavoro.* Milão: Morgan; 1995. p. 41-50.
16. Arnold SM, Angerer J, Boogaard PJ, Hughes MF, O'Lone RB, Robison RH, et al. The use of biomonitoring data in exposure and human health

- risk assessment: benzene case study. *Crit Rev Toxicol*. 2013;43(2):119-53.
17. Sul D, Lee D, Im H, Oh E, Kim J, Lee E. Single strand DNA breaks in T- and B-lymphocytes and granulocytes in workers exposed to benzene. *Toxicol Lett*. 2002;134(1-3):87-95.
 18. Buschinelli JT. Manual de orientação sobre controle médico ocupacional da exposição a substâncias químicas. São Paulo: Fundacentro; 2014.
 19. World Health Organization. Biomarkers in risk assessment: Validity and validation. EHC 222. ICPS: Geneva; 2001.
 20. Carere A, Antoccia A, Cimini D, Crebelli R, Degrassi F, Leopardi P, et al. Genetic effects of petroleum fuels: II. Analysis of chromosome loss and hyperploidy in peripheral lymphocytes of gasoline station attendants. *Environ Mol Mutagen*. 1998; 32(2):130-8.
 21. Bukvic N, Bavaro P, Elia G, Cassano F, Fanelli M, Guanti G, et al. Sister chromatid Exchange (SCE) and micronucleus (MN) frequencies in lymphocytes of gasoline station attendants. *Mutat Res*. 1998;415(1-2):25-33.
 22. Fracasso ME, Doria D, Bartolucci GB, Carrieri M, Lovreglio P, Ballini A, et al. Low air levels of benzene: correlation between biomarkers of exposure and genotoxic effects. *Toxicol Lett*. 2010;192(1):22-8.
 23. Rekhadevi PV, Rahman MF, Mahboob M, Grover P. Genotoxicity in filling station attendants exposed to petroleum hydrocarbons. *Ann Occup Hyg*. 2010;54(8):944-54.
 24. Rosa JCF, Fiegenbaum M, Soledar AL, Claus MS, Nunes ADS, Cardoso VV. Cytogenetic evaluation and the association with polymorphisms the CPY1A1 and NR1I3 genes in individuals exposed to BTEX. *Environ Monit Assess*. 2012; 185(7):5883-90.
 25. Lovreglio P, Maffei F, Carrieri M, D'errico MN, Drago I, Hrelia P, et al. Evaluation of chromosome aberration and micronucleus frequencies in blood lymphocytes of workers exposed to low concentrations of benzene. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen*. 2014;770:55-60.
 26. Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cell. *Exp Cell Res*. 1988;175(1):184-91.
 27. Azqueta A, Arbillaga L, Cerain AL, Collins AR. Enhancing the sensitivity of the comet assay as a genotoxicity test, by combining it with bacterial repair enzyme. *FPG. Mutagen*. 2013;28(3):271-7.
 28. Collins AR, Dobson VL, Dusinká M, Kennedy G, Stetina R. The comet assay: what can it really tell us? *Mutat Res*. 1997;375(2):183-93.
 29. Oliver PL. DNA damage and repair in individual cells: applications of the comet assay in radiobiology. *Int J Radiat Biol*. 1999;75(4):395-405.
 30. Speit G, Trenz K, Schütz P, Rothfuss A, Merk O. The influence of temperature during alkaline treatment and electrophoresis on results obtained with the comet assay. *Toxicol Lett*. 1999;110(1-2):73-8.
 31. Cortés-Gutiérrez EI, Dávila-Rodríguez MI, Fernández JL, López- Fernández C, Gosálbez A, Gosálvez J. New application of the comet assay: Chromosome-Comet Assay. *J Histochem Cytochem*. 2011;59(7):655-60.
 32. Azqueta A, Collins AR. The essential comet assay: a comprehensive guide to measuring DNA damage and repair. *Arch Toxicol*. 2013;87(6):949-68.
 33. Andreoli C, Leopardi P, Crebelli R. Detection of DNA damage in human lymphocytes by alkaline single cell gel electrophoresis after exposure to benzene or benzene metabolites. *Mutat Res*. 1997;377(1):95-104.
 34. Azqueta A, Shaposhnikov S, Collins AR. DNA oxidation: Investigating its key role in environmental mutagenesis with the comet assay. *Mutat Res*. 2009; 674(1-2):101-8.
 35. Gurer-Orhan H, Sabir HU, Ozgünes H. Correlation Between Clinical Indicators of Lead Poisoning and Oxidative Stress Parameters in Controls and Lead-Exposed Workers. *Toxicology*. 2004;195(2-3):147-54.
 36. Esterbauer H, Wag G, Puhl H. Lipid peroxidation and its role in atherosclerosis. *Br Med Bull*. 1993;49(3):566-76.
 37. Lyons TJ. Glycation and oxidation: a role in the pathogenesis of atherosclerosis. *Am J Cardiol*. 1993;71(6):26B-31B.
 38. Vinson JA. Oxidative stress in cataracts. *Pathophysiol* 2006; 13(3):151-62.
 39. Grollman AP, Moriya M. Mutagenesis by 8-oxoguanine: an enemy within. *Trends Genet*. 1993;9(7):246-9.
 40. Collins AR. Investigating oxidative DNA damage and its repair using the comet assay. *Mutat Res*. 2009;681(1):24-32.
 41. Evelo CT, Bos RP, Borm PJ. Decreased glutathione content and glutathione S-transferase activity in red blood cells of coal miners with early stages of pneumoconiosis. *Br J Ind Med*. 1993;50(7):633-6.
 42. Fenech M, Kirsch-Volders M, Natarajan AT, Surralles J, Crott JW, Parry J, et al. Molecular mechanisms of micronucleus, nucleoplasmic bridge and nuclear bud formation in mammalian and human cells. *Mutagen*. 2011;26(1):125-32.
 43. Kirsch-Volders M, Decordier I, Elhajouji A, Plas G, Aardema MJ, Fenech M. In vitro genotoxicity testing using the micronucleus assay in cell lines, human lymphocytes and 3D human skin models. *Mutagen*. 2011;26(1):177-84.
 44. Thomas P, Umegaki K, Fenech M. Nucleoplasmic bridges are a sensitive measure of chromosome rearrangement in the cytokinesis-block micronucleus assay. *Mutagen*. 2003;18(2):187-94.
 45. Fenech M. Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. *Nat Protoc*. 2007; 2(5):1084-104.

46. Mueller WU, Rode A. The micronucleus assay in human lymphocytes after high radiation doses (5-15Gy). *Mutat Res.* 2002;502(1-2):47-51.
47. International Atomic Energy Agency. *Cytogenetic Dosimetry: Applications in Preparedness for and Response to Radiation Emergencies.* Viena: 2011. p. 229-247.
48. Organisation for Economic Co-operation and Development. Test No 487: In Vitro Mammalian Cell Micronucleus Test, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4. OECD Publishing; 2010.
49. Bonassi S, Znaor A, Ceppi M, Lando C, Chang WP, Holland N, et al. An increased micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes predicts the risk of cancer in humans. *Carcinogen.* 2007;28(3):625-31.
50. Federici C, Botto N, Manfredi S, Rizza A, Fiandra M, Andreassi MG. Relation of increased chromosomal damage to future adverse cardiac events in patients with known coronary artery disease. *Am J Cardiol.* 2008;120(10):1296-300.
51. Furness DLF, Dekker GA, Hague WM, Khong TY, Fenech MF. Increased lymphocyte micronucleus frequency in early pregnancy is associated prospectively with pre-eclampsia and/or intrauterine growth restriction. *Mutagen.* 2010; 25(5):489-98.
52. Moore LE, Titenko-Holland N, Quintana PJ, Smith MT. Novel biomarkers of genetic damage in humans: use of fluorescence in situ hybridization to detect aneuploidy and micronuclei in exfoliated cells. *J Toxicol Environ Health.* 1993; 40(2-3):349-57.
53. Surrallés J, Natarajan AT. Human lymphocytes micronucleus assay in Europe. An international survey. *Mutat Res.* 1997;392(1-2):165-74.
54. Albertini RJ, Anderson D, Douglas GR, Hagmar L, Hemminki K, Merlo, et al. F. IPCS guidelines for the monitoring of genotoxic effects of carcinogens in humans. *International Programme on Chemical Safety. Mutat res.* 2000;463(2):111-72.
55. Lacerda LP, Dantas EBS, Cerqueira GS, Peron AP, Sousa JMC. Occupational toxicology study emphasizing the citotoxic and mutagenic activity among workers exposed to gasoline. *Biotemas.* 2015;28(3):135-41.
56. Pastor S, Creus AN, Siffel C, Marcos R.. Occupational exposure to pesticides and cytogenetic damage: results of a Hungarian population study using the micronucleus assay in lymphocytes and buccal cells. *Environ Mol Mutagen.* 2002;40(2):101-9.
57. Martino-Roth MG, Viégas J, Roth DM. Occupational genotoxicity risk evaluation through the comet assay and the micronucleus test. *Geneti Mol Res.* 2003;2(4):410-7.
58. Agova S, Groseva D, Panev T, Popov T, Toncheva D, Hadjidekova V. Effect of environmental exposure to PAHs on somatic chromosomes. *Turk J Med Sci, Âncara.* 2005;35:143-8.
59. Testa A, Festa F, Ranaldi R, Giachelia M, Tirindelli D, De Marco A. A Multi-Biomarker Analysis of DNA Damage in Automobile Painters. *Environ Mol Mutagen.* 2005;46(3):182-8.
60. Tung EWY, Philbrook NA, Macdonald KDD, Winn LM. DNA Double-Strand Breaks and DNA Recombination in Benzene Metabolite-Induced Genotoxicity. *Toxicol Sci.* 2012;126(2):569-77.
61. Rossner PJ, Rossnerova A, Spatova M, Beskid O, Uhlírova K, Libalova H, et al. Analysis of biomarkers in a Czech population exposed to heavy air pollution. Part II: chromosomal aberrations and oxidative stress. *Mutagen.* 2013;28(1):97-106.
62. Zhang L, Eastmond DA, Smith MT. The nature of chromosomal aberrations detected in humans exposed to benzene. *Criti rev toxicol.* 2002;32(1):1-42.
63. Zhang L, Lan Q, Guo W, Hubbard AE, Li G, Rappaport SM, et al. Chromosome-wide aneuploidy study (CWAS) in workers exposed to an established leukemogen, benzene. *Carcin.* 2011;32(4):605-12.
64. Ji Z, Weldon RH, Marchetti F, Chen H, Li G, Xing C, et al. Comparison of aneuploidies of Chromosomes 21, X and Y in the blood lymphocytes and sperm of workers exposed to benzene. *Environ Mol Mutagen.* 2012;53(3):218-26.
65. Griffiths AJF, Miller JH, Suzuki DT, Lewontin RC, Gelbart WM. *An introduction to genetic analysis.* 7. ed. New York: W. H. Freeman; 2000.
66. Guerra MS. *Introdução à citogenética geral.* Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1988.
67. International Programme on Chemical Safety - IPCS. *Environmental Health Criteria 46: Guidelines for the study of genetic effects in human populations.* WHO: Geneva; 1985. 126 p.
68. Natarajan AT. Chromosome aberrations: past, present and future. *Mutat Res.* 2002; 504(1-2):3-16.
69. Mitelman F, Johansson B, Mertens F. The impact of translocations and gene fusions on cancer causation. *Nat Rev Cancer.* 2007;7(4):233-45.
70. Stratton MR, Campbell PJ, Futreal PA. The cancer genome. *Nat.* 2009;458:719-24.
71. Heijink AM, Krajewska M, Van Vugt MA. The DNA damage response during mitosis. *Mutat Res.* 2013;750(1-2):45-55.
72. Zhang CZ, Leibowitz ML, Pellman D. Chromothripsis and beyond: rapid genome evolution from complex chromosomal rearrangements. *Genes Dev.* 2013;27(23): 2513-30.
73. Lister Hill National Center for Biomedical Communications, US National Library of Medicine, National Institutes of Health, Department of Health & Human Services. *Handbook: Help me understand genetics [internet].* [atualizado em 7 mar 2016; acesso em 10 mar 2016]. Disponível em: <https://ghr.nlm.nih.gov/handbook.pdf>.

74. Rani VP, Meera KA. Phytochemical analysis & in-vitro cytogenetics assay of chromosomal aberration on peripheral human blood lymphocytes by the leaf crude extract-*Passiflora foetida* L. *Biolife*. 2015;3(1):154-163.
75. Bonassi S, Norppa H, Ceppi M, Strömberg U, Vermeulen R, Znaor A, et al. Chromosomal aberration frequency in lymphocytes predicts the risk of cancer: results from a pooled cohort study of 22358 subjects in 11 countries. *Carcinogen*. 2008;29(6):1178-83.
76. Rossner PJ, Boffetta P, Ceppi M, Bonassi S, Smerhovsky Z, Landa K, et al. Chromosomal aberrations in lymphocytes of healthy subjects and risk of cancer. *Environ Health Perspect*. 2005;113(5):517-20.
77. Çelik A, Akbas E. Evaluation of sister chromatid exchange and chromosomal aberration frequencies in peripheral blood lymphocytes of gasoline station attendants. *Ecotoxicol Environ Saf*. 2005;60(1):106-12.
78. Trevisan P, Silva JN, Silva AP, Rosa RFM, Paskulin GA, Thiesen FV, et al. Evaluation of genotoxic effects of benzene and its derivatives in workers of gas stations. *Environ Monit Assess*. 2014;186:2195-204.
79. Santiago F, Alves G, Otero UB, Tabalipa MM, Scherrer LR, Kosyakova N, et al. Monitoring of gas station attendants exposure to benzene, toluene, xylene (BTX) using three-color chromosome painting. *Mol Cytogenet*. 2014;7(15):1-7.
80. Santos-Mello R, Cavalcante B. Cytogenetic studies on gas station attendants. *Mutat Res*. 1992;280(4):285-90.
81. Miller MC, Mohrenweiser HW, Bell DA. Genetic variability in susceptibility and response to toxicants. *Toxicol Lett*. 2001;120(1-3):269-80.
82. Voet D, Voet G. *Bioquímica*. Porto Alegre: Artmed; 2013.
83. Dougherty D, Garte S, Barchowsky A, Zmuda J, Taioli E. NQO1, MPO, CYP2E1, GSTT1 and GSTM1 polymorphisms and biological effects of benzene exposure-A literature review. *Toxicol Lett*. 2008;182(1):7-17.
84. Bolufer P, Barragan E, Collado M, Cervera J, López JA, Sanz MA. Influence of genetic polymorphisms on the risk of developing leucemia and on disease progression. *Leuk Res*. 2006;30(12):1471-91.
85. Sørensen M, Autrup H, Møller P, Hertel O, Jensen SS, Vinzents P, et al. Linking Exposure to Environmental Pollutants with Biological Effects. *Mutat Res*. 2003;544(2-3):255-71.
86. Wan JX, Shi JX, Hui LJ, Wu D, Jin XP, Zhao NQ, et al. Association of genetic polymorphisms in CYP2E1, MPO, NQO1, GSTM1, and GSTT1 genes with benzene poisoning. *Environ Health Perspect*. 2002;110(12):1213-8.
87. Mitri S, Fonseca ASA, Otero UB, Tabalipa MM, Moreira JC, Sarcinelli PN. Metabolic polymorphisms and clinical findings related to benzene poisoning detected in exposed Brazilian gas-station workers. *Int J Environ Res Public Health*. 2015;12(7):8434-47.
88. Mccarver DG, Byun R, Hines RN, Hichme M, Wegenek W. A genetic polymorphism in the regulatory sequences of human CYP2E1: association with increased chlorzoxazone hydroxylation in the presence of obesity and ethanol intake. *Toxicol Appl Pharmacol*. 1998;152(1):276-81.
89. Hsieh LL, Liou SH, Chiu LL, Chen YH. Glutathion *s*-transferase (GST) M1 and GST T1 genotypes and hematopoietic effects of benzene exposure. *Arch Toxicol*. 1999;73(2):80-2.
90. Verdina A, Galati R, Galasca G. Metabolic polymorphisms and urinary biomarkers in subjects with low benzene exposure. *J Toxicol Environ Health A*. 2001;64(8):607-18.
91. Sørensen M, Poole J, Autrup H, Muzyka V, Jensen A, Loft S, et al. Benzene exposure assessed by metabolite excretion in Estonian oil shale miners: influence of glutathione *s*-transferase polymorphisms. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2004;13(11):1729-35.
92. Qu Q, Shore R, Li G, Su L, Jin X, Melikian AA, et al. Biomarkers of benzene: urinary metabolites in relation to individual genotype and personal exposure. *Chem Biol Interact*. 2005;153/154:85-95.
93. Wan JX, Zhang ZB, Guan JR, Cao DZ, Ye R, Jin XP, et al. Genetic polymorphism of toxicant-metabolizing enzymes and prognosis of Chinese workers with chronic benzene poisoning. *Ann NY Acad Sci*. 2006;1076:129-36.
94. Chen Y, Li G, Yin S, Xu J, Ji Z, Xiu X, et al. Genetic polymorphisms involved in toxicant-metabolizing enzymes and the risk of chronic benzene poisoning in Chinese occupationally exposed population. *Xenobiotica*. 2007; 37(1):103-12.
95. Garte S, Taioli E, Popov T, Bolognesi C, Farmer P, Merlo F. Genetic susceptibility to benzene toxicity in humans. *J Toxicol Environ Health*. 2008;71(22):1482-9.
96. Fujiki N, Sudo M, Macer D. *Bioethics and the Impact of Genomics in the 21st Century: Pharmacogenomics, DNA Polymorphism and Medical Genetics Services*. Eubios Ethics Institute. Christchurch; New Zealand: 2001.
97. Waidyanatha S, Yeowell-O'connell K, Rappaport SM. A new assay for albumin and hemoglobin adducts of 1,2- and 1,4- benzoquinones. *Chem Biol Interact*. 1998;115(2):115-39.
98. Lin Y, Vermeulen R, Tsai CH, Waidyanatha S, Lan Q, Rothman N, et al. Albumin Adducts of Electrophilic Benzene Metabolites in Benzene-Exposed and Control Workers. *Environ Health Perspect*. 2007;115(1):28-34.
99. Snyder R. Benzene and leukemia. *Critical Rev Toxicol*. 2002;32(3):155-210.
100. Boogaard PJ. Biomonitoring of the workplace and environment. In: Ballantyne B, Marrs TC, Syversen T. *General, Applied and Systems*

- Toxicology 3rd ed. Chichester (UK); Wiley: 2759-90, 2009.
101. Loureiro APM, Mascio PD, Medeiros MHG. Formação de adutos exocíclicos com bases de DNA: implicações em mutagênese e carcinogênese. *Quím Nova*. 2002;25(5):777-93.
 102. Dipple A. DNA adducts of chemical carcinogens. *Carcinogen*. 1995;16(3):437-41.
 103. Barata-Silva C, Mitri S, Pavesi T, Saggiaro E, Moreira JC. Benzeno: reflexos sobre a saúde pública, presença ambiental e indicadores biológicos utilizados para a determinação da exposição. *Cad Saúde Col*. 2014;22(4):329-42.
 104. Tornqvist M, Fred C, Haglund J, Helleberg H, Paulsson B, Rydberg P. Protein adducts: quantitative and qualitative aspects of their formation, analysis and applications. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2002;778(1-2):279-308.
 105. Funk WE, Waidyanatha S, Chaing SH, Rappaport SM. Hemoglobin adducts of benzene oxide in neonatal and adult dried blood spots. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2008;17(8):1896-901.
 106. Ehrenberg L, Moustacchi E, Osterman-Golkar S. Dosimetry of genotoxic agents and dose-response relationships of their effects. *Mutat Res*. 1983;123(2):121-82.
 107. Rappaport SM, Waidyanatha S, Qu Q, Shore R, Jin X, Cohen B, et al. Albumin adducts of benzene oxide and 1,4-benzoquinone as measures of human benzene metabolism. *Cancer Res*. 2002;62(5):1330-7.
 108. Gouvêa AV, Cadoso MHWM, Bastos LHP, Barata-Silva C, Ortiz ND, Nóbrega AW, et al. Validação de metodologia QuEChERS-acetato para a análise de multirresíduo de agrotóxicos em amostras de soja e de extrato solúvel de soja utilizando cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas sequencial. *Rev Inst Adolf Lutz*. 2014; 73(1):40-58.
 109. Rodenhiser D, Mann M. Epigenetics and human disease: translating basic biology into clinical applications. *Canad Med Assoc J*. 2006;174(3):341-8.
 110. Jaenisch R, Bird A. Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nat Genet*. 2003;33:245-54.
 111. Ducasse M, Brown MA. Epigenetic aberrations and cancer. *Mol Cancer*. 2006; 5:60.
 112. Bollati V, Baccarelli A. Environmental epigenetics. *Hered*. 2010;105(1):105-12.
 113. Esteller M. Epigenetic changes in cancer. *F1000 Rep Biol*. 2011;3:1039-59.
 114. Smith MT, Zhang L, McHale CM, Skibola CF, Rappaport SM. Benzene, the exposome and future investigations of leukemia etiology. *Chem Biol Interac*. 2011;192(1-2):155-9.
 115. Bollati V, Baccarelli A, Hou L, Bonzini M, Fustinoni S, Cavallo D, et al. Changes in DNA methylation patterns in subjects exposed to low-dose benzene. *Cancer Res*. 2007;6(3):876-80.
 116. Clark SJ, Harrison J, Paul CL, Frommer M. High sensitivity mapping of methylated cytosines. *Nucleic Acids Res*. 1994;22(15):2990-7.
 117. Forler S, Klein O, Klose J. Individualized proteomics. *J Prot*. 2014;107:56-61.
 118. D'Ovidio MC, Signorini S, Iavicoli S. The need to improve the quality of laboratory results in the study of biological occupational risk. *G Ital Med Lav*. 2007;29(1):5-10.
 119. Vlaanderen J, Moore LE, Smith MT, Lan Q, Zhang L, Skibola CF, et al. Application of OMICS technologies in occupational and environmental health research; current status and projections. *Occup Environ Med*. 2010;67(2):136-43.
 120. Zhang L, McHale CM, Rothman N, Li G, Ji Z, Vermeulen R, et al. Systems biology of human benzene exposure. *Chem Biol Interac*. 2010;184(1-2):86-93.
 121. Joo WA, Kang MJ, Son WK, Lee HJ, Lee DY, Lee E et al. Monitoring protein expression by proteomics: human plasma exposed to benzene. *Proteomics*. 2003;3(12):2402-11.
 122. Joo WA, Sul D, Lee DY, Lee E, Kim CW. Proteomic analysis of plasma proteins of workers exposed to benzene. *Mutat Res*. 2004;558(1-2):35-44.
 123. Oh J, Pyo JH, Jo EH, Hwang SI, Kang SC, Jung JH, et al. Establishment of a near-standard two-dimensional human urine proteomic map. *Proteomics*. 2004;4(11):3485-97.
 124. Forrest MS, Lan Q, Hubbard AE, Zhang L, Vermeulen R, Zhao X, et al. Discovery of novel biomarkers by microarray analysis of peripheral blood mononuclear cell gene expression in benzene-exposed workers. *Environ Health Perspect*. 2005;113(6):801-7.
 125. Vermeulen R, Lan Q, Zhang L, Gunn L, McCarthy D, Woodbury RL, et al. Decreased levels of CXC-chemokines in serum of benzene-exposed workers identified by array-based proteomics. *Proc Nati Acad Sci USA*. 2005;102(47):17041-6.
 126. Gattás GJF, Cardoso LA, Medrado-Faria MA, Saldanha PH. Frequency of oral mucosa micronuclei in gas station operators after introducing methanol. *Occup Med*. 2001;51(2):107-13.