

Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz



Daniel Valente Soares dos Santos

**Avaliação de aberrações cromossômicas em trabalhadores de postos de
gasolina da Zona Oeste do Rio de Janeiro**

Rio de Janeiro

2015

Daniel Valente Soares dos Santos

Avaliação de aberrações cromossômicas em trabalhadores de postos de gasolina da Zona Oeste do Rio de Janeiro

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde Pública e Meio Ambiente, área de concentração “Toxicologia Ambiental”, da Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Orientadoras: Prof^a Dr^a Liliane Reis Teixeira, Prof^a Dr^a Ariane Leites Larentis e Dr^a Monica Stuck de Oliveira

Assistente de Orientação: Isabele Campos Costa Amaral, MSc

Rio de Janeiro

2015

Catálogo na fonte
Instituto de Comunicação e Informação Científica e Tecnológica
Biblioteca de Saúde Pública

S237a Santos, Daniel Valente Soares dos
Avaliação de aberrações cromossômicas em trabalhadores de
postos de gasolina da Zona Oeste do Rio de Janeiro. / Daniel
Valente Soares dos Santos. -- 2015.
95 f. : il. ; tab. ; graf.

Orientador: Liliane Reis Teixeira
Ariane Leites Larentis
Monica Stuck de Oliveira

Dissertação (Mestrado) – Escola Nacional de Saúde Pública
Sergio Arouca, Rio de Janeiro, 2015.

1. Saúde do Trabalhador. 2. Toxicologia. 3. Solventes. 4.
Genotoxicidade. 5. Exposição Ocupacional. 6. Benzeno -
toxicidade. 7. Aberrações Cromossômicas. I. Título.

CDD – 22.ed. – 363.11098153

DANIEL VALENTE SOARES DOS SANTOS

Avaliação de aberrações cromossômicas em trabalhadores de postos de gasolina da Zona Oeste do Rio de Janeiro

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde Pública e Meio Ambiente, área de concentração “Toxicologia Ambiental”, da Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Aprovado em 11 de Setembro de 2015.

Banca Examinadora:

Profª Drª Liliane Reis Teixeira - Orientadora

Profª Drª Ariane Leites Larentis - Orientadora

Profª Drª Monica Stuck de Oliveira - Orientadora

Prof Dr William Volino de Souza

Profª Drª Jamila Alessandra Perini Machado

RESUMO

No âmbito da saúde ocupacional, as exposições a agentes químicos recebem cada vez mais atenção. Pela análise de bioindicadores, se faz possível identificar e quantificar substâncias nocivas à saúde e seus efeitos. Trabalhadores de postos de revenda de combustíveis veiculares (PRCV) estão expostos a uma mistura de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) proveniente da gasolina, e nesta mistura encontra-se o benzeno, composto hematotóxico e carcinogênico, sem níveis seguros no ambiente, fato que corrobora para a importância de ações em vigilância ocupacional nesta área. O presente estudo avaliou os efeitos genotóxicos, através do teste de Aberrações cromossômicas (ACs), de uma exposição ocupacional aos vapores de gasolina em frentistas da Zona Oeste do Rio de Janeiro. O projeto central foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Ensp/Fiocruz (CAAE 17438013.5.0000.5240, parecer 434.418). 39 trabalhadores de seis PRCV da área programática 5.3 (bairros de Santa Cruz, Paciência e Sepetiba) responderam a dois questionários sobre fatores socioeconômicos, processo de trabalho e histórico de saúde; amostras de sangue e urina foram coletadas para determinação de hemograma, análises bioquímicas, ACs e ácido trans,trans-mucônico urinário (ATTM). Os voluntários não apresentaram histórico de doenças de possível associação com a exposição, assim os resultados de hemograma e bioquímica, em valores médios, ficaram dentro das faixas de normalidade. Os processos de trabalho e hábitos dos trabalhadores foram avaliados e não apresentaram relação com as ACs. A avaliação do ATTM por teste ANOVA apresentou relação com o hábito de fumar (diferença média de 0,22 mg/g creatinina; $p < 0,05$), e o valor elevado condiz com a literatura. Foram encontradas diferenças estatisticamente significativas em quantidade de quebras cromossômicas por metáfase em relação aos seis PRCV avaliados, para fumantes ($p < 0,03$) e não fumantes ($p = 0,05$). Demais comparações não apresentaram significância. Os resultados sugerem que o teste de ACs não deve ser utilizado de forma isolada para avaliar exposições a baixas doses de benzeno por sua inespecificidade, mas ainda representa uma ferramenta útil na avaliação de dano precoce à saúde humana.

Palavras-chave: Saúde do trabalhador; Toxicologia; Solventes; Genotoxicidade.

ABSTRACT

On the Occupational Health field, exposure to chemical agents is getting more attention, since technologies' advances allow identification of health early effects caused by such exposures. By the use of bioindicator's analysis, it is possible to identify and quantify harmful substances and their effects. Gas station workers are exposed to a hidrocarbon's mixture from gasoline, in which can be found benzene, carcinogenic and hematotoxic substance, with no safe levels on environment, reinforcing the need of occupational vigilance actions. This study evaluated the genotoxic effects, using the chromosomal aberration's test (CAs), of an occupational exposure to gasoline fumes in gas station workers from Rio de Janeiro's West Side. The main project was approved by Ensp/Fiocruz Research's Ethics Committee (CAAE 17438013.5.0000.5240, case 434.418). Thirty-nine workers from six gas stations from the districts of Santa Cruz, Paciência and Sepetiba answered questionnaires concerning socio-demographic, work and health questions; blood and urine samples were taken to assess CBC, biochemical factors, trans,trans-muconic acid (TTMA) and chromosomal aberrations. The subjects did not report history of diseases that could be related to the exposure, so the results of CBC and biochemical factors were at normality ranges. Work processes and the subjects' habits were assessed and were not associated to CAs. TTMA measurement and statistical evaluation through ANOVA showed a correlation between this metabolite and smoking habit (mean difference: 0,22mg/g creatinine; $p=0,05$), and the high concentration gets along with literature. Statistically significant differences were found when analyzing chromosomal breaks by the six gas stations, for the smokers ($p<0,05$) and non-smokers ($p=0,05$). Others correlations showed no significance. The results suggest chromosomal aberrations test shall not be used as the only mechanism to evaluate benzene exposure at lower doses for its inespecificity, but the test is, for itself, a useful feature for early human health damage evaluation.

Keywords: Worker's Health; Toxicology; Solvents; Genotoxicity.

Lista de Tabelas

Tabela 1: Valores de referência ponderados pelo tempo de exposição ocupacional ao benzeno.....	20
Tabela 2: Informações sociodemográficas da população de estudo.....	41
Tabela 3: Dados de exposição ocupacional.....	42
Tabela 4: Distribuição dos trabalhadores por posto e ocupação.....	44
Tabela 5: Atividades realizadas pelos trabalhadores durante o exercício da função.....	45
Tabela 6: Lista de hábitos que aumentam o risco da exposição ocupacional	46
Tabela 7: Média dos resultados dos eritrogramas categorizados por sexo e valores de referência	47
Tabela 8: Média dos resultados dos leucogramas e valores de referência.....	47
Tabela 9: Média dos resultados do plaquetograma e indicadores bioquímicos e seus valores de referência.....	47
Tabela 10: Valores do ácido trans,trans-mucônico categorizados por fumo	49
Tabela 11: Distribuição das médias de quebra por célula avaliada, categorizadas por PRCV	52
Tabela 12: Valores descritivos e teste ANOVA comparando os PRCV para as variáveis de interesse.....	53

Lista de Figuras

Figura 1: Média e mediana das concentrações de benzeno em ambientes urbanos dos EUA no período 1994-2009.....	12
Figura 2: Esquema do metabolismo hepático do Benzeno	14
Figura 3: Esquema de Aneuploidia.	28
Figura 4: Esquemas de aberrações cromossômicas.....	31
Figura 5: Esquema das inversões paracêntrica e pericêntrica	32
Figura 6: Aberrações cromossômicas visualizadas ao microscópio ótico	33
Figura 7: Distribuição dos valores de ácido trans,trans-mucônico dos trabalhadores, de acordo com suas condições de tabagistas.....	39 49
Figura 8: Exemplo de célula em metáfase com separação centromérica prematura (SCP)	51
Figura 9: Distribuição das médias de células aberrantes por célula analisada, categorizadas por PRCV.....	52
Figura 10: Distribuição das médias de quebras por célula avaliada, categorizadas por PRCV	53

Siglas e abreviaturas

8-OHdG	8-hidroxi-2'-desoxiguanosina
ACs	Aberrações Cromossômicas
ACGIH	American Conference of Industrial Hygienists (Conferência Americana de Higienistas Industriais)
AFM	Ácido S-fenilmercaptúrico
AP	Área programática
ATTM	Ácido trans, trans-mucônico
BENZ-U	Benzeno urinário
BTEX	Principais HPAs na gasolina: benzeno, tolueno, etilbenzeno e xileno
CEREST	Centro Regional de Referência em Saúde do Trabalhador
HPA	Hidrocarboneto policíclico aromático
IARC	International Agency for Research on Cancer (Agência Internacional de Pesquisa sobre Câncer)
NIOSH	National Institute for Occupational Safety and Health (Instituto Nacional para Saúde e Segurança Ocupacional)
OSHA	Occupational Safety and Health Administration (Administração de Saúde e Segurança Ocupacional)
PEL	Permitted Exposure Limit (Limite de Exposição Permitido)
REL	Reference Exposure Value (Valor de Exposição de Referência)
SNC	Sistema Nervoso Central
MTE	Ministério do Trabalho e Emprego
TLV	Threshold Limit Value (Valor Limite, Limiar)
TWA	Time Weighted Average: Refere-se a um valor ponderado no tempo
U.S. EPA	United States Environmental Protection Agency (Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos)
VISAT	Vigilância em Saúde do Trabalhador
VRT	Valor de Referência Tecnológico

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	9
2	REFERENCIAL TEÓRICO	10
2.1	BENZENO	11
2.1.1	Toxicocinética	13
2.1.2	Toxicodinâmica	15
2.1.3	Toxicidade do benzeno sobre a saúde humana	16
2.1.3.1	Efeitos carcinogênicos	17
2.1.3.2	Efeitos não carcinogênicos	18
2.2	EXPOSIÇÃO OCUPACIONAL AO BENZENO	19
2.2.1	Vulnerabilidade de Trabalhadores de Postos de Gasolina	21
2.3	GENOTOXICIDADE E MONITORAMENTO BIOLÓGICO	23
2.3.1	Biomarcadores de exposição	24
2.3.2	Biomarcadores de efeito	25
2.3.3	Biomarcadores de suscetibilidade individual	26
2.4	ABERRAÇÕES CROMOSSÔMICAS E OUTROS DANOS	26
2.4.1	Numéricas	28
2.4.2	Estruturais	29
2.5	AVALIAÇÃO DA GENOTOXICIDADE	33
3	OBJETIVOS	35
3.1	OBJETIVO GERAL	35
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	35
4	MATERIAL E MÉTODOS	36
4.1	POPULAÇÃO	36
4.1.1	Aspectos éticos	37
4.2	DADOS SOCIODEMOGRÁFICOS E PROCESSO DE TRABALHO	37
4.3	TESTE DE ABERRAÇÕES CROMOSSÔMICAS	38
4.3.1	Coleta de material	38
4.3.2	Procedimentos do teste de aberrações cromossômicas	38
4.4	ANÁLISES ESTATÍSTICAS	39
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
5.1	DADOS DE EXPOSIÇÃO OCUPACIONAL	44
5.2	RESULTADOS DO TESTE DE ABERRAÇÕES CROMOSSÔMICAS	50
6	CONCLUSÕES	58
	REFERÊNCIAS	59
	ANEXO I	71
	ANEXO II	79
	ANEXO III	88

1 INTRODUÇÃO

A gasolina possui em sua constituição, entre outras substâncias, o benzeno, composto comprovadamente genotóxico e carcinogênico (ATSDR, 2011). O desenvolvimento tecnológico e urbano em seu estado atual, com os processos produtivos que utilizam o benzeno e o uso de combustíveis fósseis, resultou em uma exposição ambiental a nível global. Ainda mais preocupante é a exposição ocupacional a esta substância, que apesar dos valores de referência preconizados por algumas agências (MTE, 1995; OSHA, 2013), não possui níveis considerados seguros no ambiente e nos organismos, por seu caráter carcinogênico (WHO, 1983). Trabalhadores de postos de gasolina são expostos diariamente a altos níveis de benzeno, não estando, na maioria das vezes, cientes da relevância dessa exposição, cujos efeitos sobre a saúde estão bem definidos por testes e estudos ambientais e clínicos (ATSDR, 2007).

Indicadores biológicos de dose interna, efeito e suscetibilidade individual podem ser utilizados para se avaliar a magnitude da exposição e de seus efeitos sobre o indivíduo ou população. Dentre estes indicadores estão aqueles que permitem avaliar alterações genéticas provocadas pela exposição a determinadas substâncias, denominadas genotóxicas, como a ocorrência de aberrações cromossômicas, micronúcleos, quebras de fita simples e duplas, adutos e danos oxidativos ao DNA, de forma a permitir a identificação precoce dos efeitos da exposição sobre a saúde em uma perspectiva de vigilância dos trabalhadores (VALENTE *et al.*, no prelo).

Dessa forma, este trabalho teve como objetivo avaliar a ocorrência de aberrações cromossômicas em trabalhadores de postos de combustíveis da Zona Oeste do município do Rio de Janeiro e investigar suas associações com processo de trabalho, que inclui a exposição aos vapores de combustíveis, e fatores sociais e de estilo de vida dos trabalhadores. Este trabalho faz parte de um projeto institucional do Centro de Estudos da Saúde do Trabalhador e Ecologia Humana, da Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca (Cesteh/Ensp/Fiocruz) que tem como objetivo traçar o perfil de exposição e seus efeitos nesse grupo de trabalhadores a partir da avaliação de indicadores ambientais e biológicos.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

O uso crescente de combustíveis fósseis aumenta a preocupação quanto a Saúde Humana e Ambiental, dada a complexa composição do petróleo que, mesmo após seu refino, apresenta uma série de compostos de potencial tóxico.

Dentre a complexa mistura de substâncias que compõem o petróleo, bem como seus derivados, encontram-se Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos, HPAs (ATSDR, 2007; ANDRADE *et al.*, 2010). HPAs são uma classe de compostos orgânicos lipofílicos, podendo ser liberados ao ar atmosférico, dentre outras formas, por volatilização ou queima incompleta de combustíveis fósseis como carvão e derivados de petróleo (NOMIYANA e NOMIYAMA, 1974a; MARCHETTI, 2009). O uso em larga escala destes, com subsequente difusão dos HPAs nos diversos compartimentos ambientais eleva o interesse destes compostos para a saúde pública, dados seus potenciais genotóxicos e carcinogênicos (WHO, 1983; ATSDR, 2011).

Segundo dados da Agência Nacional de Petróleo (ANP, 2013a) foram consumidos no ano de 2013, apenas no Brasil, uma média de 2.805.000 barris de petróleo por dia, aproximadamente 446 milhões de litros diários. Dentre seus diversos usos na cadeia produtiva, tem-se a produção de combustíveis como o de maior importância. Os combustíveis derivados de petróleo distribuídos no Brasil (ANP, 2013a) são as gasolinas (C e de Aviação), GLP, Óleos (combustível e Diesel), e Querosenes (de Aviação e Iluminante).

Os hidrocarbonetos de maior concentração na gasolina são os chamados BTEX (Benzeno, Tolueno, Etilbenzeno e Xilenos), representando cerca de 18% da mistura (MARCHETTI, 2009). Apesar de determinações do Governo terem garantido uma diminuição dos níveis dos BTEX no ar, como a redução da fração destes na gasolina (e a diluição deste combustível em até 24% de álcool) e o incentivo ao uso de outros combustíveis, como o álcool e o gás natural veicular (MARTINS *et al.*, 2007), a exposição ambiental a eles representa risco à saúde humana.

2.1 BENZENO

Dentre os HPAs presentes na gasolina, o de maior destaque é o benzeno, apesar de ser o de menor percentual no combustível, podendo chegar a 1% da mistura (ANP, 2013b). Segundo os critérios do programa das Nações Unidas de segurança química, o benzeno é considerado a sexta substância de maior risco para a saúde humana (ATSDR, 2011) e a substância tóxica de maior interesse para a saúde ocupacional (CHEN *et al.*, 2007).

Além de sua presença em emissões de queimas incompletas, o benzeno (C_6H_6) é também utilizado em processos industriais e em produtos como cigarros, desengraxantes, vernizes e matérias-primas para a fabricação de borracha, plásticos e fibras sintéticas, extração de óleos, entre outros (SWANSON e COOK, 1976; MENDES, 1987). Além das fontes antropogênicas, o benzeno também é emitido pela erupção vulcânica, por queimadas naturais e pela volatilização do composto pelas plantas (GRAEDEL, 1978; BRIEF *et al.*, 1980).

Vapores de benzeno são normalmente gerados na cadeia produtiva da gasolina, desde o refino do petróleo ao seu uso, bem como em outros processos químicos industriais, estando presente no ar com uma média global de $6\mu g/m^3$. Na maioria dos casos esse nível é superior em ambientes fechados, em especial em casas com garagens acopladas e habitadas por fumantes, tornando este compartimento ambiental o de maior interesse nos estudos toxicológicos (ATSDR, 2001). Os fumantes, ativos ou passivos, têm grande exposição ao benzeno, apresentando 10-20 vezes mais benzeno no ar exalado se comparado a não fumantes, o que representa até 90% da exposição deste grupo a este toxicante (WALLACE, 1996; GORDON *et al.*, 2002). Um estudo da Agência Americana de Proteção Ambiental (US EPA) apresentou a evolução dos valores médios da concentração de benzeno em ambientes urbanos nos Estados Unidos (Figura 1). A diminuição da concentração média ao longo dos anos é fruto de medidas e determinações legislativas com o objetivo de diminuir o uso industrial e/ou comercial de substâncias comprovadamente nocivas e sem níveis seguros.

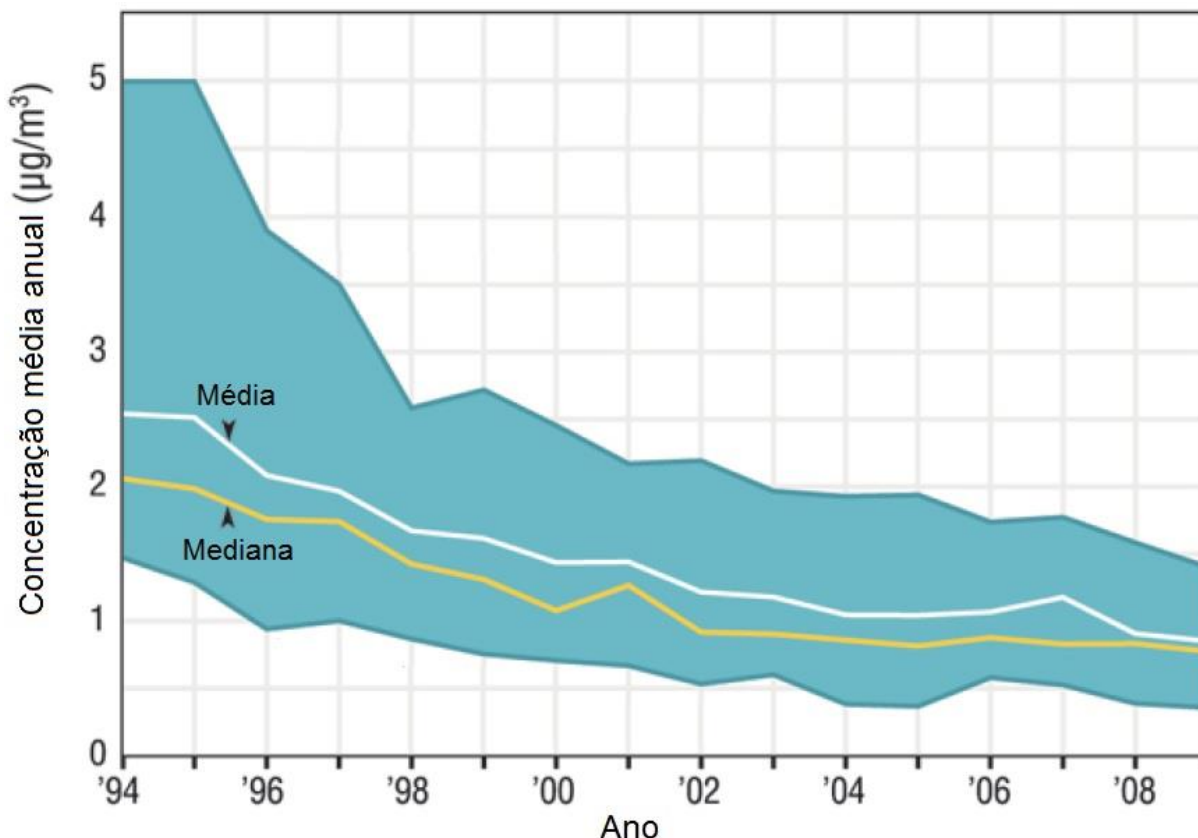


Figura 1: Média e mediana das concentrações de benzeno em ambientes urbanos dos EUA no período 1994-2009. A área em azul compreende os 80% centrais, excluindo os 10% superiores e inferiores (Adaptado de EPA, 2010).

Dadas as características físico-químicas do benzeno no ambiente (volatilidade, apolaridade, lipofilicidade, solubilidade moderada em água, alta mobilidade no solo), este se encontra em maior parte no ar atmosférico. A maior parte do benzeno liberado no solo volatiliza ou infiltra para os corpos aquáticos, de superfície ou subterrâneos, de onde também pode migrar para o ar, restando apenas uma pequena parte. Além disso, os corpos aquáticos e o solo recebem o benzeno, em grande maioria, de efluentes industriais tratados e não tratados e de vazamentos de combustíveis fósseis, sendo encontrado em lençóis freáticos e em sedimentos de rios em áreas de influência de atividades que envolvem este contaminante (ATSDR, 2007).

A degradação do benzeno em sua forma de vapor ocorre principalmente por sua reação com os radicais hidroxila livres no ar atmosférico. A substância também reage com ozônio e radicais nitrato, mas em porção insignificante se comparada com o processo anteriormente citado. A fotólise direta do benzeno não ocorre, pois

ele absorve comprimentos de onda luminosa inferiores a 260nm e a atmosfera filtra comprimentos inferiores a 290nm (ATSDR, 2007).

Em animais e plantas pode ocorrer a bioacumulação do benzeno, sendo de maior importância em vegetais. Collins e colaboradores (2000) cultivaram framboesas expostas ao benzeno e, após 40 dias, a quantidade de benzeno no fruto era superior à disponível no ar.

2.1.1 Toxicocinética do Benzeno

Absorção

A principal via de exposição ao benzeno é a inalatória, absorvendo entre 70% e 80% da quantidade inalada nos primeiros minutos; a fração absorvida cai após a primeira hora de exposição, fator relacionado ao aumento da concentração de benzeno no sangue (SRBOVA *et al.*, 1950). Estudos apontam absorção dérmica do contaminante em animais e humanos, mas em níveis inferiores, entre 0,07% - 0,23% (ATSDR, 2001; MODJTAHEDI e MAIBACH, 2008).

Distribuição

No organismo, devido as características do toxicante, o benzeno chega ao sangue por difusão passiva a partir do órgão de entrada no organismo (relacionado à via de exposição – inalação, ingestão, contato), ligando-se prontamente às proteínas do plasma e acumulando-se então nos tecidos gordurosos (TRAVIS e BOWERS, 1989; ARNOLD *et al.*, 2013). Em estudos com animais e seres humanos, foi possível detectar a presença de benzeno no cérebro, em tecidos gordurosos, nos rins, fígado, placenta, cordão umbilical e no feto (DOWTY *et al.*, 1976; LOW *et al.*, 1989).

Metabolismo

Apesar de assumir-se que a toxicidade do benzeno seja dependente de sua metabolização, não há evidências de um metabólito específico responsável pelos efeitos tóxicos decorrentes da exposição. O esquema das rotas metabólicas do benzeno é apresentado abaixo na Figura 2.

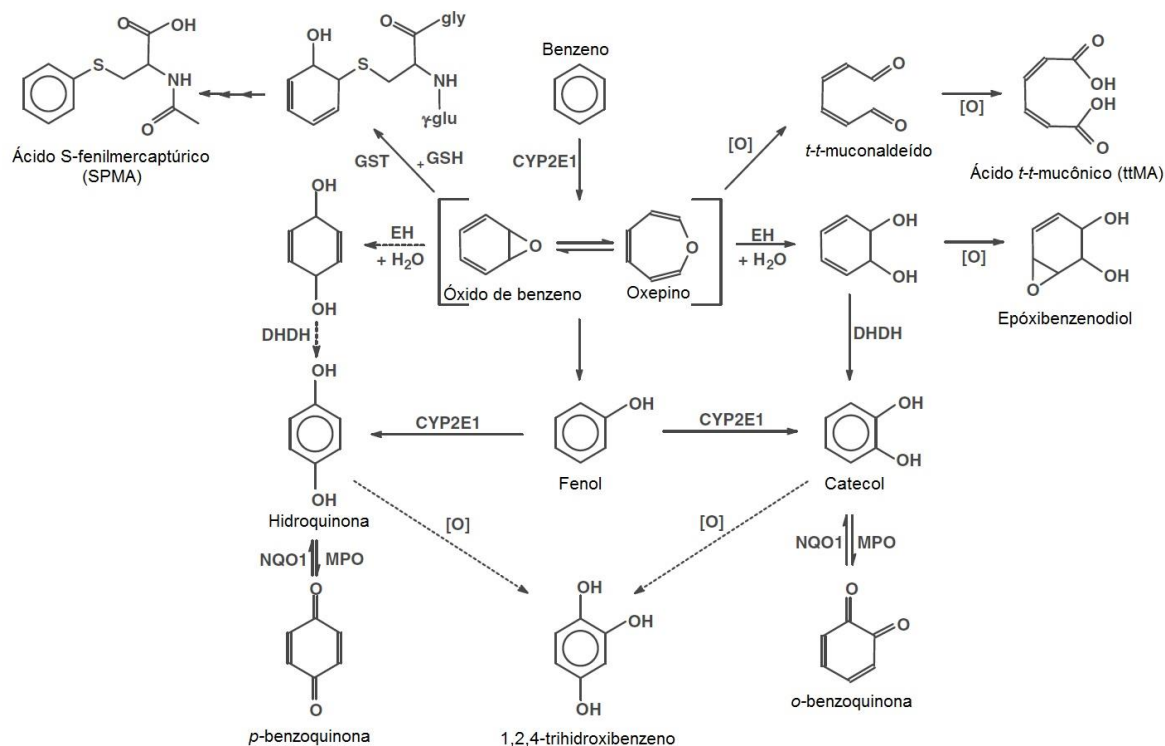


Figura 2: Esquema do metabolismo hepático do Benzeno. Adaptado de ARNOLD *et al.*, 2013.

O primeiro passo da metabolização do benzeno se dá com o citocromo P-450 (enzima CYP2E1, presente em todos os tecidos, mas em maior quantidade no fígado), transformando-o em óxido de benzeno, que forma uma mistura equilibrada com oxepino. Por mecanismos diversos, estes isômeros têm como principais metabólitos fenóis conjugados, quinonas, ácido S-fenilmercaptúrico (através de reação com glutathione – GSH) e ácido trans,trans-mucônico (ATTM), por abertura de anel (WELLS e NERLAND, 1991; ATSDR, 2007).

O metabolismo primário do benzeno ocorre, em maior parte, no fígado (no caso de exposição por inalação, o metabolismo também ocorre nos pulmões, mas dada a menor concentração de CYP2E1, o fígado é o órgão principal no metabolismo), e então os metabólitos expressam sua toxicidade característica na medula óssea. No entanto, o mecanismo responsável por esta migração ainda é desconhecido, apesar de se esperar que ligações covalentes às proteínas sanguíneas ocorram (ATSDR, 2007).

Eliminação

A excreção do benzeno pode se dar por exalação do toxicante não metabolizado (NOMIYAMA e NOMIYAMA 1974a, 1974b) ou por via urinária (em fração inferior a 1% da quantidade não metabolizada), através de derivados conjugados. Nomiyama e Nomiyama, em seus estudos (1974a, b), observaram que cerca de 17% da fração inalada era eliminada sem absorção. Através da urina, ocorre a eliminação de uma série de metabólitos da biotransformação do benzeno: fenóis, quinonas, ATTM, AFM. Em lactantes, pode-se encontrar benzeno no leite (FABIETTI *et al.*, 2004). O processo de metabolização e eliminação dos produtos dessa etapa está relacionado à duração e/ou à intensidade da exposição. Quando as vias metabólicas saturam-se, o corpo elimina o benzeno não metabolizado pela respiração e na urina (MODJTAHEDI e MAIBAH, 2008).

2.1.2 Toxicodinâmica do Benzeno

Os metabólitos do benzeno podem expressar sua toxicidade através de uma série de processos. Já se sabe que, para a manifestação dos efeitos tóxicos do benzeno sobre o sistema hematopoiético, é necessária a metabolização parcial do toxicante e que seus metabólitos reativos, ao atingir a medula óssea, seu tecido-alvo, sejam metabolizados pelas peroxidases da medula, causando dano ao tecido e, conseqüentemente, ao sistema (ATSDR, 2007). O dano causado ao DNA também pode resultar em depressão da medula óssea, tendo como possíveis desfechos anemia aplástica e leucemia mieloide aguda (SNYDER e KALF, 1994; TUNG *et al.*, 2012).

Danos ao DNA são descritos por dois mecanismos: ligação covalente com o DNA, definido como agente intercalante, fator ligado ao processo de carcinogênese (MILLER, 1978; TUNG *et al.*, 2012); e metabólitos reativos do benzeno, formando adutos de DNA e intensificando o processo de estresse oxidativo, com subsequente mutagenicidade (SNYDER e HEDLI, 1996).

Os efeitos potenciais do benzeno à saúde estão relacionados a fatores de exposição e de toxicidade, como sua estrutura química, frequência e intensidade da

exposição, interação com outros toxicantes (mesmo outro HPA, como o tolueno – TUNSARINGKARN *et al.*, 2012) e suscetibilidade individual.

2.1.3 Toxicidade do benzeno sobre a saúde humana

O conjunto de sinais, sintomas e complicações decorrentes da exposição aguda ou crônica ao benzeno recebe o nome de benzenismo (AUGUSTO e NOVAES, 1999; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2003). As complicações, quando de exposição a altas concentrações, podem ser agudas, com presença de sinais e sintomas neurológicos, ou crônicas, com sinais e sintomas clínicos diversos, podendo ocorrer complicações a médio ou longo prazo localizadas principalmente no sistema hematopoiético (ATSDR, 2007). O diagnóstico de benzenismo, de natureza ocupacional, é eminentemente clínico e epidemiológico, fundamentando-se na história da exposição ocupacional e na observação de sintomas e sinais clínicos e laboratoriais e, portanto, é feito sempre de forma tardia, quando o paciente já encontra-se afetado pela exposição (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2003).

Os efeitos de uma exposição ao benzeno são extensos. Além de sua carcinogenicidade comprovada (Grupo I na classificação da IARC, 1987), o benzeno também é responsável por alterações sanguíneas, isoladas ou associadas à exposição, consequência de lesão tecidual da medula óssea, resultando em anemia aplástica. Um estudo realizado com exposições inferiores a 1ppm em trabalhadores revelou diminuição nos níveis de leucócitos, eritrócitos e plaquetas, comparando-os a pessoas não expostas ocupacionalmente (LAN *et al.*, 2004)

A mutagenicidade atribuída ao benzeno resulta em aberrações cromossômicas (alterações estruturais e numéricas do cariótipo celular), formação de micronúcleos, troca de cromátides irmãs e malformação dos acrossomas dos espermatozoides (IARC, 1987; IPCS, 1993). Estudos indicaram associação entre a exposição ao benzeno e alta prevalência de cânceres sólidos, dano cromossômico e leucemia, além de danos aos sistemas nervoso central e reprodutor (PITARQUE *et al.*, 1997; ATSDR, 2007; CHANG *et al.*, 2009; ARNOLD *et al.*, 2013).

Além disso, exposição ao benzeno também pode causar alterações neuropsicológicas e neurológicas (BASLO e AKSOY, 1982), sendo observadas alterações de atenção, percepção, memória, habilidade motora, viso-espacial, viso-construtiva, função executiva, raciocínio lógico, linguagem, aprendizagem e humor.

A Agência de Proteção Ambiental dos EUA (US EPA) publicou dois documentos sobre as propriedades e efeitos carcinogênicos e não carcinogênicos do benzeno (EPA, 2002). Utilizando a mesma classificação adotada por esta Agência, de uma forma resumida, apresentam-se abaixo os perfis toxicológicos da exposição ao Benzeno.

2.1.3.1 *Efeitos carcinogênicos*

Estudos de caso e epidemiológicos associaram a exposição ao benzeno e o desenvolvimento de Leucemia Mieloide Aguda e, em menor escala, Leucemia Linfocítica Crônica (AKSOY, 1989; ARNOLD *et al.*, 2013). Hayes e colaboradores (1997) identificaram em um estudo de coorte envolvendo mais de 100 mil trabalhadores, entre expostos e não expostos ocupacionalmente ao benzeno, uma relação entre a exposição ao toxicante e o linfoma de Hodgkin, além das neoplasias hematológicas. Conhecendo o potencial confundidor de uma exposição múltipla, estudos que limitam essa possibilidade são tidos como mais robustos. Um exemplo é a coorte dos trabalhadores da indústria de borracha Pliofilm (RINSKY *et al.*, 1987), tida como melhor fonte de dados, apesar de suas limitações (dificuldade de estabelecimento de níveis de exposição, controle dos dados obtidos, acompanhamento da coorte), para estimativa de exposição e risco de leucemia. De acordo com Rinsky e colaboradores (1987), o risco relativo do desenvolvimento de leucemia, em ppm/ano de exposição cumulativa ao benzeno respirável, da população de estudo variou de 1,1 (0-40ppm/ano) a 66,4 (acima de 40 ppm/ano). O estudo de Rinsky *et al.* (1987) não avalia uma exposição a baixas doses, já que a menor categoria utilizada abrange uma faixa de exposição a altas concentrações. Um estudo de coorte, realizado pelo Instituto Americano de Câncer (The National Cancer Institute – NCI) em parceria com a Academia Chinesa de Medicina Preventiva (CAPM), com trabalhadores expostos e não expostos ocupacionalmente

ao benzeno em diversas áreas do processo produtivo industrial da China (LAN *et al.*, 2004), relata haver aumento do risco relativo de desenvolvimento de neoplasias hematológicas com exposições cumulativas em torno de 10ppm.

Além da importância da dosagem e da duração da exposição ao benzeno, a temporalidade dessa exposição também se mostra como fator determinante. No estudo de Rinsky (1987), a dificuldade em se estimar a exposição sofrida nos primeiros anos do estudo, quando os níveis de benzeno respirável não eram monitorados, é tratada como viés por outros pesquisadores. No estudo do NCI/CAPM verificou-se risco elevado de desenvolvimento de linfoma não-Hodgkin em trabalhadores expostos pelo menos 10 anos antes do diagnóstico e uma exposição mais recente (menos de 10 anos do diagnóstico) foi relacionada com um aumento no risco de desenvolvimento de Leucemia Mieloide Aguda e Síndromes Mielodisplásicas (LAN *et al.*, 2004). Outros estudos associam exposições a benzeno e o desenvolvimento de Leucemia Mielóide Aguda (LMA), Linfomas (Hodgkin e não Hodgkin) e mielomas múltiplos (IRONS *et al.*, 2000; INFANTE, 2006; SMITH *et al.*, 2007; GALBRAITH *et al.*, 2010).

2.1.3.2 *Efeitos não carcinogênicos*

A exposição ao benzeno gera efeitos não carcinogênicos à saúde em todas suas rotas de exposição. Hematotoxicidade e imunotoxicidade configuram como os fatores mais predominantes da intoxicação, sendo a medula óssea o órgão-alvo desse processo (AKSOY, 1989; ARNOLD *et al.*, 2013). A exposição crônica ao toxicante leva à deterioração do sistema hematopoiético através da baixa na produção das células sanguíneas e da hiperplasia do tecido medular (EPA, 2002).

Como uma exposição ambiental aguda é relativamente difícil de ocorrer, pois implicariam na exposição a 50-150ppm por 5 horas para apresentação de sintomas como cefaleia e fraqueza (IPCS, 1993), prevalecem, na literatura, estudos sobre exposições ocupacionais. Thienes e Haley (1972) descreveram os sintomas do processo de intoxicação aguda por via oral: tontura, vômitos, diminuição/aumento da frequência cardíaca, sonolência e perda de consciência, seguidos de delírios,

pneumonite, depressão do sistema nervoso central (SNC), coma e morte (com dose letal estimada em 125mg/kg).

Nos processos de intoxicação por inalação, os principais sintomas são relacionados a desordens dos sistemas: hematopoiético, desde a alteração no nível da atividade medular ao aumento de urobilinogênio nas fezes (AKSOY, 1991); nervoso, apresentando tontura, sonolência, cefaleia, tremor, vertigem, delírios e perda de consciência (SNYDER e HEDLI, 1996); e reprodutor, causando distúrbios no ciclo reprodutivo feminino com alteração do fluxo menstrual e alteração da ovulação (VARA e KINNUNEN, 1946), com consequências como malformação fetal, diminuição do tempo de gestação e aborto espontâneo (EPA, 2002). Uma exposição ao benzeno respirável é considerada letal quando em doses superiores a 20.000ppm por um período de 5 a 10 minutos (SANDMEYER, 1981).

2.2 EXPOSIÇÃO OCUPACIONAL AO BENZENO

Conhecidos os efeitos de uma exposição crônica ao benzeno, estratégias têm sido elaboradas para diminuir os riscos à qualidade de vida dos trabalhadores expostos a este toxicante, como a adoção de tecnologias avançadas nos processos de produção e determinação de espécies no ar em níveis antes não identificáveis, políticas de vigilância à saúde ocupacional mais restritivas e uma tendência de redução do uso do benzeno como solvente em processos industriais (GILLI *et al.*, 1996; COUTRIM *et al.*, 2000).

Agências de regulamentação e proteção ambiental e ocupacional têm reduzido os níveis limítrofes de exposição ao benzeno como forma de tornar mais rigoroso o processo de fiscalização. A Tabela 1 apresenta valores de referência, em médias ponderadas por um período de 8h (8h TWA – *time weighted average*), equivalentes à jornada de trabalho, da presença do benzeno no ar. De acordo com a ATSDR (2007), os valores variam entre as agências devido aos métodos de obtenção dos mesmos, que podem variar no tempo de exposição e tipos de testes buscados na literatura. Cabe ressaltar que tais valores são recomendações, não podendo, portanto, ter força de lei. Cabe às agências fornecer informações corretas

e embasadas, para que a sociedade e os trabalhadores, em suas organizações, exijam adequação, por parte de empresas e indústrias, a estes valores.

Tabela 1: Valores de referência para exposição ocupacional (valores ponderados por 8h diárias de exposição) ao benzeno (MINISTÉRIO DO TRABALHO, 1995; OSHA, 2013).

Agência	Medida	Valor
Occupational Safety and Health Administration (OSHA)	PEL	1,0 ppm
The National Institute for Occupational Safety and Health (NIOSH)	REL	0,1 ppm
American Conference of Governmental Industrial Hygienists (ACGIH)	TLV	0,5 ppm
Ministério do Trabalho e Emprego/Brasil (MTE)	VRT	1,0 ppm

PEL: Permitted exposure limit; REL: Reference exposure value;
TLV: Threshold limit value; VRT: Valor de referência tecnológico.

No Brasil, a Norma Regulamentadora (NR-15) para Atividades e Operações Insalubres estabelece como valores de tolerância (concentração no ar do local de trabalho), para uma jornada de até 48h semanais: 78 ppm (290 mg/m³) para tolueno, 78 ppm (340 mg/m³) para xileno e 78 ppm (340 mg/m³) para etilbenzeno. A legislação estabelece valores muito inferiores de tolerância ocupacional ao benzeno (1,0 ppm; 3,195 mg/m³), visando à proteção da saúde do trabalhador, sabido tratar-se de um composto comprovadamente carcinogênico (MTE, 1978; IARC, 1987).

O estabelecimento de baixos limites de exposição, apesar da redução do risco de contaminação, não assegura a proteção absoluta. E dado o uso em larga escala dos combustíveis fósseis e do benzeno em processos industriais, garantir que não haverá riscos decorrentes da exposição torna-se impraticável no contexto social atual, em que o uso de combustíveis fósseis é a base econômica mundial.

Um informativo publicado pela Agência Internacional de Pesquisa sobre Câncer (IARC, 2013), classifica a poluição presente no ar atmosférico como agente carcinogênico tipo I, ou seja, com evidências suficientes em animais e seres humanos. A não distinção dos componentes da poluição (vapores de combustíveis, materiais particulados e outros) demonstra a dificuldade em definir um ambiente livre de contaminantes carcinogênicos, bem como a realidade sobre a múltipla exposição a substâncias nocivas à saúde. Tal afirmação pode ser mal interpretada e resultar na minimização dos impactos de uma exposição ocupacional, não apenas entre frentistas, mas em qualquer exposição que represente risco carcinogênico. Por este

motivo é importante reforçar a vigilância ocupacional, garantindo que os riscos sejam compreendidos e os trabalhadores respeitados e respaldados no âmbito da saúde ocupacional.

2.2.1 Vulnerabilidade de Trabalhadores de Postos de Gasolina

Postos de revenda de combustíveis veiculares (PRCV) localizados em todo o país apresentam um potencial contaminante, tanto pelo passivo ambiental representado pelos tanques de armazenamento desses produtos (muitas vezes malconservados), quanto pela manipulação diária dos combustíveis. Esta situação de vulnerabilidade ambiental e ocupacional é sustentada por alguns fatos (MACHADO *et al.*, 2003):

- Não há uma organização do setor, que se encontra bastante fragmentado;
- Os equipamentos (tanques, bombas, etc.) são de propriedade de terceiros (empresas franqueadoras), dificultando o acompanhamento, pelos franqueados, das condições desses equipamentos;
- Os equipamentos em operação no país têm, em média, 20 anos de uso, o que, além de representar a ausência de novas tecnologias que minimizariam o risco ocupacional, leva a desgastes e deterioração de material;
- Há falta de incentivos à modernização do parque tecnológico, pelos custos que representam;
- Não há uma clareza entre os expostos a respeito dos efeitos nocivos desses compostos químicos à saúde (da população em geral e dos trabalhadores) e ao ambiente.

Mesmo o benzeno estando em concentrações menores na gasolina e em outros produtos acabados, o passivo ambiental gerado pelo transporte de grandes volumes e pelo uso descontrolado dos combustíveis e produtos que contêm benzeno pode atingir com maior severidade um grande contingente de trabalhadores dos postos, além da população residente no entorno destes empreendimentos e de

vias de tráfego intenso. A população em geral também se expõe ambientalmente devido à volatilização da gasolina nos postos e nos veículos automotores e às emissões veiculares dos mesmos, portanto com difusão universal (FISHBEIN, 1998; CARRIERI *et al.*, 2006).

O acompanhamento e a intervenção sobre fatores de risco e determinantes dos agravos à saúde de trabalhadores e trabalhadoras, no Brasil, é executado pela VISAT (Vigilância em Saúde do Trabalhador), braço da Vigilância em Saúde do Sistema Único de Saúde (BRASIL, 1998). Através dos Centros de Referência em Saúde do Trabalhador (CEREST), a vigilância em PRCV é incorporada no planejamento de ações da VISAT. Além das Secretarias e CEREST, ao final de 1995, com a efetivação do Acordo Nacional do Benzeno, foi criada a Comissão Nacional Permanente do Benzeno (CNPBz), resultado da mobilização de trabalhadores e instituições de ensino e pesquisa do país. A CNPBz, coordenada pelo Ministério do Trabalho e Emprego (BRASIL, 2011), estabeleceu pactuação tripartite (Governo, empregadores e trabalhadores) e tem trabalhado nestes 20 anos para garantir a implementação de medidas para a diminuição da exposição ocupacional através de mudanças no processo de trabalho e da atualização de tecnologias de extração, manipulação, produção e disponibilização de produtos com Benzeno.

No entanto, em nível nacional, apesar dos esforços de cooperação que têm sido feitos neste sentido por pesquisadores, universidades e secretarias municipais e estaduais, como discutido no III Encontro Nacional de Vigilância em Saúde em Postos de Combustíveis, realizado em setembro de 2013, no Rio de Janeiro e organizado pelo CESTEH/ENSP/Fiocruz, faltam medidas capazes de levantar informações e garantir alguma proteção à saúde ocupacional dos trabalhadores deste setor, seja na produção, transporte ou comercialização.

Estudos têm alertado para a importância da vigilância em saúde neste grupo, composto por mais de 180 mil trabalhadores e trabalhadoras (de acordo com o CENSO – IBGE, 2010), que sofre pelas exposições e, principalmente, pela falta de normas, fiscalização e monitoramento (COSTA, 2001; MOURA-CORREA, 2014).

2.3 GENOTOXICIDADE E MONITORAMENTO BIOLÓGICO

A genotoxicidade está relacionada à capacidade de um agente estressor, seja ele químico (como um toxicante ou o processo de estresse oxidativo), físico (radiação, calor) ou mesmo biológico (bactéria, vírus), de alterar a estrutura do DNA celular. Estas alterações podem ocorrer a nível gênico, como mutações, e/ou cromossômico, como deleções, duplicações, quebras simples e duplas (CLAYSON *et al.*, 1991).

Os mecanismos de reparo do DNA celular são de extrema importância para evitar que células perpetuem erros genéticos que possam levar a um funcionamento imperfeito daquele tecido, ou mesmo ao processo de carcinogênese ou morte celular. Estes mecanismos de reparo são eficazes para a correção de erros cometidos normalmente pelas células em seu processo de replicação. A exposição ambiental e ocupacional sofrida ao longo dos anos aumenta a taxa de erros de reparo e mutações, podendo, ocasionalmente, pô-las acima da capacidade de correção das células.

Outro fator responsável pelo aumento na frequência de danos ao material genético é a idade. Um estudo de Fraga e colaboradores (1990) acompanhou um único tipo de dano, estresse oxidativo gerando resíduos de 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina (8-OHdG), em ratos. Seus resultados apontaram que, apesar da capacidade de correção das lesões ocasionadas pelo processo oxidativo, observava-se um acúmulo de cerca de 80 moléculas de 8-OHdG por célula/dia. Dessa forma, a idade torna-se um fator intensificador dos efeitos de uma exposição a agentes genotóxicos. Quando da ocorrência de dano ao material genético de uma célula, são possíveis os desfechos (IYAMA e WILSON, 2013):

- No caso de não correção do dano, a célula pode entrar em processo apoptótico/necrótico ou dar início a uma patologia tissular;
- Caso ocorra um reparo incorreto, aquela célula pode ser eliminada pelo sistema imune do organismo, ou resultar numa mutação, devido à hiperativação de proteínas promotoras ou à inativação de enzimas supressoras de tumor;

- A célula pode ser reparada de forma correta, voltando a ser e atuar como as demais células daquele tecido.

É importante frisar que a extensão do dano, bem como a capacidade de correção celular, depende, além das características do tecido afetado, como sua taxa de divisão celular, das propriedades do toxicante e da exposição (BERMSTEIN *et al.*, 2002; CLANCY, 2008).

Uma quebra da molécula de DNA, seja em simples ou dupla fita, pode ser corrigida de duas maneiras: por recombinação homóloga, onde um conjunto de enzimas repara a quebra; e por junção de finais não homólogos (HELLEDAY, 2010). Esse último processo é o mais comum para correção de danos ao DNA em células de mamíferos. Sem um padrão homólogo, ocorre a junção aleatória de duas pontas, o que é associado a um aumento na ocorrência de recombinação e aberrações cromossômicas (TUNG *et al.*, 2012).

Tendo em vista o risco da exposição a agentes químicos, físicos e biológicos, fez-se necessária a adoção de métodos de avaliação que busquem sinais subclínicos, antevendo-se ao processo de adoecimento. Dessa forma, foram eleitos biomarcadores, ferramentas importantes no monitoramento biológico e ambiental. De forma geral, esses biomarcadores estão divididos, na epidemiologia molecular, em três grandes grupos: biomarcadores de exposição, de efeito e de suscetibilidade (LEE *et al.*, 2009). Estes foram assim definidos de acordo com as metodologias de análise e as matrizes analisadas. Na prática, um processo de exposição pode ser monitorado em todos os níveis, desde a presença do toxicante no ambiente aos seus efeitos sobre o sistema biológico de um indivíduo ou população.

2.3.1 Biomarcadores de exposição

Um biomarcador de exposição é um xenobiótico, metabólito ou produto deste (após interação com uma molécula-alvo no organismo) a ser mensurado. Normalmente são definidos como marcadores de dose externa quando se avalia a presença e quantidade de uma substância num compartimento ambiental específico; e marcadores de dose interna quando for mensurada a substância ou seus

metabólitos num organismo (NAS/NRC, 1989). Os principais metabólitos decorrentes de uma exposição ao benzeno são fenóis, ácido S-fenilmercaptúrico (AFM) e ácido trans,trans-mucônico (ATTM). Por muito tempo o grupamento fenol era o bioindicador do nível de exposição, mas este se limita a exposições superiores a 5ppm ponderados por um período de 8h TWA, pois fatores alimentares pregressos poderiam resultar em resultados similares em pessoas não expostas ocupacionalmente (YARDLEY-JONES *et al.*, 1991). Como atualmente os valores de referência para exposição ocupacional ao benzeno são de 1ppm ou menores, outro marcador precisava ser utilizado. Então AFM e ATTM foram aceitos como biomarcadores para exposição ocupacional ao benzeno (STOMMEL *et al.*, 1989; BOOGAARD e VAN SITTEERT, 1995; SANGUINETTI *et al.*, 2001). Apesar de um procedimento de coleta simples e não invasivo, a urina, matriz biológica de escolha em alguns estudos mais antigos, vem sendo substituída pelo sangue, pois análises neste material possuem altas sensibilidade e especificidade na quantificação do benzeno, assim como o ar exalado. Seguindo outra corrente, estudos recentes sugerem o uso, no futuro, do benzeno urinário não metabolizado (U-Benz) como biomarcador para avaliação de exposição a baixas doses do toxicante (ANDREOLI *et al.*, 2012; CAMPAGNA *et al.*, 2012).

2.3.2 Biomarcadores de efeito

Biomarcadores de efeito são definidos como qualquer alteração bioquímica ou fisiológica mensurável em um organismo (NAS/NRC, 1989). A pancitopenia (diminuição na contagem de leucócitos, eritrócitos e plaquetas), efeito conhecido da exposição ao benzeno, tem sido usada como biomarcador (OSHA, 1987; ARNOLD *et al.*, 2013).

Marcadores do efeito genotóxico da exposição ao benzeno, como aberrações cromossômicas, troca de cromátides irmãs, adutos e lesões no DNA, bem como o estresse oxidativo gerado pelas formas reativas dos metabólitos do toxicante também são amplamente utilizados (EASTMOND *et al.*, 1994; ATSDR, 2007). Os testes de genotoxicidade usados para avaliar o efeito do benzeno sobre o organismo serão melhor elucidados a seguir.

2.3.3 Biomarcadores de suscetibilidade individual

Apesar do efeito protetivo das mudanças na legislação, as variações interindividuais têm limitado o alcance das medidas de prevenção e controle, assim como a dificuldade para determinação de um indicador biológico de alta especificidade que permita a identificação precoce dos efeitos da exposição. Aspectos relevantes desta variabilidade estão associados a fatores genéticos, que devem ser considerados durante a execução e interpretação de programas de monitorização de populações expostas às substâncias tóxicas, de maneira geral. Com esta perspectiva, pesquisadores têm investigado diferentes indicadores de suscetibilidade individual, a fim de gerar dados específicos que complementem as avaliações da exposição de trabalhadores comumente realizadas. Polimorfismos em genes que codificam as enzimas de fase I e II GSTT1, GSTM1, MPO, CYP 2E1 RsaI, CYP 2E1 DraI e NQO1 (ROSSI *et al.*, 1999; DOUGHERTY *et al.*, 2008) têm sido os indicadores escolhidos, de acordo com a literatura, para definir fatores de suscetibilidade dos indivíduos expostos, ambiental ou ocupacionalmente, ao benzeno. Além destes, polimorfismos de genes ligados aos mecanismos de reparo do DNA (APEX1, hOGG1, NBS1, XPD, XRCC1, e XRCC3) também foram descritos como relacionados à suscetibilidade aos efeitos tóxicos do benzeno (ANGELINI *et al.*, 2012; VALENTE *et al.*, no prelo).

2.4 ABERRAÇÕES CROMOSSÔMICAS E OUTROS DANOS

As consequências das quebras cromossômicas, bem como suas causas, são diversas. É o agente de maior influência sobre a morte celular. (...) Além disso, as quebras cromossômicas estão envolvidas no desenvolvimento espontâneo de uma série de tumores. Juntamente com as mutações genéticas, estamos ainda começando a compreender sua conexão, o agente de toda mudança genética e evolutiva. Num campo amplo e único, as quebras cromossômicas se tornaram um instrumento, talvez o mais distinto, para desconstruir o cromossomo e os genes, observando como eles, e o núcleo celular, se compõe, são feitos, como funcionam e o que necessitam para funcionar (DARLINGTON, 1953, livre tradução).

Agentes genotóxicos, como explicitado anteriormente, tem ação direta sobre as moléculas de DNA, com ações deletérias diversas, que vão de mutações silenciosas à carcinogênese. A ação de um agressor, seja ele físico, químico ou biológico, endógeno ou não, pode gerar modificações moleculares e quebras, dando origem a mutações (RIBEIRO *et al.*, 2003).

Estes danos são vistos durante a divisão celular, mais especificamente na metáfase, momento do processo de divisão celular onde o material genético celular encontra-se em sua forma mais condensada, tornando a morfologia cromossômica distinta e visível ao microscópio (NATARAJAN, 2002). Apesar do avanço tecnológico de metodologias moleculares de alta resolução, a avaliação do cariótipo é largamente utilizada, já que alterações no cariótipo estão significativamente relacionadas a doenças, bem como refletem alterações a nível gênico (HENG, 2010; HENG *et al.*, 2013). Aberrações cromossômicas estão associadas ao processo de carcinogênese, tendo sido observada correlação positiva entre a frequência de aberrações em linfócitos e o desenvolvimento de câncer (NATARAJAN, 2002).

Um trabalho de metanálise realizada por Zhang e colaboradores (2002) demonstra a ocorrência de aberrações cromossômicas em células de sangue periférico e de medula óssea em indivíduos com leucemia. Os estudos elencados por Zhang descreveram vários tipos de aberrações, numéricas e estruturais, bem como células de cariótipo regular. Trabalho similar foi realizado por Wang *et al.* (2012), onde quase 100 artigos foram levantados e evidenciaram o aumento na ocorrência das aberrações cromossômicas em casos de exposição a HPAs. Essas alterações são descritas a seguir (KIRSCH-VOLDERS *et al.*, 2002):

2.4.1 Numéricas

As alterações cromossômicas numéricas incluem aneuploidia e euploidia. Ambos os casos já foram descritos em células de pessoas expostas ao benzeno (ZHANG *et al.*, 2002).

Aneuploidia: ocorre pela não disjunção mitótica, o que gera então duas células-filhas com número incorreto de cromossomos (Figura 3), normalmente apresentando um par a mais ou a menos (trissomia e monossomia, respectivamente, segundo FRAGOULI *et al.*, 2011).

Em 1998, dois estudos já haviam relacionado tipos específicos de aneuploidia (monossomia dos cromossomos 5 e 7, e trissomia dos 8 e 21) em trabalhadores saudáveis expostos ao benzeno, ou seja, sem qualquer sinal clínico referente à este tipo de alteração (SMITH *et al.*, 1998; ZHANG *et al.*, 1998). Outros estudos relacionaram a trissomia do cromossomo 21 a um estágio de “pré-leucemia”, tendo visto que pacientes com este tipo de câncer apresentam alta incidência dessa alteração a nível celular (ZHANG *et al.*, 2005, JI *et al.*, 2012).

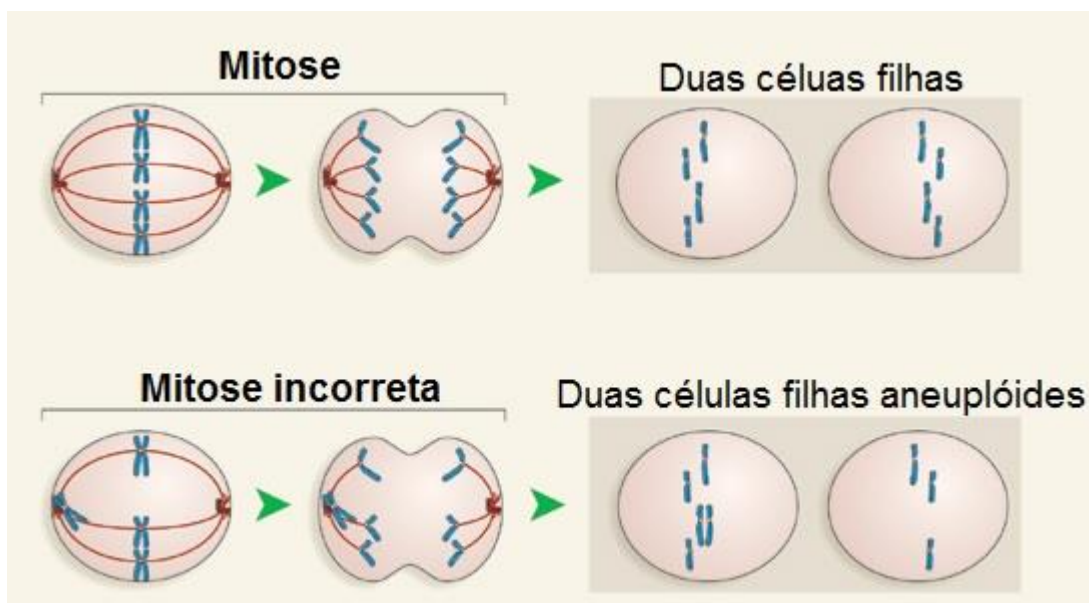


Figura 3: Esquema de Aneuploidia. Adaptado de Pellman, 2007.

Euploidia: fenômeno menos comum, onde uma célula possui um valor múltiplo do número de cromossomos haplóides (n). A sobrevivência de humanos

quando a fecundação gera células com triploidia ($3n = 69$) ou tetraploidia ($4n = 96$) é impossível, resultando em abortos espontâneos ou natimortos, mas pode ocorrer em células de um indivíduo já formado (ZHANG *et al.*, 2002). Tal fenômeno pode ter sua origem em: (1) falhas do processo de meiose dos gametas, que passam por divisões incompletas; (2) fertilização de um ovócito por dois espermatozoides; (3) falha mitótica do embrião (GUERRA, 1988; PELLMAN, 2007).

2.4.2 Estruturais

As alterações cromossômicas estruturais incluem quebras, deleções, duplicações, formação de anéis, translocações e inversões, como descrito abaixo. Também pode ocorrer a formação de adutos de DNA ou proteínas. Assim como as aberrações numéricas, as estruturais também já foram observadas em casos de exposição ao benzeno (ZHANG *et al.*, 2002).

Quebras: o dano em ligações fosfodiéster entre os nucleotídeos que formam as fitas de DNA são visíveis em sua forma mais condensada. A quebra do DNA pode ter dois desfechos: com a quebra de dupla fita sem reparo, são observadas as aberrações cromossômicas, originando cromossomos incompletos e fragmentos cromossômicos; e uma quebra reparada pode dar origem a translocações, anéis centrícos e acêntricos, fragmentos e cromossomos dicêntricos, quando as pontas de cromossomos e fragmentos se unem em processos de reparo incompleto. 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 (BI *et al.*, 2005; HEIJINK *et al.*, 2013).

As quebras, sejam elas simples (atingindo apenas uma das fitas) ou duplas, podem ocorrer naturalmente, fruto dos processos naturais do organismo ou de exposições a agentes genotóxicos, definidos clastogênicos (xenobióticos que provocam essas quebras, como o Benzeno). Os mecanismos de reparo se encarregam de impedir que esses erros tenham maiores consequências, desfazendo-os. (IPCS, 1985; NATARAJAN, 2002; STRATTON *et al.*, 2009; TUNG *et al.*, 2011; ZHANG *et al.*, 2013).

Deleções/duplicações: Uma deleção é a perda de um fragmento do cromossomo, Enquanto a duplicação é definida pela cópia de um fragmento cromossômico. Deleções/duplicações podem ser terminais, quando o cromossomo perde o final de um de seus braços, ou intersticiais, quando a deleção ocorre no meio do braço (Figura 4);

Formação de Anéis: quando um cromossomo perde as porções finais dos braços *p* (braço curto) e *q* (braço longo), com posterior junção de seus braços (Figura 4);

Translocação: A translocação ocorre quando há uma quebra num cromossomo e seu fragmento se liga a um cromossomo adjacente (Figura 4). Esse rearranjo gênico pode ter consequências que vão do silenciamento de uma sequência a erros em genes regulatórios, podendo resultar em carcinogênese (ROUKOS e MISTELI, 2014). Outro tipo de translocação, chamado *troca de cromátides irmãs*, ocorre da mesma maneira, porém entre as cromátides de um mesmo cromossomo durante a mitose. Estudos relacionam o aumento na ocorrência deste evento com exposições a toxicantes (BUKVIC *et al.*, 1998; ROSS, 2000; REKHADEVI *et al.*, 2010);

Inversão: um fragmento cromossômico é formado e realocado no mesmo espaço de origem, mas invertido. Uma inversão pode ser pericêntrica, incluindo seu centrômero no fragmento invertido, ou paracêntrica, quando o centrômero não está incluído no fragmento invertido (Figura 5);

Adutos: diversas moléculas, por suas afinidades físico-químicas, ligam-se às estruturas do DNA ou de proteínas acessórias, como as histonas. Resíduos de reações oxidativas, metabólitos de xenobióticos ou a substância não metabolizada em si podem se ligar em sítios específicos, causando, na maior parte das vezes, silenciamento da expressão gênica daquele local. Como não ocorre alteração da estrutura gênica em si, este tipo de alteração é chamada de *epigenética*, alterações que não modificam a sequência de nucleotídeos do DNA (CORRÊA *et al.*, 2013). O tipo mais comum de aduto, o radical metil (processo chamado de metilação do DNA), é descrito na literatura como regulador dos processos de expressão, mas uma hipermetilação pode resultar na não-expressão de proteínas essenciais para a

manutenção da vida naquela célula ou, em maior escala, num organismo inteiro (FAKHR, *et al.*, 2013).

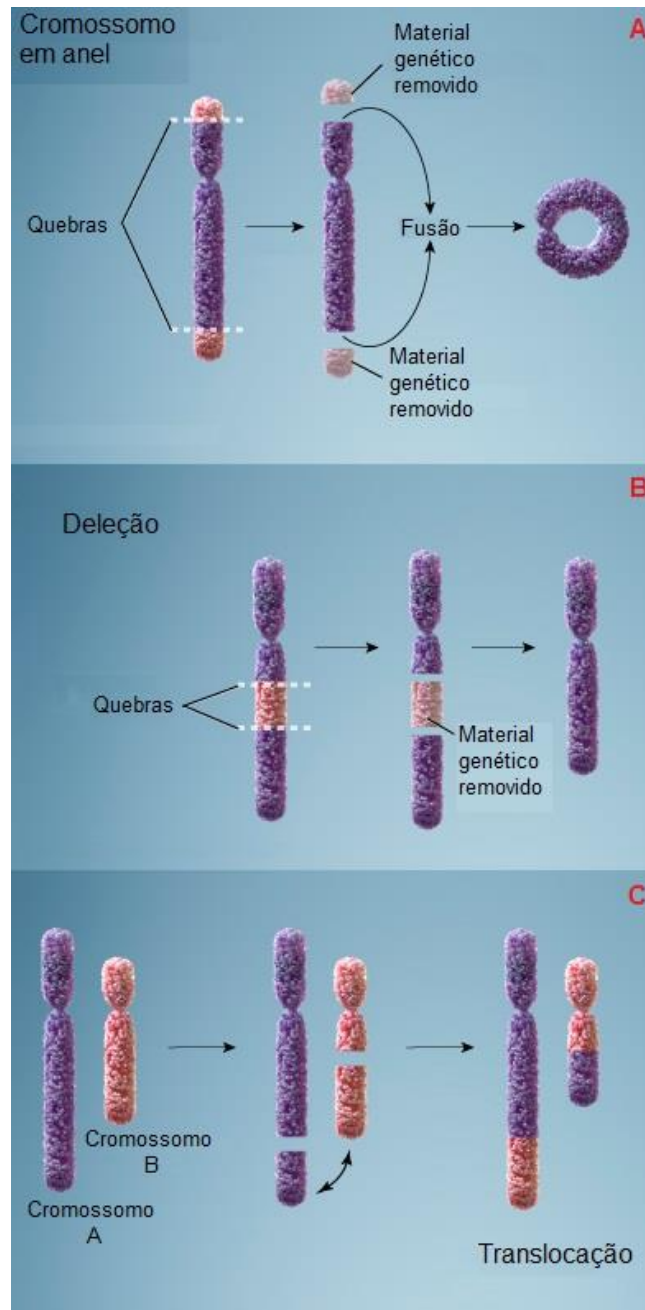


Figura 4: Esquemas de aberrações cromossômicas. A) formação de anel cromossômico; B) deleção e; C) translocação. Adaptado da U.S. NLM, 2014.

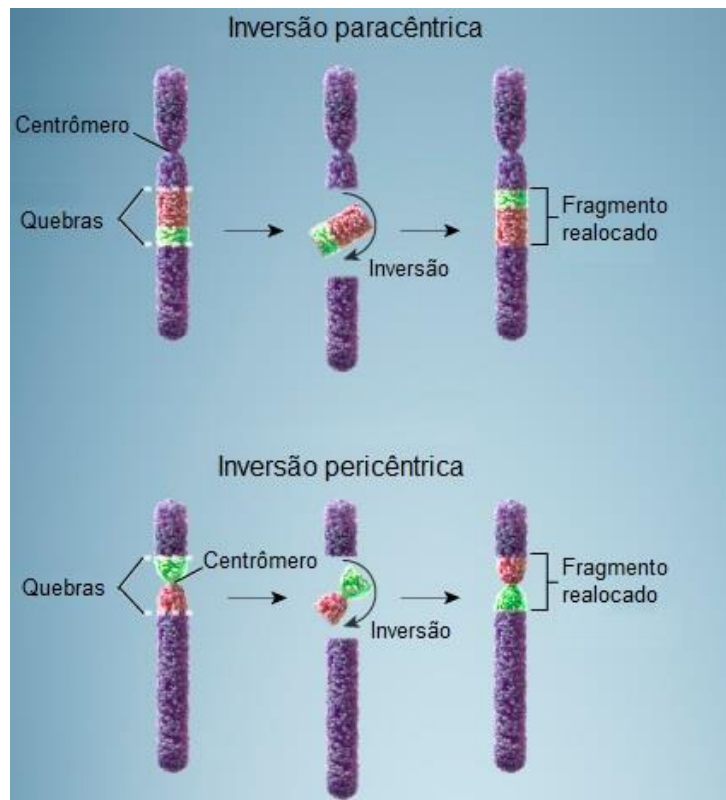


Figura 5: Esquema das inversões paracêntrica e pericêntrica. Adaptado da U.S. NLM, 2014.

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 ótico, como mostra a Figura 6. Com o avanço das técnicas laboratoriais em biologia molecular, existem técnicas de alta sensibilidade e especificidade para a detecção e quantificação dessas alterações, bem como ferramentas estatísticas e epidemiológicas que nos permitem traçar o perfil de exposição de uma população e gerar informações extrapoláveis sobre os riscos de uma exposição, mesmo em doses extremamente baixas.

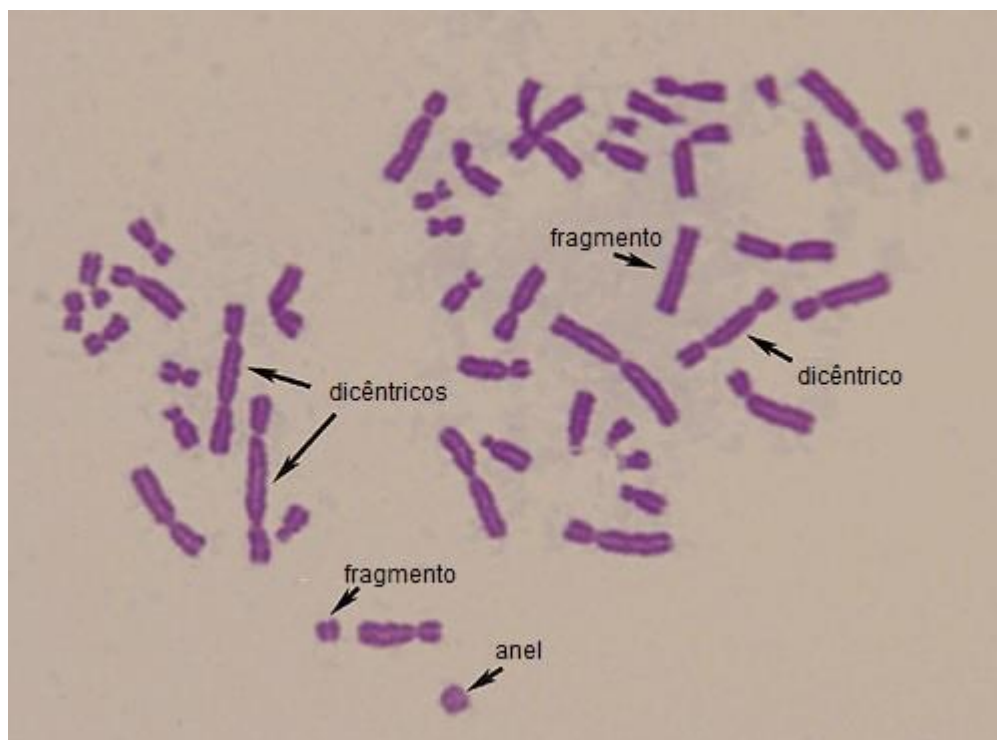


Figura 6: Aberrações cromossômicas visualizadas ao microscópio ótico (ampliação de 1000 vezes).
Fonte: <http://trialx.com/curebyte/2011/07/09/images-related-to-chromosome-aberrations>.

2.5 AVALIAÇÃO DA GENOTOXICIDADE

Um dos métodos diretos de avaliação da genotoxicidade em populações expostas de forma ambiental ou ocupacional, acidental ou intencionalmente, é a medição das mudanças ocorridas no DNA, visualizadas em células em metáfase através dos cromossomos, chamado teste de aberrações cromossômicas (AC). Estudos identificaram padrões de dose-resposta entre exposição ocupacional ao benzeno e presença de ACs mesmo em doses relativamente baixas. Padrões de genotoxicidade em exposições ambientais por vias inalatória, dérmica ou oral são normalmente extrapolações dos padrões identificados em exposições ocupacionais em suas vias mais frequentes, inalatória e dérmica (HEDLI *et al.*, 1991; SUL *et al.*, 2002; QU *et al.*, 2003^a; 2003^b).

O teste de ACs consiste em cultivar uma amostra de linfócitos de sangue periférico, interromper a divisão celular na fase de metáfase – etapa do processo de divisão onde se observa o cariótipo – e analisar e quantificar, em microscópio ótico (ampliação de 1000 vezes), a presença de alterações estruturais dos cromossomos. É uma metodologia bem estabelecida na literatura, com reagentes e matrizes

validadas em vários estudos, inclusive para exposições ao benzeno (HOLECKOVA *et al.*, 2004; TESTA *et al.*, 2005; BESKID *et al.*, 2006; FRACASSO *et al.*, 2010; REKHADEVI *et al.*, 2010; TUNG *et al.*, 2012; ROSSNER *et al.*, 2013).

Linfócitos de sangue periférico são uma matriz bem estabelecida para a realização do teste de AC em casos de exposição ambiental ou ocupacional a agentes genotóxicos, e têm sido cada vez mais usados em estudos de exposição ao benzeno 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 característica de permear por diversos órgãos (IAEG, 1986; CARRANO e NATARAJAN, 1987; OBE *et al.*, 2002; ROSSNER *et al.*, 2005).

Outros efeitos genotóxicos observados em exposições a benzeno em humanos, *in vivo* e *in vitro*, são a formação de micronúcleos, troca de cromátides irmãs e dano oxidativo ao DNA (ROBERTSON *et al.*, 1991; POPP *et al.*, 1992; BODELL *et al.*, 1993; KOLACHANA *et al.*, 1993; ROTHMAN *et al.*, 1995; LIU *et al.*, 1996; CHANG *et al.*, 2005).

Considerando todas as informações toxicológicas sobre o benzeno supracitadas, além da dificuldade em se traçar um perfil de toxicidade de uma exposição múltipla, em especial num caso complexo como a exposição ocupacional aos vapores de combustíveis, julga-se necessária a execução de estudos que busquem garantir informações confiáveis sobre este quadro, de forma a preservar a saúde, não só da classe operária em questão, mas de toda a sociedade também exposta, mesmo que em menor intensidade, a esses vapores.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Analisar possível associação entre a exposição ocupacional aos vapores produzidos em Postos de Revenda de Combustíveis Veiculares (PRCV) e as aberrações cromossômicas em trabalhadores e trabalhadoras destes locais no município do Rio de Janeiro.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar o processo de trabalho em postos de combustíveis, identificando fatores relacionados à exposição ocupacional à gasolina e ao benzeno em particular;
- Comparar os perfis de aberrações cromossômicas em trabalhadores de diferentes PRCV;
- Investigar possíveis associações entre a exposição ocupacional e a incidência de aberrações cromossômicas.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Este é um estudo observacional, descritivo do tipo transversal que, utilizando-se de um teste de genotoxicidade, busca avaliar a sensibilidade de um biomarcador já validado para exposições a maiores doses de benzeno, para evidenciar o risco da exposição ocupacional aos vapores de combustível, em especial o benzeno, composto de comprovada mutagenicidade e carcinogenicidade.

4.1 POPULAÇÃO

Foram eleitos para o estudo homens e mulheres (exceto grávidas) com idade mínima de 18 anos que trabalhavam em Postos de Revenda de Combustíveis Veiculares (PRCV) por ao menos um ano. Este projeto é uma parceria do Centro de Estudos da Saúde do Trabalhador e Ecologia Humana (Cesteh/Ensp/Fiocruz) e a Secretaria Municipal de Saúde do Rio de Janeiro (CEREST e Vigilância Ambiental), que implantou em 2012 o primeiro programa de Saúde do Trabalhador (PST) na área programática 5.3, que compreende os municípios de Santa Cruz, Paciência e Sepetiba. A atuação na AP 5.3 e a avaliação da exposição ao benzeno estão previstas como ações estratégicas no Plano de Ação da RENAST (Política Nacional de Saúde do Trabalhador e da Trabalhadora, Portaria GM/MS nº 1.823, de 23 de agosto de 2012). Nesta região participaram os postos de combustíveis que, em parceria com a Sinpospetro-RJ (Sindicato dos Empregados em Postos de Serviços de Combustíveis e Derivados de Petróleo do Estado do Rio de Janeiro), foram convidados e concordaram com o estudo. Todos os trabalhadores desses postos, quando enquadrados nos critérios de inclusão, foram convidados a participar do estudo, formando a amostra.

4.1.1 Aspectos éticos

O projeto seguiu os preceitos da ética em pesquisa com seres humanos (Conselho Nacional de Saúde – CONEP 466/2012). Todos os indivíduos que formaram a amostra leram, concordaram e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). O projeto integrador foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca (Parecer 434.418, de 25/10/2013).

4.2 COLETA DE DADOS

Para a coleta dos dados sociodemográficos, das condições de trabalho e de perfil e histórico de saúde dos sujeitos da pesquisa foram utilizados dois questionários, Individual e Clínico (Anexos I e II), já validados pela Comissão Nacional Permanente do Benzeno (CNPBz), que abordam, de forma sumarizada:

- Dados sociodemográficos dos trabalhadores;
- Os procedimentos operacionais (etapas) realizados pelos frentistas, quanto aos agentes de riscos inerentes ao benzeno;
- Uso dos Equipamentos de Proteção Individual (EPI) e Coletivo (EPC) pelos frentistas;
- Fatores de riscos e agravos à saúde decorrentes da exposição ao benzeno;
- Hábitos dos trabalhadores, identificando outras possíveis vias de exposição;
- As condições e o ambiente de trabalho quanto a agentes de risco inerentes ao benzeno;
- Possível exposição múltipla a diferentes substâncias;
- Histórico familiar de doenças, correlatas ou não com possíveis desfechos de sua exposição;

- Condições gerais de saúde.

Além dos dois questionários, coletas de sangue e urina foram realizadas para o levantamento de dados biológicos. Os exames de hemograma e bioquímica foram realizados a partir do sangue dos trabalhadores, e forneceram as seguintes informações: eritrograma (contagem de hemácias, hemoglobina, hematócrito e volume globular médio – VGM), leucograma (contagem total de leucócitos, bastonetes, segmentados, eosinófilos, basófilos, monócitos e linfócitos), plaquetograma, transaminases (oxalacética e pirúvica), bilirrubina (direta, indireta e total) e Gama GT. A partir da urina foi quantificado o metabólito ácido trans,trans-mucônico, determinado por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) para a caracterização da magnitude da exposição aos vapores de gasolina.

4.3 TESTE DE ABERRAÇÕES CROMOSSÔMICAS

4.3.1 Coleta de material

O projeto multicêntrico contempla a avaliação de uma série de fatores, de exames bioquímicos a testes de genotoxicidade. Portanto, para os testes de aberrações cromossômicas (ACs), alíquotas de 1mL de sangue total foram separadas em tubos contendo heparina, homogeneizados e mantidos resfriados.

4.3.2 Procedimentos do teste de ACs

Toda a metodologia para o teste de aberrações cromossômicas consta dos POPs (Protocolos Operacionais Padrão) do Laboratório de Toxicologia do Centro de Estudos da Saúde do Trabalhador e Ecologia Humana (Cesteh/Ensp/Fiocruz). O protocolo referente a este teste consta desta dissertação (Anexo III).

De forma sumarizada, o teste de Aberrações Cromossômicas consiste em preparar uma cultura celular que será incubada em condições favoráveis para a divisão celular dos linfócitos com o estímulo da fitohemaglutinina, e interromper a

divisão na metáfase. Após a incubação as células são lavadas e tratadas com soluções hipotônica e fixadora, de modo a garantir, ao final, uma solução límpida contendo apenas linfócitos em metáfase. Para a conclusão de todas as etapas do teste de ACs, é necessária uma semana.

Para a visualização dos cromossomos metafásicos, essa solução é distribuída em lâminas e estas lidas em microscópio ótico. Para o exame das lâminas, um microscópio com câmera acoplada e conectado a um computador foi utilizado. O *software* Metafer 4® foi utilizado para a leitura das lâminas, varrendo as mesmas e registrando as imagens de metáfases (de acordo com padrões estabelecidos no *software*) para análise mais minuciosa a ser realizada pelo especialista. As metáfases foram avaliadas pelo menos em 100 células por indivíduo, de forma a assegurar sua representatividade, de acordo com Carrano e Natarajan (1987), e quantificadas, tabuladas e avaliadas por intercomparação – agrupando os trabalhadores por postos e outros fatores de interesse, como processos de trabalho e indicadores bioquímicos. Os resultados obtidos foram comparados com estudos similares (avaliação da exposição ocupacional de frentistas através do teste de ACs) realizados por outros grupos e publicados em revistas científicas. A frequência na ocorrência de quebras (cromatídicas e cromossômicas) e o número de células aberrantes analisadas foram os fatores que determinaram, neste estudo, o impacto negativo da exposição sofrida por essa população.

Além da avaliação das aberrações cromossômicas, informações oriundas dos questionários individual e clínico, do hemograma e dos exames de urina foram utilizadas para conferir maior robustez aos achados.

4.4 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Todas as informações coletadas foram inseridas e consolidadas em banco de dados, tratadas e analisadas com auxílio do *software* estatístico SPSS®, versão 20. Foi realizada análise descritiva dos dados, com médias e desvios padrão, bem como testes de normalidade para escolha do teste estatístico adequado. Os questionários, após avaliação, tiveram questões com mesmo objetivo transformadas em variáveis-resumo, cada questão representando um ponto no somatório da variável-resumo, e

esta categorizada a partir da mediana da distribuição obtida na população do estudo. As variáveis de desfecho, neste estudo as informações obtidas através de hemograma (em especial a contagem total de leucócitos), bioquímica e teste de aberrações cromossômicas, foram cruzadas com as demais variáveis, considerando plausibilidade biológica, para correlações, comparação de médias (teste *t* ou Mann-Whitney) e proporções. Para todas as análises, foi considerada significância estatística de 95%.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A população do estudo foi composta de 39 indivíduos distribuídos em seis postos de revenda de combustíveis veiculares (PRCV). Seus dados sociodemográficos, como gênero, grupo étnico declarado, renda familiar e escolaridade, são apresentados na Tabela 2.

Tabela 2: Informações sociodemográficas da população de estudo.		
Categoria		
Gênero	n	%
Masculino	36	92,3
Feminino	3	7,7
Grupo étnico	n	%
Branco	12	30,8
Negro	8	20,5
Pardo	15	38,5
Indígena	1	2,6
Situação conjugal	n	%
Casado	26	66,7
Solteiro	1	2,6
Divorciado	12	30,8
Renda familiar	n	%
Até 1 salário	2	5,1
1-2 salários	16	41,0
2-3 salários	13	33,3
3-4 salários	6	15,4
Mais de 4 salários	2	5,1
Escolaridade	n	%
Fundamental Incompleto	5	12,8
Fundamental Completo	7	17,9
Médio Incompleto	12	30,8
Médio Completo	12	30,8
Superior Incompleto	3	7,7
	Média	d.p.
Com que idade começou a trabalhar em postos?	24,2	7,2
Há quanto tempo trabalha em postos?	9,0	9,2
Idade	37,9	10,1
TOTAL	39	100

Quanto a hábitos de tabagismo e etilismo, 14 indivíduos (35,9%) declararam que fumam ou fumaram, enquanto 32 sujeitos (82%) afirmaram que consomem ou

consumiam bebidas alcoólicas. Informações mais detalhadas são apresentadas na Tabela 3.

Tabela 3: Dados descritivos sobre consumo de álcool e fumo.

Categoria		n	%
Questão: quanto ao tabagismo, você:			
Tabagista		6	15,4
Cigarros/dia	1-10	5	83,3
	11-20	1	16,7
Ex-tabagista		8	20,5
Há quanto tempo parou?	Média (em anos)	10,5 ($\pm 8,49$)	
Por quanto tempo fumou?	Média (em anos)	11,1 ($\pm 5,9$)	
Cigarros/dia	1-10	2	28,6
	11-20	4	57,1
	40-60	1	14,3
Nunca fumou		25	64,1
TOTAL		39	100,0
Questão: quanto ao consumo de bebidas alcoólicas, você:			
Consome		30	76,9
Tipo de bebida alcoólica (n=30)	Não-destiladas	24	80,0
	Destiladas	2	6,7
Frequência n=27)	Ambas	4	13,3
	Ocasionalmente	3	11,1
	1-2 vezes/semana	17	63,0
	3-4 vezes/semana	4	14,8
	5-6 vezes/semana	1	3,7
	Diariamente	2	7,4
Consumia		2	5,1
Há quanto tempo parou?	Média (em anos)	13 (n=1)	
Por quanto tempo bebeu?	Média (em anos)	20 (n=1)	
Nunca bebeu		7	17,9
TOTAL		39	100,0

Dos hábitos pessoais, o tabagismo é o de maior importância em estudos de exposição ao benzeno, dada a influência, por sua composição complexa, sobre os metabólitos e indicadores de genotoxicidade avaliados nesses estudos. Artigos sobre efeitos genotóxicos de uma exposição ocupacional a vapores de combustíveis em frentistas publicados nos últimos anos, em sua maioria, apresentam seus resultados agrupados por tabagismo (CARERE *et al.*, 1998; BUKVIC *et al.*, 1998; FRACASSO *et al.*, 2010; REKHADEVI *et al.*, 2010; ROSA *et al.*, 2012; MORO *et al.*, 2013; LOVREGLIO *et al.*, 2014). Alguns outros estudos elencam o hábito de fumar como critério de exclusão, de modo a reduzir o impacto de variáveis confundidoras sobre os resultados. Sellappa *et al.* (2010) encontrou diferenças significativas na

ocorrência de micronúcleos num grupo de 110 frentistas e 100 sujeitos não ocupacionalmente expostos em relação ao fumo, essa diferença sendo mais evidente entre os sujeitos livres de exposição ocupacional; Também em 2010, Fracasso e colaboradores avaliaram um grupo composto por 28 frentistas, 21 técnicos de reparo de bombas de combustíveis e 51 sujeitos não expostos ocupacionalmente quanto a ocorrência de aberrações cromossômicas e não encontraram, em seus resultados, diferenças significativas entre fumantes e não fumantes nos grupos supramencionados.

5.1 DADOS DE EXPOSIÇÃO OCUPACIONAL

O questionário individual aplicado aos trabalhadores da pesquisa avalia, além de informações sociodemográficas, fatores relacionados ao processo de trabalho desses indivíduos. A população distribuída em 6 PRCV foi organizada em funções (Tabela 4). Pela avaliação das informações nota-se que, apesar da tentativa de categorização das funções dos indivíduos, todos eles desempenham a tarefa de abastecimento de veículos, tendo tal classificação sido criada com base nas demais tarefas relatadas pelos sujeitos (Técnico de lubrificação, que faz lavagem e troca de óleo dos veículos, gerência e subgerência administrativa do PRCV, frentista, que faz controle de estoque, vendas). A variável de interesse (ocorrência de aberrações cromossômicas) foi avaliada em função desta distribuição, e não houve diferenças estatisticamente significativas (dados não apresentados). O levantamento bibliográfico por estudos similares (avaliação da exposição ocupacional aos vapores de gasolina por frentistas) não encontrou artigos em que tal tipo de distinção fosse feita, tratando todos os trabalhadores de PRCV da mesma forma. Em 2014, Piero Lovreglio e sua equipe avaliaram aberrações cromossômicas e ocorrência de micronúcleos em um grupo de trabalhadores do ramo de combustíveis na Itália. Com 24 frentistas, 19 motoristas de carros-tanque e 31 sujeitos de referência, apesar de ter verificado níveis de benzeno no ar e seus metabólitos (ATTM, AFM e Benz-U) em maiores concentrações nos postos de trabalho dos motoristas, Lovreglio *et al.* (2014) não encontrou diferenças estatisticamente significativas nos padrões de ACs e MN entre os três grupos. Portanto, tal agrupamento dos sujeitos da pesquisa não será incluído nas análises, tendo sido apresentado apenas para evidenciar que os trabalhadores de um posto de revenda de combustíveis não desempenham as mesmas funções.

Tabela 4: Distribuição dos trabalhadores (n=39) por posto e ocupação.			
	Técnico de lubrificação	Gerência / subgerência	Frentista
Posto A	2	1	3
Posto B	0	1	4
Posto C	1	2	7
Posto D	0	0	6
Posto E	0	0	3
Posto F	0	2	7
TOTAL	3	6	30

Uma série de perguntas do questionário focava nas atividades realizadas nas rotinas normais de funcionamento de um PRCV, e apontava o quanto o trabalhador tem contato com os combustíveis (ou seus vapores) além da atividade de abastecimento. As informações sobre essas atividades no grupo analisado encontram-se na Tabela 5. Complementando essas informações, uma seção do questionário levantou dados sobre hábitos comuns aos frentistas, mas que representavam risco ocupacional. As perguntas e respostas do grupo analisado estão apresentadas na Tabela 6.

Tabela 5: Atividades realizadas pelos trabalhadores durante o exercício da função.

Questões		N	%
Já coletou amostras de caminhão-tanque?	Não	23	58,97
	Realizou	14	35,90
	Ainda realiza	2	5,13
Usa equipamentos além do uniforme durante as coletas?	Sim	4	26,67
	Não	11	73,33
Realiza a análise das amostras?	Não	23	74,19
	Sim	8	25,81
Já realizou medição manual dos níveis dos tanques?	Não	18	46,15
	Sim	21	53,85
Faz uso de algum equipamento além do uniforme durante a medição dos níveis dos tanques?	Sim	2	9,52
	Não	19	90,48
Já realizou limpeza de caixa separadora de água e óleo?	Não	27	69,23
	Realizou	9	23,08
	Realiza	3	7,69
Já realizou troca de óleo de carro?	Não	19	48,72
	Realizou	7	17,95
	Realiza	13	33,33
Já realizou aferição da bomba de combustível?	Não	19	48,72
	Realizou	4	10,26
	Realiza	16	41,02
Já realizou drenagem da bomba de combustível?	Não	32	82,05
	Realizou	1	2,56
	Realiza	6	15,39
TOTAL		39	100,00

Tabela 6: Lista de hábitos que aumentam o risco da exposição ocupacional.

Hábitos		N	%
Usa paninho?	Não	7	17,9
	Sim	32	82,1
Aproxima o rosto quando enche até a boca?	Não	12	30,8
	Sim	27	69,2
Cheira a tampa do carro?	Não	17	43,6
	Sim	22	56,4
Confia no bico automático	Não	30	78,9
	Sim	8	21,1
Aspira combustíveis com a mangueira?	Não	23	59,0
	Sim	16	41,0
Roupa molhada de combustível?	Não	18	46,2
	Sim	21	53,8
Usa querosene ou outra substância para dar brilho?	Não	34	91,9
	Sim	3	8,1
TOTAL		39	100,0

As informações levantadas através das questões apontadas nas Tabelas 5 e 6 indicam a realização de atividades associadas a um aumento na exposição e, portanto, no risco das funções nos postos. Para inserir tais dados nas análises, uma única variável, denominada fator de risco, foi criada, resumindo-os. Para cada atividade realizada (Tabela 5), um ponto foi dado. Um ponto a mais foi acrescido quando equipamentos de proteção individual (EPI) não eram utilizados no processo da tarefa listada. E em relação aos hábitos do frentista (Tabela 6), para cada resposta que represente risco – usar “paninho”, aproximar o rosto ao encher até a boca, cheirar a tampa do tanque de combustível do carro, não confiar no bico automático, aspirar combustíveis com mangueira, usar roupa molhada de combustível ou usar substâncias que contenham solventes para dar brilho em carros/pneus –, um ponto era adicionado ao *score*. Ao final, a variável-resumo, pode ter de 0 a 16 pontos, sendo 0 mínimo risco adicional (ao risco já considerado pela função e suas atividades) e 16, o máximo de risco adicional avaliado pelo questionário. Esta variável teve sua pontuação categorizada em dois níveis, definidos a partir da mediana da distribuição: baixo risco (0 – 7 pontos) e alto risco (8 – 16 pontos).

Avaliando artigos com mesmo foco, este tipo de análise do processo de trabalho para levantamento de maior ou menor risco decorrente das atividades

desempenhadas pelos trabalhadores não havia sido realizada ou, caso o tenha, não foi contemplada na redação dos artigos.

Quanto às análises do sangue coletado dos trabalhadores, os resultados do hemograma completo e dos indicadores bioquímicos são apresentados nas tabelas 7 a 9, organizados por resultados de eritrograma, leucograma e plaquetograma com bioquímica.

Tabela 7: médias dos resultados dos eritogramas categorizados por sexo e valores de referência

	Componente	Unidade	Valor $\pm$ d.p.	Referência
Homens (n=36)	Hemácias	M/mm³	4,99 $\pm$ 0,61	4,5 – 6,0
	Hemoglobina	g/dL	14,65 $\pm$ 1,06	13 – 17
	Hematócrito	%	42,97 $\pm$ 2,95	39 – 50
	VGM	fl	86,85 $\pm$ 6,96	80 – 98
Mulheres (n=3)	Hemácias	M/mm³	4,23 $\pm$ 0,20	4,0 – 5,4
	Hemoglobina	g/dL	12,13 $\pm$ 0,35	11,6 – 15,6
	Hematócrito	%	36,73 $\pm$ 2,84	36 – 48
	VGM	μm³	86,9 $\pm$ 4,36	82 – 92

Tabela 8: médias dos resultados dos leucogramas e valores de referência

Componente	Valores (média $\pm$ d.p.)		Referência un/mm ³
	un/mm ³	%	
Leucócitos totais	6.681 $\pm$ 1838	-	4.000 a 10.000
Bastonetes	25,4 $\pm$ 63,2	0,4 $\pm$ 0,9	0 – 550
Segmentados	3.785 $\pm$ 1334	55,9 $\pm$ 9,2	1.600 – 7.700
Eosinófilos	207,6 $\pm$ 195,2	3,1 $\pm$ 2,6	40 – 550
Basófilos	52,1 $\pm$ 59,8	0,9 $\pm$ 0,9	0 – 110
Monócitos	509,9 $\pm$ 152,5	7,9 $\pm$ 2,0	160 – 1.320
Linfócitos	2.102,2 $\pm$ 688,2	31,9 $\pm$ 7,6	1.000 – 4.950

Tabela 9: médias dos resultados do plaquetograma e indicadores bioquímicos e seus valores de referência

Componente	Unidade	Valor $\pm$ d.p.	Referência
Plaquetas	un/mm ³	251082 $\pm$ 58316	150.000 – 450.000
Transaminase	Oxalacética	U/L	32,26 $\pm$ 18,9
	Pirúvica	U/L	31,55 $\pm$ 37,5
Bilirrubina Total		mg/dL	0,44 $\pm$ 0,31
	Direta	mg/dL	0,15 $\pm$ 0,08
	Indireta	mg/dL	0,33 $\pm$ 0,23
Gama GT	U/L	46,56 $\pm$ 34,9	05 – 58

A literatura associa a exposição aos vapores de combustíveis (em especial aos solventes neles presentes, como o benzeno) a uma diminuição da contagem total de leucócitos, com possível desenvolvimento de um quadro de leucopenia (ATSDR, 2007). Na amostra analisada, apesar de a média da contagem de

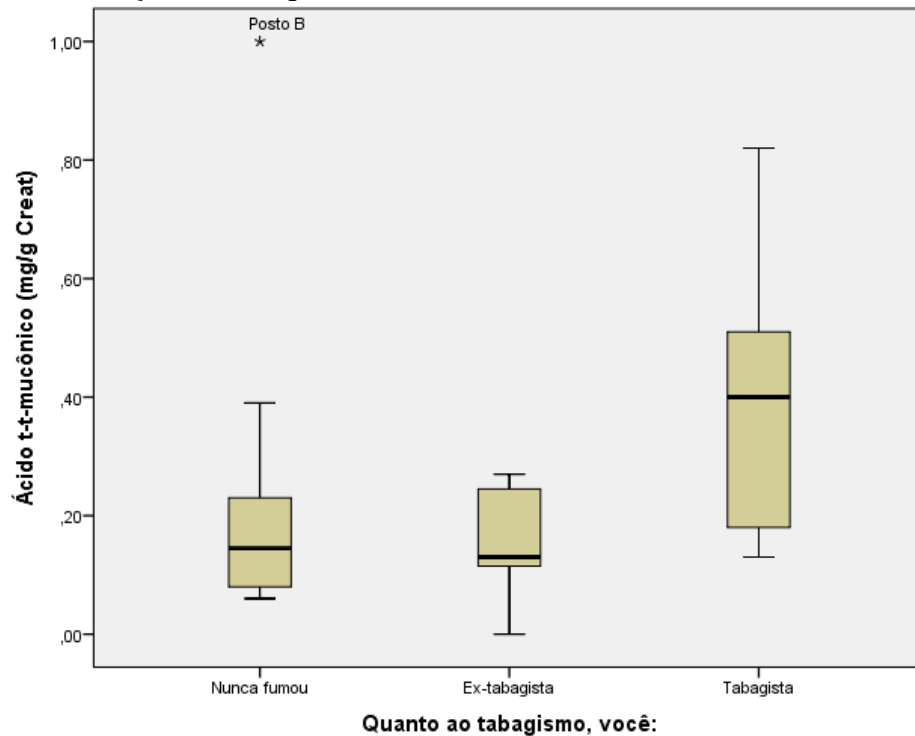
leucócitos encontrar-se dentro da faixa da normalidade, dois trabalhadores estão em leucopenia, ou seja, com contagem total de leucócitos abaixo do limite mínimo aceitável de 4000 un/mm³ e mais da metade (51,3%) têm sua contagem na metade inferior da faixa (4000 – 6999). Este quadro não representa um desfecho nocivo, mas merece atenção e aponta para a importância de acompanhamento das condições de saúde desses trabalhadores, em especial numa população com risco ocupacional já estabelecido (ZHANG *et al.*, 2002).

Através da urinálise foram determinados os níveis de ácido trans,trans-mucônico (ATTM), metabólito que tem relação com a exposição ao benzeno, apesar de ter sua especificidade prejudicada por fatores como dieta e outros hábitos, em especial o tabagismo. O ATTM é um dos metabólitos gerados pela biotransformação do benzeno no organismo, além de ser o Indicador Biológico de Exposição (IBE) por eleição do MTE desde 2001 (BRASIL, 2001). O Ministério apresenta, na mesma portaria, valores de referência de ATTM na população não exposta ocupacionalmente. Dentre os artigos elencados pelo Ministério para a composição dessa referência, a média do ATTM entre fumantes é de 0,15 mg/g Creatinina, e entre não-fumantes, 0,08. A população do presente estudo teve uma média de ATTM, em miligramas por grama de creatinina, de 0,22 (d.p. 0,2). Já é de conhecimento da literatura (PAULA *et al.*, 2003) que o fumo possui relação com as concentrações de ATTM e, portanto, os valores apresentados na Tabela 10 são categorizados por fumo (se fuma, fumou ou nunca fumou). Os valores de ATTM obtidos na população analisada neste trabalho, quando comparados com os valores listados pelo MTE (BRASIL, 2001), são 42% maior entre não-fumantes e 37% maior entre os fumantes. Um estudo publicado por Fracasso *et al.* (2010) também evidenciou os impactos do fumo e da exposição ocupacional sobre a concentração de ATTM em frentistas, mas os valores encontrados no presente estudo são maiores, não apenas em comparação com este, mas outros estudos que quantificaram este metabólito (TUNSARINGKARN *et al.*, 2011; FRACASSO *et al.*, 2010; LOVREGLIO *et al.*, 2014).

Tabela 10: Valores médios do ácido trans,trans-mucônico categorizados por fumo

Categoria	n	Valor	d.p.
Não-fumantes	24	0,19	0,19
Ex-fumantes	8	0,16	0,09
Fumantes	6	0,41	0,26
TOTAL	38	0,22	0,2

Figura 7: Distribuição das médias dos valores de ácido trans,trans-mucônico dos 39 trabalhadores, de acordo com suas condições de tabagistas.



Carrieri e colaboradores (2010) analisaram as relações entre os metabólitos da biotransformação do benzeno, ácido trans,trans-mucônico e ácido S-fenilmercaptúrico, e a exposição ocupacional a baixas doses em indústrias petroquímicas, considerando o efeito confundidor de fumo e ingestão de álcool. Apesar das baixas concentrações de benzeno no ar (abaixo de 0,5 ppm), foram identificadas correlações entre os metabólitos e o benzeno no ar, entretanto o ATTM teve maior afinidade com o hábito de fumar que com a exposição ocupacional. Apesar dessa diferença, os valores de benzeno no ar estimados a partir dos valores de ATTM, usando como base a correlação apresentada na Portaria 34 do MTE, foram inferiores a 1 mg/m³ (ou 0,3 ppm), portanto não encontram-se acima do permitido por lei. Entretanto, este quadro não pode ser tomado como ausência de risco ou mesmo de efeitos sobre a saúde.

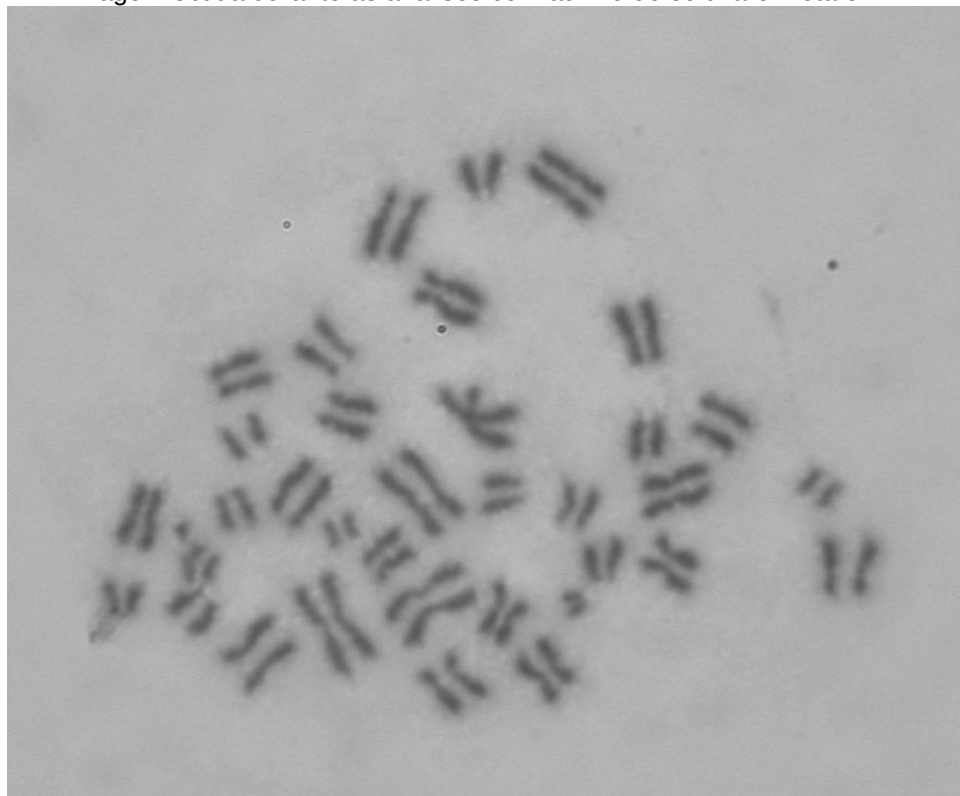
5.2 RESULTADOS DO TESTE DE ABERRAÇÕES CROMOSSÔMICAS

De cada um dos 39 sujeitos, 6 lâminas foram preparadas e lidas em microscópio ótico com o auxílio do programa Metafer 4®. Apesar da meta mínima estabelecida de 100 metáfases lidas por trabalhador, este valor não pôde ser alcançado em alguns sujeitos, fato que pode ser explicado pela complexidade das etapas do processo, baixo índice mitótico e por dificuldades do cumprimento, de forma homogênea, de todo o protocolo ao longo de todas as coletas.

Três variáveis foram elaboradas para analisar os efeitos da exposição ocupacional a qual os trabalhadores avaliados neste estudo estão sujeitos. Elas informam sobre:

- A fração de células em metáfase que apresentaram ao menos uma aberração, fosse esta cromatídica ou cromossômica, a cada 100 células analisadas – células aberrantes;
- O valor médio de quebras cromatídicas e cromossômicas observado a cada 100 células metafásicas analisadas – quebras por análise;
- O número médio de células metafásicas com segregação centromérica prematura (SCP, quando as cromátides dos cromossomos de determinada célula encontram-se separadas) por sujeito avaliado pelo teste de ACs. Um exemplo de metáfase com SCP pode ser visto na figura a seguir:

Figura 8: Exemplo de célula em divisão mitótica com separação centromérica prematura (SCP). Imagem obtida durante as análises com auxílio do software Metafer 4®.



A ocorrência de segregação centromérica prematura é um tipo de aberração pouco tratado na literatura e, em especial, em casos de exposições a solventes. Nenhum artigo foi encontrado, em busca no portal *PubMed*, sobre SCP e exposição a vapores de combustíveis. Major *et al.* (1999) elencou a ocorrência de SCP em populações com diversas exposições ocupacionais: trabalhadores da indústria petroquímica (entre eles grupos expostos a óleo bruto e benzeno, especificamente), química, farmacêutica e enfermeiros. Os trabalhadores da indústria petroquímica são os que apresentam maior taxa de ocorrência da segregação centromérica prematura, com uma média de $11,45 \pm 1,4$ células metafásicas com até três cromossomos apresentando SCP (média entre todos os grupos expostos = $3,8 \pm 0,9$; entre os não expostos, $0,45 \pm 0,2$). O artigo aponta alta correlação entre exposição e ocorrência de SCP, sugerindo mais estudos sobre o uso deste fator como indicador em genotoxicidade. Entretanto, apesar da data da publicação, a sugestão de maiores estudos sobre este bioindicador persiste.

Os dados obtidos através do teste de Aberrações Cromossômicas são apresentados, de forma sumarizada, na Tabela 11. O teste ANOVA para

comparação de médias dos resultados de ACs revelou diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) apenas entre os postos de combustíveis. As demais variáveis não apresentaram relação com a distribuição dos resultados do teste de ACs.

Tabela 11: Resultados dos testes de ACs de acordo com grupos (n=35)

Variáveis		Metáfases com AC (%)	Quebras por análise	Metáfases com SCP
Sexo	Homens	$8,7 \pm 8,0$	$16 \pm 15,5$	$3,0 \pm 5,0$
	Mulheres	$8,5 \pm 10$	$11,2 \pm 11,0$	$2,7 \pm 3,8$
Tabagismo	Nunca fumou	$8,0 \pm 7,0$	$14,7 \pm 13,5$	$3,9 \pm 5,8$
	Ex-fumante	$8,1 \pm 6,0$	$12,8 \pm 11,1$	$0,9 \pm 1,4$
	Fumante	$12,8 \pm 14,6$	$24,1 \pm 25,8$	$2,2 \pm 2,7$
PRCV	Posto A	$6,7 \pm 8,1$	$7,2 \pm 9,0$	$2,4 \pm 2,8$
	Posto B	$19,8 \pm 12,4$	$34,1 \pm 24,9$	$3,6 \pm 4,1$
	Posto C	$6,9 \pm 4,1$	$12,6 \pm 8,7$	$5,7 \pm 8,4$
	Posto D	$12,0 \pm 9,0$	$25,0 \pm 19,1$	$1,0 \pm 0,8$
	Posto E	$7,1 \pm 0,9$	$15,0 \pm 2,7$	$3,3 \pm 2,3$
	Posto F	$4,5 \pm 3,5$	$9,1 \pm 7,1$	$0,9 \pm 1,4$
Fator de risco	Baixo risco	$9,2 \pm 9,5$	$16,0 \pm 16,9$	$2,0 \pm 2,3$
	Alto risco	$8,1 \pm 5,9$	$15,1 \pm 12,9$	$4,2 \pm 6,9$

Figura 9: distribuição das médias das frequências de metáfases com AC, categorizadas por PRCV

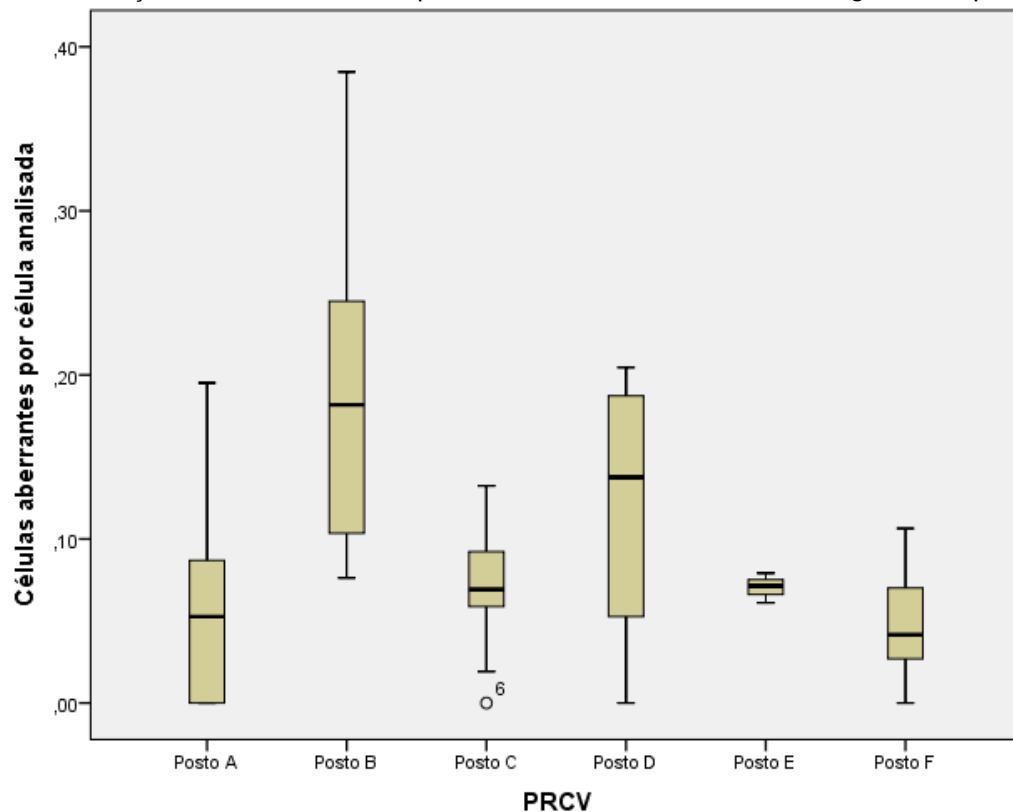
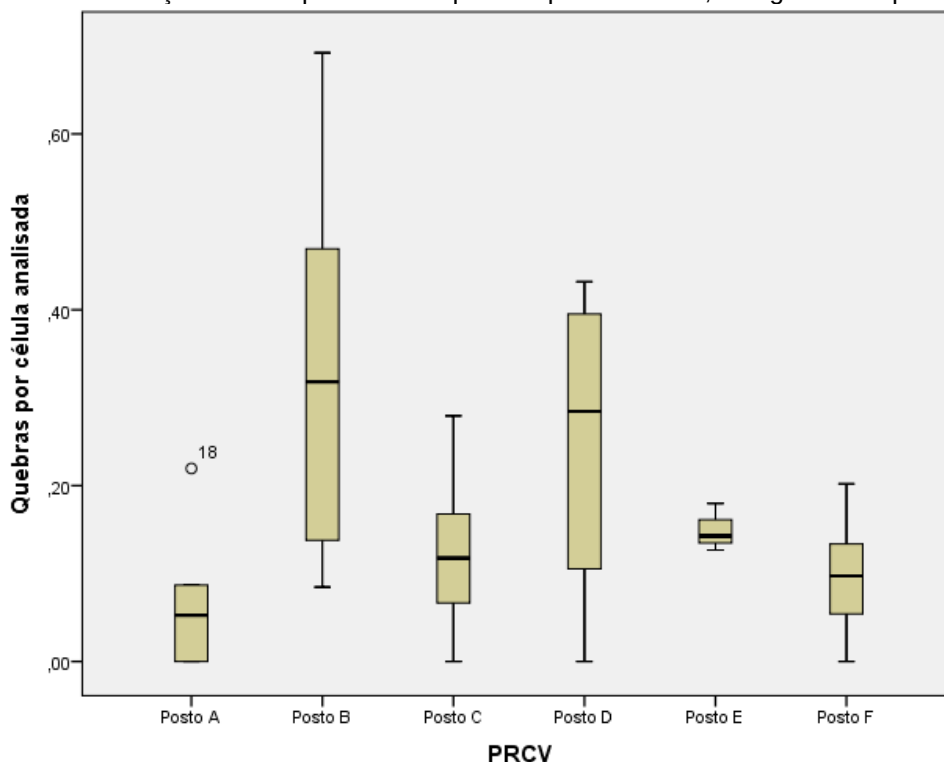


Figura 10: distribuição das frequências de quebras por metáfase, categorizadas por PRCV



Conhecendo o impacto do hábito de fumar sobre as variáveis de desfecho, novos testes de comparação de média foram realizados, analisando cada um dos três grupos relacionados ao tabagismo (não-fumantes, ex-fumantes e fumantes) categorizados pelo PRCV onde trabalham. Os resultados são apresentados na Tabela 12.

Tabela 12: Valores descritivos e teste ANOVA comparando os PRCV para as variáveis de interesse.

Variáveis		Média ± d.p.	ANOVA	
			F	p
Não-fumantes (n=25)	Ácido t-t-mucônico	0,19 ± 0,19	3,339	0,026
	Metáfases com AC (%)	10,0 ± 9,5	2,428	0,073
	Quebras/ 100 metáfases	20,0 ± 22,1	2,709	0,052
	Metáfases com SCP	3,5 ± 5,5	1,523	0,230
Ex-fumantes (n=8)	Ácido t-t-mucônico	0,16 ± 0,09	1,435	0,399
	Células aberrantes (%)	8,1 ± 6,0	0,98	0,528
	Quebras/ 100 metáfases	12,8 ± 11,1	0,923	0,548
	Células com SCP	0,88 ± 1,4	0,386	0,810
Fumantes (n=5)	Ácido t-t-mucônico	0,41 ± 0,26	168,325	0,006
	Células aberrantes (%)	12,8 ± 14,6	47,858	0,020
	Quebras/ 100 metáfases	24,1 ± 25,8	35,382	0,027
	Células com SCP	2,2 ± 2,7	0,405	0,712

Nas comparações entre postos de combustíveis foram identificadas diferenças estatisticamente significativas nas médias de ATTM entre os PRCV B a F, apenas entre os não-fumantes, dado que os grupos de ex-fumantes e fumantes não foram avaliados pelo baixo número de trabalhadores em cada posto nestes grupos. Além dos postos de combustíveis, testes de comparação de médias foram feitos categorizando as variáveis de desfecho por sexo, tempo de trabalho, aumento do risco ocupacional, tempo x risco (variável de quatro fatores que conjuga o tempo de trabalho e o aumento do risco ocupacional) e contagem de leucócitos totais. Todas as análises supracitadas não apresentaram diferenças de médias estatisticamente significativas.

Para avaliar possíveis ligações entre fatores levantados através dos questionários e dos indicadores biológicos com as variáveis de desfecho, um teste de correlação foi realizado. Apenas ATTM apresentou correlação estatisticamente significativa com a porcentagem de metáfases com AC ($r = 0,39$; $p < 0,05$). Apesar da fraca correlação positiva, fato que pode ser explicado por um baixo número de sujeitos analisados ou principalmente pela natureza múltipla e complexa das aberrações cromossômicas e seus agentes causadores, este achado reforça a relevância do risco da exposição aos vapores de combustíveis sobre a população analisada.

Os resultados dos testes de aberrações cromossômicas apontam ligação com os níveis de ATTM, além das diferenças significativas entre postos, o que pode revelar que, independente de variáveis confundidoras, como o hábito de fumar, o benzeno contido nos vapores de gasolina e, por consequência, liberado no ar, mesmo em concentrações que possam estar abaixo dos limites preconizados por lei, é metabolizado pelo organismo e, portanto, é um risco ao desenvolvimento de um quadro nocivo.

Apesar de ter sido usado nos últimos 14 anos como indicador de dose interna para exposição ocupacional a produtos que liberam benzeno (BRASIL, 2001), em especial os combustíveis fósseis, dadas as limitações de especificidade do uso do ácido trans,trans-mucônico urinário, especialmente neste momento onde as concentrações do toxicante no ambiente se tornam menores, a Comissão Nacional

Permanente do Benzeno (CNPBz) se reuniu e convocou a sociedade e instituições de ensino e pesquisa a discutir o uso deste bioindicador, bem como a adoção de um novo metabólito.

Em evento ocorrido em Julho/2014 na Fundacentro, em São Paulo, a CNPBz, com sua representação tripartite, reuniu pesquisadores sobre o tema para avaliar as mudanças no cenário sobre a exposição a benzeno e seus efeitos, em especial no que diz respeito aos frentistas e seus processos de trabalho. Foi consenso a necessidade de mudança na portaria 34, para que o ácido S-fenilmercaptúrico, por sua alta especificidade, baixa interferência por outras substâncias e ser mais indicado em casos de exposição a baixas doses (BOOGARD, VAN SITTEERT, 1995), seja acrescentado aos bioindicadores avaliados em casos de exposição ocupacional ao benzeno (FUNDACENTRO, 2014). Para a tomada desta decisão, artigos sobre exposições ocupacionais a baixas doses de benzeno ao redor do mundo e os métodos de maior acurácia para sua determinação foram discutidas com trabalhadores, Governo e comunidade científica.

Alguns estudos avaliaram, no Brasil e em outros países, o impacto da exposição ocupacional aos vapores de combustíveis a qual os frentistas estão sujeitos através de testes de genotoxicidade, como as aberrações cromossômicas (CARERE *et al.*, 1995; ÇELIK e AKBAS, 2005; FRACASSO *et al.*, 2010; LOVREGLIO *et al.*, 2014; TREVISAN *et al.*, 2014 SANTIAGO *et al.*, 2014).

Em 1995, Angelo Carere e sua equipe avaliaram os efeitos citogenéticos da exposição ocupacional sofrida por frentistas em Roma, na Itália. Neste estudo, 23 trabalhadores não-fumantes e 24 sujeitos livres de exposição ocupacional utilizando testes de micronúcleo, troca de cromátides irmãs (SCE) e aberrações cromossômicas (ACs) foram avaliados (CARERE *et al.*, 1995). Além da exposição ao benzeno, os pesquisadores consideraram o chumbo, metal presente nos combustíveis derivados de petróleo à época e, portanto, presentes na fumaça oriunda dos escapamentos de veículos automotores. Com uma média de 1,5 mg/m³ de benzeno no ar (d.p. 0,7) e maior nível de chumbo no sangue em relação aos controles ($10,7 \pm 0,8$ X $8,4 \pm 0,7$; $p < 0,05$), os níveis de aberrações cromossômicas ($1,97\% \times 1,46\%$; $p = 0,06$), troca de cromátides irmãs ($4,73 \pm 0,15$ X $4,48 \pm 0,11$; $p = 0,18$) e micronúcleos ($9,6 \pm 1,5$ X $7,7 \pm 0,9$; $p = 0,26$), mesmo sem significância

estatística, foram maiores entre os frentistas em comparação com a população exposta não-ocupacionalmente (CARERE *et al.*, 1995). Mesmo com as limitações do estudo e considerando a redução dos níveis dos contaminantes nos combustíveis nos últimos 20 anos, o estudo de Carere e colaboradores já apontava para a importância de vigilância em saúde ocupacional sobre essa categoria. Dez anos depois, Çelik e Akbas (2005) publicaram um estudo similar, avaliando através de ACs e SCE o efeito da exposição ocupacional a vapores de combustíveis em um grupo de 30 frentistas (15 desses fumantes), comparando-os com um grupo de 30 sujeitos (também composto por 15 fumantes) não expostos ocupacionalmente. Os resultados mostraram 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.

Nos últimos 5 anos, estudos com o mesmo objetivo (avaliar o impacto genotóxico de uma exposição ocupacional a vapores de combustíveis) foram publicados (FRACASSO *et al.*, 2010; LOVREGLIO *et al.*, 2014; TREVISAN *et al.*, 2014), e em todos eles os resultados apontam para um impacto negativo da exposição sobre o material genético dos trabalhadores. Entretanto, 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.

O teste de hibridização fluorescente *in-situ* (FISH) é uma técnica de visualização de aberrações cromossômicas mais robusta, por marcar com sondas fluorescentes *loci* específicos e evidenciar em seus resultados não apenas quebras, cromossomos di, tri, tetracêntricos. Através da técnica de FISH é possível identificar translocações, deleções e aberrações numéricas (aneuploidia, hiperploidia, poliploidia). A técnica de FISH tem sido usada para avaliação de exposições a BTEX e seus metabólitos há pelo menos 20 anos (ZHANG *et al.*, 1994) e, um estudo publicado em 2014 (SANTIAGO *et al.*) avaliou o efeito da exposição sofrida por frentistas utilizando esta metodologia. Santiago e colaboradores usaram sondas para marcar os cromossomos 1, 2 e 4 em 60 trabalhadores de PRCV do Município

do Rio de Janeiro, encontrando alta frequência de aberrações (superior a uma metáfase aberrante a cada 100 avaliadas) em cerca de 16% da amostra. Os pesquisadores compararam a ocorrência de cada tipo de aberração, sendo as translocações as de maior número. Desta forma, pode-se concluir também que o teste de ACs realizado da forma tradicional (coloração por Giemsa) também pode subestimar o real impacto de uma exposição por não contemplar quebras erroneamente corrigidas pelo sistema.

6 CONCLUSÕES

Após completar a análise dos dados produzidos por este estudo, e considerando sua relevância para o âmbito da saúde ocupacional e da toxicologia, pode-se concluir que mais estudos de avaliação dos impactos de uma exposição ocupacional a uma substância sem níveis seguros no ambiente precisam ser realizados, considerando cuidados no desenho do método e visando não só apontar as vulnerabilidades, mas principalmente agir fomentando os setores responsáveis para a tomada de decisão nesta área.

O estudo não pôde demonstrar a relação entre a exposição ocupacional ao benzeno oriundo da gasolina com efeitos genotóxico através do teste de aberrações cromossômicas convencional, concordando com a literatura que obteve resultados similares, apontando para as baixas doses do toxicante no ar como possível causa deste resultado, e sugerindo que outros testes de genotoxicidade, como Ensaio cometa e Micronúcleo sejam utilizados neste cenário por sua maior sensibilidade a baixas doses de agentes de potencial genotóxico, como o benzeno. Entretanto a relação entre aberrações cromossômicas, ácido trans,trans-mucônico e a combinação da exposição com o tabagismo refletem a importância de se monitorar de maneira contínua esses trabalhadores de modo a evitar que um quadro ainda precoce de dano evolua para manifestações clínicas do efeito nocivo dessa exposição.

Tendo avaliado as informações acima, conclui-se que, para amostras pequenas, o teste de aberrações cromossômicas convencional não é o mais indicado para a avaliação de uma exposição a baixas doses de benzeno, e assim como o ácido trans,trans-mucônico urinário, por sua inespecificidade, deve ser repensado como indicador de dano precoce causado por exposição a este toxicante.

REFERÊNCIAS

- AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO, GÁS NATURAL E BIOCOMBUSTÍVEIS – ANP. Anuário estatístico brasileiro do Petróleo, Gás natural e Biocombustíveis 2013a. Disponível em: <<http://www.anp.gov.br/?pg=66833>>. Acesso em 18 Jun 2014.
- AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO, GÁS NATURAL E BIOCOMBUSTÍVEIS – ANP. Resolução ANP nº 40, de 25 de Outubro de 2013b. Disponível em: <http://nxt.anp.gov.br/nxt/gateway.dll/leg/resolucoes_anp/2013/outubro/ranp%2040%20-%202013.xml>. Acesso em 20 Jun 2014.
- AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY - ATSDR. Case studies in Environmental Medicine: Benzene toxicity. *U.S. Department of Health and Human Services*, Atlanta, GA. 32p, 2001.
- AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY - ATSDR. Toxicological Profile for Benzene. *U.S. Department of Health and Human Services*, Atlanta, GA. 438p, 2007.
- AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY. The ATSDR Substance Priority List. *U.S. Department of Health and Human Services*, Atlanta, GA. Disponível em: <http://www.atsdr.cdc.gov/spl/resources/ATSDR_2011_SPL_Detailed_Data_Table.pdf>. Acesso em 16 Feb 2014.
- AKSOY, M. Hematotoxicity and carcinogenicity of benzene. *Environmental Health Perspectives*, 82:193-197, 1989.
- AKSOY, M. Hematotoxicity, leukemogenicity and carcinogenicity of chronic exposure to benzene. In: *Molecular aspects of monooxygenases and bioactivation of toxic compounds*. Arinc, E.; Schenkman, JB.; Hodgson, E., eds. New York: Plenum Press, pp. 415-434, 1991.
- ANDRADE, J.A.; AUGUSTO, F.; JARDIM, I. C.S. F. Biorremediação de solos contaminados por petróleo e seus derivados. *Eclética Química*, 35(3):17-43, 2010.
- ANDREOLI, R.; *et al.* Association between environmental exposure to benzene and oxidative damage to nucleic acids in children. *Medicina del Lavoro*, 103(5):324-337, 2012.
- ANGELINI, S.; MAFFEI, F.; BERMEJO, J. L.; RAVEGNINI, G.; L'INSALATA, D.; CANTELLI-FORTI, G.; VIOLANTE, F. S.; HRELIA, P. Environmental exposure to benzene, micronucleus formation and polymorphisms in DNA-repair genes: a pilot study. *Mutation Research*, 743:99-104, 2012.
- ARNOLD, S. M.; ANGERER, J.; BOOGARD, P. J.; HUGHES, M. F.; O'LONE, R. B.; ROBISON, S. H.; SCHNATTER, A. R. The use of biomonitoring data in exposure and human health risk assessment: benzene case study. *Critical Reviews in Toxicology*, 43(2):119-153, 2013.
- AUGUSTO, L. G. S.; NOVAES, T. C. P. Ação médico-social no caso do benzenismo em Cubatão, São Paulo: Uma abordagem interdisciplinar. *Cadernos de Saúde Pública*, 15: 729-738, 1999.

BARALE, R. Genotossità del benzene, pp. 41-50. In MINOIA C, APOSTOLI P & BARTOLUCCI GB (orgs.). *Il benzene: tossicologia, ambienti di vita e di lavoro*. Morgan Ed., Milão, 1995.

BASLO, A.; AKSOY, M. Neurological abnormalities in chronic benzene poisoning. A study of six patients with aplastic anemia and two with preleukemia. *Environmental Research* 27:457-465, 1982.

BERMSTEIN, C.; BERNSTEIN, H.; PAYNE, C. M.; GARAWAL, H. DNA repair/proapoptotic dual-role proteins in five major DNA repair pathways: fail-safe protection against carcinogenesis. *Mutation Research*, 511:145-178, 2002.

BESKID, O.; DUŠEK, Z.; SOLANSKÝ, I.; ŠRÁM, R. J. The effects of exposure to different clastogens on the pattern of chromosomal aberrations detected by FISH whole chromosome painting in occupationally exposed individuals. *Mutation Research*, 594:20-29, 2005.

BI, X.; SLATER, D. M.; OHMORI, H.; VAZIRI, C. DNA polymerase kappa is specifically required for recovery from the benzo[a]pyrenediol epoxide (BPDE)-induced S-phase checkpoint. *Journal of Biological Chemistry*, 280:22343-22355, 2005.

BODELL, W. J.; LEVAY, G.; PONGRACZ, K. Investigation of benzene-DNA adducts and their detection in human bone marrow. *Environmental Health Perspectives*, 99:241-244, 1993.

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

BRASIL. Ministério da Saúde (MS). Portaria nº 3.120 de 1º de Julho de 1998. Aprova a Instrução Normativa de VISAT no Sistema Único de Saúde. *Diário Oficial da União*, 2 jul 1998.

BRASIL. Ministério do Trabalho e Emprego. Secretaria de Inspeção do Trabalho. Portaria nº 34, de 20 de Dezembro de 2001. Determina os procedimentos para a utilização de indicador biológico de exposição ocupacional ao benzeno. Disponível em <<http://portal.mte.gov.br/legislacao/portaria-n-34-de-20-12-2001.htm>>. Acesso em 12 Ago 2015.

BRASIL. Ministério do Trabalho e Emprego. Secretaria de Inspeção do Trabalho. Portaria nº 252, de 04 de Agosto de 2011. Constitui a Subcomissão de Postos de Revendedores de Combustíveis. *Diário Oficial da União*, 4 ago 2011.

BRIEF, R. S.; LYNCH, J.; BERNATH, T.; *et al.* Benzene in the workplace. *American Industrial Hygiene Association Journal* 41:616-623, 1980.

BUKVIC, N.; NAVARO, P.; ELIA, G.; *et al.* Sister chromatid Exchange (SCE) and micronucleus (MN) frequencies in lymphocytes of gasoline station attendants. *Mutation Research*, 415:25-33, 1998.

CAMPAGNA, M.; SATTA, G.; CAMPO, L.; FLORE, V.; IBBA, A.; MELONI, M.; TOCCO, M. G.; AVATANEO, G.; FLORE, C.; FUSTINONI, S.; COCCO P. Biological monitoring of low-level exposure to benzene. *Medicina del Lavoro*, 103(5):338-46, 2012.

CARERE, A.; ANTOCCIA, A.; CREBELLI, R.; DEGRASSI, F.; FIORE, M.; IAVARONE, I.; ISACCHI, G.; LAGORIO, S.; LEOPARDI, P.; MARCON, F.; PALITTI, F.; TANZARELLA, C.; ZIJNO, A. Genetic effects of petroleum fuels: cytogenetic monitoring of gasoline station attendants. *Mutation Research*, 332:17-26, 1995.

CARRANO, A. V.; NATARAJAN, A. T. Considerations for population monitoring using cytogenetic techniques. *International commission for protection against environmental mutagens and carcinogens n° 14*, 1987.

CARRIERI, M.; BONFIGLIO, E.; ESCAPELLATO, M. L.; MACCÀ, I.; TRANFO, G.; FARANDA, P.; PACI, E.; BARTOLUCCI, G. D. Comparison of Exposure Assessment Methods in Occupational Exposure to Benzene in Gasolina filling-station Attendants. *Toxicology Letters*, 162:146-152, 2006.

Carrieri, M.; Tranfo, G.; Pigini, D.; Paci, E.; Salamon, F.; Scapellato, M. L.; Fracasso, M. E. Manno, M.; Bartolucci, G. B. Correlation between environmental and biological monitoring of exposure to benzene in petrochemical industry operators. *Toxicology Letters*, 192:17-21, 2010.

ÇELİK, 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.

CENTRO DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA – CVS/SP. Programas e Projetos: Vigilância à saúde do trabalhador exposto ao benzeno (VISAT – Benzeno). Disponível em <http://www.cvs.saude.sp.gov.br/prog_det.asp?te_codigo=19&pr_codigo=11>. Acesso em 05 Jul 2013.

CHANG, C. C.; TSAI, S. S.; CHIU, H. F.; *et al.* Traffic air pollution and lung cancer in females in Taiwan: petrol station density as an indicator of disease development. *Journal of Toxicologic Environmental Health, Part A*, 72:651-657, 2009.

CHANG, D.; SUI, H.; PAN, H. Z.; *et al.* Effects of chronic benzene poisoning on DNA and antioxidase of mice. *Zhongguo lin chuang kang fu*, 9(3):240-242, 2005.

CHEN, Y.; LI, G.; XU, J.; CHUNLING, W. Genetic polymorphisms involved in toxicant-metabolizing enzymes and susceptibility to benzene poisoning. *Journal of Toxicology*, 21:11-15, 2007.

CHENNA, A.; HANG, B.; RYDBERG, B.; *et al.* The benzene metabolite p-benzoquinone forms adducts with DNA bases that are excised by a repair activity from human cells that differs from an ethenoadenine glycosylase. *Proceedings of the National Academy of Science USA*, 92(13):5890-5894, 1995.

CLANCY, S. DNA damage and repair: mechanisms for maintaining DNA integrity. *Nature education*, 1(1):103, 2008.

CLAYSON, D. B.; IVERSON, F.; NERA, E. A.; LOK, E. Early indicators of potential neoplasia produced in the rat forestomach by non-genotoxic agents: the importance of induced cellular proliferation. *Mutation Research*, 248(2): 321-331, 1991.

COLLINS, C. D.; BELL, J. N. B.; CREWS, C. Benzene accumulation in horticultural crops. *Chemosphere*, 40(1):109-114, 2000.

CORRÊA, M. V.; VALENTE, D.; DE FALCO, A.; RODRIGUES, D. R. F.; LARENTIS, A. L. Alterações genéticas e epigenéticas: uma abordagem sobre sua

complementaridade na avaliação de exposição a agentes químicos. *Anais do XVIII Congresso Brasileiro de Toxicologia CBTOX*. Porto Alegre, 2013.

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

COSTA, M. F. B. Estudo da aplicabilidade do ácido transtrans-mucônico urinário como indicador biológico de exposição ao benzeno [tese]. Rio de Janeiro: *Escola Nacional de Saúde Pública*; 2001.

DARLINGTON, C. D. The problem of chromosome breakage: an introduction. *Heredity*, 6:3-8, 1953.

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. *Toxicology Letters*, 182:7-17, 2008.

DOWTY, B. J.; LASETER, J. L.; STORER, J. The transplacental migration and accumulation in blood of volatile organic constituents. *Pediatric Research*, 10:696-701, 1976.

EASTMOND, D. A.; RUPA, D. S.; HASEGAWA, L. S. Detection of hyperdiploidy and chromosome breakage in interphase human lymphocytes following exposure to the benzene metabolite hydroquinone using multicolor fluorescence in situ hybridization with DNA probes. *Mutation Research*, 322(1):9-20, 1994.

FABIETTI, F.; AMBRUZZI, A.; DELISE, M.; *et al.* Monitoring of the benzene and toluene contents in human milk. *Environmental International*, 30(3):397-401, 2004.

FAKHR, M. G.; HAGH, M. F.; SHANEHBANDI, D.; BARADARAN, B. DNA methylation pattern as important epigenetic criterion in cancer. *Genetics Research International*, 2013:1-9, 2013.

FISHBEIN, L. Benzene: Uses, Occurrences, and Exposure. In: FISHBEIN, L., O'NEILL, O. K. (Eds). *Environmental Carcinogens: Methods of Analysis and Exposure Measurement. Benzene and Alkylated Benzenes*, Lyon, France. vol 10. IARC. Sci Publ. 85: 67-108, 1998.

FRACASSO, M. E.; DORIA, D.; BARTOLUCCI, G. B.; CARRIERI, M.; LOVREGGIO, P.; BALLINI, A.; SOLEO, L.; TRANFO, G.; MANNO, M. Low air levels of benzene: Correlation between biomarkers of exposure and genotoxic effects. *Toxicology Letters*, 192:22-28, 2010.

FRAGA, C. G.; SHIGENAGA, M. K.; PARK, J. W.; DEGAN, P.; AMES, B. N. Oxidative damage to DNA during aging: 8-hydroxy-2-deoxyguanosine in rat organ DNA and urine. *Proceedings of the National Academy of Science USA*, 87:4533-4537, 1990.

FRAGOULI, E.; ALFARAWATI, S.; GOODALL, N. N.; SANCHEZ-GARCIA, J. F.; COLLS, P.; *et al.* The cytogenetics of polar bodies: insights of female meiosis and the diagnosis of aneuploidy. *Molecular Human Reproduction*, 17:286-295, 2011.

FUNDACENTRO. Benzeno terá novo indicador biológico de exposição. São Paulo, Jul 2014 [citado em 18 Ago 2015]. Disponível em <

<http://www.fundacentro.gov.br/noticias/detalhe-da-noticia/2014/7/benzeno-tera-novo-indicador-biologico-de-exposicao>>

GALBRAITH, D.; GROSS, S. A.; PAUSTENBACH, D. Benzene and human health: a historical review and appraisal of associations with various diseases. *Critical Reviews in Toxicology*, 40(S2):1-46, 2010.

GILLI, G.; SCURSATONE, E.; BONO, R. Geographical distribution of benzene in air in northwestern Italy and personal exposure. *Environ. Health Perspectives*, 104(6):1137-1140, 1996.

GORDON, S. M.; WALLACE, L. A.; BRINKMAN, M. C.; *et al.* Volatile organic compounds as breath biomarkers for active and passive smoking. *Environmental Health Perspectives*, 110:689-698, 2002.

GRAEDEL, T. E. Chemical compounds in the atmosphere. New York, NY: *Academic Press*, 105-107, 1978.

GREENBURG, L. Benzol poisoning as an industrial hazard. *Public Health Reports*, 41:1357-1375, 1926.

GUERRA, M. Introdução a citogenética geral. Rio de Janeiro: *Guanabara Koogan*, 1988.

HAYES, R. B.; YIN, S. N.; DOSEMECI, M. S.; *et al.* Benzene and the dose-related incidence of hematologic neoplasms in China. *Journal of National Cancer Institute* 89:1065-1071, 1997.

HEDLI, C. C.; SNYDER, R.; WITMER, C. M. Bone marrow DNA adducts and bone marrow cellularity following treatment with benzene metabolites in vivo. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 283:745-748, 1991.

HEIJINK, A. M.; KRAJEWSKA, M.; VAN VUGT, M. A. T. M. The DNA damage response during mitosis. *Mutation Research*, 750:45-55, 2013.

HELLEDAY, T. Homologous recombination in cancer development, treatment and development of drug resistance. *Carcinogenesis*, 31:955-960, 2010.

HENG, H. H. Missing heritability and stochastic genome alterations. *National Reviews in Genetics*, 11:812, 2010.

HENG, H. H. Karyotype heterogeneity and unclassified chromosomal abnormalities. *Cytogenetic Genome Research*, 139:144-157, 2013.

HOLEČKOVÁ, B.; PIEŠOVÁ, E.; ŠIVIKOVÁ, K.; DIANOVSKÝ, J. Chromosomal aberrations in humans induced by Benzene. *Annals of Agricultural Environmental Medicine*, 11:175-179, 2004.

INFANTE, P. F. Benzene exposure and multiple myeloma. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1076:90-109, 2006.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – IBGE. *Censo demográfico 2010 – Resultados gerais da amostra*. Rio de Janeiro: IBGE, 2010.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER - IARC. Summaries & evaluations: Benzene (Group 1). Lyon, 1987.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER – IARC. Outdoor air pollution a leading environmental cause of cancer deaths. Lyon, 2013.

INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY – IAEA. Biological Dosimetry: chromosomal aberration analysis for dose assessment. pp 9-12, 1986.

INTERNATIONAL PROGRAMME ON CHEMICAL SAFETY – IPCS. Environmental Health Criteria 46: Guidelines for the study of genetic effects in human populations. *World Health Organization*, Geneva, 1985.

INTERNATIONAL PROGRAMME ON CHEMICAL SAFETY – IPCS. Environmental Health Criteria 155 – Biomarkers and Risk Assessment Concept and Principles. *World Health Organization*, Geneva, 1993.

INTERNATIONAL PROGRAMME ON CHEMICAL SAFETY – IPCS. International Chemical Safety Card 0015: Benzene. *World Health Organization*, Geneva, 2004.

IRONS, R. D.; GROSS, S. S.; LE, A.; WANG, X. Q.; CHEN, Y.; RYDER, J.; SCHNATTER, A. R. Integrating WHO 2001-2008 criteria for the diagnosis of myelodysplastic syndrome (MDS): a case-case analysis of benzene exposure. *Chemical Biology Interaction*, 184:30-38, 2010.

IYAMA, T.; WILSON, D. M. 3rd. DNA repair mechanisms in dividing and non-dividing cells. *DNA Repair*, 12(8):620-636, 2013.

JI, Z.; WELDON, R. H.; 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. *Environmental Molecular Mutagenesis*, 53:218-226, 2012.

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

KIRSCH-VOLDERS, M.; VANHAUWAERT, A.; DE BOECK, M.; DECORDIER, I. Importance of detecting numerical versus structural chromosome aberrations. *Mutation Research*, 504(1-2):137-148, 2002.

KOLACHANA, P.; SUBRAHMANYAM, V. V.; MEYER, K. B.; *et al.* Benzene and its phenolic metabolites produce oxidative DNA damage in HL60 cells in vitro and in the bone marrow in vivo. *Cancer Research*, 53(5):1023-1026, 1993.

LAN, Q.; ZHANG, L.; LI, G.; VERMEULEN, R.; WEINBERG, R. S.; DOSEMECI, M.; *et al.* Hematotoxicity in workers exposed to low levels of benzene. *Science*, 306(5702):1774-1776, 2004.

LEE, K. M.; HAN, S.; PARK, W. Y.; KANG, D. Identification and application of biomarkers in molecular and genomic epidemiologic research. *Journal of Preventive Medicine and Public Health*, 42(6):349-355, 2009.

LIU, L.; ZHANG, Q.; FENG, J.; *et al.* The study of DNA oxidative damage in benzene-exposed workers. *Mutation Research*, 370(3-4):45-50, 1996.

LOVREGGIO, P.; MAFFEI, F.; CARRIERI, M.; D'ERRICO, M. N.; DRAGO, I.; HRELIA, P.; BARTOLUCCI, G. B.; SOLEO, L. Evaluation of chromosome aberration and micronucleus frequencies in blood lymphocytes of workers exposed to low concentrations of benzene. *Mutation Research*, 770:55-60, 2014.

LOW, L. K.; MEEKS, J. R.; NORRIS, K. J.; *et al.* Pharmacokinetics and metabolism of benzene in zymbal gland and other key target tissues after oral administration in rats. *Environmental Health Perspective*, 82:215-222, 1989.

LUCAS, D.; FERRARA, R.; GONZALES, E.; ALBORES, A.; MANNO, M; BERTHOU, F. Cytochrome CYP2E1 phenotyping and genotyping in the evaluation of health risks from exposure to polluted environments. *Toxicology Letters*, 124:71-81, 2001.

MAJOR, J.; JAKAB, M. G.; TOMPA, A. The frequency of induced premature centromere division in human populations occupationally exposed to genotoxic chemicals. *Mutation Research*, 445:241-249, 1999.

MARCHETTI, M. D. Tratamento de águas subterrâneas contaminadas com BTEX utilizando processo oxidativo de fenton. Dissertação, *Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo*, São Carlos, 89p, 2009.

MARTINS, E. M.; ARBILLA, G.; BAUERFELDT, G. F.; DE PAULA, M. Atmospheric levels of aldehydes and BTEX and their relationship with vehicular fleet changes in Rio de Janeiro urban area. *Chemosphere*, 67(10); 2096-2103, 2007.

MENDES, R. Benzenismo. Subsídios para a identificação de grupos ocupacionais de mais elevado risco de exposição. *Boll da IX SBHH*, 144:135-151, 1987.

MILLER, E. C. Some current perspectives on chemical carcinogenesis in humans and experimental animals. *Cancer Research*, 38:1479-1496, 1978.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Norma de Vigilância da Saúde dos Trabalhadores expostos ao Benzeno. Brasil, Junho de 2003.

MINISTÉRIO DO TRABALHO – MTB. Secretária de Segurança e Saúde no Trabalho. *Instrução Normativa nº 02*, de 20 de dezembro de 1995. Brasil, 1995.

MINISTÉRIO DO TRABALHO E EMPREGO. Portaria 3.214 de jul. 1978. Normas regulamentadoras de segurança e saúde no trabalho (NR-15): atividades e operações insalubres. Brasília, 1978. Disponível em: <[http://portal.mte.gov.br/data/files/8A7C816A36A27C140136A8089B344C39/NR-15%20\(atualizada%202011\)%20II.pdf](http://portal.mte.gov.br/data/files/8A7C816A36A27C140136A8089B344C39/NR-15%20(atualizada%202011)%20II.pdf)>. Acesso em: 05 Jul 2013.

MODJTAHEDI, B. S.; MAIBACH, H. I. In vivo percutaneous absorption of benzene in man: forearm and palm. *Food Chemical Toxicology*, 46:1171-1174, 2008.

MOURA-CORREA, M. J. Prevalência da exposição ocupacional ao benzeno e mortalidade por leucemia entre os expostos: estimativas para o Brasil [tese]. Salvador: Universidade Federal da Bahia; 2014.

NAS/NRC. Report of the oversight committee. In: *Biologic markers in reproductive toxicology*. Washington, DC: National Academy of Sciences, National Research Council, National Academy Press, 1989.

NATARAJAN, A. T. Chromosome aberrations: past, present and future. *Mutation Research*, 504(1-2):3-16, 2002.

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

NOMIYAMA, K.; NOMIYAMA, H. Respiratory retention, uptake and excretion of organic solvents in man: Benzene, toluene, n-hexane, trichloroethylene, acetone, ethyl acetate and ethyl alcohol. *Internationales Archiv Arbeitsmedizin*, 32:75-83, 1974b.

OBE, G.; PFEIFFER, P.; SAVAGE, J. R. K.; JOHANNES, C.; GOEDECKE, W.; JEPPESEN, P.; NATARAJAN, A. T.; LÓPEZ, W.; FOLLE, G. A.; DRETS, M. E.

Chromosomal aberrations: formation, identification and distribution. *Mutation Research*, 504:17-36, 2002.

OCCUPATIONAL SAFETY & HEALTH ADMINISTRATION – OSHA. Exposure limits and health effects. Disponível em <http://www.osha.gov/dts/chemicalsampling/data/CH_220100.html>. Acesso em 05 Jul 2013.

OCCUPATIONAL SAFETY & HEALTH ADMINISTRATION – OSHA. Occupational exposure to benzene. Final Rule. U.S. Department of Labor, Occupational Safety and Health Administration. *Federal Register*, 52:34460-34578, 1987.

PARKE, D. V.; WILLIAMS, R. T. Studies in detoxication 49. The metabolism of benzene containing [¹⁴C1] benzene. *Biochemical Journal*, 54:231-238, 1953.

PAVANELLO, S.; CLONFERO, E. Biological indicators of genotoxic risk and metabolic polymorphisms. *Mutation Research*, 463:285-308, 2000.

PELLMAN, D. Cell Biology: aneuploidy and cancer. *Nature*, 446:38-39, 2007.

PITARQUE, M.; CARBONELL, E.; LAPEÑA, N.; *et al.* SCE analysis in peripheral blood lymphocytes of a group of filling station attendants. *Mutation Research*, 390:153-159, 1997.

POPP, W.; VAHRENHOLZ, C.; YAMAN, S.; *et al.* Investigations of the frequency of DNA strand breakage and cross-linking and of sister chromatid exchange frequency in the lymphocytes of female workers exposed to benzene and toluene. *Carcinogenesis*, 13(1):57-61, 1992.

QU, Q.; SHORE, R.; LI, G.; *et al.* Appendix A: Analyses of the combined data for year 1 and year 2. Validation and evaluation of biomarkers in workers exposed to benzene in China. Boston, MA: *Health Effects Institute*, 1-54:115, 2003b.

QU, Q.; SHORE, R.; LI, G.; *et al.* Validation and evaluation of biomarkers in workers exposed to benzene in China. Boston, MA: *Health Effects Institute*, 1-84:115, 2003a.

RABELLO-GAY, M. N.; RODRIGUES, M. A. R.; MONTELEONE NETO, R., eds. *Mutagênese, carcinogênese e teratogênese: métodos e critérios de avaliação*. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 97-103, 1991.

RAPPAPORT, S. M.; KIM, S.; THOMAS, R.; JOHNSON, B. A.; BOIS, F. Y.; KUPPER, L. L. Low-dose metabolism of benzene in humans: science and obfuscation. *Carcinogenesis*, 34(1):2-9, 2013.

REKHADEVI, P. V.; MAHBOOB, M.; RAHMAN, M. F.; GROVER, P. Determination of Genetic Damage and Urinary Metabolites in Fuel Filling Station Attendants. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 52:310-318, 2011.

RIBEIRO, L. R.; SALVADORI, D. M. F.; MARQUES, E. K. (orgs.) *Mutagênese Ambiental*. Canoas, Ed. ULBRA, 2003.

RINSKY, R. A.; SMITH, A. B.; HORNUNG, R.; *et al.* Benzene and leukemia: an epidemiologic risk assessment. *New England Journal of Medicine*, 316:1044-1050, 1987.

ROBERTSON, M. L.; EASTMOND, D. A.; SMITH, M. T. Two benzene metabolites, catechol and hydroquinone, produce a synergistic induction of micronuclei and toxicity in cultured human lymphocytes. *Mutation Research*, 249(1):201-210, 1991.

- ROSS, D. The role of metabolism and specific metabolites in benzene-induced toxicity: evidence and issues. *Journal of Toxicological and Environmental Health Part A*, 61:357-372, 2000.
- ROSSI, A. M.; GUARNIERI, C.; ROVESTI, S.; GOBBA, F.; GHITTORI, S.; VIVOLI, G.; BARALE, R. Genetic polymorphisms influence variability in benzene metabolism in humans. *Pharmacogenetics*, 9(4):445-51, 1999.
- ROSSNER, P. Jr; BOFFETTA, P.; CEPPI, M.; BONASSI, S.; SMERHOVSKY, Z.; LANDA, K.; JUZOVA, D.; SRAM, R. J. Chromosomal aberrations in lymphocytes of healthy subjects and risk of cancer. *Environmental Health Perspectives*, 113(5):517-520, 2005.
- ROSSNER, P. Jr; ROSSNEROVA, A.; SPATOVA, M.; BESKID, O.; UHLIROVA, K.; LIBALOVA, H.; SOLANSKY, I.; TOPINKA, J.; SRAM, R. J. Analysis of biomarkers in a Czech population exposed to heavy air pollution. Part II: chromosomal aberrations and oxidative stress. *Mutagenesis*, 28(1):97-106, 2013.
- ROTHMAN, N.; HAAS, R.; HAYES, R. B.; *et al.* Benzene induces gene-duplicating but not gene-inactivating mutations at the glycophorin A locus in exposed humans. *Proceedings of the National Academy of Science*, 92:4069-4073, 1995.
- ROUKOS, V.; MISTELI, T. The biogenesis of chromosome translocations. *Nature Cell Biology*, 16(4):293-300, 2014.
- RUIZ, M. A.; VASSALLO, J.; SOUZA, C. A. Alterações hematológicas em pacientes expostos cronicamente ao benzeno. *Revista de Saúde Pública*, 27(2):145-151, 1993.
- RUIZ, M. A.; VASSALLO, J.; SOUZA, C. A. Morphologic study of the bone marrow of neutropenic patients exposed to benzene of metallurgical industry of Cubatão, S. Paulo, Brazil. *Journal of Occupational Medicine*, 33:83, 1991.
- RUSHTON, R.; ROMANIUK, H. A case-control study to investigate the risk of leukaemia associated with exposure to benzene in petroleum marketing and distribution workers in the United Kingdom. *Occupational and Environmental Medicine*, 54:152-166, 1997.
- SANDMEYER, E. E. Aromatic hydrocarbons: benzene. *Patty's Industrial Hygiene and Toxicology*, 3:3253-3283, 1981.
- SANGUINETTI, G.; ACCORSI, A.; BARBIERI, A.; *et al.* Failure of urinary trans trans-muconic acid as a biomarker for indoor environmental benzene exposure at PPB levels. *Journal of Toxicology and Environmental Health A*, 63(8):599-604, 2001.
- SANTIAGO, F.; ALVES, G.; OTERO, U. B.; TABALIPA, M. M.; SCHERRER, L. R.; KOSYAKOVA, N.; ORNELLAS, M. H.; LIEHR, T. Monitoring of gas station attendants exposure to benzene, toluene, xylene (BTX) using three-color chromosome painting. *Molecular cytogenetics*, 7(15):1-7; 2014.
- SELLAPPA, S.; SADHANANDHAN, B.; FRANCIS, A.; VASUDEVAN, S. G. Evaluation of genotoxicity in petrol station workers in South India using Micronucleus Assay. *Industrial Health*, 48:852-856, 2010.
- SMITH, M. T.; ZHANG, L.; WANG, Y.; HAYES, R. B.; LI, G.; WIEMELS, J.; *et al.* Increased translocation and aneusomy in chromosomes 8 and 21 among workers exposed to benzene. *Cancer Research*, 58:2176-2181, 1998.

SMITH, M. T.; JONES, R. M.; SMITH, A. H. Benzene exposure and risk of non-Hodgkin lymphoma. *Cancer epidemiology Biomarkers Preview*, 16:385-391, 2007.

SNYDER, R.; HEDLI, C. C. An overview of Benzene metabolism. *Environmental Health Perspectives*, 104(6):1165-1171, 1996.

SNYDER, R.; KALF, G. F. A perspective on benzene leukemogenesis. *Critical Reviews in Toxicology*, 24(3):177-209, 1994.

SRBOVA, J.; TEISINGER, J.; SKRAMOVSKY, S. Absorption and elimination of inhaled benzene in man. *AMA Archives of Industrial Hygiene and Occupational Medicine*, 2:1-8, 1950.

STEPHENS, P. J.; MCBRIDE, D. J.; LIN, M. L.; VARELA, I.; PLEASANCE, E. D.; STEBBINGS, L. A.; *et al.* Complex landscapes of somatic rearrangement in human breast cancer genomes. *Nature*, 462:1005-1010, 2009.

STOMMEL, P.; MÜLLER, G.; STÜCKER, W.; VERKOYEN, C.; SCHÖBEL, S.; NORPOTH, K. Determination of S-phenylmercapturic acid in the urine—an improvement in the biological monitoring of benzene exposure. *Carcinogenesis*, 10(2):279-282, 1989.

STRATTON, M. R.; CAMPBELL, P. J.; FUTREAL, P. A. The cancer genome. *Nature*, 458:719-724, 2009.

SUL, D.; LEE, D.; IM, H.; *et al.* Single strand DNA breaks in T- and B-lymphocytes and granulocytes in workers exposed to benzene. *Toxicology Letters*, 134:87-95, 2002.

SWANSON, M.; COOK, R. Drugs, chemicals and blood dyscrasis. Illinois, Hamilton, *Drug Intelligence Publications*, 153-170, 1976.

TESTA, A.; FESTA, F.; RANALDI, R.; GIACHELIA, M.; TIRINDELLI, D.; DE MARCO, A.; OWCZAREK, M.; GUIDOTTI, M.; COZZI, R. A Multi-Biomarker Analysis of DNA Damage in Automobile Painters. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 46:182-188, 2005.

THIENES, H.; HALEY, T. J. Clinical toxicology, 5th ed. Philadelphia: *Lea & Febiger*, 124-127, 1972.

TRAVIS, C. C.; BOWERS, J. C. Protein binding of benzene under ambient exposure conditions. *Toxicology and Industrial Health*, 5(6):1017-1024, 1989.

TREVISAN, P.; SILVA, J. N.; SILVA, A. P.; ROSA, R. F. M.; PASKULIN, G. A.; THIESEN, F. V.; OLIVEIRA, C. A. V.; ZEN, P. R. G. Evaluation of genotoxic effects of benzene and its derivatives in workers of gas stations. *Environmental Monitoring Assessment*, 186:2195-2204; 2014.

TUNG, E. W. Y.; PHILBROOK, N. A.; MACDONALD, K. D. D.; WINN, L. M. DNA Double-Strand Breaks and DNA Recombination in Benzene Metabolite-Induced Genotoxicity. *Toxicological Sciences*, 126(2):569-577, 2012.

TUNSARINGKARN, T.; SIRIWONG, W.; RUNGSİYOTHIN, A.; NOPPARATBUNDIT, S. Occupational exposure of gasoline station workers to BTEX compounds in Bangkok, Thailand. *International Journal of Environmental and Occupational Medicine*, 3(3):117-125, 2012.

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY – EPA. Toxicological Review of Benzene (Noncancer Effects). Washington, 2002.

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY – EPA. Dados do Sistema de Qualidade do Ar, 2010. Disponível em: <<http://www.epa.gov/ttn/airs/airsaqs>>. Acesso em 18 Jun 2014.

UNITED STATES NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE. Handbook: Help me understand genetics. *Lister Hill National Center for Biomedical Communications*, USA, February 2014.

VALENTE, D.; COSTA-AMARAL, I. C.; CARVALHO, L. V. B.; CORRÊA, M. V.; SILVA, C. B.; RODRIGUES, D. R. F.; DE FALCO, A.; CASTRO, V. S.; NOGUEIRA, S. M.; SIMÕES-GONÇALVES, E.; MOREIRA, J. C.; ANDRÉ, L. C.; TEIXEIRA, L. R.; SARCINELLI, P. N.; OLIVEIRA, M. S.; SISENANDO, H. A.; PERINI, J. A.; MATTOS, R. C. O. C.; LARENTIS, A. L. Emprego de ensaio cometa, estresse oxidativo, micronúcleo, aberrações cromossômicas, polimorfismos, adutos, epigenética e expressão gênica como biomarcadores para avaliação de exposição ocupacional em postos de combustíveis. *Revista Brasileira de Saúde Ocupacional*. No prelo.

VAN METRE, P. C.; MAHLER, B. J.; SCOGGINS, M.; HAMILTON, P. A.; Parking lot sealcoat--A major source of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in urban and suburban environments. *U.S. Geological Survey Fact Sheet*, 2005, 3147, 2006.

VARA, P.; KINNUNEN, O. Benzene poisoning as a gynecological problem. *Acta Obstetrica et Gynecologica Scandinavica*, 26:433-452, 1946.

WALLACE, L. Environmental exposure to benzene: an update. *Environmental Health Perspectives*, 115:117-139, 1996.

WANG, Y.; YANG, H.; LI, L.; WANG, H.; XIA, X.; ZHANG, C. Biomarkers of chromosomal damage in peripheral blood lymphocytes induced by polycyclic aromatic hydrocarbons: a meta-analysis. *International Archives of Occupational and Environmental Health*, 85:13-25, 2012.

WELLS, M. S.; NERLAND, D. E. Hematotoxicity and concentration-dependent conjugation of phenol in mice following inhalation exposure to benzene. *Toxicology Letters*, 56(1-2):159-166, 1991.

WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO. Evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans, Polynuclear Aromatic Compounds, Part 1, chemical environmental and experimental data, 32. *International Agency for Research on Cancer, World Health Organization*. Pp 477, 1983.

YARDLEY-JONES, A.; ANDERSON, D.; PARKE D. V. The toxicity of benzene and its metabolism and molecular pathology in human risk assessment. *British Journal of Industrial Medicine*, 48:437-44, 1991.

ZHANG, L.; VENKATESH, P.; CREEK, M. L.; SMITH, M. T. Detection of 1,2,4-benzenetriol induced aneuploidy and microtubule disruption by fluorescence in situ hybridization and immunocytochemistry. *Mutation Research*, 320(4):315-327, 1994.

ZHANG, L.; ROTHMAN, N.; WANG, Y.; HAYES, R. B.; LI, G.; DOSEMECI, M.; *et al.* Increased aneusomy and long arm deletion of chromosomes 5 and 7 in the lymphocytes of Chinese workers exposed to benzene. *Carcinogenesis*, 19:1955-1961, 1998.

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

ZHANG, L.; LAN, Q.; GUO, W.; LI, G.; YANG, W.; HUBBARD, A. E.; *et al.* 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, 2005.

ZHANG, C. Z.; LEIBOWITZ, M. L.; PELLMAN, D. Chromothripsis and beyond: rapid genome evolution from complex chromosomal rearrangements. *Genes & Development*, 27:2513-2530, 2013.

Avaliação da exposição ocupacional ao benzeno em postos de combustíveis no Município do Rio de Janeiro: uma abordagem integrada para as ações de vigilância em saúde

QUESTIONÁRIO INDIVIDUAL

Nome do Posto: _____

Nº do posto |_|_| Nº Questionário |_|_|_|

Data da Entrevista: ____/____/____

Entrevistador: _____

Supervisor: _____

Codificador: _____

Digitador: _____

MODULO 1: CARACTERÍSTICAS SOCIODEMOGRÁFICAS

(1) Nome:					
(2) Sexo: ☐ 1-Masculino ☐ 2-Feminino			(3) Data de Nascimento:		
(4) Idade: __ __	(5) Naturalidade (UF): __		(6) Nacionalidade:		
999-Ignorado			☐ 1-Brasileira ☐ 2-Estrangeira		
	__		País de origem: _____ ☐ 9-Ignorado		
(7) Situação familiar / conjugal: ☐ 1-Casado(a) ou vive em união; ☐ 2- Separado(a), ou divorciado(a);					
☐ 3- Viúvo(a); ☐ 4- Solteiro(a) (nunca casou ou viveu em união)					

R\$: _____

- (9) O Censo Brasileiro (IBGE) usa os termos preta, parda, branca, amarela e indígena para classificar a cor ou raça das pessoas. Se você tivesse que responder ao Censo do IBGE hoje, como se classificaria a respeito de sua cor ou raça?**

(10) Escolaridade: (ENTREVISTADOR LEIA TODAS AS ALTERNATIVAS)

- (11) Endereço Domiciliar (Rua, Avenida, N.º, Complemento):**

[illegible][illegible]

(14) UF: | | |

(15) CEP: | | | | | | | |

(16) Código IBGE (Município): |__|_|_|_|_|_|_|_|_ (*Preenchimento posterior pelo codificador*)

(17) Telephone: | | | | - | | | | |

(18) Celular: | | | | | - | | | | |

(19) Há quanto tempo reside no endereço atual? _____

☐ 9-NS/NR

MÓDULO 2: INFORMAÇÕES SOBRE EXPOSIÇÃO OCUPACIONAL

63(20) Qual sua situação atual no mercado de trabalho?

- | | | |
|---|--|----------------------------------|
| ☐ 1-Empregado registrado CLT | ☐ 5-Cooperativado | ☐ 9-NS/NR |
| ☐ 2-Empregado não registrado | ☐ 6-Aposentado | |
| ☐ 3-Autônomo / conta própria | ☐ 7-Empregador | |
| ☐ 4-Trabalho temporário | ☐ 8-Outros: _____ | |

(21) Você é sindicalizado? ☐ 1-Sim ☐ 0-Não ☐ 9-NS/NR

(21a) Se sim, qual o sindicato? _____

(22) Com que idade começou a trabalhar em postos de combustíveis? _____ anos ☐ 9-NS/NR

(23) Antes de trabalhar neste posto de abastecimento, quais trabalhos que o sr (a) permaneceu por mais tempo?

ONDE?	O QUE FAZIA?	POR QUANTO TEMPO?	
		Nº.	Meses/Ano

(24) Qual sua ocupação atual?

(24.1) Qual ou quais atividade(s) que o sr (a) desempenha nessa ocupação?

(25) Há quanto tempo o sr (a) trabalha nesta ocupação? _____ ☐ 9-NS/NR

(26) Qual seu horário de trabalho predominante?

1-|_|_| às |_|_| ☐ 9-NS/NR

(26.1) Turno:

- ☐ 1-Turno Fixo ☐ 2-Turno Alternado ☐ 9-NS/NR
☐ 3- Outros: _____

(27) O sr (a) tem folga?

- ☐ 1-Sim
☐ 0-Não (Passe para a pergunta 30)
☐ 9-NS/NR

(28) Quantos dias na semana o sr (a) tem de folga?

n° de dias da semana | __ | __ | ☐ 9-NS/NR

(29) Suas folga (s) são em dias fixos ou alternados?

- ☐ 1-Fixo
☐ 2-Alternado
☐ 9-NS/NR

(30) Quais desses procedimentos o sr (a) realiza durante o seu trabalho? ENTREVISTADOR LEIA TODAS AS OPÇÕES

- A- Uso do paninho ☐ 1-Sim ☐ 0-Não ☐ 9-NS/NR
- B- Aproxima o rosto quando abastece até a boca ☐ 1-Sim ☐ 0-Não ☐ 9-NS/NR
- C- Cheira a tampa do carro antes de abastecer ☐ 1-Sim ☐ 0-Não ☐ 9-NS/NR
- D- Confia no bico automático ☐ 1-Sim ☐ 0-Não ☐ 9-NS/NR
- E- Aspira combustíveis com a mangueira ☐ 1-Sim ☐ 0-Não ☐ 9-NS/NR
- F- Roupa molhada de combustível ☐ 1-Sim ☐ 0-Não ☐ 9-NS/NR
- G- Lava carros ☐ 1-Sim ☐ 0-Não ☐ 9-NS/NR
- H- Uso do querosene ou outra substância para dar brilho no carro ☐ 1-Sim ☐ 0-Não ☐ 9-NS/NR
- I- Outro?
- II- ☐ 1-Sim Qual: _____ ☐ 0-Não ☐ 9-NS/NR

(31) Quais combustíveis o sr(a) abastece? ENTREVISTADOR LEIA TODAS AS OPÇÕES

- ☐ 1-Gasolina Comum ☐ 4-Etanol ☐ 9-NS/NR
- ☐ 0-Gasolina Aditivada ☐ 5-GNV
- ☐ 3-Diesel ☐ 6-Outros: _____

(32) O sr(a) realiza (ou) coleta de amostras do caminhão tanque?

- ☐ 1-Sim
- ☐ 0-Não (Passe para a **questão 35**) 2- ☐ Continua realizando
- ☐ 9-NS/NR

(33) Caso o sr(a) tenha realizado amostras no caminhão tanque, por quanto tempo fez isto?

Tempo: |__||__| meses / anos

Quantas vezes na semana |__||__|

(34) O sr(a) usa equipamentos diferentes do uniforme durante as coletas do caminhão tanque?

☐ 1-Sim Quais:_____

☐ 0-Não

☐ 9-NS/NR

(35) O sr(a) realiza análise de qualidade do combustível a partir das amostras do caminhão tanque?

☐ 1-Sim Há quanto tempo: |__||__| meses / anos Quantas vezes na semana |__||__|

☐ 0-Não ☐ 9-NS/NR

(36) Onde são armazenadas as amostras de combustíveis?

A- ☐ escritório B- ☐ sala de refeição/refeitório C- ☐ loja de conveniência D- ☐ banheiro

E- ☐ sala exclusiva para armazenar combustível F- ☐ outro local fora do posto

G- ☐ Outros:Quais:_____

☐ 9-NS/NR

(37) O sr(a) realiza ou já realizou medição manual (com régua) dos níveis dos tanques do subsolo?

☐ 1-Sim Como:_____

☐ 0-Não (Passe para a **questão 40**)

☐ 9- NS/NR

(38) Por quanto tempo o sr(a) realizou este tipo de medição dos níveis dos tanques do subsolo?

Tempo: |__||__| meses / anos Quantas vezes na semana |__||__|

☐ 9-NS/NR

(39) O sr(a) fez uso de algum equipamento além do uniforme durante a medição dos níveis dos tanques do subsolo?

☐ 1-Sim Quais:_____

☐ 0-Não ☐ 9-NS/NR

(40) O sr(a) já realizou limpeza da caixa separadora de água e óleo?

☐ 1-Sim - Por quanto tempo? |__||__| meses / anos 2- ☐ Continua realizando

Quantas vezes na semana |__||__|

☐ 0-Não

☐ 9-NS/NR

(41) O sr(a) já realizou troca de óleo de carro?

☐ 1-Sim – Por quanto tempo? |__||__| meses / anos 2- ☐ Continua realizando

Quantas vezes na semana |__||__|

☐ 0-Não

☐ 9-NS/NR

(42) O sr(a) já realizou aferição da bomba de combustível?

☐ 1-Sim – Por quanto tempo? |__||__| meses / anos 2- ☐ Continua realizando

Quantas vezes na semana |__||__|

☐ 0-Não

☐ 9-NS/NR

(43) O sr(a) já realizou drenagem da bomba de combustível? (sump da bomba)

☐ 1-Sim – Por quanto tempo? |__||__| meses / anos 2- ☐ Continua realizando

Quantas vezes na semana |__||__|

☐ 0-Não

☐ 9-NS/NR

(44) Algumas desses eventos foram sofridos pelo sr (a) nesta função?

Quantas vezes?

A- Assaltos	☐ 1-Sim	☐ 0-Não	☐ 9-NS/NR	☐
B- Atropelamentos	☐ 1-Sim	☐ 0-Não	☐ 9-NS/NR	☐
C- Incêndio / explosão	☐ 1-Sim	☐ 0-Não	☐ 9-NS/NR	☐
D- Vazamento de combustível no posto	☐ 1-Sim	☐ 0-Não	☐ 9-NS/NR	☐
E- Exposição ao combustível (banho/intoxicação)	☐ 1-Sim	☐ 0-Não	☐ 9-NS/NR	☐
F- Vazamento de gás (GNV)	☐ 1-Sim	☐ 0-Não	☐ 9-NS/NR	☐
G- Queimadura	☐ 1-Sim	☐ 0-Não	☐ 9-NS/NR	☐
H- Vazamento de combustível no carro do cliente	☐ 1-Sim	☐ 0-Não	☐ 9-NS/NR	☐
I- Discussão com cliente	☐ 1-Sim	☐ 0-Não	☐ 9-NS/NR	☐
J- Outro:	☐ 1-Sim	Quais: _____	☐	
			☐ 0-Não	

EXPOSIÇÃO ATUAL:

POR FAVOR, INFORME TODAS AS SUBSTÂNCIAS QUÍMICAS AS QUAIS O(A) SR.(A) É EXPOSTO NESTE TRABALHO ATUAL.

SUBSTÂNCIAS E PRODUTOS QUÍMICOS

45. O (a) sr(a) tem contato ou sente o cheiro de?	46. Com que frequência o (a) sr(a) tem contato ou sente cheiro de? <i>Entrevistador: Leia as alternativas</i>
A. Gasolina ☐ 1-Sim ☐ 2-Não ☐ 9-NS/NR	☐ 1-Diariamente ☐ 2-Semanalmente ☐ vezes da semana ☐ 3- Raramente/Nunca ☐ 4- Não tem contato ☐ 9-NS/NR
B. Etanol (Álcool) ☐ 1-Sim ☐ 2-Não ☐ 9-NS/NR	☐ 1-Diariamente ☐ 2-Semanalmente ☐ vezes da semana ☐ 3- Raramente/Nunca ☐ 4- Não tem contato ☐ 9-NS/NR
C. Diesel ☐ 1-Sim ☐ 2-Não ☐ 9-NS/NR	☐ 1-Diariamente ☐ 2-Semanalmente ☐ vezes da semana ☐ 3- Raramente/Nunca ☐ 4- Não tem contato ☐ 9-NS/NR
D. GNV ☐ 1-Sim ☐ 2-Não ☐ 9-NS/NR	☐ 1-Diariamente ☐ 2-Semanalmente ☐ vezes da semana ☐ 3- Raramente/Nunca ☐ 4- Não tem contato ☐ 9-NS/NR
E. Fumaças de carro, caminhão e motos ☐ 1-Sim ☐ 2-Não ☐ 9-NS/NR	☐ 1-Diariamente ☐ 2-Semanalmente ☐ vezes da semana ☐ 3- Raramente/Nunca ☐ 4- Não tem contato ☐ 9-NS/NR
F. Querosene ☐ 1-Sim ☐ 2-Não ☐ 9-NS/NR	☐ 1-Diariamente ☐ 2-Semanalmente ☐ vezes da semana ☐ 3- Raramente/Nunca ☐ 4- Não tem contato ☐ 9-NS/NR
G. Óleo lubrificante ☐ 1-Sim ☐ 2-Não ☐ 9-NS/NR	☐ 1-Diariamente ☐ 2-Semanalmente ☐ vezes da semana ☐ 3- Raramente/Nunca ☐ 4- Não tem contato ☐ 9-NS/NR
H. Produtos de Limpeza especificar: _____ ☐ 1-Sim ☐ 2-Não ☐ 9-NS/NR	☐ 1-Diariamente ☐ 2-Semanalmente ☐ vezes da semana ☐ 3- Raramente/Nunca ☐ 4- Não tem contato ☐ 9-NS/NR

45. O (a) sr(a) tem contato ou sente o cheiro de?	46. Com que frequência o (a) sr(a) tem contato ou sente cheiro de? <u>Entrevistador:</u> <u>Leia as alternativas</u>
I. Graxa e cera ☐ 1-Sim ☐ 2-Não ☐ 9-NS/NR	☐ 1-Diariamente ☐ 2-Semanalmente ☐ vezes da semana ☐ 3- Raramente/Nunca ☐ 4- Não tem contato ☐ 9-NS/NR
J. Solventes, removedores, aguarrás, thinner ☐ 1-Sim ☐ 2-Não ☐ 9-NS/NR	☐ 1-Diariamente ☐ 2-Semanalmente ☐ vezes da semana ☐ 3- Raramente/Nunca ☐ 4- Não tem contato ☐ 9-NS/NR
L. Outros, Especificar: _____ _____ _____	☐ 1-Diariamente ☐ 2-Semanalmente ☐ vezes da semana ☐ 3- Raramente/Nunca ☐ 4- Não tem contato ☐ 9-NS/NR
M. Outros, Especificar: _____ _____ _____	☐ 1-Diariamente ☐ 2-Semanalmente ☐ vezes da semana ☐ 3- Raramente/Nunca ☐ 4- Não tem contato ☐ 9-NS/NR
N. Outros, Especificar: _____ _____ _____	☐ 1-Diariamente ☐ 2-Semanalmente ☐ vezes da semana ☐ 3- Raramente/Nunca ☐ 4- Não tem contato ☐ 9-NS/NR

PERCEPÇÃO DO ENTREVISTADOR:

A - Confiança nas respostas:

- ☐ Confio totalmente
☐ Confio Parcialmente
☐ Não Confio

OBSERVAÇÕES: _____

Avaliação da exposição ocupacional ao benzeno em postos de combustíveis no município do Rio de Janeiro: uma abordagem integrada para as ações de vigilância em saúde

QUESTIONÁRIO CLÍNICO

Nº do Posto	____ ____ ____	Nº Questionário	____ ____ ____
Data da Entrevista:	____/____/____		
Entrevistador:	_____		
Supervisor:	_____		
Codificador:	_____		
Digitador:	_____		

MÓDULO 1: ANAMNESE CLÍNICA

HISTÓRIA PATOLÓGICA PREGRESSA	
(1) Doenças Cardiovasculares:	☐ Sim ☐ Não ☐ Não Sabe
(1.1) Qual(is):	_____
(1.2) Quando? Ano:	_____
(2) Doenças Infecciosas:	☐ Sim ☐ Não ☐ Não Sabe
(2.1) Qual(is):	_____
(2.2) Quando? Ano:	_____
(3) Doenças Neurológicas:	☐ Sim ☐ Não ☐ Não Sabe
(3.1) Qual(is):	_____
(3.2) Quando? Ano:	_____
(4) Doenças Respiratórias:	☐ Sim ☐ Não ☐ Não Sabe
(4.1) Qual(is):	_____
(4.2) Quando? Ano:	_____

(5) Doenças Gastrointestinais: ☐ Sim ☐ Não ☐ Não Sabe	
(5.1)	Qual(is): _____
(5.2)	Quando? Ano: _____
(6) Doenças Hepáticas: ☐ Sim ☐ Não ☐ Não Sabe	
(6.1)	Qual(is): _____
(6.2)	Quando? Ano: _____
(7) Doenças Renais: ☐ Sim ☐ Não ☐ Não Sabe	
(7.1)	Qual(is): _____
(7.2)	Quando? Ano: _____
(8) Doenças Hematológicas: ☐ Sim ☐ Não ☐ Não Sabe	
(8.1)	Qual(is): _____
(8.2)	Quando? Ano: _____
(9) Doenças Endócrinas: ☐ Sim ☐ Não ☐ Não Sabe	
(9.1)	Qual(is): _____
(9.2)	Quando? Ano: _____
(10) Doenças Psíquicas: ☐ Sim ☐ Não ☐ Não Sabe	
(10.1)	Qual(is): _____
(10.1)	Quando? Ano: _____
(11) Doenças Osteoarticulares: ☐ Sim ☐ Não ☐ Não Sabe	
(11.1)	Qual(is): _____
(11.1)	Quando? Ano: _____
(12) Doenças Uro/ginecológicas: ☐ Sim ☐ Não ☐ Não Sabe	
(12.1)	Qual(is): _____
(12.1)	Quando? Ano: _____
(13) Doenças Otorrinolaringológicas: ☐ Sim ☐ Não ☐ Não Sabe	
(13.1)	Qual(is): _____
(13.1)	Quando? Ano: _____
(14) Doenças da Visão: ☐ Sim ☐ Não ☐ Não Sabe	
(14.1)	Qual(is): _____
(14.1)	Quando? Ano: _____
(15) Doenças da Pele: ☐ Sim ☐ Não ☐ Não Sabe	
(15.1)	Qual(is): _____
(15.1)	Quando? Ano: _____

(16) Neoplasias: ☐ Sim ☐ Não ☐ Não Sabe	
(16.1) Qual(is): _____	
(16.1) Quando? Ano: _____	
(17) Internações: ☐ Sim ☐ Não	
(17.1) Motivo(s): _____	
(17.2) Quando? Ano: _____	
(18) Cirurgias: ☐ Sim ☐ Não	
(18.1) Motivo(s): _____	
(18.2) Quando? Ano: _____	
(19) Transusão de sangue ou derivados: ☐ Sim ☐ Não	
(19.1) Motivo(s): _____	
(19.2) Ano da transfusão: _____	
HISTÓRIA PATOLÓGICA ATUAL	
(20) Diagnóstico de Hipertensão Arterial: ☐ Sim ☐ Não ☐ Não Sabe	
(20.1) Faz uso de remédios para controle da pressão arterial? ☐ Sim ☐ Não ☐ Não Sabe	
(20.2) Caso afirmativo, faz uso de forma regular? ☐ Sim ☐ Não ☐ Não Sabe	
(20.3) Quais os remédios que usa para controle da pressão arterial? _____	
(20.2) Há quanto tempo utiliza esses remédios : __ __ ☐ D-Dia; M-Mês; A-Ano; I-Ignorado	
(21) Diagnóstico de Diabetes Mellitus: ☐ Sim ☐ Não ☐ Não Sabe Tipo: 1 ☐ 2 ☐	
(21.1) Faz uso regular de qual(is) medicações: _____	
(21.2) Há quanto tempo : __ __ ☐ D-Dia; M-Mês; A-Ano; I-Ignorado	
(22) Tem outro(s) problema(s) de saúde diagnosticado(s) por médico? ☐ Sim ☐ Não ☐ Não Sabe	
(22.1) Qual: _____ (22.1.1) Início: __/__/__	
(22.1.2) Usa alguma medicação regularmente: ☐ Sim ☐ Não ☐ Não Sabe	
(22.1.3) Qual(is) medicamento(s): _____	
(22.2.1) Início: __/__/__	
HISTÓRIA REPRODUTIVA	
MULHERES	
(23) Possui filhos: ☐ Sim	
☐ Não. Motivo: _____	
(24) Número de Gestações: __ __ Gestações	
(No caso de nenhuma gestação, marcar "00" e passar para a questão 25)	
(24.1) Número de Partos: __ __	
(24.1.1) Número de Natimortos: __ __	(24.1.2) Número de Nascidos Vivos: __ __

(24.1.2.1) Nascidos Vivos Sadios: __ __
(24.1.2.2) Nascidos Vivos Não Sadios: __ __ Qual doença (inclusive má formação)? _____
(24.2) Número de Abortos: __ __ ☐ Provocados __ __ ☐ Espontâneos
(24.2.1) Período em que ocorreu (ram) a(s) perda(s) gestacional (is): __ __ 1.º Trimestre __ __ 2.º Trimestre __ __ 3.º Trimestre
(25) Idade em que ocorreu a primeira menstruação: __ __ Anos ☐ Não se aplica
(26) Idade em que parou de menstruar: __ __ Anos ☐ Não se aplica
(26.1) Há quanto tempo parou de menstruar? __ __ ☐ D-Dia; M-Mês; A-Ano; I-Ignorado
(26.2) Por que você não menstrua mais? ☐ 1 – Menopausa natural; 2 – Cirurgia para retirada de útero ou ovários; 3 – Outros tratamentos (hormônios, quimioterapia ou radiação); 4 – Outra razão – especificar: _____
HOMENS
(27) Possui filhos: ☐ Sim ☐ Não. Motivo: _____
(27.1) Caso afirmativo, quantos? _____
(27.2) Todos são saudáveis? ☐ Sim ☐ Não ☐ Não Sabe
(27.3) Caso negativo, qual ou quais doenças? _____

MÓDULO 2: ESTILOS DE VIDA

TABAGISMO	
(28) Você é: ☐ Tabagista ☐ Ex-tabagista (Passe para a questão 30) ☐ Nunca fumou (Passe para a questão 33)	
(29) Quantos cigarros você fuma por dia? ☐ menos de 10 ☐ de 11 a 20 ☐ 21 a 30 ☐ mais de 30	
(30) Há quanto tempo você parou de fumar: __ __ ☐ D-Dia; M-Mês; A-Ano; I-Ign.	(31) Durante quanto tempo você fumou: __ __ ☐ D-Dia; M-Mês; A-Ano; I-Ign.
(32) Quando você fumava, quantos cigarros você fumava, em média, por dia: __ __ Cigarros por dia __ __ Maços por dia __ Não sabe/Não respondeu/Variável	
CONSUMO DE ALCOOL	
(33) Você costuma ingerir bebidas alcoólicas? ☐ Sim ☐ Não (passe para 40) ☐ Parei de beber (passe para questão 37) ☐ Nunca bebi (passe para questão 40)	
(34) Que tipo de bebida alcoólica você bebe? ☐ Cerveja ☐ Vinho ☐ Cachaça ☐ Vodka ☐ Outras: _____	

(35) Qual frequência do seu consumo de bebidas alcoólicas? ☐ 1-2 x semana ☐ 3-4x semana ☐ 5 a 6 vezes por semana ☐ Diariamente ☐ Outra: _____	
(36) Em média, quantas doses por dia, por semana ou mês o sr (a) consome? ☐ 1 a 3 doses por mês ☐ 1 dose por semana ☐ 2 a 6 doses por semana ☐ 1 dose por dia ☐ 2 doses por dia ☐ 3 doses por dia ☐ 4 ou mais doses por dia ☐ NS/NR	
(37) Há quanto tempo você parou de beber: __ __ ☐ D-Dia; M-Mês; A-Ano; I-Ign.	(38) Durante quanto tempo você bebeu: __ __ ☐ D-Dia; M-Mês; A-Ano; I-Ign.
(39) Quando você bebia, quantos doses você bebia, em média, por dia: __ __ Bebida: _____	
CONSUMO DE OUTRAS SUBSTÂNCIAS PSICOATIVAS	
(40) Atualmente usa drogas: ☐ Sim ☐ Não (Passe para a questão 44)	
(41) Qual(is): _____	
(42) Frequência: ☐ 1 a 2 vezes por semana ☐ 3 a 4 vezes por semana ☐ 5 a 6 vezes por semana ☐ Diariamente ☐ Outra: _____	
(43) Há quanto tempo usa drogas: __ __ ☐ D-Dia; M-Mês; A-Ano; I-Ign.	
(44) Já usou drogas: ☐ Sim ☐ Não (Passe para a questão 49)	
(45) Qual(is): _____	
(46) Com que frequência usou drogas: ☐ 1 a 2 vezes por semana ☐ 3 a 4 vezes por semana ☐ 5 a 6 vezes por semana ☐ Diariamente ☐ Outra: _____	
(47) Por quanto tempo usou drogas: __ __ ☐ D-Dia; M-Mês; A-Ano; I-Ign.	
(48) Há quanto tempo deixou de usar drogas: __ __ ☐ D-Dia; M-Mês; A-Ano; I-Ign.	

MÓDULO 3: HISTÓRIA FAMILIAR

49) Alguém da sua família já teve câncer: ☐ Sim ☐ Não
(49.1) Quem da sua família teve câncer: ☐ Pai. Qual(is) tipo(s)? _____ ☐ Mãe. Qual(is) tipo(s)? _____ ☐ Avô. Qual(is) tipo(s)? _____ ☐ Avó. Qual(is) tipo(s)? _____ ☐ Irmão(ã). Qual(is) tipo(s)? _____ ☐ Filho(a). Qual(is) tipo(s)? _____ ☐ Esposo(a). Qual(is) tipo(s)? _____ ☐ Outro: _____. Qual(is) tipo(s)? _____

(49.2) Outras doenças familiares : _____

MÓDULO 4: SINAIS E SINTOMAS

DATA DA CONSULTA: __ __ __ __ __ __ __	
(50) Emagrecimento ☐ Sim ☐ Não ☐ Não sabe referir ☐ Não se aplica	(50.1) Há quanto tempo atrás: __ __ ☐ D-Dia; M-Mês; A-Ano; I-Ign ☐ De forma inexplicada (50.2) Quantos kg: __ __
(51) Fraqueza ☐ Sim ☐ Não ☐ Não sabe referir	(51.1) Há quanto tempo atrás: __ __ ☐ D-Dia; M-Mês; A-Ano; I-Ign ☐ De forma inexplicada
(52) Tontura ☐ Sim ☐ Não ☐ Não sabe referir	(52.1) Há quanto tempo atrás: __ __ ☐ D-Dia; M-Mês; A-Ano; I-Ign ☐ De forma inexplicada
(53) Sonolência ☐ Sim ☐ Não ☐ Não sabe referir	(53.1) Há quanto tempo atrás: __ __ ☐ D-Dia; M-Mês; A-Ano; I-Ign ☐ De forma inexplicada
SISTEMA NERVOSO CENTRAL E PERIFÉRICO	
(54) Cefaléia ☐ Sim ☐ Não ☐ Não sabe referir ☐ Não se aplica	(54.1) Há quanto tempo: __ __ ☐ D-Dia; M-Mês; A-Ano; I-Ign
(55) Irritabilidade ☐ Sim ☐ Não ☐ Não sabe referir ☐ Não se aplica (Nervosismo)	(55.1) Há quanto tempo: __ __ ☐ D-Dia; M-Mês; A-Ano; I-Ign
(56) Ansiedade ☐ Sim ☐ Não ☐ Não sabe referir ☐ Não se aplica ☐ excessiva	(56.1) Há quanto tempo: __ __ ☐ D-Dia; M-Mês; A-Ano; I-Ign
(57) Insônia ☐ Sim ☐ Não ☐ Não sabe referir ☐ Não se aplica	(57.1) Há quanto tempo: __ __ ☐ D-Dia; M-Mês; A-Ano; I-Ign
(58) Alteração de Humor ☐ Sim ☐ Não ☐ Não sabe referir ☐ Não se aplica (Depressão)	(58.1) Há quanto tempo: __ __ ☐ D-Dia; M-Mês; A-Ano; I-Ign
(59) Alteração da atenção ☐ Sim ☐ Não ☐ Não sabe referir ☐ Não se aplica	(59.1) Há quanto tempo: __ __ ☐ D-Dia; M-Mês; A-Ano; I-Ign
(60) Alteração da memória ☐ Sim ☐ Não ☐ Não sabe referir	(60.1) Há quanto tempo: __ __ ☐ D-Dia; M-Mês; A-Ano; I-Ign
(61) Sudorese noturna ☐ Sim ☐ Não ☐ Não sabe referir	(61.1) Há quanto tempo:

☐ Não se aplica		__ __ ☐ D-Dia; M-Mês; A-Ano; I-Ign
(62) Formigamentos ☐ Sim ☐ Não ☐ Não sabe referir ☐ Não se aplica (MMSS e/ou MMII)		(62.1) Há quanto tempo: __ __ ☐ D-Dia; M-Mês; A-Ano; I-Ign
(63) Espasmos ☐ Sim ☐ Não ☐ Não sabe referir ☐ Não se aplica ☐ Musculares Involuntários		(63.1) Há quanto tempo: __ __ ☐ D-Dia; M-Mês; A-Ano; I-Ign
(64) Tremores ☐ Sim ☐ Não ☐ Não sabe referir ☐ Não se aplica (MMSS e/ou MMII)		(64.1) Há quanto tempo: __ __ ☐ D-Dia; M-Mês; A-Ano; I-Ign
(65) Cãibras ☐ Sim ☐ Não ☐ Não sabe referir ☐ Não se aplica		(65.1) Há quanto tempo: __ __ ☐ D-Dia; M-Mês; A-Ano; I-Ign
(66) Diminuição de força muscular ☐ Sim ☐ Não ☐ Não sabe referir ☐ Não se aplica		(66.1) Locais: _____ (66.2) Há quanto tempo: __ __ ☐ D-Dia; M-Mês; A-Ano; I-Ign
(67) Convulsões ☐ Sim ☐ Não ☐ Não sabe referir ☐ Não se aplica		(67.1) Tipo: _____ (67.2) Há quanto tempo: __ __ ☐ D-Dia; M-Mês; A-Ano; I-Ign
SISTEMA HEMATOLOGICO E SISTEMA IMUNOLOGICO		
(68) Petéquias: ☐ Sim ☐ Não ☐ Não sabe referir ☐ Não se aplica		(68.1) Há quanto tempo: __ __ ☐ D-Dia; M-Mês; A-Ano; I-Ign
(69) Hematomas ☐ Sim ☐ Não ☐ Não sabe referir ☐ Não se aplica		(69.1) Há quanto tempo: __ __ ☐ D-Dia; M-Mês; A-Ano; I-Ign
(70) Epistaxe ☐ Sim ☐ Não ☐ Não sabe referir ☐ Não se aplica		(70.1) Há quanto tempo: __ __ ☐ D-Dia; M-Mês; A-Ano; I-Ign
ECTOSCOPIA		
(71) Irritação Ocular ☐ Sim ☐ Não ☐ Não sabe referir ☐ Não se aplica		(71.1) Há quanto tempo: __ __ ☐ D-Dia; M-Mês; A-Ano; I-Ign
(72) Orientado: ☐ Sim ☐ Não		(73) Lúcido: ☐ Sim ☐ Não
(74) Fácies: ☐ atípico ☐ inexpressivo ☐ indiferente ☐ tristeza ☐ euforia ☐ ansiedade ☐ outra: _____		
(75) Marcha: ☐ atáxica ☐ parética ☐ em bloco ☐ miopática ☐ misto ☐ outra: _____		
(76) Deformidades: ☐ Sim ☐ Não → Qual: _____		

(77) Equilíbrio: Dinâmico: ☐ normal ☐ alterado		Estático: ☐ normal ☐ alterado	
(78) Tremores: ☐ Sim ☐ Não → Onde: ☐ facial ☐ membro superior ☐ membro inferior ☐ outro(s): _____			
(79) Pupilas isocóricas: ☐ Sim ☐ Não		(80) Dificuldade para enxergar: ☐ Sim ☐ Não	
(81) Nistagmus: ☐ Sim ☐ Não	(82) Diplopia: ☐ Sim ☐ Não	(83) Acomodação: ☐ Sim ☐ Não	
(84) Disfonia: ☐ Sim ☐ Não			
(85) Mucosas: ☐ coradas ☐ descoradas		(86) Icterícia: ☐ Sim ☐ Não	
(87) Gânglios palpáveis: ☐ Sim ☐ Não → Quais: ☐ submandibular ☐ pescoço ☐ axilares ☐ inguinais ☐ outro(s): _____			
(88) Lesões de pele: ☐ Sim ☐ Não → Quais: ☐ manchas ☐ furúnculos ☐ pruridos ☐ dermatite irritativa ☐ eritema ☐ outra(s): _____			
(89) Acne: ☐ Sim ☐ Não			
(89.1) Localização: _____		(89.2) Extensão: _____	
(90) Manchas: ☐ Sim ☐ Não			
(90.1) Localização: _____			
(90.2) Descrição: _____			
(91) Edemas: ☐ Sim ☐ Não → Onde: _____			
(92) Fâneros ☐ Normal ☐ Alterado → Qual: _____			
(93) Tireóide: ☐ Normal ☐ Alterado → Qual: _____			
APARELHO CARDIOVASCULAR (ACV)			
(94) Pressão Arterial: _ _ _ x _ _ _ mmHg		(95) Frequência Cardíaca: _ _ _ bpm	
(96) Temperatura: _ _ .°C	(97) Altura: _ _ _ cm	(98) Peso: _ _ _ kg	
(99) Estase Jugular: ☐ Sim ☐ Não			
APARELHO CARDIOVASCULAR (ACV)			
(100) Ritmo cardíaco: ☐ Normal ☐ Alterado	(101) Sopros: ☐ Sim ☐ Não		(102) Bulhas normofonéticas: ☐ Sim ☐ Não
(103) Bulhas Extras: ☐ Sim ☐ Não		(104) Pulso Radial Esquerdo: ☐ Normal ☐ Alterado	

APARELHO RESPIRATÓRIO (AR)
(105) Deformidade torácica: ☐ Sim ☐ Não → Qual: _____
(106) ☐ Eupnéico ☐ Taquipnéico ipm _____
(107) Murmúrio Vesicular bem distribuído: ☐ Sim ☐ Não → Por que? _____
(108) Percussão: ☐ Normal ☐ Anormal → Por que? _____
ABDÔMEN
(109) Plano: ☐ Sim ☐ Escavado ☐ Globoso
(110) Cicatrizes: ☐ Sim ☐ Não → Qual: _____
(111) Massas palpáveis: ☐ Sim ☐ Não → Qual: _____
(112) Fígado palpável: ☐ Sim. Descrição: _____ ☐ Não
(113) Baço palpável: ☐ Sim. Descrição: _____ ☐ Não
ASSISTÊNCIA MÉDICA
(114) Outros locais onde busca atendimento médico: ☐ PSF. Qual? _____ ☐ Outra unidade de saúde do SUS (que não seja PSF). Qual? _____ ☐ Hospital privado. Qual? _____ ☐ Clínicas particulares. Qual? _____

PERCEPÇÃO DO ENTREVISTADOR:

A - Confiança nas respostas:

- ☐ Confio totalmente
- ☐ Confio Parcialmente
- ☐ Não Confio

OBSERVAÇÕES: _____



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca



ESCOLA NACIONAL DE SAÚDE PÚBLICA
SERGIO AROUCA
ENSP

TÍTULO TESTE DE ABERRAÇÕES CROMOSSÔMICAS EM LINFÓCITOS DE SANGUE PERIFÉRICO		CÓDIGO CESTEH 46
PALAVRA-CHAVE ABERRAÇÕES CROMOSSÔMICAS - INDICADOR DE EFEITO	DATA DA CRIAÇÃO DO DOCUMENTO 17/12/2010	REVISÃO 01

SUMÁRIO

1. Objetivo
2. Campo de Aplicação
3. Definições
4. Siglas
5. Fundamento do Método
6. Condições de Biossegurança
7. Material
8. Equipamentos/Instrumentos de Medição
9. Procedimento
10. Responsabilidades
11. Referências Bibliográficas

1. OBJETIVOS

Este POP fixa condições, padroniza, define e estabelece regras que devem ser aplicadas na avaliação de aberrações cromossômicas, através do método de *Carrano e Natarajan* (1987). Tem como objetivo avaliar a exposição de indivíduos a substâncias químicas através da determinação de alterações citogenéticas (aberrações cromossômicas) em linfócitos de sangue periférico humano.

ELABORADO	VERIFICADO	APROVADO	DATA	PÁGINAS 10
------------------	-------------------	-----------------	-------------	----------------------

TÍTULO: TESTE DE ABERRAÇÕES CROMOSSÔMICAS EM LINFÓCITOS DE SANGUE PERIFÉRICO
--

CÓDIGO CESTEH 46

2. CAMPO DE APLICAÇÃO

Este POP aplica-se ao Setor Executor de Indicadores de Efeito, do Laboratório de Toxicologia do CESTE H.

3. DEFINIÇÕES

3.1) Aberrações cromossômicas: são alterações no cariótipo celular, podendo ser numéricas ou estruturais, envolvendo um ou mais autossomos, cromossomos sexuais ou ambos. As aberrações cromossômicas numéricas incluem os casos em que há aumento ou diminuição do número do cariótipo normal da espécie humana, enquanto as aberrações cromossômicas estruturais incluem os casos em que um ou mais cromossomos apresentam alterações de sua estrutura.

3.2) Linfócitos de Sangue Periférico Humano: Representam uma população de células que está predominantemente num estágio pré-sintético de DNA (fase G0) na qual as atividades bioquímicas e fisiológicas são mínimas. A capacidade dos linfócitos de permear por diversos órgãos e retornar a circulação através de um pool de recirculação permite com suas observações termos uma visão ampla do efeito genotóxico no organismo.

3.3) Genotoxicidade: Está relacionada a capacidade de uma determinada substância química alterar a estrutura do DNA celular, como resultado de uma ou mais alterações, incluindo mutações gênicas, deleções, rearranjos cromossômicos e quebras simples e duplas.

REVISÃO

01

PÁGINA

2 / 10

**TÍTULO: TESTE DE ABERRAÇÕES CROMOSSÔMICAS EM
 LINFÓCITOS DE SANGUE PERIFÉRICO****CÓDIGO
CESTEH 46****4. SIGLAS**

São usadas no texto deste POP as seguintes siglas:

PHA	Fitohemaglutinina
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
mL	Mililitro
KCl	Cloreto de potássio
mg/mL	Miligrama por mililitro
µL	Microlitro

5. FUNDAMENTO DO MÉTODO

O método em questão tem por finalidade avaliar a frequência de alterações citogenéticas em linfócitos de sangue periférico.

6. CONDIÇÕES DE BIOSSEGURANÇA

O ensaio deve ser realizado utilizando jaleco, luvas de látex descartáveis, óculos de segurança e máscara ou protetor facial, na preparação das amostras. A preparação das culturas deve ser realizada em capela de fluxo laminar, e demais os demais processos, em capela química.

7. MATERIAL**7.1 – Vidrarias e Diversos:**

- Erlenmeyer com tampa de rosca
- Pipeta volumétrica de 25mL
- Pipeta Pasteur
- Recipiente Coplin vertical



TÍTULO: TESTE DE ABERRAÇÕES CROMOSSÔMICAS EM LINFÓCITOS DE SANGUE PERIFÉRICO
--

CÓDIGO CESTEH 46

- Recipiente Coplin horizontal
- Tubo graduado do tipo Falcon (15mL)
- Lâminas microscópicas de boa qualidade
- Provetas de 100mL

7.2 – Reagentes:

- Tampão fosfato de sódio 0,1 mol/L e pH= 6,8 (para 500mL):
 - 1,71g de Fosfato de Sódio dibásico (Na_2HPO_4);
 - 4,29g de Fosfato de Sódio monobásico (NaH_2PO_4);
 - 500mL de água Tipo I.
- Solução Hipotônica 0,075M (para 500mL):
 - 2,796g de Cloreto de Potássio (KCl);
 - 500mL de água Tipo I.
- Fixador (para 100mL):
 - 75mL de Metanol PA;
 - 25mL de Ácido acético glacial PA.
- Solução de limpeza das lâminas (para 500mL):
 - 400mL de Etanol PA;
 - 100mL de Ácido clorídrico concentrado a 37%.
- Meio de cultura:
 - 100mL de Meio Ham F-10;
 - 25mL de Soro fetal bovino;
 - 5mL de Fitohemaglutinina.
- Colchicina 95% (16 μg /mL)
- Corante azur-eosina-azul de metileno, segundo Giemsa



TÍTULO: TESTE DE ABERRAÇÕES CROMOSSÔMICAS EM LINFÓCITOS DE SANGUE PERIFÉRICO
--

CÓDIGO CESTEH 46

8. EQUIPAMENTOS / INSTRUMENTOS DE MEDIÇÃO

- Centrífuga para tubos
- Agitador de tubos
- Estufa para cultura
- pHmetro
- Balança analítica
- Microscópio
- Pipetador automático
- Micropipeta 100µL

9. PROCEDIMENTO

ESTERILIZAR POR AUTOCLAVAÇÃO (20 MINUTOS À 121°C) TODO O MATERIAL UTILIZADO NA PREPARAÇÃO DO MEIO DE CULTURA.

9.1 - Todo o procedimento de manipulação das amostras (preparo do meio e obtenção das células) deverá ser realizado em capela de fluxo laminar, previamente desinfetada com álcool etílico à 70% e luz ultravioleta germicida por 10 minutos;

9.2 - O preparo das soluções e a coleta das células deverá ser realizado em capela química;

9.3 - Coletar 5 mL de sangue venoso em tubo a vácuo estéril, contendo o anticoagulante heparina (sal sódico – tubo Vacutainer® de tampa verde);

REVISÃO

01

PÁGINA

5 / 10

TÍTULO: TESTE DE ABERRAÇÕES CROMOSSÔMICAS EM LINFÓCITOS DE SANGUE PERIFÉRICO
--

CÓDIGO CESTEH 46

9.4 - Até o início da cultura, o tubo contendo sangue deve permanecer em baixa temperatura. Para isso, pode-se usar isopor com gelo ou com recipientes de gel congelável;

9.5 - Técnica de Cultura:

9.5.1 – Pode-se utilizar o meio pronto PB MAX (Gibco®), meio para cariótipo Cutilab® ou preparar um meio;

9.5.2 - Homogeneizar o tubo de sangue por inversão, no mínimo 6 vezes;

9.5.3 – Transferir 0,5mL de sangue total para um Erlenmeyer com capacidade para 50mL, contendo 5 mL de meio de cultura (ou um frasco de meio de cultura de 5mL, caso tenha adquirido um meio pronto);

9.5.4 - Agitar levemente os frascos contendo as culturas e incubar em estufa, à 37°C por 46 horas. Sempre conferir a temperatura da estufa utilizando termômetro num Becker com água;

9.5.5 - Após este tempo adicionar a cada cultura 50µL de solução de colchicina para interromper a mitose na fase de metáfase;

9.5.6 - Incubar novamente as culturas à 37°C por mais 2 horas.

9.6 - Coleta das Células:

9.6.1 - Passadas as 48 horas de incubação, homogeneizar as culturas e verter em tubos de centrifuga graduados (Falcon), com capacidade para 15mL;

9.6.2 - Centrifugar os tubos à 200g durante 10 minutos. Caso, ao final, o sobrenadante não esteja límpido, centrifugar por mais 5 minutos. Ao fim do processo, desprezar o sobrenadante com o auxílio de pipeta Pasteur;

REVISÃO

01

PÁGINA

6 / 10

TÍTULO: TESTE DE ABERRAÇÕES CROMOSSÔMICAS EM LINFÓCITOS DE SANGUE PERIFÉRICO
--

CÓDIGO CESTEH 46

9.6.3 - Sob agitação mecânica em agitador de tubos do tipo vórtex, adicionar a cada tubo solução hipotônica de KCl 0,075mol/L até o volume de 8mL. A solução deve ser preparada no mesmo dia e previamente aquecida a 37°C;

9.6.4 - Incubar as células em solução hipotônica por 20 minutos à 37°C, para aumentar o volume celular;

9.6.5 - Centrifugar os tubos à 200g por 10 minutos e desprezar o sobrenadante;

9.6.6 - Adicionar o fixador, preparado no momento do uso e previamente resfriado, sob agitação em Vórtex, gota a gota, até completar o volume de 2mL, e depois rapidamente até o volume de 8mL;

9.6.7 - Guardar os tubos em geladeira por pelo menos uma hora (preferencialmente até o dia útil seguinte), para possibilitar um melhor espalhamento celular;

9.6.8 - Centrifugar os tubos à 600g por 5 minutos e desprezar o sobrenadante;

9.6.9 - Adicionar fixador (preparado no dia do uso e previamente resfriado) até o volume de 3mL sob agitação no vórtex;

9.6.10 – Os passos 9.6.8 e 9.6.9 podem ser repetidos mais uma ou duas vezes, até que o aspecto da solução no Falcon seja límpido e o mais transparente possível;

9.6.11 - Centrifugar os tubos à 600g por 5 minutos e desprezar o sobrenadante;

9.6.12 - Ressuspender as células com um pequeno volume de fixador e estimar visualmente ao microscópio ótico, de modo que a concentração das células na suspensão seja adequada para o posterior preparo das lâminas;

9.6.13 - Armazenar os tubos com a suspensão das células em freezer (-20°C) por no mínimo 3 dias, para melhorar o espalhamento celular. A suspensão celular pode permanecer em freezer por até quatro meses, mantendo boa qualidade.

9.7 - Preparo das Lâminas

REVISÃO

01

PÁGINA

7 / 10

TÍTULO: TESTE DE ABERRAÇÕES CROMOSSÔMICAS EM LINFÓCITOS DE SANGUE PERIFÉRICO
--

CÓDIGO CESTEH 46

9.7.1 - Colocar as lâminas em recipiente do tipo Coplin, e deixar de molho em mistura de etanol PA e ácido clorídrico concentrado a 37%, por tempo variável, mas nunca inferior a um dia;

9.7.2 - Após enxaguar em água corrente por 5 minutos, imergir as lâminas em Coplin com água tipo I e levar ao freezer por 15 minutos;

9.7.3 – Homogeneizar com cuidado a suspensão de células e despejar 1 gota sobre uma lâmina molhada e gelada com auxílio de pipeta Pasteur. Preparar uma lâmina de cada tubo desta forma;

9.7.5 - Secar as lâminas em contato com o ar, à temperatura ambiente, e marcar com o código de identificação do indivíduo;

9.7.6 - Verificar a concentração das células e o espalhamento das metáfases na lâmina ao microscópio óptico, sob contraste de fase. Caso a concentração de células esteja baixa, centrifugar o tubo a 600g por 5 minutos e desprezar parte do sobrenadante, ressuspensando a seguir; Se a concentração estiver alta, diluir um pouco mais com fixador (preparado no momento do uso e previamente resfriado).

9.7.7 – Tendo garantido concentração ideal em cada tubo, seguir com o preparo das lâminas, usando de 3 a 5 gotas por lâmina. Fazer em triplicata, ou seja, três lâminas por tubo.

9.8 - Coloração das Lâminas:

9.8.1 - Corar as lâminas em recipiente do tipo Coplin vertical, contendo 100 mL de tampão fosfato de sódio, e 3mL de corante azur-eosina-azul de metileno segundo Giemsa, por 4 minutos;

9.8.2 - Depois de coradas, lavar as lâminas em água corrente com fluxo suave e secar à temperatura ambiente, em contato com o ar.

REVISÃO

01

PÁGINA

8 / 10

TÍTULO: TESTE DE ABERRAÇÕES CROMOSSÔMICAS EM LINFÓCITOS DE SANGUE PERIFÉRICO
--

CÓDIGO CESTEH 46

9.9 - Análise das Metáfases ao Microscópio:

9.9.1 - Analisar as lâminas em microscópio ótico, equipado com lentes oculares e lentes objetivas planocromáticas de 10x e 100x;

9.9.2 - Localizar as células em metáfase com objetiva de 10x e, após a sua visualização, examinar os cromossomos com objetivas de 100x, com óleo de imersão;

9.9.3 – Contar e analisar as metáfases de cada célula. Observar a morfologia dos cromossomos e a presença de aberrações estruturais do tipo cromatídica e cromossômica.

NOTAS:

Número de Células Analisadas por Indivíduo: *Carrano e Natarajan* recomendam examinar pelo menos 100 metáfases por indivíduo para avaliar a presença de aberrações estruturais em cultura de linfócitos humanos. Para que se tenha um bom poder de detecção de alterações de baixa frequência nas populações controle e exposta indicamos a avaliação de 200 metáfases por indivíduo.

Índice Mitótico: Determinar o índice mitótico para cada indivíduo (razão que expressa o número de metáfases por 1000 células examinadas).

10. RESPONSABILIDADES

A execução das análises é da responsabilidade do técnico do setor executor de Indicadores de Efeito e de estagiários ou alunos, devidamente treinados, e, na ausência destes, do Responsável Técnico do setor. A assinatura do resultado de análise e/ou laudo deve ser feita pelo Responsável Técnico ou pelo Chefe do Laboratório de Toxicologia do CESTE H.

REVISÃO

01

PÁGINA

9 / 10



TÍTULO: TESTE DE ABERRAÇÕES CROMOSSÔMICAS EM LINFÓCITOS DE SANGUE PERIFÉRICO
--

CÓDIGO CESTEH 46

11. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA SANTOS, M.F.M; FERRARI, I; LUNA, H. **Chromosomal aberration analysis in workers exposed to chemical and biological hazards in research laboratories.** Environmental Research, 97:330-334, **2005**.

CARRANO, A. V.; NATARAJAN, A. T. **International commission for protection against environmental mutagens and carcinogens. ICPEMC publication nº 14 - Considerations for population monitoring using cytogenetic techniques.** Mutation Research, 204:379-406, **1988**.

ROSSNER, P.; BOFFETTA , P.; CEPPI, M.; BONASSI, S.; SMERHOVSKY, Z.; LANDA, K.; JUZOVA, D.; SRAM, R.J. **Chromosomal aberrations in lymphocytes of healthy subjects and risk of cancer.** Environmental Health Perspectives, 113(5):517-520, **2005**.

MAJOR, J.; JAKAB, M.G.; TOMPA, A. **The frequency of induced premature centromere division in human populations occupationally exposed to genotoxic chemicals.** Mutation Research, 445:241-249, **1999**.