

FIOCRUZ

**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ**

**CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA EM  
SAÚDE E MEDICINA INVESTIGATIVA**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**ESTUDO DE ALTERAÇÕES CROMOSSÔMICAS  
ESTRUTURAIS E NUMÉRICAS EM TRABALHADORES  
COM INTOXICAÇÃO CRÔNICA POR BENZENO**

**ROZANA OLIVEIRA GONÇALVES**

**Salvador-Bahia - Brasil  
2008**

**ROZANA OLIVEIRA GONÇALVES**

**ESTUDO DE ALTERAÇÕES CROMOSSÔMICAS ESTRUTURAIS E  
NUMÉRICAS EM TRABALHADORES COM INTOXICAÇÃO  
CRÔNICA POR BENZENO**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado em  
Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa,  
Fiocruz-Ba, como requisito parcial para obtenção do  
grau de mestre.

Orientador: Prof. Dr. Marco Antônio V. Rêgo

Co-orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Neli de Almeida Melo

Salvador-Bahia - Brasil  
**2008**

Dedico a minha família pelo carinho, apoio, compreensão e incentivo diante das minhas escolhas.

## AGRADECIMENTOS

1. Ao Prof. Dr. Marco Antônio Vasconcelos Rêgo, pela orientação e receptividade, pela disponibilidade dos livros e pelo empenho na compra dos reagentes e término do trabalho.
2. A Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Neli de Almeida Melo, pela co-orientação neste trabalho, pela receptividade e pela importante e efetiva participação na minha formação científica.
3. Ao Prof. Dr. Fernando Carvalho, coordenador do projeto 03/2000 subsidiado pela FINEP e CTPETRO, que permitiu montar o laboratório de citogenética da Maternidade Climério de Oliveira da UFBA, onde este trabalho foi realizado.
4. Aos dirigentes da Maternidade Climério de Oliveira (MCO), por terem disponibilizado as instalações e aos funcionários que direta ou indiretamente contribuíram para realização deste trabalho.
5. Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) por disponibilizar o apoio financeiro do projeto.
6. Aos colegas e amigos do laboratório de citogenética da Maternidade Climério de Oliveira pelo companheirismo, proporcionando um agradável ambiente de trabalho.
7. A professora Acácia Lacerda e demais funcionárias do Laboratório DNA, por terem disponibilizado o microscópio de microfotografia, sobretudo pela forma atenciosa que sempre me receberam.
8. A Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Catarina Satie Takahashi da USP – Ribeirão Preto, pela atenção e gentil disponibilidade na leitura e sugestões do manuscrito.
9. A José Avani, pelas instruções de informática, pelo carinho e disponibilidade.
10. Aos meus amigos pelo apoio, amizade, incentivo e por me mostrarem a importância de ter com quem compartilhar os grandes e os pequenos momentos da vida.
11. A todos os voluntários que participaram deste estudo com a doação das amostras de sangue, tornando assim, possível conhecer um pouco mais sobre os efeitos da exposição ocupacional a benzeno, sem os quais este trabalho não seria realizado.

12. A Fiocruz- Bahia pelo fornecimento da bolsa de estudo durante um ano (2006).

13. A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB) pelo fornecimento da bolsa de estudo durante um ano (2007).

Não basta abrir a janela  
Para ver os campos e o rio.  
Não é bastante não ser cego  
Para ver as árvores e flores.

Alberto Caeiro

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS</b>	<b>iii</b>
<b>LISTA DE TABELAS</b>	<b>iv</b>
<b>LISTA DE FIGURAS</b>	<b>v</b>
<b>RESUMO</b>	<b>vi</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>vii</b>
<b>1 INTRODUÇÃO</b>	<b>14</b>
<b>2 REVISÃO DA LITERATURA</b>	<b>17</b>
2.1 METABOLIZAÇÃO DO BENZENO	17
2.2 EXPOSIÇÃO AO BENZENO E ALTERAÇÕES HEMATOLÓGICAS	20
2.3 EFEITOS GENOTÓXICOS DO BENZENO	23
<b>2.3.1 Classificação e definição das alterações cromossômicas</b>	<b>28</b>
<b>2.3.2 Índice mitótico</b>	<b>32</b>
2.4 EFEITOS MUTA/ CARCINOGENICO DO BENZENO	33
2.5 EXPOSIÇÃO OCUPACIONAL E DANO CITOGENÉTICO	36
<b>3 OBJETIVOS</b>	<b>41</b>
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>42</b>
4.1 Tipo do estudo	42
4.2 População e área do estudo	42
4.3 Coleta de dados	44
4.4 Cultura de linfócitos para obtenção de cariótipo	44

4.5	Preparação citológica para retirada da cultura	45
4.6	Preparo das lâminas	46
4.7	Preparo das lâminas para análise de quebras e “gaps”	46
4.8	Técnica de bandeamento G	47
4.9	Cálculo do Índice mitótico	48
<b>5</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>50</b>
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO</b>	<b>60</b>
<b>7</b>	<b>CONCLUSÃO</b>	<b>65</b>
<b>8</b>	<b>BIBLIOGRAFIA</b>	<b>66</b>



**LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

AC	Aberração cromossômica
CESAT	Ambulatório de Doenças do Trabalho
CID	Classificação Internacional de Doenças
CYP	Citocromo P-450
CYP2E1	Gene ou enzima envolvidos no metabolismo oxidativo do benzeno
GST	Glutathione-S-transferase
GSTT1	Gene ou enzima envolvidos na detoxificação do benzeno
HQ	Hidroquinona
IM	Índice mitótico
LMA	Leucemia Mieloide Aguda
MPO	Mieloperoxidase
MSD	Síndrome Mielodisplásica
NQO1	Quinona oxireductase
TCI	Trocas entre cromátides irmãs

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Descrição das médias dos números absolutos de leucócitos e seus subtipos entre os grupos casos e controles.....	50
Tabela 2 Distribuição do percentual médio e desvio padrão do número de neutrofilos, linfócitos, monócitos e eosinófilos entre casos e controles.....	51
Tabela 3 Distribuição dos números (N) e dos respectivos percentuais (%) dos portadores de benzenismo e dos controles segundo grupo racial.....	52
Tabela 4 Distribuição dos números (N) e dos respectivos percentuais (%) dos portadores de benzenismo e dos controles, segundo as variáveis do estilo de vida estudadas.....	53
Tabela 5 Distribuição dos números (N) e dos respectivos percentuais (%) dos portadores de benzenismo (caso) e dos controles, segundo as variáveis do estilo de vida estudadas.....	54
Tabela 6 Médias ( $\bar{x}$ ) e desvio padrão (dp) de gaps, quebras e aneuploidias em em culturas de linfócitos de sangue periférico de 54 e 72h, analisadas em 50 metáfases por indivíduo portadores de benzenismo e nos controles.....	55
Tabela 7 Distribuição dos números (N) e dos respectivos percentuais (%) Cromossomos marcadores (não identificados) observados nos portadores de benzenismo (casos) e controles em culturas de linfócitos periféricos de 54 e 72 horas. ....	56
Tabela 8 Médias do índice mitótico em culturas de linfócitos de sangue periférico de 54 e 72h, analisadas em 1000 células por indivíduo portadores de benzenismo e nos controles. ....	58

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação esquemática dos fatores de risco, que podem causar danos citogenéticos e promover o desenvolvimento da tumorigênese. Adaptado de Louro e col., (2002).....33

Figura 2. Metáfase apresentando um cromossomo com uma quebra cromossômica. Maternidade Climério de oliveira, laboratório de citogenética Humana.....55

Figura 3. Cromossomo marcador observado em um indivíduo do grupo controle em cultura de 72h. Cariótipo 48,XY,+ 6, 3 e mar.....57

Figura 4. figura quadrirradial observada em um indivíduo do grupo caso em cultura de 54h.....59

## RESUMO

### ESTUDO DE ALTERAÇÕES CROMOSSÔMICAS ESTRUTURAIS E NUMÉRICAS EM TRABALHADORES COM INTOXICAÇÃO CRÔNICA POR BENZENO.

Os sinais clínicos da intoxicação crônica por benzeno não são bem definidos e as alterações cromossômicas (AC) em linfócitos de sangue periférico têm se mostrado um biomarcador precoce e sensível dos efeitos. Com o intuito de investigar a associação entre efeito genotóxico e exposição ocupacional a benzeno, foi realizado um estudo caso-controle em 20 pacientes com benzenismo, afastados da exposição entre três e treze anos e 16 controles. Os pacientes com benzenismo foram selecionados do arquivo do Ambulatório de Doenças do Trabalho (CESAT) registrados no período de 1988 a 1999. Os controles foram selecionados do mesmo arquivo de onde os casos provieram, sem alterações hematológicas, com diagnóstico de outras doenças ocupacionais. O efeito genotóxico foi avaliado através do estudo de quebras, “gaps” e aneuploidias em culturas de 54h e 72h, empregando as técnicas de coloração convencional e banda G, respectivamente. A diferença das frequências de gaps foi estatisticamente significativa em culturas de 54h ( $2,13 \pm 2,86$  e  $0,97 \pm 1,27$ ,  $p=0,001$ ). As quebras mostraram significância estatística em culturas de 72h ( $0,21 \pm 0,58$  e  $0,12 \pm 0,4$ ,  $p=0,0002$ ). Os resultados não mostraram diferenças quando comparadas as frequências de aneuploidias entre casos e controles, tanto em culturas de 54h ( $0,031 \pm 0,18$  e  $0,027 \pm 0,17$ ,  $p=0,614$ , respectivamente), quanto em culturas de 72h ( $0,19 \pm 0,13$  e  $0,02 \pm 0,14$   $p=0,868$ ). Não se observou diferença entre os grupos quanto ao índice mitótico, tanto em culturas de 54h (12,41 e 12,05) quanto naquelas de 72h (12,16 e 15,36) em casos e controles respectivamente. Esses resultados não permitem concluir de forma definitiva sobre a existência de efeitos genotóxicos em indivíduos com diagnóstico de intoxicação crônica por benzeno quando comparados a indivíduos controles, sendo recomendada a realização de estudos em células mais específicas com técnicas mais sensíveis.

## ABSTRACT

### STUDY OF STRUCTURAL AND NUMERICAL CHROMOSOMAL ALTERATIONS IN WORKERS WITH CHRONIC BENZENE POISONING.

The clinical signs of chronic benzene poisoning (CBP) are not well defined and the CA in peripheral blood lymphocytes has been used as a biomarker sensitive early of the effects. In order to investigate the association between genotoxic effect and occupational exposure to benzene, a case-control study was conducted in 20 patients with CBP, away from exposure between three and thirteen years, and 16 controls. The CBP patients were in the Ambulatory of Occupational Diseases (CESAT), registered in the period from 1988 to 1999. The controls were selected from the same file from which the cases came, without haematological disorders, diagnosed with other occupational diseases. The genotoxic effect was evaluated through the study of breaks, gaps and aneuploidy in cultures of 54h and 72h, employing the techniques of conventional color and G band, respectively. The difference of the frequencies of gaps was statistically significant in cultures of 54h ( $2.13 \pm 2.86$  and  $0.97 \pm 1.27$ ,  $p = 0001$ ). The breaks showed statistical significance in cultures of 72h ( $0.21 \pm 0.58$  and  $0.12 \pm 0.4$ ,  $p = 0.0002$ ). The results showed no statistical differences when compared the frequencies of aneuploidy between cases and controls in both cultures of 54h ( $0.031 \pm 0.18$  and  $0.027 \pm 0.17$ ,  $p = 0.614$ , respectively), as in cultures of 72h ( $0.19 \pm 0.13$  and  $0.02 \pm 0.14$ ,  $p = 0.868$ ). No difference was observed between the groups on the mitotic index in both cultures, 54 h (12.41 and 12.05) as those of 72h (12.16 and 15.36) in cases and controls, respectively. These results no permit to conclude of definitive forms about the existence of genotoxic effects in individuals with diagnostic of CBP when compared the controls. Future studies should analyze more specific cells and use more sensible techniques.

## 1 INTRODUÇÃO

O benzeno é um hidrocarboneto cíclico, aromático, líquido, incolor, volátil, com odor característico e altamente inflamável. É produzido, principalmente, pela destilação do petróleo, sendo utilizado como matéria-prima para fabricação de plásticos e outros produtos orgânicos, como solventes para indústria de borracha, tintas e vernizes. Além disso, apresenta ampla e diversificada aplicação na indústria siderúrgica e petroquímica, as quais se caracterizam como os principais ambientes de risco ocupacional (RUIZ e cols., 1993; MIRANDA e cols., 1997).

O benzeno é um importante genotóxico, mutagênico e carcinogênico humano. Como a saúde do trabalhador está intrinsecamente relacionada às condições do ambiente de trabalho, os danos genômicos podem ser utilizados como biomarcadores precoces dos efeitos genotóxicos da exposição ocupacional. Deste modo, o estudo das aneuploidias e das alterações cromossômicas tem se mostrado útil para mensurar e monitorar os efeitos genotóxicos da exposição ocupacional ao benzeno (TOMPA e cols., 1994; ZHANG e cols., 1998).

O benzeno é um reconhecido leucemogênico humano e carcinogênico para roedores. A exposição pode ser ocupacional ou ambiental, incluindo um grande número de indústrias, como as de petróleo e da borracha, o contato com tintas, solventes, o hábito de fumar e o contato com gases de combustão de automóveis. No entanto, o mecanismo pelo qual o benzeno exerce estes efeitos não está bem esclarecido. Uma das hipóteses, é que o efeito envolve os metabólitos do benzeno, espécies mais reativas que podem interagir com o DNA para formar aductos. Estes

aductos de DNA se ocorrerem em genes críticos e não forem reparados podem levar ao surgimento de mutações (GASKELL e cols., 2005a).

Segundo Smith e cols., (1996), o benzeno é carcinogênico pela ação conjunta de seus metabólitos que produzem quebras no DNA, inibição da topoisomerase II e dano ao ciclo mitótico, os quais desencadeiam recombinação mitótica, translocação cromossômica e aneuploidia. Estes eventos genotóxicos causariam a ativação de protooncogenes, a perda da heterozigosidade e inativação de genes supressores de tumor. Se isto ocorre na medula óssea ou em células progenitoras podem surgir clones leucêmicos em vantagem e crescimento seletivo.

As substâncias genotóxicas e mutagênicas têm a capacidade de interagir com o material genético (DNA) produzindo alterações em sua estrutura e função, o que pode resultar no aumento da freqüência de mutações as quais estão associadas ao desenvolvimento de neoplasias. Os mecanismos de mutagênese e carcinogênese parecem portanto estar intrinsecamente relacionados. A mutação é uma conseqüência do dano no DNA e este pode ser o estágio inicial no processo pelo qual a maioria dos carcinógenos químicos desencadeiam a tumorigênese (TARDIFF e cols., 1994; BISHOP, 1991).

O aumento na freqüência de alterações cromossômicas de linfócitos do sangue periférico de trabalhadores expostos ocupacionalmente ao benzeno está associado, na maioria das vezes, a altos níveis de exposição. Entretanto, alguns estudos mostraram aumento na freqüência de aberrações cromossômicas em trabalhadores expostos a baixos níveis de benzeno (TOMPA e cols., 1994).

O monitoramento genético de indivíduos expostos a potenciais mutagênicos e carcinogênicos é uma forma precoce de prevenir possíveis fatores de riscos para a saúde. As alterações cromossômicas estruturais e aneuploidias estão bem estabelecidas como biomarcadores de exposição ocupacional ou ambiental a agentes genotóxicos. Contudo, as pessoas estão geralmente expostas a uma variada mistura de substâncias químicas e agentes físicos que podem dificultar a determinação da causa exata do aumento na frequência do dano cromossômico (CELIK e cols., 2005).

Este trabalho procura determinar o aumento da frequência de alterações cromossômicas estruturais e numéricas em trabalhadores das indústrias petroquímicas do Estado da Bahia, afastados da exposição entre 3 a 13 anos com diagnóstico de benzenismo.



## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 METABOLIZAÇÃO DO BENZENO

Os carcinógenos químicos cuja exposição ocorre pela ingestão, inalação ou contato através da pele, são absorvidos, distribuídos, metabolizados e excretados por vias que são determinadas pelas propriedades químicas dos carcinógenos e pelos fatores fisiológicos e bioquímicos do hospedeiro ((XU e cols., 1998; ARCURI e cols., 2005; TARDIFF e cols., 1994).

Muitas vias de biotransformação produzem a detoxificação das substâncias que são excretadas. Porém, durante esse processo de metabolização a maioria dos carcinógenos é convertida em compostos eletrofílicos, geralmente mais reativos que o composto original. Este processo é chamado de bioativação e depende de enzimas presentes nos tecidos (TARDIFF e cols., 1994).

A ativação metabólica do benzeno é um evento fundamental para formação de compostos eletrofílicos e interação destes com o DNA. A sua biotransformação é catalisada pelas enzimas do citocromo P-450 (CYP), mieloperoxidases (MPO) e neutralizada pelas glutationa-S-transferases (GST) e quinonas oxiredutases NQO1 (SMITH e cols., 1996, 2000a).

O efeito tóxico do benzeno pode ocorrer por ação direta ou por ação de seus metabólitos, os quais são gerados a partir da atuação destas enzimas de biotransformação e detoxificação. Muitos compostos, como os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, são convertidos a metabólitos altamente reativos pelas

enzimas oxidativas, dessa forma, um pró-carcinógeno pode tornar-se carcinógeno, enquanto que as enzimas inativadoras tornam tais metabólitos mais hidrofílicos e passíveis de excreção urinária (TONINGHER e cols., 1999; WAN e cols., 2002).

Estudos indicam que a principal toxicidade do benzeno resulta dos seus metabólitos reativos intermediários, onde o benzeno é inicialmente oxidado a óxido de benzeno pela CYP2E1 presente no fígado, o qual pode formar fenol espontaneamente ou conjugar-se com as glutationas (GST) para formar derivados menos tóxicos. O fenol é catalisado pela CYP2E1 para os potencialmente tóxicos di ou trihidroxibenzeno, bem como hidroquinona, catecol e 1,2,4-benzenotriol, que são oxidados na medula óssea pelas mieloperoxidases (MPO) a benzoquinona, um potente agente genotóxico e hematóxico, que pode ser detoxificado pelas quinonas oxiredutases (NQO1) a hidroxibenzeno, que são compostos menos nocivos (WAN e cols., 2002).

As enzimas de biotransformação apresentam variações quantitativas e qualitativas marcantes, na sua expressão, entre indivíduos de uma mesma ou de diferentes populações, constituindo polimorfismos genéticos. Essas diferenças podem ser um dos fatores que aumentam ou diminuem a susceptibilidade aos efeitos de carcinógenos ambientais (TARDIFF e cols., 1994).

Esses polimorfismos são freqüentes, e tanto o tipo quanto a freqüência, são étnico-dependentes. Os polimorfismos dos genes GST avaliados em brasileiros mostram até agora freqüências diferentes das observadas em etnias semelhantes presentes em outros países, principalmente da América do Sul, provavelmente

devido à intensa miscigenação que caracteriza a população brasileira (ROSSINI e cols., 2002).

Atualmente, com o conhecimento físico do Genoma Humano e, mais recentemente, com o projeto Genoma Ambiental espera-se que a compreensão da susceptibilidade genética e da interação entre os fatores genético e ambiental esclareça e viabilize novas estratégias de prevenção e tratamento de doenças (LOURO e cols., 2002).

## 2.2 EXPOSIÇÃO AO BENZENO E ALTERAÇÕES HEMATOLÓGICAS

A absorção humana do benzeno pode ocorrer por três vias: respiratória, cutânea e digestiva. A via respiratória é a principal, do ponto de vista toxicológico, sendo retido no corpo 46% do benzeno inalado e distribuído para vários tecidos. Após sua absorção, parte do benzeno é metabolizada pelos microssomos do fígado e cerca de 30% são transformados em fenol e em derivados como pirocatecol, hidroquinona e hidroxiquinona, os quais são eliminados pela urina nas primeiras horas até 24 horas após cessada a exposição (RUIZ e cols., 1993; MIRANDA e cols., 1997).

A exposição ao benzeno determina seus efeitos através de dois tipos de intoxicação: a aguda e a crônica. Na intoxicação aguda, a maior parte é retida no sistema nervoso central; já na intoxicação crônica permanece na medula óssea (40%), no fígado (43%) e nos tecidos gordurosos (10%) (RUIZ e cols., 1993; MIRANDA e cols., 1997).

A intoxicação pelo benzeno, conhecida como benzenismo, caracteriza-se por um conjunto de sinais e sintomas decorrentes da exposição crônica a este composto. As complicações podem ser agudas, quando ocorre exposição a altas concentrações com presença de sinais e sintomas neurológicos, ou crônicas, com sinais e sintomas clínicos diversos, podendo ocorrer complicações a médio, ou a longo prazo, localizadas principalmente no sistema hematopoético (RUIZ e cols., 1993).

O quadro clínico do benzenismo caracteriza-se por repercussões orgânicas múltiplas, em que o comprometimento da medula óssea é o componente mais

freqüente e significativo, sendo a causa básica das diversas alterações hematológicas, as quais têm como principais sinais e sintomas: astenia, mialgia, sonolência, tontura e sinais infecciosos de repetição (ARCURI e cols., 2005).

Os efeitos agudos da exposição ao benzeno incluem: irritação das mucosas, agitação, convulsões, excitação, depressão, coma e até mesmo a morte, enquanto a exposição crônica está associada com desordens hematológicas como anemia aplástica e leucemia (KHAN, 2007).

Estudos indicam que mesmo baixos níveis de exposição (< 5 ppm) podem resultar em supressão hematológica, a qual pode ser gerada pelo efeito sinérgico com outros poluentes ambientais (KHAN, 2007). Collins e cols., (1997) realizaram estudo com trabalhadores expostos diariamente a concentrações de benzeno de (0,55 ppm) e não observaram nenhuma hematotoxicidade.

A leucemia induzida pelo benzeno é a leucemia mielóide aguda (LMA), caracterizada pelo aumento no número de células morfológicamente similares aos mieloblastos. A LMA é freqüentemente precedida por anormalidades funcionais na medula óssea e no crescimento de células precursoras sanguíneas muito tempo antes de aparecer a leucemia. Essas anormalidades são chamadas coletivamente de síndrome mielodisplásica (MSD). A MSD é um grupo heterogêneo de desordens em células precursoras caracterizada por anemia, leucopenia e trombocitopenia (KHAN, 2007; PAIVA, 1995).

Os linfócitos aparentemente não são as células alvo principais para indução da leucemia provocada pelo benzeno em humanos. A leucemia é provavelmente causada por dano genético às células pluripotentes ou às células progenitoras da

medula óssea, as quais apresentam em sua superfície o antígeno CD 34 (SMITH e cols., 2000b). Em experimentos com células CD 34+ do sangue de cordão umbilical Smith e col. (2000b) observaram que estas células foram muito mais susceptíveis à indução de aneuploidia pela hidroquinona que as células CD 34- . Nestas células foi observado também que doses menores que 2 $\mu$ M produziram significativo aumento das trissomias dos cromossomos 7 e 8.

A sensibilidade das células progenitoras CD 34+ à hidroquinona é considerada maior quando comparada com a dos linfócitos e outras células humanas. Concentrações de hidroquinona  $\geq 25\mu$ M produzem significativo dano genético nos linfócitos adultos (Yager e cols., 1990). Monossomia e trissomia dos cromossomos 7 e 8 foram de 2 a 3 vezes mais frequentes nas células CD 34+ tratados com 2 ou 10 $\mu$ M de hidroquinona quando comparado com os controles (SMITH e cols., 2000).

### 2.3 EFEITOS GENOTÓXICOS DO BENZENO

Numerosas substâncias e agentes físicos presentes no ambiente são capazes de interagir com o DNA causando-lhe danos. Por outro lado os seres humanos possuem um potente sistema de defesa para superar potencialmente os efeitos prejudiciais desses agentes nocivos. Este sistema de defesa compreende: os processos metabólicos e farmacocinéticos que determinam a absorção, ativação e detoxificação de substâncias xenobióticas, citotoxicidade, sistema de reparo do DNA, sistema imunológico e outros processos de defesa para doença como o câncer (TARDIFF e cols., 1994).

A genotoxicidade pode resultar de mutações de ponto, rearranjos cromossômicos, recombinação, inserção, deleção ou amplificação de genes. A proliferação celular é necessária para converter o dano no DNA em mutação bem como para expansão clonal das células mutadas (TARDIFF e cols., 1994).

Existem três níveis de mutações, as mutações gênicas, as aberrações cromossômicas estruturais e as aberrações cromossômicas numéricas. Na mutação gênica um alelo de um gene muda, decorrente de alterações a nível de nucleotídeos, enquanto a mutação cromossômica resulta em alterações de segmentos de cromossomos, de cromossomos inteiros ou mesmo de conjuntos cromossômicos, levando a rearranjos em partes dos cromossomos e números anormais de cromossomos, respectivamente (GRIFFITHS e cols., 1998).

Entretanto, algumas mutações cromossômicas, em particular as que se originam de quebras cromossômicas, são acompanhadas de mutações gênicas

causadas pela alteração no ponto de quebra. Os efeitos de uma mutação cromossômica são devido a novos arranjos de cromossomos e dos genes que eles contêm (GRIFFITHS e cols., 1998).

O benzeno e seus metabólitos principalmente Para-Benzoquinona (P-BZ) e Hidroquinona, têm se mostrado potenciais formadores de mutações, tanto *in vivo* (RECIO, e cols., 2005) quanto *in vitro* (GASKELL e cols., 2005). Entretanto, em experimentos com leveduras Xie e cols., (2005) constataram que *in vivo* a P-BZ induziu deleção e inserção de nucleotídeos, já *in vitro* induziu apenas inserção.

Estudos em linfócitos de trabalhadores expostos ao benzeno evidenciaram várias formas de genotoxicidade incluindo aumento na frequência de micronúcleo, de trocas entre cromátides irmãs, aberrações cromossômicas (AC), dano oxidativo ao DNA e formação de aductos de DNA (LÉVAY E BODELL, 1992; KOLACHANA e col., 1993). A dose resposta para indução destas alterações cromossômicas é diferente a depender do agente indutor, do estágio do ciclo celular e do tipo de AC analisadas (KHAN, 2007; OBE e cols., 2002).

Os carcinógenos humanos que produzem dano genético por meio de interação eletrofílica com o DNA são chamados de carcinógenos genotóxicos, enquanto que os carcinógenos cujos mecanismos de ação aparentemente não envolvem dano detectável ao DNA são denominados de carcinógenos não genotóxicos ou promotores de tumor (TARDIFF e cols., 1994).

Na investigação de Tsutsui e cols. (1997) para avaliação do potencial carcinogênico e genotóxico do benzeno e seus principais metabólitos, o catecol foi o mais potente, sendo capaz de induzir transformações celulares morfológicas entre 1-



30  $\mu\text{M}$ , seguido pela hidroquinona entre 3-30  $\mu\text{M}$ , fenol 10-100  $\mu\text{M}$  e benzeno, a partir de 100  $\mu\text{M}$ , enquanto que AC foram induzidas especialmente pelo catecol e aneuploidias pelo catecol e pelo benzeno, sugerindo que o benzeno e seus metabólitos apresentam propriedades clastogênica e mutagênica.

A relação entre os níveis de exposição ao benzeno e citotoxicidade é um importante mecanismo para entendimento dos danos celulares e genômicos. Alguns estudos sugerem que exposição a elevadas doses de benzeno está associada à maior frequência de AC e aneuploidias. No entanto, os mecanismos de ação entre níveis de exposição e toxicidade não estão bem definidos, pois exposição a baixas doses de benzeno também representa um fator de risco para a saúde do trabalhador (GIVER e cols., 2001b; KASUBA e cols., 2000).

Estudos citogenéticos em trabalhadores expostos a baixos níveis de benzeno tiveram resultados contraditórios. Fredga e cols. (1979) não detectaram aumento na frequência de AC entre atendentes de postos de gasolina. Sarto e cols. (1984) não encontraram aumento estatisticamente significativo na frequência de trocas entre cromátides irmãs (TCI), mas observaram aumento significativo na frequência de AC estrutural em indivíduos expostos a baixos níveis de benzeno, em relação aos controles. Por outro lado, Tompa e cols. (1994) chegaram a conclusão de que exposição contínua a baixas doses de benzeno aumenta significativamente a frequência de AC e TCI.

A competição entre metabólitos de substâncias químicas diferentes, denominado de efeito metabólito combinado, pode resultar na modificação do processo metabólico normal das mesmas, reduzindo o efeito deletério de uma das

substâncias. Em experimentos com ratos, Bukvic e cols. (1998) observaram que as TCI induzidas pelo benzeno poderiam ser reduzidas pela presença do tolueno, principalmente se ambas substâncias estiverem presentes em altas concentrações.

Em experimento com células linfóides e mielóides, Giver e cols. (2001b) observaram maior frequência de aneuploidias em células com nove semanas de exposição ao benzeno, quando comparado com células expostas apenas cinco dias. Nos estudos de Tompa e cols. (1994) não foi observada correlação entre a frequência de alterações cromossômicas e o tempo de exposição ao benzeno. Entretanto, Giver e cols. (2001b) observaram que em exposições inferiores a uma semana, o benzeno é transitoriamente citotóxico, enquanto que exposições de mais de duas semanas, a toxicidade é mais persistente.

O tempo em que as alterações genéticas provocadas pelo benzeno continuam presentes no organismo humano ainda não está claro. AC típicas se mostraram aumentadas em estudos epidemiológicos até 30 anos após a exposição ao benzeno, enquanto a contagem sanguínea (hemograma) se encontrava normal (FORNI e cols., 1996). Por outro lado em experimentos com camundongos que receberam doses orais de benzeno foi observada persistência de 14% de células aneuploides até oito meses depois da exposição (GIVER e cols., 2001).

A maioria dos carcinógenos genotóxicos é considerada pré-carcinogênica, ou seja, é composta por substâncias estáveis no pH fisiológico e, portanto, incapaz de reagir com o DNA. No entanto, durante a biotransformação destes carcinógenos em compostos mais hidrossolúveis e passíveis de excreção, são gerados produtos extremamente eletrofílicos que podem reagir com centros nucleofílicos das células,

dentre eles regiões do DNA, RNA e proteínas (RIBEIRO e cols., 2003; TARDIFF e cols., 1994).

Uma rede complexa de sistemas de reparo do DNA constitui a principal barreira protetora contra as conseqüências deletérias de danos no DNA. Lesões persistentes no DNA acarretam um funcionamento celular incorreto e aumento da mutagênese. Contudo, as células desenvolveram meios para reparar esses danos causados no DNA, no sentido de manter a integridade do genoma (RIBEIRO e cols., 2003; TARDIFF e cols., 1994).

### 2.3.1 Classificação e definição das alterações cromossômicas

As aberrações cromossômicas podem ser: a) numéricas, as quais correspondem ao aumento ou diminuição do número cariotípico normal da espécie; b) estruturais, correspondem a alterações na estrutura dos cromossomos (BEIGUELMAN, 1982; GRIFFITHS, e cols., 1998).

As AC numéricas podem ser classificadas em: aneuploidias, quando ocorre aumento ou diminuição de cromossomos de um ou de mais pares; e euploidias que corresponde ao aumento ou diminuição do genoma isto é o conjunto cromossômico haplóide de uma espécie ( $n$ ). A análise destas alterações pode ser realizada através da análise do cariótipo por várias técnicas como contagem através de coloração convencional; quando necessária a identificação de cada cromossomo usa-se o bandamento G ou hibridação fluorescente “in situ” (FISH) (GRIFFITHS, e cols., 1998; ZHANG e cols., 1999).

Nas aneuploidias em que há diminuição do número cromossômico, diz-se que a célula somática apresenta monossomia de um determinado par cromossômico. A célula será nulissômica se os dois cromossomos do par estiverem ausentes. Já nos casos de aumento do número dos cromossomos, a célula é dita polissômica do cromossomo afetado, deste modo ela será denominada trissômica, tetrassômica, conforme existam na célula três, quatro. homólogos (BEIGUELMAN, 1982; GRIFFITHS, e cols., 1998).

Quanto às euploidias, as células podem ser classificadas como triploides, tetraploides, octoploides, de acordo com grau de ploidia múltipla que apresentam, ou

seja, conforme apresentem 3, 4, 8 genomas respectivamente (BEIGUELMAN, 1982; GRIFFITHS, e cols., 1998).

A perda cromossômica pode resultar de duas causas, uma das quais é a não-disjunção durante a mitose ou durante a meiose que é a principal causa da maioria das aneuploidias. A outra causa é a ocorrência de certas aberrações estruturais que impedem a viabilidade do cromossomo afetado e/ou da célula. A disjunção é a separação normal dos cromossomos homólogos ou das cromátides para os pólos opostos durante a divisão celular. A não-disjunção é uma falha neste processo de separação, e dois do mesmo par cromossômico (ou cromátides) vão para o mesmo pólo da célula e nenhum para o outro. Esta ocorre espontaneamente, como resultado de uma falha casual de um processo celular básico. Porém os processos moleculares exatos que falham não são conhecidos. Em sistemas experimentais a frequência da não-disjunção pode ser aumentada por interferência na ação dos microtúbulos (GRIFFITHS, e cols., 1998).

As AC estruturais podem ser estáveis e instáveis. As AC estáveis mais estudadas são as translocações (ocorre troca de segmentos entre dois cromossomos não-homólogos) deleções (ocorre perda de material cromossômico) e inversões (ocorrem duas quebras em um cromossomo, seguida da soldadura do segmento cromossômico em posição invertida). Estas tendem a permanecer nas células ao longo dos processos de divisão celular (RAMALHO e cols., 1990 citado por FERNANDES, 2005). Por outro lado as AC estruturais instáveis (cromossomos dicêntricos, em anel e figuras quadrirradiais) encontram dificuldades na mitose durante o pareamento dos cromossomos e são caracterizadas por alterações na

morfologia dos cromossomos. Os cromossomos fraturados (quebras e “gaps”) também são instáveis durante a divisão celular, por causa da possível aderência das extremidades quebradas a outras em idênticas condições (GRIFFITHS e cols., 1998).

A principal lesão no processo de formação das aberrações cromossômicas são as quebras na dupla fita do DNA. As extremidades quebradas ficam livres para interagir com os cromossomos, (se ocorrer com o cromossomo de origem pode resultar em restituição) ou unir-se com extremidades produzidas por uma segunda quebra de outro cromossomo. Estudos de aberrações cromatídicas indicam que muitas alterações envolvendo múltiplas quebras e\ ou cromossomos, levam à formação de configurações complexas, como os cromossomos em anel e as figuras quadrirradiais (PFIFFER, e cols., 2002).

Cromossomos marcadores são cromossomos muito pequenos, geralmente encontrados em estado de mosaico, presente na célula além do complemento cromossômico normal (cromossomos supranumerários). Embora superficialmente pareça uma anormalidade numérica também é um rearranjo estrutural. São considerados difíceis de serem caracterizados especificamente pela técnica de bandeamento G, devido ao tamanho. Por serem pequenos o padrão de bandas é inaparente, sendo necessária a hibridização in situ com fluorescência (FISH) para sua caracterização. Os cromossomos marcadores consistem, muitas vezes, em pouco mais que heterocromatina cêntrica. Os maiores contêm algum material de um ou ambos os braços cromossômicos, criando desequilíbrio em quaisquer genes que estejam envolvidos (THOMPSON e cols., 1993).

Durante a interfase, quando os cromossomos estão mais distendidos e metabolicamente ativos, eles são mais vulneráveis a variações do ambiente as quais provocam fraturas em sua estrutura. Os fatores, capazes de provocar danos aos cromossomos, podem ser radiações, infecções bem como produtos químicos (BEIGUELMAN, 1982; GRIFFITHS e cols.,1998).

As fraturas presentes nos cromossomos podem ser denominadas quebras cromossômicas (isocromátidica), quebras cromátidicas e falhas (“gaps”). Nas quebras cromossômicas as lesões do material cromossômico ocorrem antes do período de síntese do DNA (período S), na fase G do ciclo celular e as duas cromátides apresentaram fraturas em lugares correspondentes. Contudo as fraturas que afetam os cromossomos depois do período S (fase G2 do ciclo celular) afetaram apenas uma das cromátides e são denominadas quebras cromátidicas. Já os “gaps” são descontinuidades presentes nas duas cromátides ou apenas em uma (BEIGUELMAN, 1982; GRIFFITHS e cols.,1998).

Na prática, são consideradas como quebras as descontinuidades cromossômicas mais largas que a espessura de uma cromátide, com os fragmentos distais deslocados em relação ao eixo cromossômico. As descontinuidades cromossômicas com largura inferior à espessura de uma cromátide, que mantêm as extremidades proximal e distal na mesma direção, são classificadas como “gaps” (BEIGUELMAN, 1982; GRIFFITHS e cols., 1998).

### 2.3.2 Índice mitótico

Os efeitos genotóxicos e citotóxicos de determinadas substâncias químicas podem ser avaliados utilizando-se como biomarcadores as aberrações cromossômicas e o índice mitótico (IM)). A citotoxicidade pode ser considerada como indicação precoce de dano celular, a qual é decorrente do aumento da apoptose e diminuição da viabilidade celular, resultando na diminuição do índice mitótico em cultura de células (PEREIRA e cols., 2005; PEREZ e cols., 2005). Segundo Bakopoulou e cols. (2007); Cassani e cols. (2005) o aumento da frequência das aberrações cromossômicas estaria relacionado com marcante diminuição do IM.



## 2.4 EFEITOS MUTA/ CARCINOGENICO DO BENZENO

Os mecanismos de mutagênese e cacinogênese parecem estar intrinsecamente relacionados. A mutação é uma consequência do dano no DNA, que pode ser o estágio inicial no processo pelo qual a maioria dos carcinógenos químicos inicia a formação do tumor. No entanto as diferenças genéticas podem estar relacionadas com a sensibilidade ou resistência à exposição e determinação do risco de câncer (figura 1) (TARDIFF e cols., 1994; GATTAS e cols., 2000).

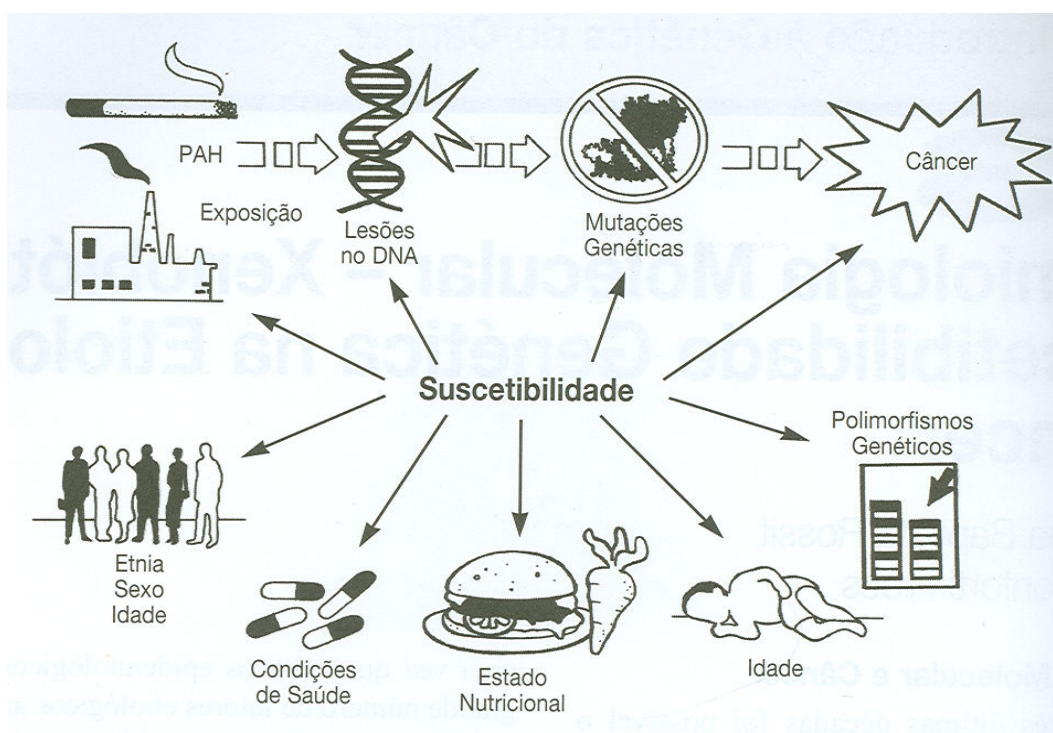


Figura 1. Representação esquemática dos fatores de risco, que podem causar danos citogenéticos e promover o desenvolvimento da tumorigênese. Louro e col., (2002).

O aparecimento de mutações ocorre em todos os seres vivos, muitas das quais não implicam mudanças detectáveis na atividade metabólica da célula ou do

organismo e, portanto, passam despercebidas. Enquanto que outras mutações que ocorrem em genes específicos podem determinar um crescimento desordenado das células ou pode determinar a morte celular (RIBEIRO e cols., 2003).

As mutações podem ser classificadas em: somáticas (ocorrem em células do corpo, decorrente de erros mitóticos) e germinativas (ocorrem nas células das gônadas sexuais masculinas ou femininas, determinadas por erros na gametogênese). Caso estas alterações genéticas ocorram em células somáticas, não há transmissão para a geração futura. Mas devem ser estudadas, para avaliação de sua importância toxicológica (GRIFFITHS e cols., 1998; TARDIFF e cols., 1994).

Os agentes mutagênicos que causam alterações nas seqüências de bases do DNA (mutação gênica) podem aumentar o aparecimento de mutações que estão associadas ao desenvolvimento de neoplasias. Durante os processos de divisões, uma célula poderá acumular mutações que poderão determinar a perda do controle de sua divisão, determinando assim o aparecimento do câncer (RIBEIRO e cols., 2003).

Segundo Smith e cols. (1996), o benzeno é carcinogênico pela ação conjunta de seus metabólitos que produzem quebras no DNA, inibição da topoisomerase II e dano ao fuso mitótico, os quais desencadeiam recombinação mitótica, translocação cromossômica e aneuploidia respectivamente. Estes eventos genotóxicos causariam a ativação de protooncogenes, a perda da heterozigosidade e inativação de genes supressores de tumor. Se isto ocorre na medula óssea ou em células progenitoras pode levar ao surgimento de clones com vantagens e crescimento seletivo.

Khalil e cols. (1994) relataram um elevado risco de tumor de cérebro em pessoas morando próximo a uma fábrica de produtos químicos. Câncer de bexiga em homens teria sido um outro fator indicativo de que exposição ocupacional em indústrias petroquímicas está associado a cânceres. Neste mesmo trabalho, os autores encontraram uma série de eventos em trabalhadores de uma refinaria, como elevação significativa na mortalidade por cânceres do sistema digestivo e pele, excesso de morte por leucemia, melanomas e mieloma múltiplo associados à exposição ocupacional destes indivíduos a produtos petroquímicos.

## 2.5 EXPOSIÇÃO OCUPACIONAL E DANO CITOGENÉTICO

Uma das conseqüências biológicas da exposição humana aos agentes químicos genotóxicos é a indução de aberrações cromossômicas, que são consideradas importantes biomarcadores de exposição. As AC representam a parte visível de um grande espectro de alterações no DNA (RIBEIRO e cols., 2003). Estudos epidemiológicos têm evidenciado que elevadas freqüências de AC em linfócitos do sangue periférico têm significativamente maior risco de desenvolver câncer (OBE e cols., 2002).

Os trabalhos sobre os efeitos citogenéticos em populações humanas expostas a produtos petroquímicos encontrados na literatura mostram resultados contraditórios. Estudos epidemiológicos (GU e cols., 1992; KEANE e cols., 1991) demonstraram que emissão de partículas de diesel induzem a formação de micronúcleo e TCI em cultura de células de mamíferos. Zhou e cols., (1986) observaram que longo período de exposição a processos de tratamento de efluentes em uma grande indústria petroquímica induziu dano citogenético significativo mensurado pelas técnicas de AC e TCI em linfócitos de sangue periférico. Por outro lado, alguns estudos não revelaram aumento na freqüência de TCI em trabalhadores expostos cronicamente a produtos petroquímicos (TSUTSUI e cols., 1997; GONÇALVES e cols., 2004).

O dano inicial que desencadeia o ganho ou perda dos cromossomos ou um rearranjo estrutural, como uma translocação de modo geral é considerado aleatório podendo ocorrer em qualquer cromossomo. Os metabólitos do benzeno causam

elevada taxa de danos nos cromossomos envolvidos na leucemogênese, e que como tal são seletivos em seus efeitos. Aberração clonal nos cromossomos 5, 7, 8 e 21 estão entre as mais comuns alterações citogenéticas encontradas em leucemia mielóide aguda e precursores da síndrome mielodisplásica (ZHANG e cols., 2005a,b).

Em um estudo piloto com seis trabalhadores altamente expostos ao benzeno e cinco trabalhadores não expostos Zang e cols. (2005a) observaram efeito seletivo da exposição ao benzeno em certos cromossomos: a frequência de monossomia dos cromossomos 1, 4, 9, 11, 22 e y foi igual nos trabalhadores expostos e controles (IRR = 1,0 – 1,2  $p \geq 0,4$ ) em contraste, a frequência de monossomia dos cromossomos 5, 6, 7 e 10 foi significativamente mais elevada nos trabalhadores expostos ao benzeno (IRR  $\geq 2,5$   $p = 0,001$ ). Similar efeito seletivo foi observado para as trissomias, uma vez que a exposição ao benzeno não teve essencialmente nenhum efeito na trissomia do cromossomo 15, mas produziu elevado e significativo aumento nas trissomias dos cromossomos 8, 9, 17, 21 e 22.

A perda ou ganho de cromossomos específicos é comum em síndrome mielodisplásica (MSD) e leucemia. A monossomia dos cromossomos 5 e 7 é o evento precoce mais comum em MSD e leucemia mieloide aguda (AML). Aumento na frequência de monossomia do cromossomo 7 e trissomia do 8 tem sido detectado em células do sangue periférico de trabalhadores expostos ao benzeno (ZHANG e cols., 2005a, b).

Estudos têm demonstrado que indivíduos expostos ocupacionalmente ao benzeno apresentam um padrão de AC, envolvendo perda de todo ou parte dos

cromossomos 5 e/ou 7, aneuploidia do grupo C (6-12 e X) bem como trissomia do 8 (MIRANDA e cols., 1997; STILLMAN e cols., 1999; ZHANG e cols., 1999).

Alterações cromossômicas numéricas e estruturais, como monossomia e trissomia dos cromossomos 5, 7, 8, e 21, hiperdiploidia do cromossomo 1, elevada incidência de cromossomo dicêntrico, quebra na região 1q12, translocação entre o cromossomo 8 e um outro não identificado [t(8:?)] e entre o cromossomo 21 e um outro não identificado [t(21:?)] foram detectadas por FISH em linfócitos humanos expostos a 124-benzenotriol (BT), hidroquinona (HQ) e ácido trans, trans-mucônico (AM) (ZHANG e cols., 1999; CHUNG e cols., 2002; EASTMOND e cols., 2001; KASUBA e cols., 2000).

Zhang e cols. (1998) estudaram 43 trabalhadores saudáveis expostos a elevadas concentrações de benzeno (média de 31ppm). Em comparação aos seus controles, observaram aumento na frequência das seguintes aneuploidias: monossomia dos cromossomos 5 e 7, trissomia e tetrassomia dos cromossomos 5, 7 e 1.

Em investigação de casos de leucemia mielóide aguda e síndromes mielodisplásicas associadas a altas concentrações de benzeno (>31ppm), Smith e col. (1998, 2000b) detectaram aumento na frequência das seguintes alterações cromossômicas: trissomia do 8 e monossomia do 5 e 7, translocações (8:21) e (9:22), inversão (16) e deleção (5q), enquanto que trabalhadores saudáveis com elevada exposição ao benzeno teriam revelado aumento na frequência de trissomia do cromossomo 9.

Em experimentos com células tronco hematopoiética, (Giver e cols., 2001) postularam que a exposição a agentes tóxicos, associada ao aumento do risco de leucemia estaria induzindo mudança genômica nestas células, como aneussomia dos cromossomos 2 e 11, observada em células de ratos que receberam doses tóxicas de benzeno. Foi verificado aumento na frequência destas alterações de quatro para oito, seis dias após repetidas exposições a benzeno ou tricloroetileno independente da dose aplicada.

As trocas de material genético no grupo C estariam ligadas a uma seqüência de eventos que poderiam alterar a hematopoiese normal, resultando em grande risco para desenvolver leucemia. Trissomia dos cromossomos do grupo C poderia ser detectada em desordens mieloproliferativas e em metaplasia com possível leucemia. Conseqüentemente, alterações numéricas e estruturais de cromossomos do grupo C podem desempenhar importante papel nas leucemias induzidas pelo benzeno (ROWLEY e cols., 1996).

Como os sinais clínicos da intoxicação crônica por benzeno não são bem definidos e só se desenvolvem algum período depois da exposição, as AC presentes em linfócitos de sangue periférico têm-se mostrado um biomarcador precoce e sensível dos efeitos da exposição. Estas AC, quando persistentes, estão associadas a um risco maior de desenvolver câncer no futuro, devendo ser melhor investigadas, uma vez que trabalhadores expostos à elevada concentração de benzeno tiveram suas mortes diagnosticadas por eritroleucemia aguda, tumor de cérebro, câncer de pulmão e de cavidade paranasal (BOGADI e cols., 1997; FORNI e cols., 1996; ZHANG e cols., 1998, 2002).

Estudos epidemiológicos têm mostrado resultados contraditórios sobre a associação entre o tempo, a dose de exposição ao benzeno e a frequência de AC e aneuploidias presente em linfócitos, bem como entre o tempo de exposição e a persistência destas alterações. Assim, torna-se necessária a realização de estudos que investiguem estes aspectos nos ambientes de trabalho, visando a implantação de programas de prevenção de riscos para a saúde do trabalhador (GIVER e cols., 2001).



### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo geral**

-Investigar a frequência de aberrações cromossômicas numéricas e estruturais em trabalhadores com alteração hematológica (benzenismo) devido à exposição a benzeno.

#### **3.2 Objetivos Específicos**

- Verificar se trabalhadores com benzenismo apresentam maior frequência de aneuploidias e alterações cromossômicas estruturais quando comparado com trabalhadores sem benzenismo.

- Identificar os cromossomos afetados.

- Determinar o índice mitótico nos grupos com e sem benzenismo.

## **4 MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1 Tipo do estudo:**

Estudo caso-controle não-pareado, a partir da definição de grupos, de portadores e de não-portadores de benzenismo.

### **4.2 População e área do estudo**

Este trabalho é parte de um projeto mais abrangente, referente à exposição a benzeno (Rêgo e cols., 2002), onde estão sendo investigadas alterações hematológicas, imunológicas, doença periodontal e polimorfismos genéticos. A seleção dos indivíduos foi realizada em três etapas. A primeira correspondeu a um estudo de demanda ao serviço. Foram estudados todos os trabalhadores que foram registrados no Ambulatório de Doenças do Trabalho (CESAT) no período de 1988 a 1999 com diagnóstico de qualquer tipo de alteração hematológica, de acordo com a classificação Internacional de Doenças – CID 10. O levantamento inicial identificou 830 casos. Na segunda etapa, foram coletados, dos prontuários médicos, as demais variáveis clinico-epidemiológicas, como: antecedentes médicos, dados da doença atual, os resultados de exames laboratoriais (principalmente os hemogramas e exames da medula óssea), hábitos de vida e informações sobre exposição a

benzeno e a outras substâncias químicas em ambiente de trabalho, com base na história ocupacional, “ramo de atividade” e “ocupação do trabalhador”. Dos 830 pacientes, 270 eram diretamente vinculados a empresas que manipulam benzeno, e estima-se que cerca de 500 pacientes tenham tido exposição a benzeno, levando-se em consideração os trabalhadores de empreiteiras e os empregos anteriores. Para 685 pacientes que tiveram a emissão de um laudo do CESAT, 294 foram classificados como portadores ou prováveis portadores de patologia relacionada ao trabalho, neste caso intoxicação crônica por benzeno (ICB). Esses casos foram revisados para se confirmar o diagnóstico com base nos seguintes critérios: exposição ocupacional a benzeno; número de leucócitos inferior a 4.000 e de neutrófilos inferior a 2.000; tendência decrescente do número destas células, a partir do início da exposição. Na terceira etapa, 50 pacientes com diagnóstico mais provável de ICB foram selecionados por um hematologista com base nos referidos critérios. Os controles foram selecionados do mesmo arquivo de onde os casos provieram (CESAT), sem exposição a benzeno e sem alterações hematológicas (figura 1), com diagnóstico de outras doenças (perda auditiva por ruído e lesão por esforço repetitivo).

Dos 50 casos e 50 controles identificados no projeto original, foram selecionados para este estudo, aleatoriamente, 20 indivíduos com benzenismo e 16 controles, do mesmo sexo e faixa etária

### **4.3 Coleta de dados**

Antes da coleta do sangue os indivíduos foram submetidos a um questionário específico para avaliação de exposição, dados pessoais e investigação de possíveis fatores de confundimento como: fumo, álcool, idade, sexo, raça, doenças virais, exposição a raios X e uso de medicamentos. Foram excluídos os indivíduos com história de doenças virais, como Herpes simples e vírus da hepatite tipo B (Almeida-Melo, 1978).

### **4.4 Cultura de linfócitos para obtenção de cariótipo**

Através de punção venosa, de cada indivíduo foram coletados cerca de 5 ml de sangue periférico com seringa estéril e descartável, contendo o anticoagulante heparina sódica 5000 U/ml. As culturas foram realizadas segundo procedimento de (Moorhead, e col., 1960) com modificações.

Foram estabelecidas de cada indivíduo três culturas de 5 ml de meio RPMI 1640, 20% (1 ml) de soro bovino fetal, e 2% (0,1 ml) de fitohemaglutinina (todos da CULTILAB), para estimular a divisão celular. Em seguida, foram adicionadas 18 gotas de sangue total. As culturas foram incubadas em estufa comum a 37 °C por 54 horas (duas culturas) e 72 horas (uma cultura).

#### **4.5 Preparação citológica para retirada da cultura**

Aproximadamente 1 hora antes do término da incubação, adicionou-se 0,1 ml de colcemid 16 µg/ML (CULTILAB) em cada frasco de cultura, para obtenção de células em metáfase.

Após quarenta e cinco minutos de incubação, a cultura de linfócitos foi transferida para um tubo cônico de 10ml estéril e centrifugada a 1000 RPM por 5 minutos. Em seguida o sobrenadante foi descartado e o sedimento foi lavado com 4 ml de solução de KCL a (0,075M) para hipotonização das células e rompimento das membranas celulares.

Em seguida este material foi para o banho-maria na temperatura de 37°C por 12 minutos. Decorrido este tempo, foi adicionado 1 ml de fixador, que consiste em metanol (MERCK) e ácido acético na proporção de 3:1 respectivamente. Centrifugou-se a 1000 RPM por 5 minutos, o sobrenadante foi desprezado e o sedimento lavado em 4 ml de fixador.

Após o repouso de uma hora, na geladeira, o material foi centrifugado novamente a 1000 RPM por 5 minutos, sendo desprezado o sobrenadante e resuspendido o sedimento em 4 ml de fixador. Repetiu-se este procedimento por duas vezes ou até a obtenção da camada de linfócitos límpido esbranquiçado em cerca de 0,5/1ml de fixador, a depender da quantidade de material, para preparação das lâminas.

#### **4.6 Preparo das lâminas**

Antes do preparo das lâminas, as mesmas eram lavadas com sabão extran e armazenadas na geladeira a 4°C imersas em água destilada e sem resíduos de gordura. Retirou-se a lâmina do reservatório, deixando escorrer o excesso de água em papel absorvente e gotejou-se 2 a 4 gotas do material sobre a lâmina em posição horizontal, inclinando-a levemente para o espalhamento do material.

#### **4.7 Preparo das lâminas para análise de quebras e “gaps”**

Após secagem das lâminas à temperatura ambiente ou à 37°C em estufa de secagem, as lâminas foram coradas com Giemsa (MERCK) cobrindo toda a lâmina com uma camada uniforme por 3 minutos (coloração convencional). Em seguida, as lâminas foram lavadas em água destilada e colocadas para secar na estufa por alguns minutos.

As metáfases eram escolhidas pela qualidade técnica, em teste cego, ao microscópio de luz na objetiva de 10X. Uma vez localizada a metáfase pela qualidade técnica, mudou-se para a objetiva de imersão, de 100X. Para análise inicialmente contava-se os cromossomos. As células contendo menos que 45 cromossomos eram desprezadas e procurava-se outra da mesma forma.

Investigou-se a presença de aberrações cromossômicas estruturais (quebras e “gaps”) em culturas de 54 h e 72 h. Para cada experimento foram analisadas 50 metáfases por indivíduo, perfazendo um total de 6.200 (seis mil e duzentas) células,

das quais 3.100 foram para detectar “gaps” ( 1.400 54h e 1.700 72h) e 3.100 para quebras ( 1.400 54h e 1.700 72h). Em culturas de 54 h foram investigados 28 indivíduos, sendo 16 casos e 12 controles e para as culturas de 72 h foram investigados 34 indivíduos, sendo 18 casos e 16 controles. As microfotografias de células em metáfase foram obtidas através do sistema de imagem LEICA 4.000.

#### **4.8 Técnica de bandeamento G**

O procedimento para obtenção de banda G seguiu o procedimento de Seabright., (1971), com modificações.

Após o preparo das lâminas, as mesmas foram envelhecidas em estufa a 37°C por um período de 5 a 7 dias, para a revelação das bandas G por tripsinização dos cromossomos. Foi preparada uma solução de tripsina a 1%:0,1gr de tripsina (DIFICO) dissolvida em 100 ml de PBS, a qual era aquecida em banho-maria a 37°C. Em seguida mergulhava-se as lâminas por 5 a 30 segundos.

Imediatamente após a tripsinização as lâminas foram banhadas em água destilada e em seguida coradas durante 5 minutos em solução de Giemsa. Depois foram lavadas em água destilada, colocadas para secar em estufa a 37°C ou a temperatura ambiente e analisadas ao microscópio de luz.

As análises das metáfases bandeadas foram realizadas em teste cego ao microscópio de luz na objetiva de 100X.

Para investigar a presença de alterações cromossômicas numéricas (aneuploidias), foram analisadas 100 metáfases de cada indivíduo, sendo 50

metáfases de culturas de 54 horas e 50 de culturas de 72 horas, perfazendo um total de 3.100 células (1.400 54h e 1.700 72h). Em cada metáfase foram identificados os 46 cromossomos, através do padrão específico de bandas, seguido do desenho das células que apresentavam metáfases alteradas, para investigar possível ganho ou perda de cromossomos específicos.

#### **4.9 Cálculo do Índice mitótico**

O cálculo do índice mitótico (IM) seguiu as recomendações de Almeida-Melo, (1985).

Foram observadas mil células por indivíduo, perfazendo um total de 62.000, sendo 28.000 em culturas de 54 horas e 34.000 em culturas de 72 horas.

A coloração das lâminas foi realizada utilizando o mesmo procedimento para análise das quebras e “gaps”. A análise para cálculo do índice mitótico foi realizada em teste cego ao microscópio de luz na objetiva de 100X , registrando-se a frequência de núcleos interfásicos e metáfases. Utilizou-se a seguinte fórmula, para o cálculo do IM.

$$\text{IM: } \frac{\text{número de metáfases}}{\text{número de núcleos interfásicos}} \times 100$$



Os resultados foram analisados através de frequência simples, comparação de médias de AC e aneuploidias nos dois grupos, através do teste de Kruskal-Wallis, adotando-se um alfa de 5% e teste T de student por comparação de duas médias independentes. Foi utilizado o software EPI-INFO.

## 5 RESULTADOS

Dos 36 indivíduos estudados, 32 (89,0%) eram do sexo masculino. Os casos apresentaram uma média de 52,4 anos, variando entre 38 a 67 anos e os controles de 51,4 anos, variando entre 37 a 72 anos. Não houve diferença estatisticamente significativa na média das idades entre os dois grupos.

A tabela 1 descreve as médias dos números absolutos de leucócitos dos grupos com benzenismo e controles. Para a comparação das médias entre os grupos utilizou-se o valor do percentual médio de cada grupo (tabela 2), devido a heterogeneidade dos grupos em relação ao número de células. Foram encontradas diferenças estatisticamente significantes para os neutrófilos ( $p= 0,001$ ) e monócitos ( $p=0,001$ ).

Tabela 1 Descrição das médias dos números absolutos de leucócitos e seus subtipos entre os grupos casos e controles.

células	Grupo com benzenismo	Controles
Leucócitos	3244	6668
Neutrófilos	1400	3892
Linfócitos	1375	2091
Monócitos	234	344
Eosinófilos	206	309

Tabela 2 Distribuição do percentual médio e desvio padrão do número de neutrófilos, linfócitos, monócitos e eosinófilos entre os grupos casos e controles.

células	Grupo com benzenismo		Controle		Valor de P
	$\bar{X}$ %	DP	$\bar{X}$ %	DP	
Neutrófilos	42,6	8,3	56,1	11,3	0,001
Linfócitos	59,8	82,0	33,4	9,8	0,124
Monócitos	7,3	1,6	5,3	1,3	0,001
Eosinófilos	6,0	4,6	4,6	4,1	0,250

A tabela 3 mostra a distribuição dos trabalhadores por grupo racial e por grupo experimental (caso e controle). A distribuição racial entre casos e controles foi bastante similar, não evidenciando diferenças estatisticamente significante ( $p=1,000$ ) quando comparado os grupos branco e não branco. Sendo observada maior frequência de indivíduos no grupo racial mulato médio: 35% nos casos e 37,5% nos controles. Os indivíduos são predominantemente mulatos (60,0% nos casos e 75% nos controles) e negros (30% nos casos e 12,5% nos controles).

Tabela 3 Distribuição dos números (N) e dos respectivos percentuais (%) dos indivíduos com benzenismo e dos controles segundo grupo racial.

GRUPO/RAÇA	BRANCO		NEGRO		M.CLARO		M.MÉDIO		M.ESCURO		TOTAL
	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	
<b>CASO</b>	2	10,0	6	30,0	2	10,0	7	35,0	3	15,0	20
<b>CONTROLE</b>	2	12,5	2	12,5	3	18,75	6	37,5	3	18,75	16
<b>TOTAL</b>	4	11,1	8	22,2	5	13,9	13	36,1	6	16,7	36

Valor p: (Teste Qui-quadrado ( $X^2$ ))

$p=1.000$

Como mostra a tabela 4, o hábito de tomar café foi observado em 90,0% dos casos e 93,75% dos controles, não mostrando diferenças significantes entre ambos os grupo ( $p= 1,000$ ); o consumo de álcool também foi freqüente em ambos os grupos 50,0% nos casos e 81,25% nos controles ( $p= 0,112$ ); quanto ao hábito de fumar, este foi mais freqüente nos controles (18,75%) que nos casos (5,0%), mas não foi estatisticamente significativa ( $p=0,303$ ). Não foi possível quantificar a quantidade de café, álcool e cigarro consumido por cada indivíduo.

Tabela 4 Distribuição dos números (N) e dos respectivos percentuais (%) dos indivíduos com benzenismo e dos controles, segundo as variáveis do estilo de vida estudadas.

HABIT/GRUP		CASO		CONTROLE		TOTAL		VALOR P
		N	%	N	%	N	%	
CAFÉ	SIM	18	90,0	15	93,75	33	91,67	1,000
	NÃO	02	10,0	1	6,25	3	8,33	
ÁLCOOL	SIM	10	50,0	13	81,25	23	63,89	0,112
	NÃO	10	50,0	3	18,75	13	36,11	
FUMO	SIM	01	5,0	3	18,75	4	11,11	0,303
	NÃO	19	95,0	13	81,25	32	88,89	

Valor p: (Teste Qui-quadrado (X<sup>2</sup>))

A tabela 5 mostra o percentual de indivíduos que tinha alguma doença, usava medicamento, e/ou tinha exposição a raios X no período da coleta. Não foram observadas diferenças significantes para nenhuma das variáveis quando comparados casos e controles ( $p=0,024$ ), ( $p= 0,526$ ) e ( $p= 0,478$ ) respectivamente. Foi observada maior frequência de doenças nos controles (31,25%), que nos casos (10%). O uso de medicamentos foi mais freqüente nos controles 56,25%, que nos casos 40%. Quanto a realização de raios X foi mais freqüente dentre os casos 55%, que dentre os controles 37,5%. Em ambos os grupos hipertensão foi a doença mais observada, ficando os casos de viroses em segundo lugar.

Tabela 5 Distribuição dos números (N) e dos respectivos percentuais (%) dos indivíduos com benzenismo e dos controles, segundo as variáveis do estilo de vida estudadas.

HABT/GRUP		CASO		CONTROLE		TOTAL		VALOR P
		N	%	N	%	N	%	
DOENÇA	SIM	2	10,0	5	31,25	7	19,44	0,024
	NÃO	18	90,0	11	68,75	29	80,56	
MEDICAM	SIM	8	40,0	9	56,25	17	47,20	0,526
	NÃO	12	60,0	7	43,75	19	52,80	
RAIOS X	SIM	11	55,0	6	37,50	17	47,20	0,478
	NÃO	9	45,0	10	62,50	19	52,80	

Valor p: (Teste Qui-quadrado ( $X^2$ ))

A tabela 6 mostra as médias das freqüências de “gaps,” quebras (figura 2) e aneuploidias analisadas em culturas de 54h e 72h em casos e controles, respectivamente. A diferença das freqüências de “gaps” foi estatisticamente significativa pelo teste de Kruskal-Wallis apenas em culturas de 54h ( $2,13 \pm 2,86$  e  $0,97 \pm 1,27$   $p= 0,001$ ). As quebras mostraram significância estatística apenas em culturas de 72h ( $0,21 \pm 0,58$  e  $0,12 \pm 0,4$ ,  $p= 0,0002$ ). As médias das freqüências de aneuploidias não foram estatisticamente diferentes entre casos e controles, tanto em culturas de 54h ( $0,031 \pm 0,18$  e  $0,027 \pm 0,17$   $p= 0,614$ ), quanto em culturas de 72h ( $0,19 \pm 0,13$  e  $0,02 \pm 0,14$   $p= 0,868$ , respectivamente). Não se observou freqüência destacada para cromossomos específicos.

Tabela 6 Médias (x) e desvio padrão (dp) de gaps, quebras e aneuploidias em culturas de linfócitos periféricos de 54h e 72h, analisadas em 50 metáfases por indivíduo com benzenismo e nos controles.

	54 HORAS*			72 HORAS**		
	CASO	CONTROLE	VALOR P***	CASO	CONTROLE	VALOR P***
“gaps”	2,13 ± 2,86	0,97 ± 1,27	0,001	0,74 ± 1,14	0,78 ± 1,21	p = 0,612
quebras	0,37 ± 1,19	0,24 ± 0,58	0,539	0,21 ± 0,58	0,12 ± 0,4	p= 0,0002
aneuploidia	0,031 ± 0,18	0,027 ± 0,17	0,614	0,19 ± 0,13	0,02 ± 0,14	p = 0,868

\* 16 casos e 12 controles

\*\* 18 casos e 16 controles

\*\*\* Teste de Kruskal-Wallis

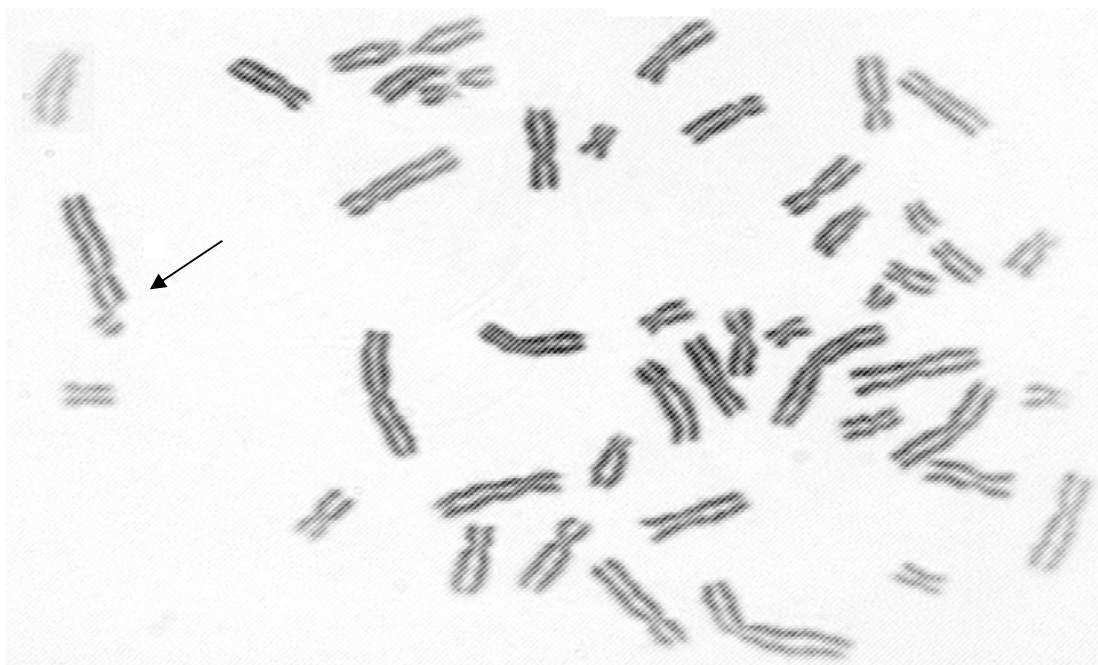


Figura 2 Metáfase apresentando um cromossomo com uma quebra cromossômica. Maternidade Climério de oliveira, laboratório de citogenética Humana

A tabela 7 mostra o número de cromossomos não identificados (marcadores) (figura 3) encontrados nos casos e controles em culturas de 54h e 72h. Foram observados maior número nos casos (oito) que nos controles (cinco), sendo mais freqüente em culturas de 54h tanto nos casos (cinco) quanto nos controles (três).

Tabela 7 Distribuição dos números (N) dos cromossomos marcadores (não identificados) observados nos indivíduos com benzenismo (casos) e nos controles em culturas de linfócitos periféricos de 54 e 72 horas.

TEMPO	CASO	CONTROLE	TOTAL
54h	5	3	8
72h	3	2	5
TOTAL	8	5	13



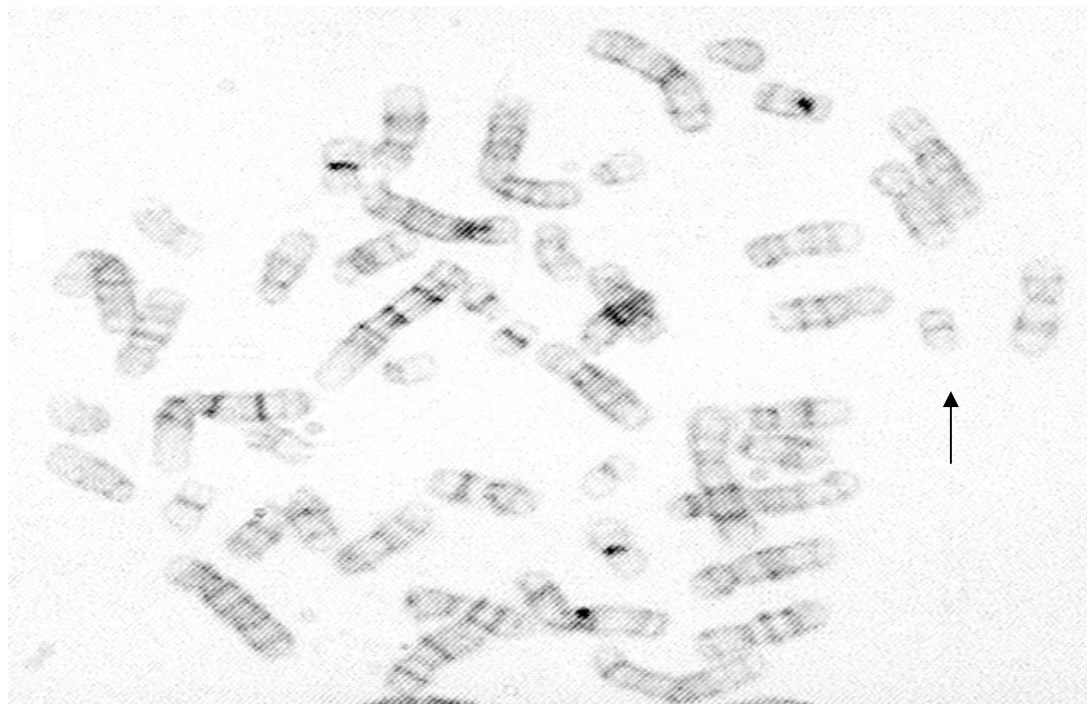


Figura 3 Cromossomo marcador observado em um indivíduo do grupo controle em cultura de 72h. Cariótipo 48,XY,+ 6, 3 e mar.

Com base nos resultados da tabela 8, não se observou diferença entre os grupos quanto ao índice mitótico, pelo teste T de student tanto em culturas de 54h (12,41 e 11,05) quanto naquelas de 72h (12,16 e 15,36) em casos e controles, respectivamente.

Tabela 8 Médias do índice mitótico em culturas de linfócitos de sangue periférico de 54 e 72h, analisadas em 1000 células por indivíduo com benzenismo e nos controles.

INDIVÍDUOS	54 HORAS		72 HORAS	
	CASO	CONTROLE	CASO	CONTROLE
1	6,1	9,6	7,6	13,7
2	6,7	8	5,7	19,3
3	7,2	14,1	6,7	5,2
4	5,4	9,8	11,5	14,4
5	13,6	6,3	5,4	20
6	9,4	9,7	8,2	10,8
7	17,1	12,6	13,2	4,3
8	16,3	8,2	13,4	17,7
9	14,4	14,8	11,8	16,8
10	13,1	11,6	18,5	22,6
11	26,2	13,6	11,1	12,7
12	12,4	14,4	24,4	10,3
13	15	--	17,3	16
14	11,8	--	18,5	19,3
15	9,9	--	11,7	30
16	14,1	--	15,5	12,8
17	--	--	9,6	--
18	--	--	8,9	--
<b>MÉDIAS</b>	<b>12,41*</b>	<b>11,05*</b>	<b>12,16**</b>	<b>15,36**</b>

-- material não adequado para análise

\* p= 0,461

\*\* p=0,121

Foram observadas duas figuras quadrirradiais (figura 4) uma dentre os casos e uma nos controles, ambas em culturas de 54 h.

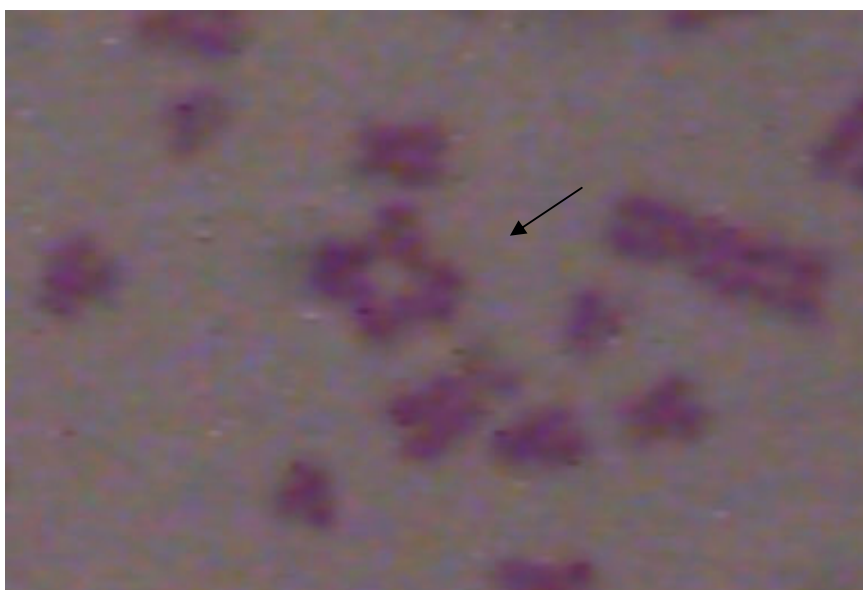


Figura 4 figura quadrirradial observada em um indivíduo do grupo caso em cultura de 54 h.

## 6 DISCUSSÃO

As freqüências médias de quebras por células examinadas em culturas de 54h (0,37) e 72h (0,21) estão dentro do esperado para amostras da população geral que é de até 2%. O número médio de gaps, que é de até 4,5% para a população geral também está acima do que foi encontrado, tanto em 54h (2,13) como em 72h (0,74) (Beiguelman, 1982). Isto sugere que: a) no presente estudo o fato de os indivíduos estarem afastados da exposição possa ter resultado na diminuição das freqüências das aberrações cromossômicas pelo sistema de reparo durante as sucessivas divisões celulares; b) esteja relacionada com o persistente dano na replicação do DNA desses trabalhadores, levando à perda das células danificadas por seleção negativa; c) é possível que após alguns anos afastados da exposição, os danos genômicos não sejam mais detectadas em linfócitos do sangue periférico, em decorrência dos mecanismos anteriores (a e b), sendo necessários outros meios de investigação, envolvendo, por exemplo, células da medula óssea, e técnicas moleculares, para detecção de pequenos danos no DNA. Smith e cols., (2000) em experimentos com células progenitoras constataram que as células da medula são mais sensíveis aos efeitos tóxicos do benzeno que linfócitos periféricos, granulócitos e outras linhagens celulares; d) que fatores desconhecidos possam ter selecionado para este estudo um subgrupo de indivíduos geneticamente não susceptíveis aos efeitos tóxicos da exposição ao benzeno.

O polimorfismo das enzimas que ativam e detoxificam o benzeno são provavelmente determinantes genéticos da toxicidade induzida pelo mesmo. Foi

observado que a GSTT1 é um importante determinante da heterogeneidade da suscetibilidade individual a dano genético (trocas entre cromátides irmãs) associado à exposição ao benzeno e outros xenobióticos (XU e cols., 1998; ROSSINI e cols., 2002). Estudos indicam que a freqüência do genótipo GSTM1 nulo na população de São Paulo é significativamente maior entre brancos (55,4%) que entre mulatos (41,4%) e negros (32,8%), ou entre indivíduos em geral (35,7%) na Bahia (GATTÁS e cols., 2004). Levando em consideração que o referido genótipo nulo é menor entre os negros, e que os indivíduos do presente estudo são predominantemente mulatos (66,7%) e negros (22,2%), este evento pode ter sido um fator de proteção que diminuiu a susceptibilidade aos efeitos genotóxicos da exposição ao benzeno.

Khalil e cols. (1994) não encontraram diferenças estatisticamente significantes entre indivíduos expostos ( $7,55 \pm 0,55$ ) e não-expostos ( $6,2 \pm 0,67$ ) a produtos do petróleo. Tompa e cols., (1995) constataram uma complexa relação entre diminuição dos níveis de exposição ao benzeno e significativa diminuição das freqüências de AC e gaps, em trabalhadores expostos ao benzeno. No presente estudo onde os indivíduos estão afastados da exposição entre três e treze anos foram observadas diferenças estatisticamente significantes entre casos e controles, para quebras 72h e “gaps” 54h. Estes resultados podem ser um indicativo do efeito genotóxico do benzeno para linfócitos do sangue periférico, concordando com outros estudos que reportam o potencial clastogênico e mutagênico do benzeno (GU e cols., 1992; KEANE e cols., 1991; ZHOU e cols., 1986)

Alguns autores defendem o efeito seletivo do benzeno em determinados cromossomos e sugerem que as alterações citogenéticas mais comuns envolvem as

monossomias e trissomias dos cromossomos 5, 7, 8 e 21 (ZHANG e cols., 2005a,b). Nesse estudo não foi observada diferenças estatisticamente significantes entre casos e controles para aneuploidias com 54h nem 72h. Foi encontrada maior frequência de monossomias tanto em culturas de 54h quanto em culturas de 72h, porém esta ocorrência foi muito variada, envolvendo cromossomos distintos, tanto entre si quanto naqueles citados pela literatura, nos casos e nos controles, sugerindo que estas podem ser artefato de cultura.

Os valores dos índices mitóticos foram bastante similares em ambos os grupos, conforme o teste T student não evidenciando diminuição da viabilidade celular dos casos quando comparado com os controles.

A ocorrência de um complexo e variado padrão de exposição em diferentes ambientes ocupacionais, bem como a carência de informações quantitativas dos níveis de exposição, dificultam a mensuração dos efeitos genéticos sobre a saúde humana decorrentes da exposição ocupacional. Em estudo com trabalhadores de uma plataforma de petróleo (Anderson e cols.,1996) observaram significativo aumento da frequência de aberrações cromossômicas dos casos (0,063) quando comparado com os controles (0,023), mas este aumento não foi correlacionado com o tempo de exposição. Contradizendo estes resultados (Giver e cols., 2001) em experimentos com camundongos tratados com altas doses de benzeno constataram que quanto maior o tempo e os níveis de exposição maior a frequência dos danos citogenéticos.

Adicionalmente o tempo em que as alterações genéticas provocadas pelo benzeno continuam presentes no organismo humano ainda não está claro. Augusto

e cols., (1993) constataram que 48% dos pacientes com benzenismo afastados da exposição há cinco anos não tinham suas células sangüíneas normalizadas. Segundo Forni e cols. (1996) as AC típicas se mostraram aumentadas em estudos epidemiológicos até 30 anos após a exposição ao benzeno. Já (Giver e cols., 2001) em experimentos com camundongos que receberam doses orais de benzeno observaram a persistência de 14% de células aneuploides até oito meses depois da exposição.

Em estudos de mutagenicidade é esperado que as culturas de 54h sejam mais sensíveis para mensurar as alterações cromossômicas e evidenciar as diferenças entre os grupos, uma vez que em culturas de 72h muitas células com danos genômicos (instáveis) não sobrevivem durante os processos de divisão celular e são eliminadas durante o cultivo. Isto sugere que: a) o método laboratorial talvez esteja subestimando o real valor do evento avaliado nos grupos estudados (viés de aferição); b) fatores desconhecidos possam ter interferido, e estes eventos aconteceram ao acaso.

No presente estudo foram realizadas culturas de 72h porque os indivíduos com benzenismo apresentam leucopenia e o pico da atividade mitótica é alcançado entre 60-70 horas de cultivo (BARCH e cols., 1991).

A presença de metabólitos do benzeno em alguns componentes da dieta alimentar e em produtos farmacêuticos, bem como a sazonalidade são considerados importantes fatores de confundimento, não considerados nessa análise, podendo mascarar alguns resultados. A hidroquinona e o catecol estão presentes no café e no cigarro em níveis relativamente altos e o fenol está presente em muitos alimentos

(SMITH, 1996). A sazonalidade pode influenciar na freqüência de AC, pois, a poluição ambiental parece ser maior no inverno (ANDERSON, e cols., 1996).

Um outro aspecto que chamou a atenção foi o fato de 11 indivíduos (sete casos e quatro controles) apresentarem cromossomos marcadores e dois indivíduos apresentarem figuras quadrirradiais (um caso) e um (controle). Os efeitos clínicos destas alterações não são bem conhecidos (Thompson e cols., 1993), mas como são alterações cromossômicas estruturais e envolvem quebras cromossômicas, indicam instabilidade cromossômica (PFIFFER e cols., 2002).

Atualmente sabe-se que a saúde do trabalhador está intrinsecamente relacionada com as condições do ambiente de trabalho e com a susceptibilidade genética de cada indivíduo. No entanto, estudos epidemiológicos têm mostrado resultados contraditórios sobre a associação entre o tempo, a dose de exposição ao benzeno e a freqüência de AC presentes em linfócitos do sangue periférico, bem como entre o tempo de exposição e a persistência destas alterações. As variações interindividuais quanto à capacidade de metabolização de substâncias tóxicas como, por exemplo, o benzeno podem estar relacionadas com a sensibilidade ou resistência à exposição e indução da citotoxicidade (GATTAS e cols., 2000; ROSSINI e cols., 2002).

Assim, torna-se necessária a realização de estudos que investiguem estes aspectos nos ambientes de trabalho, visando à implantação de programas de prevenção de riscos para saúde do trabalhador, com utilização de marcadores que possam ser úteis e sensíveis na detecção de alterações sub-clínicas e assim minimizar os efeitos da exposição (GIVER e cols., 2001; ZHANG e cols., 2005).



## 7 CONCLUSÃO

Os resultados desse trabalho não permitem concluir de forma definitiva sobre a existência de diferença quanto aos efeitos genotóxicos em indivíduos com diagnóstico de intoxicação crônica por benzeno quando comparados a indivíduos controles, apesar da demonstração de diferenças estatisticamente significantes para “gaps” 54h e quebras 72h.

Entretanto, estes resultados não excluem a possibilidade de genotoxicidade que pode resultar da exposição crônica ao benzeno, sendo recomendada a realização de estudos em células mais específicas, como as da medula óssea utilizando técnicas mais sensíveis de biologia molecular, para detecção de pequenos danos no DNA, bem como dos polimorfismos das enzimas que ativam e detoxificam o benzeno e influenciam na susceptibilidade aos genotóxicos originários do metabolismo do benzeno.

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA-MELO, N. **Estudo Cromossômico em portadores assintomáticos do vírus da hepatite B**. 1978. 70f. Dissertação (Mestrado em ciências) Universidade de São Paulo, Instituto de Biociências. São Paulo.

ALMEIDA-MELO, N. **Estudo da ação do ultra-som pulsado em cultura temporária de linfócitos humanos**. 1985. 168f. Tese (Doutorado em ciências na área de biologia-genética) Universidade de São Paulo, Instituto de Biociências, São Paulo.

ANDERSON, D.; HUGHES, J. A.; CEBULSKA-WASILEWSKA, A.; WIERZEWSKA, A.; KASPER, E. **Biological Monitoring of Workers Exposed to Emissions from Petroleum Plants**. *Env. Health Persp.*, v. 104, sup. 3:609-13, 1996.

ARCURI, A. COSTA, D.; MACHADO, J.; CARDOSO, L.; MAGRINI, R.; MARRA, V. **Vigilância do risco químico, módulo do benzenismo**. Ministério da Saúde, Secretaria de Atenção à Saúde, Departamento de Ações Programáticas Estratégicas, Área Técnica de Saúde do Trabalhador, 2005.

AUGUSTO, L. G. S.; VIGORITO, A. C.; SOUZA, C. A. **Alterações histológicas da medula óssea secundárias à exposição ao benzeno e a evolução hematológica do sangue periférico em pacientes acometido**. *Rev. Bras. Saúde Ocup.*, v. 21, n. 78, p. 85-89, 1993.

BAKOPOULOU, A.; MOURELATOS, D.; TSIFTSOGLU, A. S; MIOGLOU, E.; GAREFIS, P. **Sister-chromatid exchange, chromosomal aberrations and delays in cell-cycle kinetics in human lymphocytes induced by dental composite resin eluates**. *Mut. Res.*, v. 649, n. 1-2, p. 79-90, 2008.

BARCH, M. J.; KNUSTSEN, T.; SPURBECK, J. L. **The AGT cytogenetics Laboratory Manual**. 3 ed. Washington: Lippincott-Raven Publishers, 1997.

BEIGUELMAN, B. **Citogenética Humana**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., 1982.

BISHOP, M. J. **Molecular themes in oncogenesis**. Cell, v. 64, p. 235-248, 1991.

BRANDÃO, M. M; RÊGO, M. A.; PUGLIESE, L.; CLARÊNCIO, J.; BASTOS, C. M.; FERREIRA, J.; MEYER, R.; NEVES, M.; FREIRE, S. M. **Phenotype analysis of lymphocytes of workers with chronic benzene poisoning**. Immunol. Letters, v. 101, p. 65-70, 2005.

BUKVIC, N.; BÁVARO, P.; ELIA, G. **Sister chromatid exchange and micronucleus frequencies in lymphocytes of gasoline station attendants**. Mutation Research, 415, 25-33, 1998.

CELIK, A.; AKBAS, E. **Evaluation of sister chromatid exchange and chromosomal aberration frequencies in peripheral blood lymphocytes of gasoline station attendants**. Ecotoxicology and Environmental Safety, (60) 106-112, 2005.

COLLINS, J. J. **Evaluation of lymphopenia among workers with low-level benzene exposure and the utility of routine data collection**. Journal Occupational Environmental of Medical 39(3):232-7, 1997

CHUNG, H. W.; Kang, J. S.; KIM, S. Y. **Detection of chromosome-specific aneusomy and translocation by benzene metabolites in human lymphocytes using fluorescence in situ hybridization with DNA probes for**

**chromosomes 5,7,8 and 21.** J Toxicol Environmental Health; 65(5-6):365-72, 2002.

CASSANI, G. M.; MADRIGAL-BUJAJIDAR, E.; CHAMORRO, G.; DÍAZ, F.; TAMARIZ, J.; ESPINOSA-AGUIRRE, J. J. **In vitro genotoxic evaluation of three alpha-asarone analogues.** Toxicology In Vitro, 19(4):547-52, 2005.

EASTMOND, D. A.; SCHULER, M.; FRANTZ, C.; CHEN, H.; PARKS, R.; WANG, L.; HASEGAWA, L. **Characterization and mechanisms of chromosomal alterations induced by benzene in mice and humans.** Research Report (Health Effects Institute); (103):1-68, 2001.

FERNANDES, Tiago Salazar. **Emprego das aberrações cromossômicas instáveis e micronúcleo no biomonitoramento individual: estudo comparativo.** 2005. 69 f. Tese (mestrado em Tecnologia Energética e Nuclear) Universidade Federal de Pernambuco, Recife.

FORNI, A. **Benzene-induced Chromosome Aberrations: A Follow-up study.** Environmental Health Perspectives 104 (6):1309-1312, 1996.

GASKELL, M.; MCLUCKIE, K. I. E.; FARMER, P. B. **Genotoxicity of the benzene metabolites *para*- benzoquinone and hydroquinone.** Chemico-Biological Interactions, (153-154), 267-270, 2005a.

GASKELL, M.; MCLUCKIE, K. I. E.; FARMER, P. B. **Comparison of the repair of DNA damage induced by the benzene metabolites hydroquinone and *p*-benzoquinone: a role for hydroquinone in benzene genotoxicity.** Carcinogenesis, 26 (3) 673-680, 2005b.

GATTAS, G. J. F.; SOARES-VIEIRA, J. A. **Cytochrome P450 - 2E1 and glutathione S-transferase mu polymorphisms among Caucasians and mulattoes from Brazil.** Occupational Medicine, 50(7):508-511, 2000. \*

GATTÁS, G. J. F.; KATO, M.; SOARES-VIEIRA, J. A.; SIRIQUE, M. S.; KOHLER, P.; GOMES, L.; REGO, M. A.; BYDLOWSKI, S. P. **Ethnicity and glutathione S-transferase (GSTM1/ GSTT1) polymorphisms in a Brazilian population.** Brazilian Journal of Medical and Biological Research, 37: 451-458, 2004.

GIVER, R.C.; WONG, R.; MOORE, D. H. 2ND.; PALLAVICINI, M. G. **Persistence of aneuploid immature primitive hemopoietic sub-populations in mice 8 months after benzene exposure in vivo.** Mutation Research. 491: 127-138, 2001.

GONÇALVES, Rozana Oliveira. **Trocas entre cromátides irmãs em trabalhadores do refino de petróleo com alterações de enzimas hepáticas.** 2004. Monografia (Curso de Especialização em Citogenética Humana e Médica) Universidade Católica do Salvador, Salvador.

GRIFFITHS, A. J. F.; MILLER, J. H.; SUZUKI, LEWONTIN, R. C.; GELBART, W. M. **Introdução a genética.** Rio de Janeiro, 6ª ed. Editora Guanabara Koogan S. A. 1998.

GU, Z.; ZHONG, B. Z.; NATH, B.; WHONG, W. Z.; WALLACE, W. E.; ONG, T. M. **Micronucleus induction and phagocytosis in mammalian cells treated with diesel emission particles.** Mutation Research, 279, 55-60, 1992.

KASUBA, V.; ROZGAJ, R.; SENTIJA, K. **Cytogenetic changes in subjects occupationally exposed to benzene.** Chemosphere; 40(3):307-10, 2000.

KEANE, M. J.; XING, S. G.; HARRISON, J. C. **Genotoxicity of diesel exhaust particles dispersed in stimulated pulmonary surfactant.** Mutation Research, 260, 233-38, 1991.

KHALIL, A. M.; QASSEM, W.; KAMAL, O. M. **No significant increase in sister-chromatid exchanges in cultured blood lymphocytes from workers in a large oil refinery.** Mutation Research, 312, 187-191, 1994.

KHAN, A. H. **Benzene's toxicity: a consolidated short review of human and animal studies.** Human & Experimental Toxicology, 26: 677-685, 2007.

KOLACHANA, P.; SUBRAHMANYAM, V. V.; MEYER, K. B.; ZHANG, L.; SMITH, M. T. **Benzene and Its phenolic Metabolites Produce Oxidative DNA Damage in HL60 Cells *in vitro* and in the bone Marrow *in vivo*.** Cancer Research, 53, 1023-1026, 1993.

LÉVAY, G.; BODELL, W. J. **Potentialiation of Benzene DNA adduct formation in HL-60 cells by combinations of benzene metabolites.** Biochemistry, v. 89, 7105-7109, 1992.

LOURO, I. D.; LLERENA-JR, J. C.; MELO, M. S. V.; ASHTON-PROLLA, P.; CONFORTI-FROES, N. **Genética molecular do câncer,** São Paulo- Editora:MSG, produção editorial, LTDA-ME, 2ª ed. Agost.2002.

NATARAJAN, A. T. **Chromosome aberrations: past, present and future.** Mutation Research, (504) 3-16, 2002.

MIRANDA, C. R.; DIAS, C. R.; OLIVEIRA, L. C. C.; PENA, P. G. L. **Benzenismo no Complexo Petroquímico de Camacari, Bahia**. Revista Brasileira de Saúde Ocupacional, Nº 89/90-vol. 24, 1997.

MOORHEAD, P. S.; NOWELL, P. C.; MELLMAN, W. J.; BATTIPS, D. M.; HUNGERFORD, D. A. **Chromosome preparations of leukocytes cultured from human peripheral blood**. Exp. Cell Res, 20:613-616, 1960.

OBE, G.; PFEIFFER, P.; SAVAGE, J. R.; JOHANNES, C.; GOEDECKE, W.; JEPPESEN, P.; NATARAJAN, A. T.; MARTÍNEZ-LÓPEZ, W.; FOLLE, G. A.; DRETS, M. E. **Chromosomal aberrations: formation, identification and distribution**. Mutation Research (504) 17-36, 2002.

PAIVA, F. S. M. E. **A survey of studies on benzene-induced human leucemogenesis**. Aggriornamenti in Medicina Occupazionale e Riabilitazione, v 1, N. 2, 1995.

SILVA-PEREIRA, L. C.; CARDOSO, P. C.; LEITE, D. S.; BAHIA, M. O.; BASTOS, W. R.; SMITH, M. A.; BURBANO, R. R. **Cytotoxicity and genotoxicity of low doses of mercury chloride and methylmercury chloride on human lymphocytes *in vitro***. Brazilian Journal of Medical and Biological Research, 38: 901-907, 2005.

PÉREZ, R. P.; MADRIGAL-BUJAJIDAR, E.; REYES-CADENA, S.; MOLINA-JASSO, D.; GALLAGA, J. P.; SILVA-MIRANDA, A.; VELAZCO, O.; HERNÁNDEZ, N.; CHAMORRO, G. **Genotoxic and cytotoxic studies of beta-sitosterol and pteropodine in mouse**. Journal of Biomedicine and Biotechnology, 242-247, 2005.

PFEIFFER, P.; GOEDECKE, W.; OBE, G. **Mechanisms of DNA double-strand break repair and their potential to induce chromosomal aberrations.** *Mutagenesis* (15) 4, 289-302, 2000.

RECIO, L.; BAUER, A.; FAIOLA, B. **Use of genetically modified mouse models to assess pathways of benzene-induced bone marrow cytotoxicity and genotoxicity.** *Chemico-Biological Interactions* v. 153-154, 159-164, 2005.

RÊGO, M. A. V. **Alterações hematológicas, genotóxicas, imunológicas, susceptibilidade genética e exposição ocupacional a benzeno.** Departamento de Medicina Preventiva – DPM/UFBA, Centro de Estudos da Saúde do Trabalhador – CESAT/SESAB. 2002.

RIBEIRO, L. R.; SALVADORI, D. M. F.; MARQUES, E. K. **Mutagênese Ambiental.** 1ª edição, Canoas: Ed. ULBRA, 2003.

ROBINSON, S. N.; SHAH, R.; WONG, B. A.; WONG, V. A.; FARRIS, G. M. **Immunotoxicological effects of benzene inhalation in male sprague-Dawley rats.** *Toxicology* (119) 227-237, 1997.

ROSSINI, A.; RAPOZO, D. C.; AMORIM, L. M.; MACEDO, J. M.; MEDINA, R.; NETO, J. F.; GALLO, C. V.; PINTO, L. F. **Frequencies of *GSTM1*, *GSTT1*, and *GSTP1* polymorphisms in a Brazilian population.** *Genetics and molecular Research*; 1 (3): 233-240, 2002.

RUIZ, M. A.; VASSALO, J.; SOUZA, C. A. **Alterações hematológicas em pacientes expostos cronicamente ao benzeno.** *Revista de Saúde Publica*; 27(2): 145-51, 1993.



SARTO, F.; COMINATO, I.; PINTON, A. M.; BROVEDANI, P. G.; MERLER, E.; PERUZZI, M.; BIANCHI, V.; LEVIS, A. G. **A cytogenetic study on workers exposed to low concentrations of benzene.** *Carcinogenesis*, 5(6):827-32, 1984.

SEABRIGHT, M. **A rapid banding technique for human chromosomes.** *Lancet* 30: 971, 1971.

SMITH, M. T. **The Mechanism of benzene-induced Leukemia: A Hypothesis and Speculations on the Causes of Leukemia.** *Environmental Health Perspectives* (104) 6, 1996.

SMITH, M. T.; ZHANG, L.; WANG, Y.; HAYES, R. B.; LI, G.; WIEMELS, J.; DOSEMECI, M.; TITENKO-HOLLAND, N.; XI, L.; KOLACHANA, P.; YIN, S.; ROTHMAN, N. **Increased translocations and aneusomy in chromosomes 8 and 21 among workers exposed to benzene.** *Cancer Research* ;58(10):2176-81, 1998.

SMITH, M. T.; ROTHMAN, N. **Biomarkers in the Molecular Epidemiology of Benzene-exposed Workers.** *Journal of Toxicology Environmental Health* ;61(5-6):439-45, 2000a.

SMITH, M. T.; ZHANG, L.; JENG, M.; WANG, Y.; GUO, W.; DURAMAD, P.; HUBBARD, A. E.; HOFSTADLER, G.; HOLLAND, N. T. **Hydroquinone, a benzene metabolite, increase the level of aneusomy of chromosomes 7 and 8 in human CD34-positive blood progenitor cells.** *Carcinogenesis*, (21) 8, 1485-1490, 2000b.

STILLMAN, W. S.; VARELLA-GARCIA, M.; IRONS, R. D. **The benzene metabolites hydroquinone and catechol act in synergy to induce dose-**

**dependent hypoploidy and 5q31 in a human cell line.** Leukemia e lymphoma, 35(3-4):269-81, 1999.

TARDIFF, R. G.; LOHMAN, P. H. M.; WOGAN, G. N. **Methods to assess DNA damage and repair: Interspecies comparisons.** Scope 52, England: John & Sons Ltd. 1994.

THOMPSON, M. W.; MCLNNES, R. R.; WILLARD, F.H. **Genética médica.** 5<sup>a</sup> ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A. 1993.

TOMPA, A.; MAJOR, J.; JAKAB, G. M. **Monitoring of benzene-exposed workers for genotoxic effects of benzene: improved-working-condition-related decrease in the frequencies of chromosomal aberrations in peripheral blood lymphocytes.** Mutation Research (304) 159-165, 1994.

TONINGHER, M.; MALACARNE, D.; IZZOTI, A.; PARODI, S. **Drug metabolism polymorphisms as modulators of cancer susceptibility.** Mutation Research. 436:227-61, 1999.

TSUTSUI, T.; HAYASHI, N.; MAIZUMI, H.; HUFF, J.; BARRETT, J. C. **Benzene – catechol – hydroquinone – and phenol – induced cell transformation, gene mutations, chromosome aberrations, aneuploidy, sister chromatid exchanges and unscheduled DNA synthesis in syrian hamster embryo cells.** Mutation Research; 373(1):113-23, 1997.

WAN, J.; SHI, J.; HUI, L.; WU, D.; JIN, X.; ZHAO, N.; HUANG, W.; XIA, Z.; HU, G. **Association of Genetic Polymorphisms in CYP2E1, MPO, NQO1, GSTM1, and GSTT1 Genes with Benzene Poisoning.** Environmental Health Perspectives vol. 110, n°12, 2002.

XIE, Z.; ZHANG, Y.; GULIAEV, A. B.; SHEN, H.; HANG, B.; SINGER, B.; WANG, Z. **The p-benzoquinone DNA adducts derived from benzene are highly mutagenic.** DNA repair, 4, 1399-1409, 2005.

XU, X. WIENCKE, JK.; NIU, T.; WANG, M.; WATANABE, H.; KELSEY, K. T.; CHRISTIANI, D. C. **Benzene exposure, glutathione S- transferase theta homozygous deletion, an sister chromatid exchanges.** American Journal of Industrial Medicine; 33(2):157-63, 1998.

YAGER, J. W.; EASTMOND, D. A.; ROBERTSON, M. L.; PARADISIN, W. M.; SMITH, M. T. **Characterization of Micronuclei Induced in Human Lymphocytes by Benzene Metabolites.** Cancer Research (50) 393-399, 1990.

ZHANG, L.; ROTHMAN, N.; WANG, Y.; HAYES, R. B.; LI, G.; DOSEMECI, M.; YIN, S.; KOLACHANA, P.; TITENKO-HOLLAND, N.; SMITH, M. T. **Increase aneusomy and long arm deletion of chromosomes 5 and 7 in the lymphocytes of Chinese workers exposed to benzene.** Carcinogenesis;19(11):1955-61, 1998.

ZHANG, L.; ROTHMAN, N.; WANG, Y.; HAYES, R. B.; YIN, S.; TITENKO-HOLLAND, N.; DOSEMECI, M.; WANG, Y. Z.; KOLACHANA, P.; LU, W.; XI, L.; LI, G. L.; SMITH, M. T. **Benzene increases Aneuploidy in the Lymphocytes of Exposed Workers: a comparison of data obtained by fluorescence in Situ Hybridization in Interphase and metaphase cells.** Environmental and Molecular Mutagenesis; 34:260-268, 1999.

ZHANG, L.; EASTMOND, D. A.; SMITH, M. T. **The nature of chromosomal aberrations detected in humans exposed to benzene.** Critical Reviews in Toxicology;32(1):1-42, 2002.

ZHANG, L.; LAN, Q.; GUO, W.; LI, G.; YANG, W.; HUBBARD, A. E.; VERMEULEN, R.; RAPPAPORT, S. M.; YIN, S.; ROTHMAN, N.; SMITH, M. T. **Use of OctoChrome fluorescence in situ hybridization to detect specific aneuploidy among all 24 chromosomes in benzene-exposed workers.** *Chemico-Biological Interactions*, 153-154, 117-122, 2005a.

ZHANG, L.; YANG, W.; HUBBARD, A. E.; SMITH, M. T. **Nonrandom aneuploidy of Chromosomes 1, 5, 6, 7, 8, 9, 11, 12, and 21 Induced by Benzene Metabolites Hydroquinone and Benzenetriol.** *Environmental and Molecular Mutagenesis*. 45(4):388-396, 2005b.

ZHOU, X.; LI, L. R.; CUI, M. Y.; YU, R. F.; LI, L.; YAN, Z. A. **Cytogenetic monitoring of petrochemical workers.** *Mutation Research*, (175) 237-242, 1986.