

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE FARMÁCIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**HEMATOTOXICIDADE, IMUNOTOXICIDADE E CARCINOGENICIDADE NA  
EXPOSIÇÃO OCUPACIONAL AO BENZENO**

**ELISA SAUER**

**PORTO ALEGRE, 2018**



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE FARMÁCIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

HEMATOTOXICIDADE, IMUNOTOXICIDADE E CARCINOGENICIDADE NA  
EXPOSIÇÃO OCUPACIONAL AO BENZENO

Tese apresentada por **Elisa Sauer** como  
pré-requisito para obtenção do TÍTULO DE  
DOUTOR em Ciências Farmacêuticas

Orientadora: Profa. Dra. Solange Cristina Garcia

PORTO ALEGRE, 2018

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, e avaliada pela Banca Examinadora constituída por:

Profa. Dra. Angela Maria Moro

Faculdade Especializada na Área da Saúde do Rio Grande do Sul (FASURGS)

Profa. Dra. Natália Brucker

Universidade Federal de Santa Maria (UFSM)

Profa. Dra. Sabrina Nunes do Nascimento

Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)

Prof. Dr. Fabrício Figueiró (Banca Suplente)

Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)

#### CIP - Catalogação na Publicação

SAUER, ELISA  
HEMATOTOXICIDADE, IMUNOTOXICIDADE E  
CARCINOGENICIDADE NA EXPOSIÇÃO OCUPACIONAL AO  
BENZENO / ELISA SAUER. -- 2018.  
140 f.  
Orientadora: SOLANGE CRISTINA GARCIA.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto Alegre, BR-RS, 2018.

1. Benzeno. 2. Exposição ocupacional. 3. Moléculas coestimulatórias B7.1 e B7.2. 4. Polimorfismos enzimáticos . 5. ALA-D. I. CRISTINA GARCIA, SOLANGE, orient. II. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Agradecimentos à CAPES, órgão que financiou a bolsa de estudos para o desenvolvimento deste trabalho. Ao CNPq (CNPq/Universal Nº 485342/2013-8) e FAPERGS (PPSUS/FAPERGS Nº 1207-2551/13-9) que disponibilizaram os recursos financeiros necessários para a execução deste trabalho; ao PPGCF; aos participantes que aceitaram participar de forma voluntária deste trabalho; ao SESMT/Barrisul; ao Laboratório de Toxicologia (LATOX) da Faculdade de Farmácia desta Universidade, que disponibilizou equipamentos e materiais necessários para a realização das análises laboratoriais na elaboração da presente tese.



*“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota.” (Madre Teresa de Calcutá)*





## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pela vida e saúde permitindo que eu realizasse os meus objetivos.

À minha orientadora Profa. Dra. Solange Cristina Garcia pela oportunidade concedida, pela confiança, por me incentivar da iniciação científica ao doutorado e pela sua contribuição para o meu amadurecimento pessoal e profissional.

Aos meus pais, Lorena e Valdir, por serem os meus primeiros incentivadores, os meus maiores exemplos, o meu chão, minha base e porto seguro. Sem vocês nada seria possível e nem teria sentido. Eu amo vocês.

À minha irmã Kelli, minha afilhada Gabi e ao meu cunhado Bolivar, por me acolherem em sua casa durante toda a minha jornada acadêmica e me proporcionarem o melhor lar que eu poderia ter durante essa caminhada, vocês são incríveis e serei eternamente grata por tudo.

Ao meu namorado Rafael, pelo amor e parceria, por sempre me apoiar em meus projetos e estar sempre ao meu lado me dando forças para seguir em frente. Te amo.

Aos meus amigos por tornarem tudo mais leve, por todas as palavras de incentivo e força.

Agradeço imensamente à família LATOX, por todos os IC's e pós-graduandos que fizeram e fazem parte dessa equipe e contribuíram de forma direta ou indireta para realização desse trabalho.

Agradeço às amigadas que levarei para sempre comigo, minhas “PhD Students”, Gabi, Sá, e especialmente, àquela que foi a minha “amiga-irmã”, dupla e parceira dos maiores desafios dessa etapa, Bruna. A amizade de vocês é um presente de Deus e serei eternamente grata por tê-las comigo durante essa caminhada.

Ao professor Albert Duschl, por me receber em seu laboratório na Universidade de Salzburg, durante meu estágio de doutorado sanduíche, período de grande crescimento e amadurecimento pessoal e profissional. Muito obrigada!

Às professoras doutoras Angela Maria Moro, Natália Brucker e Sabrina Nunes do Nascimento por aceitarem o convite para compor a banca de avaliação desse trabalho.

A todos que aceitaram participar desse estudo voluntariamente, trabalhadores de postos de combustíveis da região metropolitana de Porto Alegre, RS, e bancários da rede BANRISUL.

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul, especialmente à Faculdade de Farmácia, instituição que tenho muito orgulho por ter realizado toda minha formação acadêmica.

Ao Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas pela oportunidade de realizar o meu doutorado.

À CAPES pela bolsa concedida durante a realização do Doutorado.

Enfim, a todos que contribuíram de forma direta ou indireta para que eu concluísse essa importante etapa da minha carreira acadêmica. Muito obrigada!

## APRESENTAÇÃO

De acordo com as normas vigentes no Regimento do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, a presente tese foi redigida na forma de encarte para publicações e está organizada em seções dispostas da seguinte maneira: Parte I: Introdução e Objetivos; Parte II: Manuscritos I e II; Parte III: Discussão, Conclusões, Perspectivas e Referências Bibliográficas e Anexos.

A **Introdução** apresenta o embasamento teórico que nos levou ao desenvolvimento desta proposta de trabalho. Nos **Objetivos** constam os principais questionamentos do trabalho realizado.

Os **Materiais e Métodos, Resultados, Discussão** e as **Referências específicas** encontram-se no corpo de cada manuscrito, apresentados na forma de **Capítulo I e Capítulo II**.

A seção **Discussão** contém uma interpretação geral dos resultados obtidos e que estão descritos nos manuscritos.

A seção **Conclusões** aborda as conclusões gerais dos principais resultados da tese. Em seguida, está apresentada a seção **Perspectivas**, a qual aborda os próximos estudos a serem realizados com os resultados gerados neste Doutorado.

A seção **Referências Bibliográficas** lista a bibliografia utilizada nas seções Introdução e Discussão da tese.

A seção **Anexos** contém o aceite do Comitês de Ética em Pesquisa da UFRGS, os modelos de termo de consentimento livre e esclarecido e termo de assentimento e do questionário aplicado aos participantes do estudo.



## RESUMO

Desde 1982, o benzeno é classificado como agente químico carcinogênico e, portanto, sua utilização passou a ser controlada por órgãos regulamentadores mundiais, visando a redução dos níveis de exposição. Entretanto, o benzeno permanece sendo um importante poluente ambiental e estudos recentes mostram que seus efeitos tóxicos, especialmente hematotoxicidade, imunotoxicidade e carcinogenicidade, ocorrem mesmo em baixos níveis de exposição. Esse estudo buscou avançar no conhecimento relacionado ao mecanismo de toxicidade do benzeno, a fim de evidenciar potenciais biomarcadores precoces de dano. Bem como, avaliar a suscetibilidade individual através da avaliação de polimorfismos enzimáticos. Trabalhadores de postos de combustíveis do estado do Rio Grande do Sul, Brasil, compuseram o grupo exposto ocupacionalmente ao benzeno (GSW), e trabalhadores com atividades administrativas desse mesmo estado, compuseram o grupo não exposto ocupacionalmente (NEG). Avaliação da exposição ocupacional foi realizada através do monitoramento ambiental – quantificação dos níveis de benzeno no ar – e, quantificação do seu biomarcador de exposição ocupacional, o ácido *trans, trans* mucônico urinário (*AttM*). Foram observados maiores níveis de benzeno no ar e maiores níveis urinários de *AttM* nos indivíduos do grupo GSW comparados ao NEG. No capítulo I, avaliamos a imunotoxicidade e carcinogenicidade na exposição ocupacional ao benzeno, através da avaliação das principais moléculas coestimulatórias do sistema imune, B7.1 e B7.2, sistema complemento (SC) e gene supressor tumoral p53. Foi observada redução significativa na expressão proteica e gênica das moléculas B7.1 e B7.2 no grupo GSW comparado ao NEG. Além disso, os níveis das proteínas C3 e C4 do SC estavam reduzidas no grupo GSW, demonstrando prejuízo nessa outra via do sistema imune nos indivíduos expostos ao benzeno. Análise da expressão gênica do p53 demonstrou níveis reduzidos no grupo GSW, e modelo de correlação parcial demonstrou associações positivas entre as reduções das expressões gênicas das moléculas B7 e do p53. Esses resultados demonstram alteração em duas importantes vias de defesa do organismo frente ao desenvolvimento tumoral, e sugerem que a evasão imune juntamente com a supressão do p53 têm um papel importante na carcinogenicidade do benzeno. No capítulo II, avaliamos a influência de polimorfismos enzimáticos (GSTM1, GSTT1, CYP2E1 e ALAD) sobre parâmetros hematológicos, atividade enzimática da  $\delta$ -

aminolevulinato desidratase ( $\delta$ -ALA-D) e biomarcadores de estresse oxidativo. Observamos redução na atividade da  $\delta$ -ALA-D no grupo GSW quando comparado ao NEG, corroborando com resultados previamente publicados por nosso grupo. A inibição da  $\delta$ -ALA-D estava associada negativamente a maior tempo de exposição, maiores níveis urinários de *A<sub>1</sub>M* e de benzeno no ar, demonstrando a ação do benzeno sobre a inibição dessa enzima. A inibição da  $\delta$ -ALA-D pode resultar em anemia, um efeito hematotóxico comum na exposição ao benzeno, portanto, sugere-se a avaliação da  $\delta$ -ALA-D como potencial biomarcador precoce de hematotoxicidade do benzeno. De fato, a inibição da  $\delta$ -ALA-D estava correlacionada positivamente a menores níveis de hemoglobina (Hb) e hematócrito (HCT) observados nos indivíduos do grupo GSW. Análise genotípica observou aumento significativo de carreadores do genótipo polimórfico do gene ALAD no grupo GSW comparado ao NEG, e apesar do aumento observado de genótipos polimórficos nos genes GSTT1 e CYP2E1 no grupo GSW, não foram observadas diferenças significativas entre os genótipos desses genes e do GSTM1 entre os grupos. Agrupamento genotípico revelou que indivíduos portadores de genótipo polimórfico do gene ALAD apresentaram menor atividade de  $\delta$ -ALA-D, sugerindo, pela primeira vez, a ocorrência desse polimorfismo como potencial biomarcador de suscetibilidade aos efeitos hematotóxicos do benzeno. Além disso, a inibição dessa enzima resulta no acúmulo do seu substrato, um composto pró-oxidante, que pode contribuir para o aumento do estresse oxidativo, o qual foi observado nesse estudo através de marcadores clássicos como malondialdeído; níveis de grupamentos tiólicos não proteicos e enzimas do sistema antioxidante no grupo GSW comparado ao NEG. Portadores de genótipos polimórficos nos genes GSTT1 e CYP2E1 apresentaram aumento na atividade enzimática da glutatona peroxidase (GPx) e glutatona transferase (GST), respectivamente, demonstrando um possível efeito protetivo desses polimorfismos. Nossos resultados sugerem potenciais biomarcadores precoces de hematotoxicidade, imunotoxicidade e carcinogenicidade na exposição ocupacional ao benzeno, e adicionalmente, evidenciamos o polimorfismo do gene ALAD como um potencial biomarcador de suscetibilidade, entretanto estudos adicionais são necessários para confirmar esses achados prévios.

**Palavras-chave:** Benzeno; exposição ocupacional; moléculas coestimulatórias B7.1 e B7.2; p53; polimorfismos enzimáticos;  $\delta$ -ALA-D.

## ABSTRACT

### **Hematotoxicity, immunotoxicity and carcinogenicity in occupational exposure to benzene**

Benzene was classified in 1982 as a carcinogenic chemical agent and its use has been controlled ever since by regulatory agencies worldwide, aiming to reduce exposure levels. However, benzene remains as an important environmental pollutant and recent studies show that its toxic effects, especially hematotoxicity, immunotoxicity and carcinogenicity, occur even at low levels of exposure. This study aimed to further the knowledge on the mechanism of benzene toxicity in order to evidence potential early biomarkers of damage, and to evaluate the individual susceptibility through the evaluation of enzymatic polymorphisms. Gas station workers from the Brazilian state of Rio Grande do Sul were recruited as the group of individuals occupationally exposed to benzene (GSW), while workers with administrative activities from the same region composed the non-occupationally exposed group (NEG). Occupational exposure was assessed by means of the environmental monitoring accomplished by quantification of indoor air benzene in the workplace; in addition, the urinary biomarker *trans, trans*, muconic acid (*t, t* - MA) was determined to measure the occupational exposure to benzene. There were higher airborne benzene levels and higher urinary levels of *t, t* - MA in individuals of the GSW group compared to NEG. In chapter I, we evaluated the immunotoxicity and carcinogenicity of benzene occupational exposure through the evaluation of the major costimulatory molecules of the immune system, B7.1 and B7.2, complement system (CS) and the tumor suppressor gene p53. Significant reduction in protein and gene expression of B7.1 and B7.2 molecules was observed in the GSW group compared to NEG. Besides, levels of C3 and C4 complement proteins were reduced in the GSW group, demonstrating that the impairment in this additional pathway of the immune system occurs in subjects exposed to benzene. Analysis of the p53 gene expression demonstrated reduced levels in the GSW group, and partial correlation model demonstrated positive associations between the gene expression reductions of the B7 molecules and p53. These results demonstrate alterations in two important pathways of organism defense against tumor development, and suggest that immune evasion together with p53 suppression have an important role in the carcinogenicity of benzene. In the chapter II, we evaluated the influence of enzyme polymorphisms (ALAD, CYP2E1, GSTM1 and GSTT1) on hematological parameters,

enzymatic activity of  $\delta$ -aminolevulinatase dehydratase ( $\delta$ -ALA-D) and oxidative stress biomarkers. We observed a reduction in the  $\delta$ -ALA-D activity in the GSW group when compared to the NEG, corroborating with results previously published by our group. Inhibition of  $\delta$ -ALA-D was negatively associated with higher exposure time, higher levels of *t*, *t*-MA and airborne benzene, demonstrating the action of benzene on the inhibition of this enzyme. Inhibition of  $\delta$ -ALA-D may result in anemia, a common hematotoxic effect of benzene exposure, therefore the evaluation of  $\delta$ -ALA-D is suggested as a potential early biomarker of benzene hematotoxicity. In fact, inhibition of  $\delta$ -ALA-D was positively correlated with lower levels of hemoglobin (Hb) and hematocrit (HCT) observed in individuals from GSW group. Genotypic analysis showed a significant increase in the ALAD gene polymorphism in the GSW group compared to NEG. Despite the observed increase of polymorphic GSTT1 and CYP2E1 genotypes in the GSW group, no significant differences were observed between the genotypes of these genes and GSTM1 between groups. Genotypic grouping revealed that individuals carrying polymorphic genotypes of the ALAD gene had lower  $\delta$ -ALA-D activity, suggesting for the first time the occurrence of this polymorphism as a potential susceptibility biomarker to the hematotoxic effects of benzene. In addition, inhibition of this enzyme results in the accumulation of its pro-oxidant substrate, which may contribute to the increase of oxidative stress observed in this study by classic markers such as malondialdehyde, non-protein thiol groups and enzymes of the antioxidant system in the GSW group compared to NEG. Polymorphic genotype carriers of GSTT1 and CYP2E1 genes showed an increase in the enzymatic activity of glutathione peroxidase (GPx) and glutathione S-transferase (GST), respectively, demonstrating a possible protective effect of these polymorphisms. Our results suggest potential early biomarkers of benzene occupational exposure, and additionally evidence a potential biomarker of susceptibility, however additional studies focused on the results obtained are necessary to confirm these findings.

**Keywords:** Benzene; occupational exposure; costimulatory molecules B7.1 and B7.2; p53; enzymatic polymorphisms;  $\delta$ -ALA-D.



## LISTA DE FIGURAS

### PARTE I

<b>Figura 1.</b> Esquema da biotransformação hepática do benzeno.....	<b>28</b>
<b>Figura 2.</b> Mecanismos de dano e efeitos tóxicos causados pelo benzeno em diferentes sistemas biológicos .....	<b>29</b>
<b>Figura 3.</b> Vias de ativação do complemento .....	<b>40</b>



## LISTA DE ABREVIATURAS

8-OHdG – 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina  
ACGIH – American Conference of Governmental Industrial Hygienists  
ANP – Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis  
ALA – Ácido  $\delta$ -aminolevulinato  
ALA-D – Gene ALAD  
 $\delta$ -ALA-D –  $\delta$ -aminolevulinato desidratase  
APC – Células apresentadoras de antígenos  
*AttM* – Ácido *trans, trans* mucônico  
BEI – Índice biológico de exposição  
BTEX – Benzeno, tolueno, etilbenzeno e xilenos  
BTX – Benzeno, tolueno e xilenos  
B7.1 – Molécula coestimulatória do sistema imune B7.1  
B7.2 – Molécula coestimulatória do sistema imune B7.2  
CAT – Catalase  
CD28 – Receptor coestimulador  
CLAE – Cromatografia Líquida de alta eficiência  
CTL4 – Antígeno 4 do linfócito T ativado  
CNPq – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico  
CYP – Citocromo P450  
CYP2E1 – Isoforma 2E1 do citocromo P450  
DNA – Ácido desoxirribonucleico  
DTT – Ditioneitol  
EPA – Agência de Proteção Ambiental  
EROS – Espécies reativas de oxigênio  
GPx – Glutaciona peroxidase  
GR – Glutaciona redutase  
GSH – Glutaciona reduzida  
GST – Glutaciona S-transferase  
HA – Ácido hipúrico  
Hb – Hemoglobina  
HCT – Hematócrito

IARC – International Agency for Research on Cancer  
LATOX – Laboratório de toxicologia  
LMA – Leucemia mielóide aguda  
LLC – Leucemia linfocítica crônica  
LLA – Leucemia linfocítica aguda  
LNH – Linfoma não-hodgkin  
PD-1 - Morte programada 1  
PPGCF – Programa de pós-graduação em ciências farmacêuticas  
MA – Ácido mandélico  
mHA – Ácido metilhipúrico  
MBL – Lecitinas ligadoras de manose  
MDA – Malondialdeído  
MHC – Complexo principal de histocompatibilidade  
MPAS – Ministério da Previdência e Assistência Social  
MPO – Mieloperoxidase  
MS – Ministério da Saúde  
MTE - Ministério do Trabalho e Emprego  
NIOSH – Instituto Nacional para Saúde e Segurança Ocupacional  
NQO1 – NADP(H) Quinona oxireductase  
PGA – Ácido fenilgloxílico  
SH – Grupamentos tiólicos  
SNPs – Polimorfismos de nucleotídeos únicos  
SOD – Superóxido dismutase  
SPMA – Ácido S-fenilmercaptúrico  
TCLE – Termo de consentimento livre e esclarecido  
TCR – Receptor de célula T  
TLV-TWA – Valor Limite de Limiar – Média Ponderada por Tempo  
UFRGS – Universidade Federal do Rio Grande do Sul  
VA – Via alternativa  
VC – Via clássica  
VL – Via das lecitinas  
VRT – Valor de referência tecnológico  
WHO – Organização Mundial da Saúde

## SUMÁRIO

PARTE I.....	23
<b>INTRODUÇÃO</b> .....	25
1. Benzeno .....	25
1.1. Exposição ocupacional ao benzeno .....	26
1.2. Toxicocinética do benzeno.....	27
1.3. Toxicodinâmica .....	29
2. Efeitos da exposição ao benzeno.....	34
2.1. Efeitos carcinogênicos .....	34
2.2. Efeitos não carcinogênicos .....	35
2.2.1. Hematotoxicidade .....	35
2.2.2. Imunotoxicidade.....	35
2.2.2.1. Sistema imunológico.....	36
2.2.2.1.1. Moléculas coestimulatórias.....	37
2.2.2.1.2. Sistema complemento.....	39
3. Monitoramento .....	41
3.1. Monitoramento ambiental.....	42
3.2. Biomonitoramento.....	43
3.2.1. Biomarcadores de exposição.....	43
3.2.2. Biomarcadores de efeito .....	44
3.2.3. Biomarcadores de suscetibilidade .....	46
3.2.3.1. Polimorfismos enzimáticos na exposição ocupacional ao benzeno... 46	
<b>OBJETIVOS</b> .....	49
1. Objetivo geral.....	49
2. Objetivos específicos.....	49
PARTE II.....	51
<b>CAPÍTULO I</b> .....	53
The role of B7 costimulation in benzene immunotoxicity and its potential association with cancer	

<b>CAPÍTULO II</b> .....	65
Effects of enzymatic polymorphisms on hematological and oxidative stress parameters in Brazilian workers exposed to benzene	
PARTE III.....	101
<b>DISCUSSÃO</b> .....	103
<b>CONCLUSÕES</b> .....	113
<b>PERSPECTIVAS</b> .....	115
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	117
<b>ANEXOS</b> .....	131
Anexo I .....	131
Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da UFRGS	
Anexo II.....	132
Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) Grupo não exposto	
Anexo III.....	135
Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) Grupo exposto	
Anexo IV .....	138
Questionário de Avaliação	

## PARTE I







## INTRODUÇÃO

---

### 1. Benzeno

O benzeno (C<sub>6</sub>H<sub>6</sub>) é um hidrocarboneto aromático e nas condições normais de temperatura e pressão apresenta-se na forma líquida, incolor e com odor característico. Foi descoberto e isolado do alcatrão de carvão pela primeira vez por volta do ano de 1800, é obtido do petróleo e está presente no ar, solo e na água, sendo proveniente tanto de fontes naturais como antropogênicas (ATSDR, 2007).

Em 1982, o benzeno foi classificado pela primeira vez pela International Agency for Research on Cancer (IARC) (IARC, 2012) como agente químico carcinogênico, pertencente ao grupo A1. Tendo em vista os seus efeitos tóxicos sobre a saúde humana, órgãos regulamentadores mundiais como a American Conference of Governmental Industrial Hygienists (ACGIH) dos Estados Unidos da América e União Europeia passaram a controlar e regulamentar a utilização do benzeno (BARATA-SILVA *et al.*, 2014). No Brasil o controle do uso e exposição ao benzeno é marcado pelo processo que resultou na instituição da Comissão Nacional Permanente do Benzeno (CNPBz) em 1995, sob designação do Ministério do Trabalho e Emprego (MTE), Ministério da Saúde (MS) e Ministério da Previdência e Assistência Social (MPAS) (MENDES *et al.*, 2017).

Apesar dos esforços das agências regulatórias mundiais para redução dos níveis de exposição a esse solvente, o benzeno continua sendo um predominate contaminante ambiental, amplamente utilizado pelas indústrias para produção de produtos químicos como, por exemplo, o ciclohexano e o estireno (ATSDR, 2014), em processos industriais, e como matéria prima de alguns produtos como borrachas, detergentes, corantes, lubrificantes, pesticidas e cigarros (LEZAMA *et al.*, 2001; KIM *et al.*, 2006; COTTICA e GRIGNANI, 2012; SAHMEL *et al.*, 2013; ATSDR, 2014).

Adicionalmente, o benzeno, juntamente com o tolueno, etilbenzeno e xilenos (BTEX) constituem o grupo de hidrocarbonetos em maior concentração na gasolina, em torno de 18% (MARCHETTI, 2009; MENDES *et al.*, 2017). Apesar do benzeno ser o hidrocarboneto de menor percentual no combustível, podendo chegar até a 1%, conforme regulamentado pela Comissão Europeia (DIRETIVA, 98/70/EC) e, no Brasil, pela ANP através da resolução n° 40, de 25/10/2013 (ANP, 2013), é o de maior

destaque. Desta forma, a gasolina é uma importante fonte de exposição ambiental e ocupacional ao benzeno, assim como aos demais hidrocarbonetos presentes em sua constituição.

A população em geral está exposta ao benzeno principalmente pela inalação de ar contaminado, ou ainda através da ingestão de água e alimentos contaminados. A sua presença na atmosfera é registrada em áreas industriais, ambientes urbanos e rurais, sendo considerado um contaminante global (RAPPAPORT *et al.*, 2009; ARNOLD *et al.*, 2013). 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, 2017).

### **1.1. Exposição ocupacional ao benzeno**

As atividades ocupacionais relacionadas à produção de couro, refinamento de produtos petroquímicos, laboratórios científicos, produção de aço, produção e impressão de plásticos apresentam alta potencialidade de exposição ao benzeno (GALBRAITH, 2010). Além disso, postos de revenda de combustíveis representam uma potencial fonte contaminante de benzeno, assim como dos demais solventes presentes na constituição dos combustíveis, tanto através do passivo ambiental representado pelos tanques de armazenamento dos combustíveis (em sua maioria, mal conservados), quanto pela manipulação diária dos combustíveis (CONAMA, 2001).

As atividades relacionadas aos postos de revenda de combustíveis envolvem diferentes processos de trabalho, como abastecimento, troca de óleo, lavagem de veículo, recebimento de caminhão-tanque, análise de amostras-controle da gasolina, revenda de mercadorias, entre outras (MENDES *et al.*, 2017). No Brasil, estima-se que dentre 90 milhões de trabalhadores ativos, aproximadamente 8 milhões possuem atividades com potencial exposição ocupacional ao benzeno (MOURA-CORREA e SANTANA, 2014).

Atualmente, após as ações regulamentadoras em relação a porcentagem de benzeno na gasolina, bem como, os níveis máximos permitidos de benzeno no ar, a exposição ocupacional é tipicamente inferior aos limites máximos permitidos, e na maioria das vezes é até menor que 0,1 ppm (WEISEL *et al.*, 2010). No entanto, estudos recentes mostram que os efeitos tóxicos graves para a saúde humana

causados pela exposição ao benzeno, especialmente carcinogenicidade, genotoxicidade, hematoxicidade e imunotoxicidade, ocorrem mesmo em baixos níveis de exposição, uma vez que não existem limites seguros de exposição a agentes cancerígenos, como o benzeno (BAHADAR *et al.*, 2014; XIONG *et al.*, 2016; YOON *et al.*, 2018).

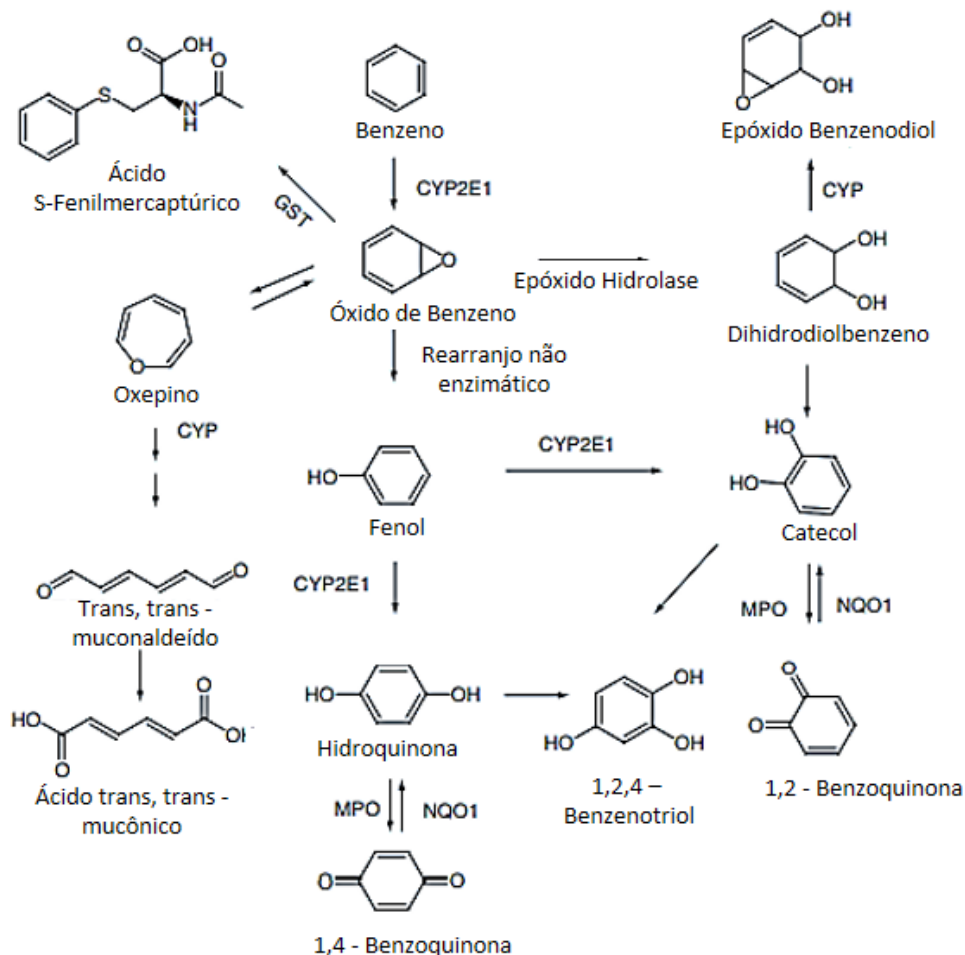
## 1.2. Toxicocinética do benzeno

Em termos de saúde pública e exposição ocupacional, a via de maior relevância na exposição ao benzeno é a via inalatória, sendo o organismo capaz de absorver de 70 a 80% da quantidade inalada. Entretanto, essa absorção decai após a primeira hora de exposição em decorrência do aumento da concentração do benzeno no sangue (SRBOVA *et al.*, 1950; ATSDR, 2007). O benzeno também pode ser absorvido pela via oral, através de água e alimentos contaminados ou, ainda, pela via cutânea através do contato da pele com a substância líquida (JOHNSON *et al.*, 2007). Após absorção, o benzeno chega no sangue por difusão passiva, liga-se às proteínas plasmáticas e acumula-se nos tecidos lipídicos (RASERA, 2009; ARNOLD *et al.*, 2013).

A biotransformação do benzeno ocorre preferencialmente no fígado e, apesar de assumir-se que a sua toxicidade seja dependente da sua biotransformação, não há evidências de um metabólito específico responsável pelos efeitos tóxicos decorrentes da exposição. O esquema de biotransformação do benzeno está apresentado na Figura 1.

A primeira etapa da biotransformação envolve a participação de enzimas da família do citocromo P450, isoforma 2E1 (CYP2E1), levando à formação de um intermediário eletrofílico reativo, o óxido de benzeno, que forma uma mistura equilibrada com oxepino (SNYDER e HEIDI, 1996; MONKS *et al.*, 2010). Óxido de benzeno sofre oxidação com seguida abertura do seu anel, e é então convertido em ácido trans, trans-mucônico (AtM) que é excretado na urina. Uma pequena fração do óxido de benzeno é detoxificada através da conjugação com a glutatona reduzida (GSH), através da ação das glutatona transferases (GSTs), e é então excretado na urina na forma de ácido S-fenilmercaptúrico (SPMA) (KIM *et al.*, 2006). A maior parte do óxido de benzeno é convertido através de rearranjo não enzimático a fenol, o qual é oxidado através da CYP2E1 a hidroquinona e catecol, e então a 1,2,4-benzenotriol.

O catecol, pode também ser derivado da oxidação do dihidrodilbenzeno, formado pela hidrólise do óxido de benzeno pela ação das epóxido hidrolases (CARBONARI *et al.*, 2016).



**Figura 1.** Esquema da biotransformação hepática do benzeno. Adaptado de CARBONARI *et al.*, 2016. CYP: Citocromo P450; CYP2E1: Enzima da família do citocromo P450 – Isoforma 2E1; GST: Glutathione transferase; MPO: Mieloperoxidase; NQO1: NADP(H) quinona oxireductase.

Adicionalmente, os intermediários catecol, hidroquinona e 1,2,4-benzenotriol podem sofrer oxidação catalisada pela mieloperoxidase (MPO) dando origem a suas respectivas semiquinonas e benzoquinonas que apresentam maior toxicidade. Essas reações de oxidação catalisadas pela MPO ocorrem na medula óssea, na qual essa enzima tem sua ação regulada pela reação de oxidação de elétrons, a qual, por sua

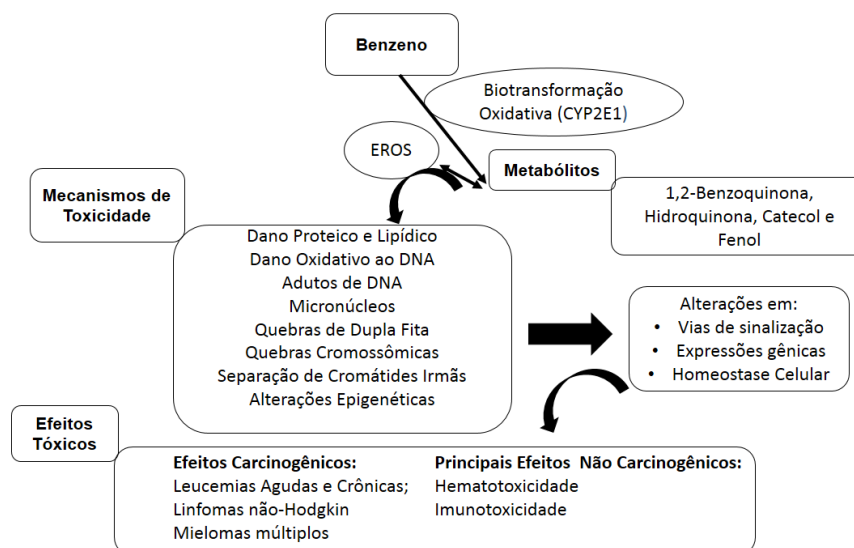
vez, é catalisada pela ação da NADP(H) quinona oxiredutase (NQO1) (CARBONARI *et al.*, 2016).

A eliminação do benzeno ocorre tanto através dos metabólitos formados a partir da sua metabolização (fenóis, quinonas, *AttM* e SPMA), como na sua forma inalterada através de difusão passiva do sangue para urina (GHITTORI *et al.*, 1993) e por exalação do ar (KIM *et al.*, 2006 e BARATA-SILVA *et al.*, 2014).

### 1.3. Toxicodinâmica do benzeno

Assume-se que a chave da toxicidade do benzeno reside no seu metabolismo, no qual os seus metabólitos eletrofílicos são produzidos em conjunto com espécies altamente reativas de oxigênio (EROS) e estão relacionados à promoção do desenvolvimento de dano celular e dano ao DNA. Esses danos resultam em alterações nas vias de sinalização, expressão gênica e homeostase celular, culminando nos diferentes efeitos tóxicos causados por essa exposição (ATSDR, 2007).

Na Figura 2 esta representado um esquema envolvendo os mecanismos de danos e efeitos tóxicos em diferentes sistemas biológicos, causados pelo benzeno.



**Figura 2.** Mecanismos de danos e efeitos tóxicos causados pelo benzeno em diferentes sistemas biológicos (Adaptado de BAHADAR *et al.*, 2014).

O aumento na produção de EROS e/ou diminuição das defesas antioxidantes leva a um desequilíbrio que caracteriza o estresse oxidativo (SIES, 2015). A oxidação

é parte fundamental da vida aeróbia e do metabolismo humano, portanto, os radicais livres são produzidos naturalmente ou por alguma disfunção biológica. O excesso na produção dessas espécies, causado por diversos fatores como, por exemplo, na biotransformação do benzeno, conduz à oxidação de biomoléculas com consequente perda de suas funções biológicas e/ou desequilíbrio homeostático, cuja manifestação é o dano oxidativo potencial contra células, tecidos e diretamente ao DNA (BARBOSA *et al.*, 2010; SIES *et al.*, 2015). Os principais alvos de danos oxidativos são as macromoléculas celulares, que incluem os lipídios, as proteínas e o DNA.

O ataque de espécies reativas aos lipídios desencadeia um processo chamado peroxidação lipídica. A peroxidação lipídica é altamente prejudicial às membranas biológicas, que são ricas em ácidos graxos poli-insaturados. Dentre os efeitos deletérios estão a diminuição da fluidez, aumento da permeabilidade iônica e perda da função de barreira, levando à lise celular e até mesmo à morte celular (MORO *et al.*, 2010; AYALA *et al.*, 2014). Nas reações subsequentes à peroxidação lipídica há a formação de produtos secundários, como aldeídos reativos, dos quais pode destacar-se o malondialdeído (MDA), amplamente utilizado como biomarcador de dano lipídico oxidativo (GROTTO *et al.*, 2007; NIKI, 2014).

As proteínas, assim como os lipídios, também são alvos das espécies reativas e podem sofrer numerosas modificações oxidativas, variando na sua susceptibilidade aos diferentes tipos de oxidantes, e nos locais e grau de oxidação. Em situações de dano irreversível, as EROS podem ser responsáveis pela inativação da função enzimática de muitas proteínas. Os aminoácidos tiólicos cisteína e metionina são particularmente suscetíveis ao ataque oxidativo de quase todas as EROS (DALLE DONNE *et al.*, 2003).

A enzima  $\delta$ -aminolevulinato desidratase ( $\delta$ -ALA-D), uma metaloenzima que requer grupamentos tiólicos reduzidos para sua atividade, é considerada um importante biomarcador do estresse oxidativo (ROCHA *et al.*, 2012). Estudo recente publicado por nosso grupo de pesquisa demonstrou redução na atividade enzimática da  $\delta$ -ALA-D em indivíduos expostos ocupacionalmente a baixos níveis de benzeno (MORO *et al.*, 2015). A  $\delta$ -ALA-D faz parte da via biossintética do grupo prostético heme, catalisando a condensação de duas moléculas de ácido aminolevulínico (ALA) com consequente formação do composto monopirrólico porfobilinogênio, sendo, portanto, essencial para a produção de hemoglobina. É, contudo, altamente sensível

a elementos pró-oxidantes, os quais agem nos grupamentos sulfidril (-SH) da mesma, resultando em redução da sua atividade e, conseqüentemente, prejudicando a síntese do heme, o que pode levar a anemia (GOERING, 1993). Adicionalmente, o acúmulo do substrato da enzima, o ALA, no sangue exacerba a produção de EROS, contribuindo para o estresse oxidativo (VALENTINI *et al.*, 2007).

O excesso de radicais livres é combatido por antioxidantes endógenos ou exógenos, estes provenientes da dieta. Os antioxidantes consistem em qualquer substância que, quando presente em elevada concentração comparada à do substrato oxidável, atrasa ou inibe significativamente a oxidação deste substrato de maneira eficaz (BARREIROS e DAVID, 2006; COTINGUIBA *et al.*, 2013).

O sistema antioxidante é composto por antioxidantes produzidos pelo organismo, incluindo as enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx), glutathione S-transferase (GST) e glutathione reductase (GR). Além disso, o organismo dispõe de outro importante antioxidante endógeno não-enzimático, a glutathione reduzida (GSH), um tripeptídeo que desempenha função fundamental na proteção das células contra danos oxidativos causados por radicais oxidantes, agindo como sequestradora de radicais na homeostase tiólica, na manutenção do balanço redox da célula e na defesa contra agentes eletrofílicos, como os xenobióticos (COTINGUIBA *et al.*, 2013). O sistema de defesa antioxidante não-enzimático inclui também os compostos antioxidantes de origem dietética, tais como ácido ascórbico (vitamina C), vitamina E ( $\alpha$ -tocoferol) e vitamina A (retinol), licopeno e  $\beta$ -caroteno (BARBOSA *et al.*, 2010).

A alteração nas vias de sinalização celulares a partir da desregulação dos níveis de EROS circulantes pode ser o principal mecanismo através do qual o benzeno exerce a sua toxicidade, com conseqüente dano ao DNA (WAN *et al.*, 2010). De acordo com Angelini e colaboradores (2011), as EROS atuam inibindo as topoisomerasas II responsáveis pela replicação e reparo ao DNA, o que por sua vez gera instabilidade gênica, levando a rupturas de cadeias de DNA, deleções de genes, rearranjos, alterações cromossômicas e dano oxidativo ao DNA (FRACASSO *et al.*, 2010 e KIRKELEIT *et al.*, 2008).

Estudos vêm avaliando o *status* oxidativo e antioxidante e suas conseqüências como dano lipídico, dano proteico e dano ao DNA, em indivíduos expostos ao benzeno (UZMA *et al.*, 2010; MORO *et al.*, 2013). No estudo publicado por Uzma e

colaboradores (2010), foi encontrado níveis elevados de MDA e redução dos níveis de SOD e GPx, demonstrando os efeitos oxidativos do benzeno e seus metabólitos.

Adicionalmente, no estudo publicado por nosso grupo de pesquisa (MORO *et al.*, 2013) foi demonstrado que trabalhadores expostos a baixos níveis de benzeno apresentaram alterações em parâmetros do estresse oxidativo, dentre eles redução na atividade enzimática da GST, diminuição dos níveis eritrocitários dos grupamentos tiólicos não proteicos (GSH) e de níveis séricos de vitamina C, quando comparado a um grupo não exposto ocupacionalmente. Além disso, estas alterações estavam correlacionadas aos maiores níveis de exposição ao benzeno. Nesse mesmo estudo, foi observado aumento de quebras na fita de DNA, avaliado através do ensaio cometa, e aumento na frequência de micronúcleos no grupo exposto ocupacionalmente quando comparado ao grupo não exposto. E ainda, demonstrou-se que GST e GSH apresentam-se como um fator protetivo frente ao dano de DNA.

Nessa mesma linha, corroborando com os nossos resultados publicados por Moro e colaboradores (2013), em estudo publicado por Xiong e colaboradores (2016) foi demonstrada redução nos níveis enzimáticos da SOD, diminuição nos níveis eritrocitários de GSH e aumentos dos níveis do biomarcador de peroxidação lipídica (MDA). Além disso, avaliaram o dano genético através do ensaio cometa e teste de micronúcleos e seus resultados também estavam de acordo com os demonstrados em nosso estudo, onde observaram um aumento no dano de DNA no grupo exposto quando comparado ao grupo não exposto.

Dentre as várias formas de alterações genéticas causadas pelo benzeno, a aneuploidia e a quebra cromossômica são considerados os eventos genotóxicos iniciais (HOLECKOVA *et al.*, 2003 e ZHANG *et al.*, 2011). O efeito genotóxico do benzeno também tem sido observado através de aberrações cromossômicas em linfócitos de sangue periférico e medula óssea (KAŠUBA *et al.*, 2000 e ZHANG *et al.*, 2002, 2011). Gonçalves e colaboradores (2016) avaliaram alterações cromossômicas em expostos ocupacionalmente ao benzeno, e encontraram aumento em quebras e falhas cromossômicas no grupo exposto quando comparado ao grupo controle, ao passo que essas alterações estavam associadas aos maiores níveis de exposição ao benzeno.

Além disso, um estudo realizado em nosso laboratório utilizou como biomarcador de dano oxidativo ao DNA, a avaliação dos níveis urinários de 8-hidroxi-



2'-desoxiguanosina (8-OHdG) em trabalhadores expostos ao benzeno. Níveis aumentados da excreção desse biomarcador foram observados no grupo exposto quando comparado ao grupo não exposto ocupacionalmente (GÖETHEL *et al.*, 2014).

Adicionalmente, alguns estudos vêm demonstrando que a exposição ocupacional ao benzeno resulta em alterações epigenéticas, e que o provável mecanismo para a ocorrência dessas alterações são as EROS formadas durante a sua metabolização (PENG e JC, 2016).

Bollati e colaboradores (2007) encontraram alterações epigenéticas em expostos ocupacionalmente a baixos níveis de benzeno, as quais também foram encontradas em células de leucemia mieloide aguda (LMA) (MELKI *et al.*, 1999; GREINER *et al.*, 2000; GALM *et al.*, 2006). Além disso, outros estudos vêm demonstrando alterações epigenéticas causadas pelo benzeno em gene supressor tumoral (YANG *et al.*, 2014), gene associado ao desenvolvimento de melanomas (ZHANG *et al.*, 2010) e genes de reparo ao DNA (GAO *et al.*, 2010; XING *et al.*, 2013; LI *et al.*, 2016).

Estudos experimentais e epidemiológicos vêm associando a exposição ao benzeno a alterações na via do gene p53 (BOLEY *et al.*, 2002; YOON *et al.*, 2003; KAWASAKI *et al.*, 2009). A partir dos anos 90, o gene p53 foi amplamente reconhecido como gene supressor tumoral, estando mutado ou deletado em torno de 50% de todas as neoplasias humanas. A proteína p53 é considerada uma das proteínas mais importantes para manter a estabilidade e integridade do genoma. Ela protege a célula impedindo a proliferação celular após um dano no DNA e ativando a apoptose no caso de um dano irreparável (HARRIS, 1996; VOUSDEN e LU, 2002; CHI, 2016).

## **2. Efeitos da exposição ao benzeno**

### **2.1. Efeitos carcinogênicos**

Em 1982, a International Agency for Research on Cancer (IARC) realizou abrangente avaliação dos estudos prévios que avaliaram os efeitos carcinogênicos do benzeno e considerou as evidências suficientes para comprovar a relação da exposição a esse solvente e o desenvolvimento de leucemia mieloide aguda (LMA) (IARC, 1982).

Mais recentemente, no ano de 2012, uma revisão realizada pela mesma agência avaliou numerosos casos de coorte e casos-controle de leucemias e seus subtipos, linfomas não-Hodgkin (LNH), mielomas múltiplos e outros tipos de tumores em adultos e crianças (IARC, 2012) e reafirmou a sua designação de que o benzeno é cancerígeno para seres humanos (Grupo 1), com base em evidências suficientes de que o benzeno causa LMA em humanos (ATSDR, 2015).

Adicionalmente, a IARC avaliou as evidências relacionadas à exposição ao benzeno e o desenvolvimento de leucemia linfocítica aguda (LLA), leucemia linfocítica crônica (LLC), mieloma múltiplo e LNH, e considerou as associações positivas (ATSDR, 2015). Apesar de, na maioria dos casos, essas associações não terem atingido o nível estatístico, essas evidências destacam a relação entre a carcinogenicidade desse solvente e uma variedade de cânceres no sangue (BAAN *et al.*, 2009; KHALADE *et al.*, 2010; STEINMAUS *et al.*, 2008 e SNYDER *et al.*, 2012).

Estudos epidemiológicos publicados após a última revisão realizada pela IARC em 2012 apontam evidências adicionais em relação à carcinogenicidade do benzeno. Estudo realizado por Bulka e colaboradores (2013) reporta a maior incidência de LNH em lugares próximos a locais de liberação de benzeno no ar. Outros estudos recentes sugerem associação entre a exposição ocupacional ao benzeno e o desenvolvimento de leucemia na infância, demonstrando a ação carcinogênica do benzeno ambiental na saúde humana durante a gravidez e a infância (HECK *et al.*, 2014 e ZHOU *et al.*, 2014). Além disso, estudos demonstram o aumento do risco de desenvolvimento de síndrome mielodisplásica em trabalhadores expostos a baixos níveis de benzeno (LAN *et al.*, 2004; IRONS *et al.*, 2010 e SCHNATTER *et al.*, 2012).

## **2.2. Efeitos não carcinogênicos**

### **2.2.1. Hematotoxicidade**

Estudos experimentais e epidemiológicos demonstram que a exposição crônica ao benzeno, mesmo em baixas doses, é associada à diminuição no número de eritrócitos, leucócitos e plaquetas em humanos, resultando em anemia aplástica, trombocitopenia e pancitopenia (HSIEH *et al.*, 1990; TRAVIS *et al.*, 1994; LAN *et al.*, 2004; ATSDR, 2015; CASALE *et al.*, 2016), confirmando que a medula óssea é um tecido alvo de toxicidade do benzeno (SNYDER *et al.*, 2012).

Estudo realizado por Uzma e colaboradores (2008) avaliou número total e diferencial de células brancas em expostos ocupacionalmente ao benzeno e observou diminuição da porcentagem de linfócitos em relação ao número de células totais. Além disso, conforme o aumento na duração da exposição, observou-se redução no número total de células brancas.

Schnatter e colaboradores (2012) avaliaram os parâmetros hematológicos em um grupo de trabalhadores expostos ocupacionalmente ao benzeno na China, e observaram que em exposições a níveis de benzeno maiores que 10 ppm ocorrem alterações em índices hematológicos das células vermelhas, tais como anemia e macrocitose.

Apesar do amplo conhecimento dos efeitos hematotóxicos causados pelo benzeno, sabe-se, atualmente, que parâmetros hematológicos clássicos não são biomarcadores sensíveis e precoces do dano causado por essa exposição (SWAEN *et al.*, 2010). Resultados prévios publicados por nosso grupo de pesquisa sugerem a avaliação da enzima  $\delta$ -ALA-D como potencial biomarcador de dano hematológico precoce na exposição ocupacional ao benzeno, tendo em vista a inibição da atividade dessa enzima em indivíduos expostos ocupacionalmente a baixos níveis de benzeno (MORO *et al.*, 2015).

### **2.2.2. Imunotoxicidade**

Além do sistema hematopoiético, a exposição ocupacional ao benzeno é reconhecida por causar distúrbios no sistema imunológico, uma vez que prejudica a proliferação de linfócitos T e B (FARRIS *et al.*, 1997 e ATSDR, 2007), o que contribui para o aumento do risco de infecções oportunistas e compromete o sistema imunológico (UZMA *et al.*, 2010; TUNSARINGKARN *et al.*, 2013). Farris e colaboradores (1997), em seu estudo experimental, demonstraram a redução nos níveis de linfócitos T e B em camundongos expostos pela via inalatória ao benzeno. Estudos epidemiológicos também demonstraram a redução na contagens de linfócitos T e B em trabalhadores expostos ocupacionalmente ao benzeno (BOGADI-ŠARE *et al.*, 2000; LAN *et al.*, 2004; LAN *et al.*, 2005).

Um estudo realizado com trabalhadores expostos cronicamente ao benzeno no Brasil demonstrou aumento significativo nas subpopulações de linfócitos T citotóxicos

e diminuição de células T de memória nos trabalhadores expostos quando comparados ao grupo controle (BRANDÃO *et al.*, 2005).

Além disso, Kirkeleit e colaboradores (2006) observaram redução nos níveis de imunoglobulinas do sistema imunológico em seu estudo epidemiológico, apesar de não ter observado redução nos níveis de linfócitos circulantes.

Em estudo realizado por nosso grupo de pesquisa, foi demonstrado uma elevação nos níveis de interleucina-8 (IL-8) em expostos ocupacionalmente ao benzeno quando comparado a um grupo não exposto (MORO *et al.*, 2015). A IL-8 é uma citocina envolvida na progressão tumoral, atuando sobre a sobrevivência e crescimento tumoral (WAUGH *et al.*, 2008). O aumento dos níveis de IL-8 nos trabalhadores expostos ao benzeno possivelmente está relacionado a ação tóxica dos metabólitos desse solvente sobre a medula óssea (BIRONAITE *et al.*, 2004).

### **2.2.2.1. Sistema imunológico**

O sistema imunológico é constituído por dois sistemas distintos e interativos: inato e o adaptativo. O sistema imune inato é reconhecido como responsável pela resposta imune inespecífica, composto por barreiras físicas, fisiológicas, inflamatórias e fagocíticas. Quando essas barreiras são rompidas, uma série de eventos inflamatórios são desencadeados por mediadores químicos, os quais são produzidos principalmente por microrganismos invasores e leucócitos. Esses mediadores são componentes das cascatas enzimáticas que funcionam a fim de eliminar a ameaça ao organismo. São 4 cascatas enzimáticas conhecidas: sistema complemento, sistema de coagulação, fibrinolítico e das cininas. Enquanto isso, a imunidade específica é subdivida em imunidade celular e humoral. A imunidade celular é mediada pelos linfócitos T, e é responsável pela defesa intracelular. A imunidade humoral, por sua vez, é mediada por anticorpos produzidos pelos linfócitos B, e é responsável pela defesa extracelular (ABBAS *et al.*, 2014; SCHALLER, 2016).

#### **2.2.2.1.1. Moléculas coestimulatórias**

Dentro da imunidade celular, a proliferação e diferenciação das células T virgens requer dois sinais específicos. O primeiro deles é a ativação através do receptor de célula T (TCR) pelo reconhecimento do antígeno apresentado pelo complexo principal de histocompatibilidade (MHC) nas células apresentadoras de

antígenos (APCs). O segundo envolve a ligação de moléculas coestimulatórias em seus respectivos receptores e, na ausência dessa ação coestimulatória as células T que encontram seus antígenos não respondem e entram em um estado de não responsividade, reconhecido como anergia celular (JECKINS *et al.*, 1994; DOLEN e ESENDAGLI, 2013 e ABBAS *et al.*, 2014).

A via de moléculas coestimulatórias mais bem caracterizada é a via do receptor de células T, o CD28, que se liga às moléculas coestimulatórias B7.1 (CD80) e B7.2 (CD86) expressas nas APCs ativadas (ABBAS *et al.*, 2014. ESENSTEN *et al.*, 2016 e SCHILDBERG *et al.*, 2016). A ligação dessas moléculas ao receptor CD28, em adição à ligação TCR ao MHC leva à ativação de linfócitos T, produção de citocinas e previne a indução da anergia celular (PARDOL *et al.*, 2012; DOLEN e ESENDAGLI, 2013 e ABBAS *et al.*, 2014). CD28 possui numerosos homólogos, da mesma forma que ocorre para os seus ligantes B7, e essas proteínas são responsáveis por regular positiva e negativamente as células T (GREAVES e GRIBBEN, 2013 e ABBAS *et al.*, 2014).

As moléculas coestimulatórias B7.1 e B7.2 podem ligar-se ao CD28 (receptor coestimulador), ou aos receptores CTL4 (antígeno 4 do linfócito T ativado) e PD-1 (morte programada 1), os quais são caracterizados por sua atividade inibitória no que diz respeito a sua ação sobre a atividade das células T. Os receptores com ação inibitória estão envolvidos no fenômeno da tolerância, e anormalidades na sua expressão e/ou função causam doenças autoimunes (GREAVES e GRIBBEN 2013 e SCHILDBERG *et al.*, 2016). O receptor CTL4 (receptor coinibidor) possui afinidade de ligação às moléculas B7 de 20 a 50 vezes comparada à afinidade de ligação do CD28 a essas moléculas coestimulatórias. Além disso, o CTL4 é reconhecido por ser acoplado quando a expressão das moléculas B7 nas APCs está baixa, enquanto o CD28 é acoplado quando a expressão das moléculas B7 está elevada. Ou seja, o nível de expressão das moléculas coestimulatórias influencia o acoplamento diferencial do CD28 ou CTL4, o que por sua vez irá determinar se a resposta será iniciada ou terminada (ABBAS *et al.*, 2014).

O sistema imunológico e o desenvolvimento de câncer estão fundamentalmente inter-relacionados, pois o sistema imune é responsável por prevenir e controlar o crescimento tumoral maligno através da vigilância imunológica (SCHREIBER *et al.*, 2011; HANAHAN e WEIBERG, 2011). Atualmente, sabe-se que

a evasão ativa das células cancerígenas, frente ao ataque e eliminação pelo sistema imune, é uma das principais características de malignidade (HANAHAN e WEINBERG, 2011). Tendo em vista que a resposta imune adaptativa mediada por células T é regulada por coestimulação positiva ou coinibição negativa da interação da família B7 com a família dos receptores de CD28, reconhece-se que alterações nas expressões das moléculas estimulatórias B7.1 e B7.2 é um dos principais mecanismos de escape de células tumorais (CEERAZ *et al.*, 2013; SHARMA e ALLISON, 2015; JANAKIRAM *et al.*, 2016).

De fato, há inúmeros estudos documentados e amplamente revisados, os quais em conjunto demonstram alterações na expressão dos componentes dessa via coestimulatória em diferentes tipos de malignidades, incluindo câncer de mama, bexiga, linfomas e melanomas (GREAVES e GRIBBEN, 2013; LI *et al.*, 2017). É comprovado ainda que a expressão das moléculas B7.1 e B7.2 é reduzida tanto nas leucemias linfocíticas crônicas, como em casos de leucemia aguda (COSTELO *et al.*, 1998; VOLLMER *et al.*, 2003; ZHAO *et al.*, 2012).

Estudo recente realizado e publicado por nosso grupo de pesquisa demonstrou redução nos níveis de expressão das moléculas coestimulatórias B7.1 e B7.2 em monócitos de trabalhadores expostos cronicamente a baixos níveis de benzeno. Além disso, os níveis reduzidos de expressão dessas moléculas estavam correlacionados a maiores níveis de exposição ao benzeno, bem como, a maiores níveis do biomarcador de exposição urinário *AtfM* (MORO *et al.*, 2015).

Com base no fato de que a exposição ocupacional ao benzeno está intimamente relacionada ao desenvolvimento de leucemia, a avaliação dessas moléculas coestimulatórias em trabalhadores expostos ao benzeno pode ser útil como uma ferramenta interessante no monitoramento biológico.

#### **2.2.2.1.2. Sistema complemento**

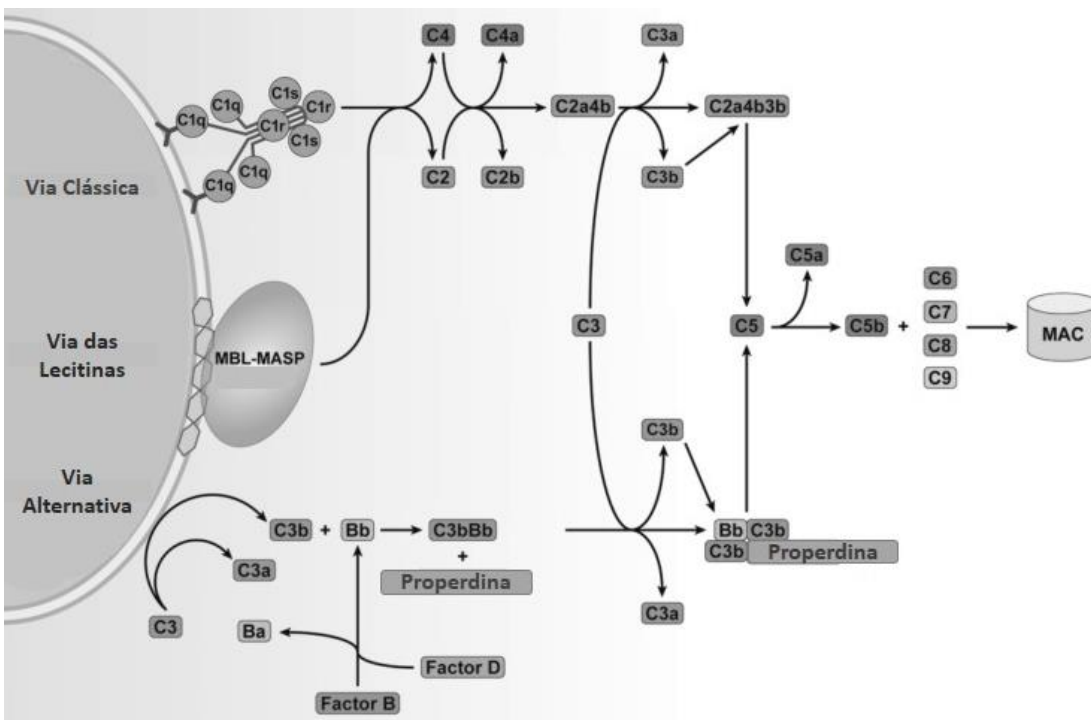
O sistema complemento foi identificado pela primeira vez em 1884, quando foi evidenciada a sua função em auxiliar e “complementar” a função dos anticorpos séricos na resposta imune. Entretanto, por conta da sua complexidade, a sua natureza química e mecanismo exato de ação não foram esclarecidos até o ano de 1960. Considera-se ainda que apenas em 1980 as proteínas que compõem o sistema complemento foram completamente identificadas (ROSS, 2014).

O sistema complemento consiste em mais de 30 proteínas, algumas solúveis no plasma e em outros fluídos biológicos e outras ligadas a superfícies celulares (UNSWORTH *et al.*, 2008; BOTTO *et al.*, 2009; SARMA e WARD, 2011). Atualmente, a importância do sistema complemento no sistema imune é amplamente reconhecida, e sua atuação pode ser dividida em 3 atividades fisiológicas abrangentes: (1) conexão entre a imunidade inata e a imunidade adaptativa; (2) defesa do organismo frente a infecções bacterianas; e (3) eliminação dos complexos imunológicos e produtos de lesões inflamatórias (WALPORT, 2001).

A ativação do sistema complemento ocorre, dependendo do contexto, por 3 vias distintas, relacionadas entre si, denominadas via clássica (VC), via alternativa (VA) e via das lecitinas (VL), as quais envolvem uma cascata de eventos de mudanças conformacionais e de clivagem proteolítica, gerando moléculas biologicamente ativas. A ativação da VC depende da formação de um complexo imune após a ligação de IgM ou IgG a um patógeno ou a outro antígeno. O complexo C1 (C1q, C1r e C1s) se liga ao complexo imune através da porção C1q, levando à ativação do C1r, o qual cliva e ativa o C1s. C1s por sua vez, cliva C2 e C4, levando a formação do complexo C3 convertase da via clássica (SARMA e WARD, 2011). Na VA e VL não é necessária a presença de um complexo imune para a sua ativação (WALPORT, 2011 e MERLE *et al.*, 2015). A VA é ativada pela hidrólise espontânea do C3, o qual se liga ao Bb (resultante da clivagem do fator B) e a uma properdina gerando a formação da C3 convertase da via alternativa (SJÖBERG, *et al* 2009, MERLE *et al*, 2015). A VL, por sua vez, é ativada através da ligação de proteínas, denominadas lecitinas ligadoras de manose (MBL), a carboidratos presentes na superfície de microrganismos, formando um complexo chamado (MBL-MASP) com consequente ativação e clivagem do C2 e C4 o que, assim como na via clássica, gera a formação do complexo C3 convertase (WALLIS, 2007 e RUTKOWSKI *et al*, 2010).

Após a ativação de cada uma das 3 vias do sistema complemento, todas convergem a um ponto comum: formação dos complexos C3 convertases, os quais irão clivar o C3, componente central e mais abundante do sistema imune, convertendo-o da sua forma proteica inativa (C3) para suas formas funcionais C3a e C3b. O C3a é um mediador inflamatório, enquanto o C3b atua na opsonização, auxiliando na amplificação do sistema complemento e fagocitose (MERLE *et al.*, 2015). Além disso, C3b juntamente com os complexos C3 convertases previamente

formados, irão formar os complexos C5 convertases, que irão clivar o componente C5 nas suas formas C5a e C5b. O complexo de ataque a membrana (CAM) também chamado de complexo complemento terminal é então iniciado através da ligação dos componentes C6 e C7 ao C5b, com posterior ligação dos componentes C8 e C9. Por fim, o complexo CAM forma um poro inserindo-se na célula resultando na lise celular (RUTKOWSKI *et al.*, 2010; SARMA e WARD, 2011) (Figura 3).



**Figura 3.** Vias de ativação do complemento. (Adaptado RUTKOWSKI *et al.*, 2010)

A contribuição da cascata do complemento ao processo inflamatório agudo é bem estabelecida, assim como é reconhecido que ocorre contínua ativação e consumo das suas proteínas em estados de inflamação crônica (KOHL, 2001). As proteínas formadas durante a ativação da cascata, C3a e C5a, apesar de não serem responsáveis pela iniciação do processo inflamatório, são responsáveis pela promoção e perpetuação do mesmo (GUO e WARD, 2005).

Estudos vêm demonstrando uma forte associação entre infecção crônica, processo inflamatório e o desenvolvimento de neoplasias (COUSSENS e WERB, 2002; LIN e KARIN, 2007; RUTKOWSKI *et al.*, 2010 e ALLAVENA *et al.*, 2015). Acredita-se ainda que a cronicidade da inflamação determina o seu efeito sobre o câncer. Estados de inflamação aguda dificultam e impedem o desenvolvimento



neoplásico, enquanto a inflamação crônica atua facilitando o surgimento e desenvolvimento de tumores (MARKIEWSKI e LAMBRIS, 2009; GRIVENNIKOV *et al*, 2010). Como por exemplo, a utilização de forma abusiva de bebidas alcoólicas desencadeia um estado de inflamação no fígado e pâncreas e aumento do risco de desenvolvimento de câncer nesses órgãos. Da mesma forma, o fumo está relacionado à inflamação e ao desenvolvimento de câncer no pulmão e, na mesma linha, a exposição a agentes químicos é relacionada a um maior índice de inflamação e risco de desenvolvimento de neoplasias (LIN e KARIN, 2007).

Tendo em vista o potencial carcinogênico do benzeno (IARC, 2012), a avaliação de níveis de proteínas do complemento mostra-se uma potencial ferramenta como biomarcador precoce de dano causado por essa exposição, bem como poderá vir a auxiliar na elucidação do mecanismo de toxicidade e carcinogenicidade desse agente químico. Poucos estudos epidemiológicos avaliaram níveis de componentes do sistema complemento em trabalhadores expostos ao benzeno, entretanto SMOLIK e colaboradores (1973) demonstraram diminuição dos níveis de C3 e C4 em expostos ocupacionalmente ao benzeno.

### **3. Monitoramento**

Monitoramento é definido como uma atividade sistemática de medidas e interpretações e é realizado com o objetivo de prevenir o aparecimento de efeitos deletérios a saúde humana decorrentes de determinada exposição (MOREAU e SIQUEIRA, 2016). Há dois métodos de monitoramento possíveis para proteger a saúde humana em caso de exposição a substâncias químicas, o monitoramento ambiental e biomonitoramento, sendo que ambos se complementam na avaliação total da exposição sob a qual o indivíduo encontra-se exposto (MANNO *et al.*, 2010).

#### **3.1. Monitoramento ambiental**

No monitoramento ambiental, a exposição humana a xenobióticos pode ser diretamente estimada através da medida da concentração do agente químico, físico ou biológico em amostras ambientais, como ar, água, solo, etc. O monitoramento ambiental se faz necessário para identificar as fontes de exposição, facilitando a

tomada de medidas para minimizar as emissões (AMORIM, 2003; ANGERER *et al.*, 2007).

A ACGIH, recomenda como limite de exposição para o benzeno o Valor Limite de Limiar – Média Ponderada por Tempo (*TLV-TWA*), considerando média de exposição ponderada por tempo de 8 horas diárias de trabalho, 0,5 ppm. Enquanto a União Europeia estabelece esse limite em 1 ppm (ACGIH, 2014; DIRETIVA, 2000/69/EC).

Por outro lado, a agência federal dos EUA responsável pela realização de pesquisas e produção de recomendações para a prevenção de lesões e doenças relacionadas ao trabalho, o National Institute for Occupational Safety and Health (NIOSH), recomenda um valor-limite de exposição ocupacional ao benzeno de 0,1 ppm.

No Brasil, estabeleceu-se através da Norma Regulamentadora do Trabalho, nº 15 (NR-15) o Valor de Referência Tecnológico (VRT) de 1,0 ppm considerando a média ponderada de 8 horas diárias de jornada de trabalho para as empresas que produzem, transportam, armazenam, utilizam ou manipulam benzeno e suas misturas líquidas; e 2,5 ppm para as siderúrgicas.

Algumas organizações como, Environmental Protection Agency of United States e World Health Organization não estabelecem esses valores limites de exposição, mas apresentam níveis de risco de leucemia dependendo da exposição (EPA, 1997; WHO, 2000).

A EPA estabelece 5 µg/L como limite máximo para a concentração de benzeno para água potável, e o Brasil segue esse mesmo limite conforme regulamentado pela portaria nº 2914, de 12 de dezembro de 2011. Adicionalmente, o Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA), através da resolução nº 396, de 3 de abril de 2008, estabelece que o valor máximo de benzeno permitido em água para recreação é 10 µg/L.

### **3.2. Biomonitoramento**

O biomonitoramento consiste na medida de parâmetros químicos, bioquímicos ou biológicos denominados indicadores biológicos ou biomarcadores em amostras biológicas diversas, incluindo sangue, urina, entre outras (ANGERER *et al.*, 2007; BUDNIK e BAUER, 2009; MOREAU e SIQUEIRA, 2016). O principal objetivo do

biomonitoramento é avaliar a exposição e os riscos à saúde, comparando os dados obtidos com valores de referência e, se necessário, realizar ações corretivas (ANGERER *et al.*, 2007). Para tanto, é importante que haja uma correlação dos biomarcadores com a exposição ou com a eventual ação do xenobiótico no organismo (MOREAU e SIQUEIRA, 2016). Para a realização do biomonitoramento são utilizados três tipos de biomarcadores que são definidos como biomarcadores de exposição, biomarcadores de efeito e biomarcadores de suscetibilidade (AMORIM, 2003).

### **3.2.1. 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, que permita estimar o nível das substâncias químicas a que o indivíduo está exposto (AMORIM, 2003).

A Associação Brasileira de Higienistas Ocupacionais ratifica os limites preconizados pela ACGIH para o biomonitoramento de exposição ao benzeno (ACGIH, 2014). Portanto, no Brasil prescreve-se como biomarcadores da exposição ocupacional ao benzeno a determinação dos níveis de excreção de SPMA e *AtM*, em amostra de urina coletada ao final da jornada de trabalho, e estabelece como Índice Biológico de Exposição (BEI) os valores 25 µg/g de creatinina e 500 µg/g de creatinina, respectivamente (ACGIH, 2014 e BARATA-SILVA *et al.*, 2014).

O *AtM* urinário é um biomarcador sensível à exposição mesmo às baixas concentrações ambientais. No entanto, os níveis de excreção urinários do *AtM* podem sofrer influência resultante da ingestão de alimentos contendo ácido sórbico e seus sais, os quais são muito utilizados pela indústria alimentícia (PROTANO *et al.*, 2012; GAGNÉ, 2013 e CAMPAGNA *et al.*, 2014) e de bebidas alcoólicas (REKHADEVI *et al.*, 2011). Paralelamente, o tabagismo pode influenciar na excreção urinária do *AtM*, uma vez que há presença de benzeno na fumaça do cigarro (LOVREGLIO *et al.*, 2011). Entretanto, considera-se como maior limitação na utilização do *AtM* como biomarcador biológico de exposição, o fato de que exposições a baixas concentrações de benzeno podem gerar variações no nível de excreção na urina por conta das diferenças individuais no metabolismo que fazem com que a curva dose resposta não seja linear (COUTRIM *et al.*, 2000).

O SPMA é excretado na urina, assim como o *AtM*, sendo que apenas 0,11% do benzeno absorvido é metabolizado e excretado nesse produto. Uma vantagem desse biomarcador quando comparado ao *AtM* é o fato do SPMA não sofrer interferência da dieta, entretanto, o fumo continua sendo um fator confundidor (ACGIH, 2014). Tendo em vista a baixa concentração desse metabólito na urina, o método empregado para a sua determinação deve ser altamente sensível (BARATA-SILVA *et al.*, 2014).

Esses biomarcadores de exposição apresentam valor útil para o conhecimento da ocorrência da exposição ao agente químico, contudo, a relação entre a medida desses biomarcadores e os efeitos sobre a saúde não é direta uma vez que fatores ambientais e genéticos interferem nesse processo. Portanto, a avaliação de biomarcadores de efeito e de suscetibilidade genética são de extrema importância para o monitoramento da saúde de indivíduos expostos (CARBONARI *et al.*, 2016).

### **3.2.2. Biomarcadores de efeito**

A avaliação da interação entre o xenobiótico e os diferentes órgãos se dá através da investigação de parâmetros biológicos conhecidos como biomarcadores de efeito. Um biomarcador de efeito ideal é aquele que mede uma alteração biológica em um estágio ainda reversível (precoce), quando ainda não representa danos à saúde (AMORIM, 2003). Portanto, biomarcadores de efeito são entendidos como alterações bioquímicas, fisiológicas ou comportamentais, precoces e reversíveis, que podem ser mensuradas em amostras biológicas e se relacionam com a ação do xenobiótico no organismo (MOREAU e SIQUEIRA, 2016). Para avaliar tais biomarcadores, torna-se necessário o conhecimento da toxicodinâmica dos xenobióticos sobre o sistema biológico, sob os pontos de vista bioquímico e molecular (interação com macromoléculas) (OGA *et al.*, 2014).

Tendo em vista os efeitos hematotóxicos, amplamente reconhecidos e evidenciados da exposição ocupacional ao benzeno por inúmeros estudos, alterações nos parâmetros hematológicos são largamente utilizados como biomarcadores de efeito dessa exposição, entretanto, atualmente reconhece-se que esses parâmetros não são sensíveis a exposições crônicas a baixas concentrações de benzeno (SWAEN *et al.*, 2010).

Estudos vêm sendo realizados com o objetivo de compreender o completo mecanismo de toxicidade do benzeno e evidenciar biomarcadores de efeito precoces e sensíveis que possibilitem o monitoramento da saúde de indivíduos expostos a esse solvente. A maioria desses estudos estão focados na utilização de biomarcadores de estresse oxidativo, tendo em vista o reconhecimento de que a chave da toxicidade do benzeno reside no seu metabolismo com formação de metabólitos eletrofílicos juntamente com EROS responsáveis por danos diretos a biomoléculas orgânicas (lipídios, proteínas e DNA) e alterações em diferentes vias de sinalização celular.

Dentre os biomarcadores de efeito de estresse oxidativo encontram-se o principal produto da peroxidação lipídica MDA, enzimas do sistema antioxidante endógeno (CAT, SOD, GST e GPx), grupamentos tiólicos não proteicos (GSH). Adicionalmente, tendo em vista o conhecimento relativo à ação genotóxica da exposição ao benzeno, marcadores de dano ao DNA como aberrações cromossômicas, troca de cromátides irmãs também vêm sendo amplamente utilizados (ATSDR, 2015).

Além dos efeitos hematotóxicos, a imunotoxicidade do benzeno, bem como sua carcinogenicidade também são bem estabelecidos, portanto a evidenciação de biomarcadores precoces que possam auxiliar na identificação de danos reversíveis nesses sistemas podem ser úteis para monitorar a saúde de indivíduos ocupacionalmente expostos e auxiliar no esclarecimento dos mecanismos de toxicidade do benzeno.

### **3.2.3. Biomarcadores de suscetibilidade**

Os biomarcadores de suscetibilidade são indicadores de aumento da sensibilidade aos efeitos da exposição ocupacional que podem ser medidos objetivamente em um sistema ou em uma amostra (ARNOLD *et al.*, 2013; MOREAU e SIQUEIRA, 2016). A suscetibilidade genética pode afetar a resposta individual a xenobióticos, tanto no contexto ambiental como ocupacional e sabendo disso, um número crescente de estudos vêm avaliando a inter-relação da genética e a exposição aos xenobióticos na etiologia das doenças (DE PALMA e MANNO, 2014).

Os efeitos à saúde causados pelo benzeno ocorrem através da produção de metabólitos tóxicos, bem como por indução do estresse oxidativo com consequentes danos ao DNA. Portanto, três categorias principais de polimorfismos vêm sendo

estudadas e avaliadas para acessar suas influências frente à exposição ocupacional ao benzeno, sendo elas: (1) polimorfismos nas enzimas participantes da biotransformação do benzeno; (2) polimorfismos em genes envolvidos no estresse oxidativo, (3) polimorfismos em genes envolvidos nos mecanismos de reparo ao DNA (CARBONARI, *et al* 2016).

### **3.2.3.1. Polimorfismos enzimáticos na exposição ocupacional ao benzeno**

Muitas pessoas apresentam alterações em genes que codificam enzimas metabolizadoras de xenobióticos, ou seja, apresentam polimorfismos genéticos que aumentam ou diminuem a atividade destas enzimas explicando, em parte, diferenças individuais na sensibilidade aos efeitos tóxicos. Essas variações têm sido associadas a diferenças na toxicocinética de diferentes xenobióticos, o que pode modificar a dose ativa em órgãos alvo, eventualmente resultando em maior risco (suscetibilidade) de doenças relacionadas à exposição ambiental e ocupacional (BUDNIK e BAUER, 2009).

Genes que codificam as enzimas envolvidas na biotransformação do benzeno (CYP2E1 e GSTs) são altamente polimórficos, o que pode alterar a formação, concentração e excreção dos metabólitos desse solvente. Portanto, esses polimorfismos podem influenciar na toxicidade decorrente da exposição ocupacional ao benzeno (CHEN *et al.*, 2007; KIM *et al.*, 2007).

CYP2E1, um membro da superfamília do citocromo P450, está envolvido nas reações de biotransformação de fase I de inúmeras substâncias endógenas e exógenas (LU *et al.*, 2017). Ocorrência de inúmeros polimorfismos de nucleotídeos únicos (SNPs) tem sido reportada na literatura, entretanto, apenas mutações que resultam em alterações na atividade enzimática vêm sendo investigados, dentre elas está a troca de uma guanina por uma citosina (rs3813867) e a de uma citosina por uma timina (rs2031920) (HAN e ZHOU, 2000).

A glutathione S-transferase (GST) consiste em uma família de isoenzimas classificadas em grupos como alfa ( $\alpha$ ), mu ( $\mu$ ), omega ( $\omega$ ), pi ( $\pi$ ), theta ( $\theta$ ) e zeta ( $\zeta$ ), que são codificadas, respectivamente, pelos genes GSTA, GSTM, GSTO, GSTP, GSTT e GSTZ. Cada grupo consiste em uma ou mais isoenzimas com diferentes

substratos específicos (KOCH *et al.*, 2010). As GSTs estão envolvidas em muitas funções biológicas tendo como principal função a sua atuação na fase II do metabolismo no qual catalisam a conjugação da glutathiona (GSH) com uma variedade de compostos eletrofílicos, incluindo muitos agentes mutagênicos, carcinogênicos e seus metabólitos (ALI-OSMAN *et al.*, 1997).

Tem sido relatado que a GST possui pelo menos três genes com polimorfismos funcionais: GSTT1 ( $\theta$ ), GSTM1 ( $\mu$ ), e GSTP1 ( $\pi$ ), sendo que mutações em qualquer um deles podem levar a prejuízos na atividade enzimática (SONG *et al.*, 2016). A deleção genômica (alelo nulo) dos genes GSTT1 e GSTM1 pode resultar na completa ausência da atividade enzimática no organismo, enquanto o polimorfismo na GSTP1 causa uma redução na atividade enzimática (SAFARINEJAD *et al.*, 2011). Portanto, a deficiência ou alteração da atividade da enzima GST causada por polimorfismos genéticos representa uma maior suscetibilidade para o desenvolvimento de vários tipos de doenças incluindo diversos tipos de câncer (CARBONARI *et al.*, 2016; SONG *et al.*, 2016).

Wan e colaboradores (2002) demonstraram em seu estudo realizado com pacientes intoxicados por benzeno e trabalhadores expostos ocupacionalmente a esse solvente, que indivíduos portadores do polimorfismo da CYP2E1 (G/C) e com ausência do alelo GSTM1 (alelo nulo) tendem a ser mais suscetíveis aos efeitos tóxicos do benzeno. Por outro lado, Garte (2008) não encontrou associação entre o polimorfismo da GSTM1 e o número de aberrações cromossômicas estruturais quando avaliou trabalhadores de uma indústria petroquímica da Bulgária. Dougherty e colaboradores (2008), através de sua revisão sistemática, demonstraram que a presença de polimorfismos enzimáticos (CYP2E1, GSTM1 e GSTT1) podem apresentar efeitos tanto positivos quanto negativos na exposição ocupacional ao benzeno, o que pode ser explicado por conta da alta complexidade de metabolização deste solvente, com inúmeros possíveis genes alvo, produtos gênicos e mecanismos de *feedback* envolvidos no metabolismo e eliminação.

Além destes, polimorfismos em genes ligados aos mecanismos de reparo ao DNA também foram descritos como relacionados à suscetibilidade aos efeitos tóxicos do benzeno, tais como XRCC1 e APEX1 (CHANVAIVIT *et al.*, 2007; ANGELINI *et al.*, 2012). Considerando o dano ao DNA como parte chave dos mecanismos de toxicidade do benzeno, a avaliação de polimorfismos em genes envolvidos no reparo

aos danos de DNA, principalmente dano oxidativo, é parte fundamental na elucidação de biomarcadores de suscetibilidade à toxicidade desse solvente.

Adicionalmente, diferentes polimorfismos enzimáticos no gene codificante para a enzima  $\delta$ -ALA-D foram identificados até o momento. O polimorfismo do gene ALA-D mais estudado até o momento foi descoberto por Petrucci e colaboradores (1982) e é nomeado “ALAD G177C” (rs1800435). A mudança de um único alelo na posição 177 resulta na substituição da asparagina por uma lisina levando a formação de dois alelos (ALAD-1 e ALAD-2). Da Cunha Martins Jr e colaboradores (2015) demonstraram que a ocorrência desse polimorfismo enzimático resulta na inibição da atividade dessa enzima em indivíduos expostos ocupacionalmente ao chumbo. Resultados prévios publicados por nosso grupo de pesquisa (MORO *et al.*, 2015) demonstram inibição na atividade da  $\delta$ -ALA-D em indivíduos expostos ocupacionalmente ao benzeno, sugerindo essa enzima como potencial biomarcador precoce de dano hematológico decorrente dessa exposição. Portanto, a avaliação de polimorfismo no gene codificante para essa enzima, pode auxiliar na evidência de um potencial biomarcador de suscetibilidade frente aos efeitos hematotóxicos decorrentes da exposição a esse solvente.



## OBJETIVOS

---

### 1. Objetivo Geral

Avançar no conhecimento relacionado ao mecanismo de toxicidade do benzeno, com ênfase nos sistemas hematológico e imunológico, neste último com foco sobre as moléculas coestimulatórias, B7.1 e B7.2, e sua relação com a carcinogenicidade do benzeno, a fim de evidenciar potenciais biomarcadores precoces de dano. Bem como, avaliar a suscetibilidade dos indivíduos expostos ocupacionalmente ao benzeno através da avaliação de polimorfismos enzimáticos.

### 2. Objetivos Específicos

- Quantificar níveis de compostos BTX no ar sob os quais indivíduos encontram-se expostos ocupacionalmente;
- Quantificar biomarcadores urinários de exposição aos compostos BTX;
- Avaliar a expressão proteica em monócitos circulantes das moléculas coestimulatórias (B7.1 e B7.2) do sistema imunológico;
- Avaliar a expressão gênica das moléculas coestimulatórias (B7.1 e B7.2);
- Avaliar o sistema complemento do sistema imunológico;
- Avaliar expressão gênica do gene supressor tumoral p53;
- Quantificar biomarcadores de dano oxidativo e antioxidantes;
- Avaliar a atividade enzimática da  $\delta$ -ALA-D;
- Avaliar perfil de suscetibilidade individual a exposição ocupacional ao benzeno através dos polimorfismos enzimáticos: GSTs, CYP2E1, ALAD;



## PARTE II





## CAPÍTULO I

### **The role of B7 costimulation in benzene immunotoxicity and its potential association with cancer risk**

Manuscrito publicado na revista Environmental Research

(Environ Res., v.5 (166), p. 91 – 99, 2018)

---





Contents lists available at ScienceDirect

Environmental Research

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/envres](http://www.elsevier.com/locate/envres)

## The role of B7 costimulation in benzene immunotoxicity and its potential association with cancer risk



Elisa Sauer<sup>a,b</sup>, Bruna Gauer<sup>a,b</sup>, Sabrina Nascimento<sup>a,b</sup>, Jessica Nardi<sup>a,b</sup>, Gabriela Göethel<sup>a,b</sup>,  
 Bárbara Costa<sup>a</sup>, Douglas Correia<sup>a,b</sup>, Ursula Matte<sup>c</sup>, Mariele Charão<sup>d</sup>, Marcelo Arbo<sup>a,b</sup>,  
 Albert Duschl<sup>e</sup>, Angela Moro<sup>f</sup>, Solange Cristina Garcia<sup>a,b,\*</sup>

<sup>a</sup> Laboratório de Toxicologia (LATOX), Departamento de Análises, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brazil

<sup>b</sup> Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brazil

<sup>c</sup> Departamento de Genética, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

<sup>d</sup> Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Feevale, Novo Hamburgo, RS, Brazil

<sup>e</sup> Department of Molecular Biology, University of Salzburg, Salzburg, Austria

<sup>f</sup> Faculdade Especializada na Área de Saúde do Rio Grande do Sul, Passo Fundo, RS, Brazil

### ARTICLE INFO

#### Keywords:

Benzene  
 Early biomarkers  
 Toxicity  
 Immune system  
 Gene and protein expression

### ABSTRACT

Benzene is a recognized human carcinogen; however, there are still some gaps in the knowledge regarding the mechanism of toxicity of this organic solvent and potential early biomarkers for the damage caused by it. In a previous study, our research group demonstrated that the adhesion molecules of the immune system (B7.1 and B7.2) could be potential biomarkers in the early detection of immunotoxicity caused by benzene exposure. Therefore, this study was developed to deepen the understanding regarding this important topic, aiming to contribute to the comprehension of the benzene toxicity mechanism mediated by B7.1 and B7.2 and its potential association with the risk of carcinogenicity. B7.1 and B7.2 protein expression in blood monocytes and B7.1 and B7.2 gene expression in PBMCs were evaluated. Additionally, complement C3 and C4 levels in serum were measured, as well as p53 gene expression in PBMCs. Seventy-four gas station workers (GSW group) and 71 non-occupationally exposed subjects (NEG) were evaluated. Our results demonstrated decreased levels of B7.1 and B7.2 protein and gene expression in the GSW group compared to the NEG ( $n = 71$ ) ( $p < 0.01$ ). Along the same lines, decreased levels of the complement system were observed in the GSW group ( $p < 0.01$ ), demonstrating the impairment of this immune system pathway as well. Additionally, a reduction was observed in p53 gene expression in the GSA group ( $p < 0.01$ ). These alterations were associated with both the benzene exposure biomarker evaluated, urinary trans, trans-muconic acid, and with exposure time ( $p < 0.05$ ). Moreover, strong correlations were observed between the gene expression of p53 vs. B7.1 ( $r = 0.830$ ;  $p < 0.001$ ), p53 vs. B7.2 ( $r = 0.685$ ;  $p < 0.001$ ), and B7.1 vs. B7.2 ( $r = 0.702$ ;  $p < 0.001$ ). Taken together, these results demonstrate that the immune system co-stimulatory molecule pathway is affected by benzene exposure. Also, the decrease in p53 gene expression, even at low exposure levels, reinforces the carcinogenicity effect of benzene in this pathway. Therefore, our results suggest that the promotion of immune evasion together with a decrease in p53 gene expression may play an important role in the benzene toxicity mechanism. However, further and targeted studies are needed to confirm this proposition.

### 1. Introduction

More than thirty years have passed since benzene, an aromatic hydrocarbon, was classified for the first time as a Group I carcinogenic chemical by the International Agency for Research on Cancer (IARC) (International Agency for Research on Cancer, 2012). Despite the efforts of environmental regulatory agencies throughout the world to

reduce exposure, benzene still remains an important occupational and environmental pollutant, widely used as an industrial solvent and as a component of gasoline, representing a hazard of occupational concern (Thomas et al., 2014; Liu et al., 2016; Zhang et al., 2016).

Recent studies have shown that levels of benzene exposure have decreased considerably over the years, leading to exposure levels below the recommended limits and often lower than 0.1 ppm (Weisel, 2010;

\* Correspondence to: Avenida Ipiranga 2752, Santa Cecília, Porto Alegre, RS CEP: 90610-000, Brazil.

E-mail address: [solange.garcia@ufrgs.br](mailto:solange.garcia@ufrgs.br) (S.C. Garcia).

<https://doi.org/10.1016/j.envres.2018.05.029>

Received 30 January 2018; Received in revised form 24 May 2018; Accepted 26 May 2018  
 0013-9351/ © 2018 Elsevier Inc. All rights reserved.

Moro et al., 2015, 2017; Fenga et al., 2017). However, many recent studies have also shown that severe toxicity-related health effects caused by benzene exposure, especially hematotoxicity and genotoxicity, occur even at low levels of exposure, since there are no safe limits for exposure to carcinogenic agents (Snyder, 2012; Bahadar et al., 2014; Xiong et al., 2016). One of the main occupational risk groups is composed of gas station workers, who are chronically exposed to benzene during shifts at work (Galbraith et al., 2010; Moro et al., 2013, 2015, 2017; Mohammadyan et al., 2016).

Exposure to benzene is widely associated with the development of several alterations in the hematological system, involving all blood cells. This exposure can result in aplastic anemia (Baak et al., 1999; Linet et al., 2015), leukocytopenia, acute myeloid leukemia (Rinsky et al., 1987; Arnold et al., 2013; Rushton et al., 2014), myelodysplastic syndrome, and non-Hodgkin lymphoma (Lamm et al., 2005; Bassig et al., 2015; Switchenko et al., 2016). In addition, the proliferation of B and T-cells is also reduced by benzene exposure, altering the immune system response (ATSDR, 2007).

Recent studies have shown numerous early alterations in subjects occupationally exposed to benzene, even at low levels. These alterations include oxidative stress imbalance (Xiong et al., 2016; Costa et al., 2016; Fenga et al., 2016), hematotoxicity (Moro et al., 2015; Casale et al., 2016), immunotoxicity (Bogadi-Sare et al., 2000; ASTDR, 2007; Santiago et al., 2017), DNA damage (Göethel et al., 2014; Moro et al., 2013; Trevisan et al., 2014; Zhang et al., 2016), and carcinogenicity (International Agency for Research on Cancer, 2012). However, despite benzene immunotoxicity and carcinogenicity being well-known, the exact and whole mechanism that leads to these outcomes is not fully understood, and additional studies are needed to clarify it.

In order to further elucidate the effect of benzene toxicity on the immune system, a previous study was performed by our research group using workers occupationally exposed to low levels of benzene. The study demonstrated reduced expression of key molecules of the B7 pathway (B7.1/CD80 and B7.2/CD86) in monocytes, suggesting that exposure to this solvent is related to impairment of the adaptive immune system (Moro et al., 2015). The immune system plays a critical role in detecting and controlling the proliferation of tumor cells (Schreiber et al., 2011; Janakiram et al., 2016), and the B7 system acts irreversibly in combating neoplastic development, especially in immune evasion (Zhu et al., 2017). Along these same lines, tumor suppressor gene p53 is widely recognized as a protector against cancer cells, acting especially in cell cycle control, apoptosis, and carcinogenicity suppression (Harris, 1996; Marcel et al., 2011; Merkel et al., 2017). Additionally, the complement system, a major component of the humoral immune response, plays a crucial role in inflammatory response, and inflammation is involved in different stages of tumor progression (Coussens and Werb, 2002; Mamadi et al., 2017). There are no recent studies evaluating the complement system in individuals occupationally exposed to benzene.

Therefore, the aim of this study was to evaluate the effect of benzene exposure on the immune system, by evaluating B7.1 and B7.2 gene and protein expression and assessing the complement system protein levels in order to help unravel the benzene toxicity mechanism in the immune system. Additionally, benzene carcinogenicity was also evaluated, investigating possible alterations in gene expression of the tumor suppressor gene p53, in gas station workers occupationally exposed to benzene.

## 2. Material and methods

### 2.1. Study population

A total of 145 subjects were included in this study. Seventy-four gas station workers in the metropolitan region of the city of Porto Alegre, RS, Brazil, represent the occupationally exposed group (gas station workers - GSW), including 58 men and 16 woman. All subjects had been

working in their current job for at least 6 consecutive months. The non-occupationally exposed to benzene group (NEG) was composed of 71 male workers from administrative activities who live in the same region as the exposed group. Although the NEG group was not occupationally exposed to benzene, this is a global contaminant, so these workers may be in contact with benzene through environmental sources, such as car exhausts, cigarette smoke, and others (ATSDR, 2014).

Individuals with chronic diseases, except diabetes and hypertension, were not included in the study.

All the subjects answered a questionnaire about general health, lifestyle, smoking status, and history of exposure. This study was approved by the Research Ethics Committee of the Universidade Federal do Rio Grande do Sul (CAAE Registration no 47190615.6.3001.5327). Informed consent was obtained from each participant.

### 2.2. Sample collection

Blood and urine samples were obtained from all subjects participating in this study. The collection of samples was conducted at the end of their work shift, after at least three consecutive days of exposure. Venous blood samples were obtained by venipuncture. Two 2 mL blood tubes containing EDTA and one 4 mL blood tube without anticoagulant were collected and stored at 4–8 °C until the analyses. One EDTA tube was used for hemogram and adhesion molecule analyses, and the second tube with EDTA was used for RNA extraction. Serum for the complement system (C3 and C4) analyses was obtained from the tube without anticoagulant, after centrifugation for 10 min at 1500 ×g, at room temperature. Urine samples were stored at – 80 °C until the quantification of trans, trans-muconic acid (t, t-muconic acid), hippuric acid (HA), methylhippuric acid (mHA), phenylglyoxylic acid (PGA), and mandelic acid (MA) levels. Urine creatinine levels were analyzed before storage at – 80 °C.

### 2.3. Benzene and toluene environmental monitoring

Benzene, toluene, and xylene (BTX) exposure was evaluated using personal passive samplers (SKC 575-002). After collection, 2.5 mL of dichloromethane was added to each sampler and mixed for 30 min in a shaker. The desorbed BTX was transferred to a vial and analyzed using a gas chromatography - flame ionization detector (GC-FID; Varian, Middleburg, The Netherlands) and an OV-1 column (30 m x 0.32 mm x 1 µm). The carrier gas (helium) flow rate was 4 mL min<sup>-1</sup>. The initial oven temperature was set at 35 °C, maintained for 7 min, and then increased at 10 °C min<sup>-1</sup> up to 90 °C, which was maintained for 4 min, and after that increased at 30 °C min<sup>-1</sup> up to 150 °C, which was maintained until the end of the analysis (18.5 min total run). The retention times were 4.6 for benzene, 9.1 for toluene, and 12.0, 12.3, and 12.8 for o-, m-, and p-xylenes, respectively. The limits of detection (LOD) and quantification (LOQ) were 0.05 and 0.19 µg mL<sup>-1</sup>, respectively.

### 2.4. Biological monitoring of solvent exposure

Quantification of the urinary benzene metabolite (t, t-muconic acid) was carried out using high performance liquid chromatography with UV detection (HPLC-UV; Shimadzu<sup>®</sup>, USA) after solid-phase extraction (SPE), in accordance with Ducos et al. (1990), with some modifications previously described by Moro et al. (2015).

An evaluation of urinary levels of HA, mHA, PGA, and MA, metabolites of toluene, xylene, styrene, and ethylbenzene, respectively, were determined simultaneously using a HPLC-UV (Knauer<sup>®</sup>, German), in accordance with Bulcão et al. (2008).

The t, t-muconic acid levels were expressed as µg g<sup>-1</sup> creatinine and the HA, mHA, PGA, and MA levels as g g<sup>-1</sup> creatinine.

The urinary creatinine was quantified spectrophotometrically using a MindRay BS 120 biochemical analyzer (MindRay<sup>®</sup>, China) and commercial kits (BioClin<sup>®</sup>, Belo Horizonte, MG, Brazil).



### 2.5. Immune system biomarkers

EDTA-blood was used for assessing B7.1 and B7.2 expression in monocytes. The samples were incubated with PE-conjugated anti-B7.1 (Clone L307.4) and FITC-conjugated anti-B7.2 (Clone 2331 [FUN-1]) (BD Biosciences™, San Jose, CA, USA). BD FACS lysing solution was used following the manufacturer's instructions. The cells were immediately analyzed using the BD FACSVERSE™ Flow cytometer (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) and FACSuite software (Becton Dickinson, USA). Monocyte cells were identified by manual gating according to side scatter and size.

C3 and C4 serum levels were quantified in serum using a MindRay BS 120 (MindRay®, China) by means of the immunoturbidimetric method using commercial kits (BioClin®, Belo Horizonte, MG, Brazil).

### 2.6. B7.1, B7.2, and p53 real-time RT-PCR analysis

Determination of B7.1, B7.2, and p53 gene expression was performed via real-time RT-PCR analysis. Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were isolated from whole blood by Ficoll-Histopaque (Sigma Chemical Co, St Louis, MO) density gradient centrifugation. Briefly, blood samples were diluted with 8 mL of PBS solution, layered on Ficoll-Histopaque, and centrifuged at 400g for 30 min at room temperature. PBMCs were collected from the interface between plasma and Ficoll-Histopaque, washed with PBS buffer, resuspended in diethylpyrocarbonate (DEPC)-treated H<sub>2</sub>O, stored at –80 °C for a maximum period of 48 h, and used for RNA extraction.

Total RNA was extracted from the PBMCs using Trizol reagent (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), in accordance with the manufacturer's instructions. A NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, USA) was used to estimate concentration and to obtain the A260/A280 purity ratio. Samples with ratios between 1.8 and 2.0 were considered free of proteins and contaminants. Additionally, RNA integrity was assessed by means of standard denaturing agarose gel electrophoresis, visualizing RNA bands 18S and 28S. Only samples with a suitable purity and integrity were used for the gene expression analysis.

Prior to cDNA synthesis, total RNA was treated with DNase (Promega, Madison, Wisconsin, USA) for 30 min at 37 °C to digest genomic DNA remains. For cDNA synthesis, total RNA was transcribed using the High Capacity cDNA Reverse Transcriptase kit (Applied Biosystems, Darmstadt, Germany). The gene-specific TaqMan primers and probes were designed by Applied Biosystems (Foster City, CA). Three genes, B7.1 (Hs00175478\_m1), B7.2 (Hs01567026\_m1), and p53 (TP53) (Hs\_01034249\_m1), and the human housekeeping  $\beta$ -actin (ACTB) (Hs\_01060665\_g1) were examined.

Real-time reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) was carried out using the StepOne real-time PCR machine (Applied Biosystems, Foster City, CA), in triplicates in 48-well reaction plates. Real-time PCR reaction was performed in a total volume of 10  $\mu$ l reaction mix containing 5  $\mu$ l TaqMan® Gene Expression Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA), 3  $\mu$ l cDNA (3 ng/  $\mu$ l), 0.5  $\mu$ l of each TaqMan® Gene Expression Assay (Applied Biosystems, Foster City, CA), and 1  $\mu$ l PCR-grade water per well. The cycling conditions were as follows: initial holding period at 95 °C for 10 min, followed by a two-step PCR program consisting of 95 °C for 15 s and 60 °C for 1 min, for 40 cycles. Reverse transcriptase negative controls and "no template controls" (without cDNA in PCR) were included. The data were collected and quantitatively analyzed using the StepOne™ Software v2.1.

The comparative Ct values were normalized to the  $\beta$ -actin reference gene expression, and the  $\Delta\Delta$ Ct (fold change) value was calculated using the  $\Delta$ Ct values of each sample and the median  $\Delta$ Ct values in the non-occupationally exposed group.

### 2.7. Hematological parameters

Hematological analyses (hemoglobin, hematocrit, red blood cells, white blood cells, and platelet counts) were performed in whole blood collected with EDTA by a hematology analyzer (ABX Pentra XL 80 Horiba®, France).

### 2.8. Statistical analysis

The data were analyzed using the IBM SPSS Statistics software (version 22). A normality test was used to check data distribution, and each variable was evaluated using the Shapiro-Wilk test. Comparisons between the groups were carried out using the Student *t*-test and Mann-Whitney *U*-test. The results are expressed as mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM) or median (interquartile range), according to the distribution of the variables. Analyses of covariance (ANCOVA) were used to assess differences between groups and examine the influence of confounding factors (age, gender, smoking and drinking habits, and physical activity practice), followed by Bonferroni's post hoc test. Partial correlation was carried out to evaluate the associations between pairs of variables with a control for confounding factors.

A multiple linear regression model was applied to assess the major influencer (time exposure, *t*, *t*-muconic acid, or airborne benzene) on the biomarkers of effect considering the confounding factors and co-exposure to toluene. Variables with a non-normal distribution were log transformed to be included in the ANCOVA, partial correlations analysis, and multiple linear regression model. The level of significance used for all statistical tests was set at 5%.

## 3. Results

The main characteristics of the study population, according to the questionnaire applied, are reported in Table 1. Significant differences were observed for age, gender, smoking and drinking habits, and physical activity practice between groups. Therefore, analysis of covariance (one-way ANCOVA) was used to verify the differences between the groups for urinary biomarkers of exposure as well as for all effect biomarkers evaluated. Age, gender, smoking and drinking habits, and physical activity practice were included as covariates.

The results of the environmental and biological exposure assessment are described in Table 2. The concentrations of airborne benzene and toluene were significantly increased in the GSW group compared to the non-occupationally exposed group (*p* < 0.001). Similarly, a significant increase was found in the levels of urinary biomarkers of benzene and

**Table 1**  
Characteristics of the study population.

	NEG (n = 71)	GSW (n = 74)
Time of occupational exposure (months)	NA	35.77 $\pm$ 7.15
Age (years)	44.08 $\pm$ 1.30	33.81 $\pm$ 1.34 <sup>a</sup>
Men (n)	71 (100%)	58 (78.38%) <sup>b</sup>
Women (n)	0 (0%)	16 (21.62%) <sup>b</sup>
Smokers [n (%)]	5 (6.84%)	16 (21.62%) <sup>b</sup>
Occasional alcohol drinkers [n (%)]	54 (76.05%)	35 (47.29%) <sup>c</sup>
Physical activity practice [n (%)]	40 (56.30%)	27 (36.50%) <sup>b</sup>

Results of time of exposure and age are expressed as mean  $\pm$  SEM.

NA (not applicable).

NEG (non-occupationally exposed group).

GSW (gas station workers).

[n (%)]: total number found per group, with the percentage in parenthesis.

<sup>a</sup> *p* < 0.001 compared to non-occupationally exposed group (Mann-Whitney *U*-test).

<sup>b</sup> *p* < 0.05 compared to non-occupationally exposed group (Chi-squared test).

<sup>c</sup> *p* < 0.001 compared to non-occupationally exposed group (Chi-squared test).

**Table 2**  
Airborne benzene and toluene and urinary biomarkers.

	NEG (n = 71)	GSW (n = 74)
Benzene (mg m <sup>-3</sup> )	0.040 (0.0 – 0.09)	0.216 (0.140 – 0.406) <sup>a</sup>
Toluene (mg m <sup>-3</sup> )	0.149 (0.123 – 0.226)	0.402 (0.250 – 0.559) <sup>a</sup>
t,t-muonic acid (μg g <sup>-1</sup> creatinine)	74.3 (40.9 – 114.9)	243.7 (106.1 – 617.8) <sup>b</sup>
Hippuric acid (g g <sup>-1</sup> creatinine)	0.15 (0.1 – 0.3)	0.51 (0.3 – 0.7) <sup>b</sup>
Methylhippuric acid (g g <sup>-1</sup> creatinine)	NF	NF
Mandelic acid (g g <sup>-1</sup> creatinine)	NF	NF
Phenylglyoxylic acid (g g <sup>-1</sup> creatinine)	NF	NF

Results are expressed as median (interquartile range).

NF (not-found).

NEG (non-occupationally exposed group).

GSW (gas station workers).

<sup>a</sup>  $p < 0.001$  compared to non-occupationally exposed group (Mann-Whitney U-test).

<sup>b</sup>  $p < 0.001$  compared to non-occupationally exposed group (ANCOVA one-way).

toluene, t, t-muonic acid, and hippuric acid, respectively, in the GSW group compared to the non-occupationally exposed workers ( $p < 0.001$ ).

The gasoline station workers were exposed to significantly higher airborne benzene and toluene levels than the individuals in the non-occupationally exposed group ( $p < 0.001$ ). Hence, the median t, t-muonic acid and hippuric acid values were higher in the exposed group compared to the non-occupationally exposed group. However, the levels of the biomarkers for both groups were below the limits established by ACGIH (500 μg g<sup>-1</sup> creatinine and 1.6 g g<sup>-1</sup> creatinine, respectively). On the other hand, the individual data showed that 25 individuals (33.78%) from the GSW presented higher values than those recommended by ACGIH (500 μg g<sup>-1</sup> creatinine) (ACGIH, 2014), while none of the non-occupationally exposed group exceeded these values (Fig. 1A).

In relation to hippuric acid, 3 individuals (4.22%) from the GSW group and none from the non-occupationally exposed group presented higher values than those recommended by ACGIH (1.6 g g<sup>-1</sup> creatinine). Moreover, no detectable levels were found for the metabolites of xylene, styrene, and ethylbenzene for both groups.

Spearman's correlation showed an association between the airborne levels of benzene and toluene ( $r = 0.434$ ,  $p < 0.001$ ). Partial correlations were performed using all the participants from both groups studied as a single sample. Age, gender, smoking and drinking habits, and physical activity practice were applied as covariates to control the associations between the biomarkers and these possible confounding factors. Airborne benzene levels were correlated with the urinary levels of t, t-muonic acid ( $r = 0.410$ ;  $p < 0.01$ ) (Fig. 1B), and the t, t-muonic acid levels were correlated with the exposure time ( $r = 0.566$ ;  $p < 0.001$ ). Urinary t, t-muonic acid and HA levels were positively

correlated ( $r = 0.372$ ;  $p < 0.001$ ). The time of exposure was positively correlated with urinary HA excretion ( $r = 0.320$ ;  $p < 0.001$ ). No correlation was observed between toluene levels and HA excretion.

In relation to the immune system biomarkers, the results for the B7.1 and B7.2 expression in monocytes are shown in Fig. 2. A significant reduction in the expression of B7.1 ( $1.09 \pm 0.05\%$ ) and B7.2 ( $77.34 \pm 1.34\%$ ) was found in the GSW group when compared to the non-occupationally exposed group ( $1.54 \pm 0.06\%$  and  $95.28 \pm 0.49\%$ , respectively;  $p < 0.001$ ) (Fig. 2).

A significant decrease in the C3 ( $128.63 \pm 2.68$  mg/dL) and C4 ( $22.11 \pm 0.55$  mg/dL) complement fraction levels was observed in the GSW group in relation to the NEG ( $139.20 \pm 2.08$ ;  $28.83 \pm 0.85$  mg/dL respectively;  $p < 0.001$ ) (Fig. 3).

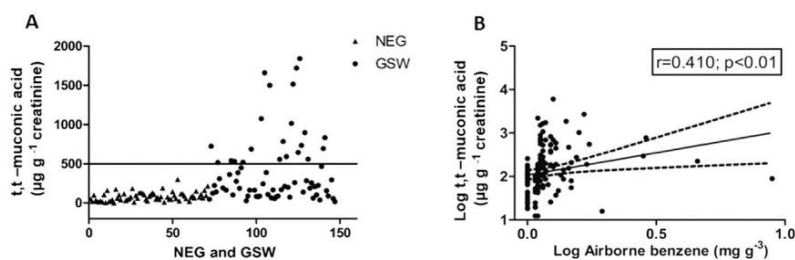
Fold change (FC) values from the gene expression analysis are shown in Fig. 4. Corroborating with the results found in the evaluation of the phenotypic expression of the adhesion molecules B7.1 and B7.2, a significant reduction was also observed in genotype expression of B7.1 ( $1.69 \pm 0.33$  FC) and B7.2 ( $1.39 \pm 0.18$  FC) in the GSW group compared to the non-occupationally exposed group ( $2.51 \pm 0.64$  and  $1.56 \pm 0.18$  FC,  $p < 0.05$ ). In addition, the tumor suppressor gene p53 showed a significant fold change decrease in the GSW group ( $1.22 \pm 0.24$  FC) in relation to the non-occupationally exposed group ( $2.69 \pm 0.69$  FC) ( $p < 0.01$ ).

Regarding the hematological assessment, the results were within the reference values, in accordance with previous results published by our research group (Moro et al., 2015, 2017) (data not shown).

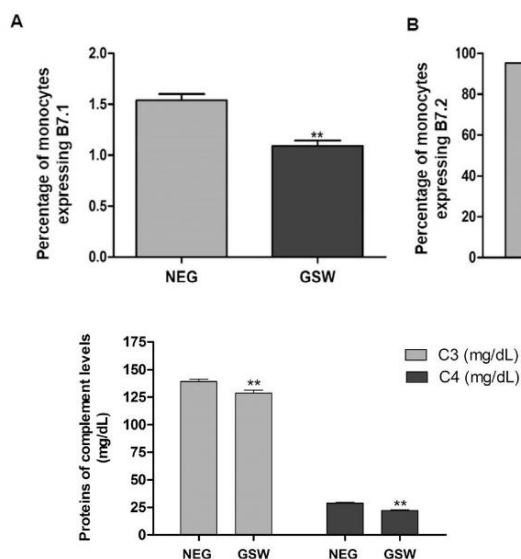
Additional partial correlations, controlled by age, gender, smoking and drinking habits, and physical activity practice, were found between time of exposure, t, t-muonic acid, and airborne benzene with biomarkers of effect ( $p < 0.05$ ), as showed in Table 3. No correlations were observed between toluene airborne levels and HA levels with the biomarkers of effect tested. B7.1 and B7.2 were inversely associated with urinary t, t-muonic acid excretion and exposure time ( $p < 0.05$ ). The fold change values presented negative correlations with t, t-muonic acid, time of exposure, and airborne benzene. The C3 serum levels were negatively associated with exposure time only, while the C4 serum levels were negatively associated with t, t-muonic acid only.

In addition, strong partial correlations were found between gene expressions of p53 vs. B7.1 ( $r = 0.830$ ;  $p < 0.001$ ), p53 vs. B7.2 ( $r = 0.685$ ;  $p < 0.001$ ), and B7.1 vs B7.2 ( $r = 0.702$ ;  $p < 0.001$ ) (Fig. 5ABC, respectively).

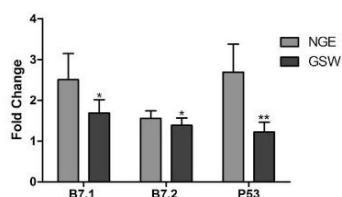
Multiple linear regression models are shown in Table 4. In this model, occupational co-exposure to toluene was also considered. In relation to the phenotypic expression of B7.1 in monocytes, the best-fit model showed that exposure time was the only factor that contributed to the decrease in the expression of this adhesion molecule in the monocytes. Meanwhile, for the B7.2 expression in monocytes, the best predictor was urinary t, t-muonic acid excretion. Airborne benzene levels were modeled as the best predictor for the reduction in B7.1 and B7.2 fold change values. For the p53 fold change values, the best predictor was exposure time.



**Fig. 1.** (A) Individual urinary levels of trans, trans-muonic acid (t, t-muonic acid) of non-occupationally exposed group (NEG) (n = 71) and gas station workers (GSW) (n = 74). (B) Partial correlation between log-transformed urinary levels of t, t-muonic acid (μg g<sup>-1</sup> creatinine) and log-transformed airborne benzene levels (mg m<sup>-3</sup>) ( $r = 0.410$ ;  $p < 0.01$ ) (n = 145) controlled by age, gender, smoking and drinking habits, and physical activity practice.



**Fig. 3.** Serum levels of C3 and C4 (mg/dL) of non-occupationally exposed group (NEG) (n = 71) and gas station workers (GSW) (n = 74). Results are expressed as mean  $\pm$  SEM.  $^{**}p < 0.001$  in relation to the non-occupationally exposed group compared using one-way ANCOVA controlled by age, gender, smoking and drinking habits, and physical activity practice.



**Fig. 4.** B7.1, B7.2, and p53 gene expressions in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs). Results are expressed as mean  $\pm$  SEM. NEG (non-occupationally exposed group) (n = 71); GSW (gas station workers) (n = 74).  $^{*}p < 0.05$  and  $^{**}p < 0.01$  compared to non-exposed group using one-way ANCOVA controlled by age, gender, smoking and drinking habits, and physical activity practice. Fold change results were obtained through real time RT-PCR analysis and calculated as  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  and  $\Delta\Delta Ct$  calculated using  $\Delta Ct_1$  (Target gene Ct – Beta-Actin Ct) –  $\Delta Ct_2$  ( $\Delta Ct_1$  control group mean).

#### 4. Discussion

Despite the recognized carcinogenic effects of occupational exposure to benzene, the exact mechanisms by which this organic solvent exerts its toxicity are only partially understood. It is well known that during benzene biotransformation, toxic metabolites and reactive

oxygen species are generated, and that the excess of these substances can result in oxidative stress, which can produce alterations in organic molecules such as DNA, and are able to interfere in signaling pathways (Wan et al., 2005; Bahadar et al., 2014). However, the action of benzene in immunological signaling pathways, cell cycle control, apoptosis, and carcinogenicity suppression is not well understood. Therefore, the discovery of new early biomarkers, which may help to identify precocious immunological alterations, could be essential to clarify the benzene toxicity mechanisms in the immune system and its carcinogenic action, and could be useful for monitoring the health of occupationally exposed individuals.

Many studies have attempted to elucidate the benzene carcinogenicity mechanism (Snyder, 2012; Thomas et al., 2014; Trevisan et al., 2014; Loomis et al., 2017). However, most of them use only classic effect biomarkers. A previous study by our group showed that the adhesion molecules of the immune system (B7.1 and B7.2) may be potential biomarkers in the early detection of immunotoxicity caused by occupational exposure to benzene (Moro et al., 2015). In order to deepen the understanding of these previous findings, this study evaluated other possible early markers of benzene toxicity, to improve the knowledge regarding its toxic effects on important control and signaling pathways, which could be involved in the mechanisms of immunotoxicity and carcinogenicity caused by this organic solvent.

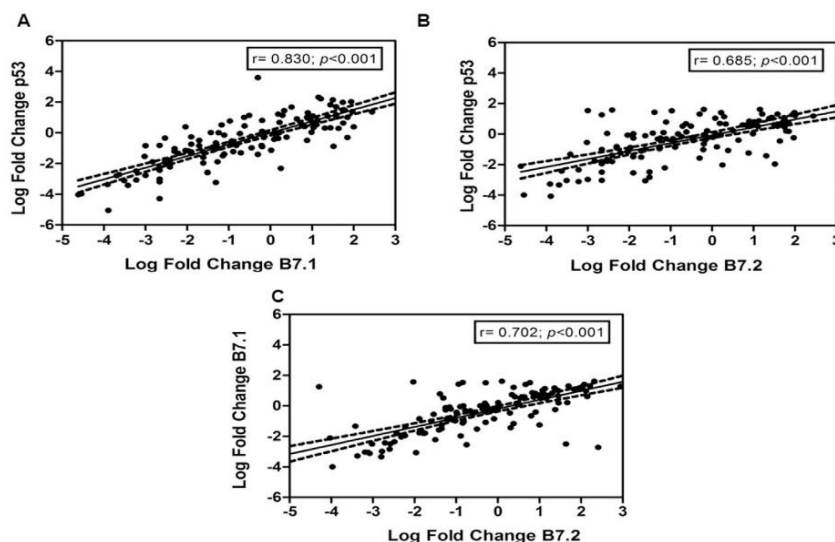
Our results showed that the GSW were exposed to higher airborne levels of benzene and toluene compared to the non-occupationally exposed group. However, the levels of benzene and toluene were much lower than those recommended by ACGIH (ACGIH, 2014), characterizing low-level exposure to these organic solvents. Our results are in accordance with previous studies that have also found airborne benzene and toluene concentrations lower than recommended by ACGIH (Moro et al., 2013, 2015, 2017; Li et al., 2017; Xiong et al., 2016).

Regarding the biomarkers of exposure, our data showed that the urinary t, t-muconic acid, biomarker of exposure to benzene, was increased in the GSW compared to the NEG. Although the median values were within the values preconized by ACGIH (BEI:  $500 \mu\text{g g}^{-1}$  creatinine), 33.78% of the exposed individuals presented levels above those recommended by ACGIH (ACGIH, 2014). On the other hand, according to the findings for HIA, a biomarker of exposure to toluene, only 3 participants presented levels above those established by ACGIH (BEI:

**Table 3**

Partial correlations between t, t-muconic acid and time of occupational exposure versus biomarkers of effect.

	Log t,t-muconic acid ( $\mu\text{g g}^{-1}$ creatinine)		Log airborne benzene exposure ( $\mu\text{g m}^{-3}$ )		Log time of occupational exposure (months)	
	r	p-values	r	p-values	r	p-values
B7.1 in monocytes (%)	-0.296	< 0.05	-	-	-0.481	< 0.001
B7.2 in monocytes (%)	-0.304	< 0.01	-	-	-0.210	< 0.05
Log fold change B7.1	-0.311	< 0.01	-0.300	< 0.01	-0.264	< 0.01
Log fold change B7.2	-0.222	< 0.05	-0.254	< 0.01	-0.233	< 0.01
Log fold change P53	-0.268	< 0.01	-0.246	< 0.01	-0.283	< 0.001
C3 (mg/dL)	-	-	-	-	-0.241	< 0.01
C4 (mg/dL)	-0.236	< 0.05	-	-	-	-



**Fig. 5.** Partial correlation between log-transformed fold changes (FC) of gene expression. (A) Log FC of p53 gene expression and log FC of B7.1 gene expression ( $r = 0.830$ ;  $p < 0.001$ ); (B) Log FC of p53 gene expression and log FC of B7.2 gene expression ( $r = 0.685$ ;  $p < 0.001$ ); and (C) Log FC of B7.1 gene expression and log FC of B7.2 gene expression ( $r = 0.702$ ;  $p < 0.001$ ), all controlled by age, gender, smoking and drinking habits, and physical activity practice.

1.6 g g<sup>-1</sup> creatinine; ACGIH); however the concentration in the GSW group was higher compared to the NEG. Positive partial correlations between benzene and toluene airborne concentration, and a positive Spearman's correlation between t, t-muconic acid and HA urinary levels, suggest a common source of exposure, which is usually observed at gas stations and was already observed in our previous study (Moro et al., 2015). However, it is possible to observe that the alterations in effect biomarkers were due to occupational exposure to benzene, as demonstrated by the presented data from the partial correlations and the multiple linear regression models.

Recent studies have demonstrated immunotoxicity and hematotoxicity even at low levels of benzene exposure (International Agency for Research on Cancer, 2012; Bahadar et al., 2014; Casale et al., 2016; Moro et al., 2013, 2015). Our results for costimulatory molecules also suggest that benzene may act in the immune system of occupationally exposed individuals. The B7.1 and B7.2 protein expression data showed lower levels in the GSW group monocytes compared to the non-occupationally exposed group, and these reduced levels were associated with higher levels of exposure to benzene, corroborating the findings of the recent study by our research group (Moro et al., 2015).

Additionally, for the first time, gene expression of the costimulatory molecules B7.1 and B7.2 was evaluated, and a lower relative mRNA expression ( $2^{\Delta\Delta Ct}$ ) of B7.1 and B7.2 was observed in workers exposed to low benzene levels compared to the NEG. These results show that the alteration of this pathway of the immune system occurs at a pre-transcriptional level and not only at the protein level in blood. The B7 system is one of the most important signaling mechanisms and plays crucial roles in the regulation of adaptive cellular immunity (Greaves and Gribben, 2013; Baumeister et al., 2016). B7.1 and B7.2 are recognized as the major costimulatory molecules of the immune system and bind to the T cell stimulating receptor CD28. When expression levels of these costimulatory molecules are decreased, the CD28 receptor is replaced by receptors CTL4 and PD-1, with inhibitory actions in this signaling pathway. That is, the expression level of costimulatory molecules influences the differential coupling of CD28 or CTL4 and PD-1, which in turn determines whether the response will be initiated or terminated (Abbas et al., 2014; Schildberg et al., 2016). The absence or depletion of these costimulatory molecules of this system results in a decrease in immune response, or in the production of anergic T cells, culminating in inefficient immune surveillance (Hanahan and

**Table 4**  
Multiple linear regression models.

	B7.1 in monocytes (%) R <sup>2</sup> = 0.289		B7.2 in monocytes (%) R <sup>2</sup> = 0.214		Log FC B7.1 R <sup>2</sup> = 0.110		Log FC B7.2 R <sup>2</sup> = 0.072		Log FC p53 R <sup>2</sup> = 0.134	
	$\beta$	p-values	$\beta$	p-values	$\beta$	p-values	$\beta$	p-values	$\beta$	p-values
Log exposure time (months) <sup>a</sup>	-0.394	0.002	-0.040	0.672	-0.179	0.074	-0.108	0.267	-0.266	0.008
Log t,t-muconic acid ( $\mu\text{g g}^{-1}$ creatinine) <sup>b</sup>	-0.034	0.716	-0.242	0.007	-0.178	0.071	-0.108	0.267	-0.074	0.443
Log HA ( $\mu\text{g g}^{-1}$ creatinine) <sup>b</sup>	0.018	0.849	-0.016	0.123	0.008	0.932	-0.078	0.404	-0.092	0.335
Log airborne benzene ( $\mu\text{g m}^{-3}$ )	0.047	0.576	-0.016	0.849	-0.202	0.025	-0.191	0.028	-0.179	0.043
Log airborne toluene ( $\mu\text{g m}^{-3}$ )	-0.104	0.206	-0.012	0.886	0.148	0.090	0.125	0.136	0.173	0.144
Gender <sup>b</sup>	0.025	0.779	-0.143	0.181	0.153	0.101	0.056	0.535	0.029	0.749
Age (years) <sup>a</sup>	0.107	0.257	0.183	0.056	-0.054	0.583	-0.079	0.413	0.033	0.735
Smoking <sup>b</sup>	0.040	0.633	0.018	0.829	0.030	0.734	0.066	0.438	0.064	0.460
Chronic disease <sup>b</sup>	0.107	0.227	0.143	0.110	0.120	0.198	0.152	0.092	0.012	0.895

FC: Fold change.

<sup>a</sup> Continuous variable.

<sup>b</sup> Categorical variable.

Weinberg, 2011; Dolan and Esendagli, 2013). Tumor immune evasion is one of the hallmarks of cancer and the expression of immune checkpoints is an important mechanism of immune evasion (Janakiram et al., 2016). Accordingly, alterations in the expression of B7.1 and B7.2, as observed in our results in the individuals occupationally exposed to benzene, are considered one of the main mechanisms of escape for tumor cells in relation to immune surveillance. Therefore, this could be one of the pathogenic mechanisms of some types of cancers, including leukemia (Dolan and Esendagli, 2013; Upadhyay et al., 2015). Our results demonstrate that this may be one of the body's defense signaling pathways that may be modified through occupational exposure to benzene and that could contribute to the development of benzene immunocarcinogenic effects, since it is known that the immune system is highly involved in carcinogenesis. However, additional and further studies are needed to confirm this.

The complement system, a key component of innate immunity, not only participates in inflammation but also acts to enhance the adaptive immune response, connecting - like a bridge - the innate immune system and the adaptive immune system (Carroll and Iseman, 2012). Among the numerous proteins, complement system, C3, and C4 are crucial components (Dunkelberger and Song, 2010). C3 deficiency results in injury to all functions of this system, while C4 deficiency results in a failure to activate its classical pathway (Kumar et al., 2015). In our study, we observed reduced C3 and C4 serum levels in the GSW group compared to the NEG, demonstrating impairment in this fundamental immune system pathway in the occupationally exposed individuals. Additionally, in states of chronic inflammation, the continuous activation and consequent consumption of the proteins of the complement system occur, possibly explaining this alteration in the GSW group (Guo and Ward, 2005). During the last decade, the relationship between inflammation and the development of cancer has been discussed, as well as the fact that the chronicity of inflammation determines its effect on cancer (Balkwill and Mantovani, 2001; Karin et al., 2006; Rutkowski et al., 2010). In fact, clinical medicine has shown that individuals chronically exposed to toxic agents develop chronic inflammation, significantly increasing the risks of developing different types of cancer (Lin and Karin, 2007). Moreover, as previously described by Afshar-Kharghan (2017), the complement activation in the tumor micro-environment may promote tumor growth and metastasis. Nevertheless, the role of inflammation in cancer is very complex and future studies associating the complement system with specific inflammatory markers may help to elucidate this possible pathway of the benzene toxicity mechanism.

Our partial correlation results showed that C3 and C4 levels were associated with exposure time and urinary levels of t, t-muconic acid, respectively, demonstrating that this alteration in the GSW group could be related to occupational exposure to benzene. Our results are in accordance with a prior study conducted by Smolik et al. (1973), which also found decreased levels of C3 and C4 when there was exposure to benzene. However, our study showed, for the first time, the association between C3 and C4 levels and both exposure time and urinary biomarkers for low levels of exposure.

In fifty percent of tumors in humans, the tumor suppressor gene p53 presents mutations, and these alterations are associated with a poor prognosis and treatment failure (Harris, 1996; Vousden and Lu, 2002; Toledo and Wahl, 2006; Chi, 2016). p53 downregulation is the foundation of most tumors and its inactivation confers a predisposition to cancer (Shafi, 2016). Some studies, using animal models, have demonstrated that p53 plays an important role in the toxicity mechanism for benzene exposure (Boley et al., 2002; Yoon et al., 2003; Kawasaki et al., 2009). p53 acts as a genome guardian through cell cycle arrest, induction of apoptosis (induction of pro-apoptotic gene transcription), and transactivation of DNA repair genes (Efeyan and Serrano, 2007). Therefore, in this study, p53 gene expression was evaluated in order to assess this other defense mechanism of the body against cancerous development. Lower p53 expression was observed in the GSW group

compared to the non-occupationally exposed group, indicating probable impairment in this control pathway against neoplastic growth in the GSW group. Our results corroborate with previous findings by Sun et al. (2009), who evaluated the levels of mRNA expression of p53 in Chinese workers exposed to benzene, and found lower levels of p53 compared to non-occupationally exposed workers.

Interestingly, our data from the partial correlation model showed that mRNA expressions of B7.1, B7.2, and p53 were positively associated with each other. The GSW evaluated in this study presented a reduction in two important guards against tumor development, i.e., immune surveillance, which prevents tumor development of malignant cells; and a tumor suppressor gene, which promotes, when necessary, DNA repair or cell death. These findings suggest the immune system fragility caused by occupational exposure to benzene plays a key role.

In turn, the fold change values of B7.1, B7.2, and p53 were associated with t, t-muconic acid, airborne benzene levels, and exposure time. According to the multiple linear regression analysis, airborne benzene levels were the only factor that significantly contributed to reduced mRNA levels of B7.1 and B7.2. On the other hand, for the mRNA levels of p53, the best predictor was exposure time. Therefore, the results reinforce the hypothesis that benzene is toxic for the immune system and occupational exposure time is important in producing alterations in the tumor suppressor gene p53.

Our study has some limitations. The most important is the lack of matching populations due to the difficulty in obtaining volunteer participants for this study. The exclusion of some participants to obtain a more homogenous sample would substantially reduce the number of subjects, therefore, the statistical analyses were controlled (ANCOVA) to rule out possible influences of these differences in the study population. Also, the assessment of urinary S-phenylmercapturic acid could enrich the findings of this study to better characterize exposure to low levels of benzene, since this metabolite is a more specific and sensitive biomarker compared to t, t-muconic acid (Lovreglio et al., 2013).

## 5. Conclusion

Our results show impairment of the immune system, observed through reduced B7.1 and B7.2 protein and gene expressions, a reduction in C3 and C4 of the complement system, and reduced gene expression of the tumor suppressor gene p53, in workers occupationally exposed to benzene, even at low levels of exposure. These are important findings, since changes were observed in highly relevant signaling pathways in the development of carcinogenesis. These initial results may contribute to elucidating possible toxicity mechanisms (immunotoxicity and carcinogenicity) arising from this exposure. However, additional and further studies are needed to clarify the involvement of these factors in benzene toxicity, including studies using cell cultures and animals. Also, our study contributes to suggesting new markers that can be used in clinical practice in the future to diagnose early benzene-induced damage, contributing to safety measures and a higher quality of life for occupationally exposed workers.

## Acknowledgments

The authors would like to thank all the participants who volunteered for this study. This work was supported by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio Grande do Sul, through the grants provided to S.C. Garcia. Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (CAPES) gave a Ph.D. research fellowship to Elisa Sauer. Solange C Garcia received a CNPq research fellowship.

## Conflict of interest

The authors declare that there are no conflicts of interest.

## Funding sources

This study was supported by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Brazil (granted to S.C. Garcia; Process no. 485342/2013-8), and Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio Grande do Sul (FAPERGS) (granted to S.C. Garcia; Process no. PPSUS process 1207-2551/13-9), via a grant to SC Garcia.

The study was approved by the Research Ethics Committee of the Universidade Federal do Rio Grande do Sul (CAAE Registration no 47190615.6.3001.5327).

## References

- Abbas, A.K., Lichtman, A.H., Pillai, S., 2014. Cellular and Molecular Immunology. Elsevier Health Sciences.
- ACGIH, 2014. TLVs and BEIs based on the documentation of the threshold limit values for chemical substances and physical agents and biological indices. In: Proceedings of the American Conference of Governmental Industrial Hygienists, Cincinnati.
- Afshar-Kharghan, V., 2017. The role of the complement system in cancer. The Journal of clinical investigation. Am. Soc. Clin. Investig. 127 (3), 780–789.
- Arnold, S.M., Angerer, J., Boogaard, P.J., Hughes, M.F., O'Lone, R.B., Robison, S.H., Robert Schnatter, A., 2013. The use of biomonitoring data in exposure and human health risk assessment: benzene case study. Crit. Rev. Toxicol. 43, 119–153.
- ATSDR, 2014. – Agency for Toxic Substances and Disease Registry. Case studies in Environmental Medicine: Benzene toxicity. Atlanta, Georgia: Agency for Toxic Substances and Disease Registry.
- ATSDR, 2007. – Agency for Toxic Substances and Disease Registry. Toxicological Profile for Benzene. Atlanta, Georgia: Agency for Toxic Substances and Disease Registry.
- Baak, Y.M., Ahn, B.Y., Chang, H.S., Kim, J.H., Kim, K.A., Lim, Y., 1999. Aplastic anemia in a petrochemical factory worker. Environ. Health Perspect. 10, 851.
- Bahadar, H., Mostafalou, S., Abdollahi, M., 2014. Current understandings and perspectives on non-cancer health effects of benzene: a global concern. Toxicol. Appl. Pharmacol. 276, 83–94.
- Balkwill, F., Mantovani, A., 2001. Inflammation and cancer: back to Virchow? Lancet 357, 539–545.
- Bassig, B.A., Friesen, M.C., Vermeulen, R., Shu, X.O., Purdue, M.P., Stewart, P.A., Xiang, Y.B., Chow, W.H., Zheng, T., Ji, B.T., Yang, G., Linet, M.S., Hu, W., Zhang, H., Zheng, W., Gao, Y.T., Rothman, N., Lan, Q., 2015. Occupational exposure to benzene and non-Hodgkin lymphoma in a population-based cohort: the Shanghai Women's Health Study. Environ. Health Perspect. 123, 971.
- Baumeister, S.H., Freeman, G.J., Dranoff, G., Sharpe, A.H., 2016. Coinhibitory pathways in immunotherapy for cancer. Annu. Rev. Immunol. 34, 539–573.
- Bogadi-Säre, A., Zavalic, M., Trošić, I., Turk, R., Kontosić, I., Jelčić, I., 2000. Study of some immunological parameters in workers occupationally exposed to benzene. Int. Arch. Occup. Environ. Health 73, 397–400.
- Boley, S.E., Wong, V.A., French, J.E., Recio, L., 2002. p53 heterozygosity alters the mRNA expression of p53 target genes in the bone marrow in response to inhaled benzene. Toxicol. Sci. 66, 209–215.
- Bulcão, R.P., Santa Maria, L., Charão, M.F., Moro, A.M., Roehrs, M., Garcia, S.C., Limberger, R.P., 2008. Quantificação simultânea de indicadores biológicos de exposição a solventes orgânicos por cromatografia líquida de alta eficiência. Quím. Nova 31, 1343–1348.
- Carroll, M.C., Isenman, D.E., 2012. Regulation of humoral immunity by complement. Immunology 37 (2), 199–207.
- Casale, T., Sacco, C., Ricci, S., Loreti, B., Pacchiarotti, A., Cupelli, V., Cupelli, V., Arcangeli, G., Mucci, N., Antuono, V., De Marco, F., Tomei, G., Tomei, F., Rosati, M.V., 2016. Workers exposed to low levels of benzene present in urban air: assessment of peripheral blood count variations. Chemosphere 152, 392–398.
- Chi, K.R., 2016. The dark side of the human genome. Nature 538, 275–277.
- Costa, C., Ozcagil, E., Gangemi, S., Schembri, F., Giambò, F., Androutsopoulos, V., Tsatsakis, A., Fenga, C., 2016. Molecular biomarkers of oxidative stress and role of dietary factors in gasoline station attendants. Food Chem. Toxicol. 90, 30–35.
- Coussens, L.M., Werb, Z., 2002. Inflammation and cancer. Nature 420, 860–867.
- Dolen, Y., Esendagli, G., 2013. Myeloid leukemia cells with a B7-2+ subpopulation provoke Th-cell responses and become immuno-suppressive through the modulation of B7 ligands. Eur. J. Immunol. 43, 747–757.
- Ducos, P., Gaudin, R., Robert, A., Francin, J.M., Maire, C., 1990. Improvement in HPLC analysis of urinary trans, trans-muconic acid, a promising substitute for phenol in the assessment of benzene exposure. Int. Arch. Occup. Environ. Health 62, 529–534.
- Dunkelberger, J.R., Song, W.C., 2010. Complement and its role in innate and adaptive immune responses. Cell Res 20, 34–50.
- Efeyan, A., Serrano, M., 2007. p53: guardian of the Genome and policeman of the oncogenes. Cell Cycle 6 (9), 1006–1010.
- Fenga, C., Gangemi, S., Giambò, F., Tsitsimpikou, C., Golokhvast, K., Tsatsakis, A., Costa, C., 2016. Low-dose occupational exposure to benzene and signal transduction pathways involved in the regulation of cellular response to oxidative stress. Life Sci. 147, 67–70.
- Fenga, C., Gangemi, S., Teodoro, M., Rapisarda, V., Golokhvast, K., Docen, A., Costa, C., 2017. 8-Hydroxydeoxyguanosine as a biomarker of oxidative DNA damage in workers exposed to low-dose benzene. Toxicol. Rep. 31, 291–295.
- Gallbraith, D., Gross, S.A., Paustenbach, D., 2010. Benzene and human health: a historical review and appraisal of associations with various diseases. Crit. Rev. Toxicol. 40, 1–46.
- Goethel, G., Brucker, N., Moro, A.M., Charão, M.F., Fracasso, R., Barth, Bubols, G., Durgante, J., Nascimento, S., Baierle, M., Saldiva, P.H., Garcia, S.C., 2014. Evaluation of genotoxicity in workers exposed to benzene and atmospheric pollutants. Mutat. Res. Genet. Toxicol. Environ. Mutagen 770, 61–65.
- Greaves, P., Gribben, J.G., 2013. The role of B7 family molecules in hematologic malignancy. Blood 121, 734–744.
- Guo, R.F., Ward, P.A., 2005. Role of C5a in inflammatory responses. Annu. Rev. Immunol. 23, 821–852.
- Hanahan, D., Weinberg, R.A., 2011. Hallmarks of cancer: the next generation. Cell 144, 646–674.
- Harris, C.C., 1996. p53 tumor suppressor gene: at the crossroads of molecular carcinogenesis, molecular epidemiology, and cancer risk assessment. Environ. Health Perspect. 104 (435).
- International Agency for Research on Cancer, 2012. Agents Classified by the IARC Monographs 1, 103.
- Janakiram, M., Pareek, V., Cheng, H., Narasimulu, D.M., Zang, X., 2016. Immune checkpoint blockade in human cancer therapy: lung cancer and hematologic malignancies. Immunotherapy 8, 809–819.
- Karin, M., Lawrence, T., Nizet, V., 2006. Innate immunity gone awry: linking microbial infections to chronic inflammation and cancer. Cell 124, 823–835.
- Kawasaki, Y., Hirabayashi, Y., Kaneko, T., Kanno, J., Kodama, Y., Matsushima, Y., Yonn, B., Inoue, T., Umemura, T., 2009. Benzene-induced hematopoietic neoplasms including myeloid leukemia in Trp53-deficient C57BL/6 and C3H/He mice. Toxicol. Sci. 110 (2), 293–306.
- Kumar, V., Abbas, A.K., J. C., 2015. Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease. Elsevier.
- Lamm, S.H., Engel, A., Byrd, D.M., 2005. Non-Hodgkin lymphoma and benzene exposure: a systematic literature review. Chem. Biol. Interact. 153, 231–237.
- Li, J., Zhang, X., He, Z., Sun, Q., Qin, F., Huang, Z., Gao, C., 2017. MGMT hypomethylation is associated with DNA damage in workers exposed to low-dose benzene. Biomarkers 22 (5), 470–475.
- Lin, W.W., Karin, M., 2007. A cytokine-mediated link between innate immunity, inflammation, and cancer. J. Clin. Investig. 117, 1175–1183.
- Linet, M.S., Yin, S.N., Gilbert, E.S., Dores, G.M., Hayes, R.B., Vermeulen, R., Tian, H.Y., Lan, Q., Portengen, L., Ji, B.T., Li, G.L., Rothman, N., Chinese Center for Disease Control and Prevention-U.S. National Cancer Institute Benzene Study Group, 2015. A retrospective cohort study of cause-specific mortality and incidence of hematopoietic malignancies in Chinese benzene-exposed workers. Int. J. Cancer 137, 2184–2197.
- Liu, Y., Chen, X., Shi, Y., Zhang, J., Zhang, H., Zhang, F., Zhu, B., 2016. Plasma microRNA expression in workers occupationally exposed to benzene. Public Health Emerg. 1, 3.
- Loomis, D., Guyton, K.Z., Grosse, Y., El Ghissassi, F., Bouvard, V., Benbrahim-Tallaa, L., Guha, N., Vilahur, N., Mattedock, H., Straif, K., International Agency for Research on Cancer Monograph Working Group, 2017. Carcinogenicity of benzene. Lancet Oncol. 18 (12), 1574–1575.
- Lovreglio, P., Carrieri, M., Barbieri, A., Sabatini, L., Fustinoni, S., Andreoli, R., D'Errico, M.N., Basso, A., Bartolucci, G.B., Soleo, L., 2013. Monitoring of the occupational and environmental exposure to low doses of benzene. G. Ital. Med. Lav. Ergon. 35 (4), 251–255.
- Mamadi, S., Höne, S., Kirschfink, M., 2017. The complement system in cancer: ambivalence between tumour destruction and promotion. Immunobiology 222 (1), 45–54.
- Marcel, V., Dichtel-Danjoy, M.L., Sagne, C., Hafsi, H., Ma, D., Ortiz-Cuaran, S., Olivier, M., Hall, J., Mollereau, B., Hainaut, P., Bourdon, J.C., 2011. Biological functions of p53 isoforms through evolution: lessons from animal and cellular models. Cell Death Differ. 18, 1815–1824.
- Merkel, O., Taylor, N., Prutsch, N., Staber, P., Moriggl, R., Turner, S., Kenner, L., 2017. When the guardian sleeps: reactivation of the p53 pathway in cancer. Mutat. Res. Genet. Toxicol. Environ. Mutagen 773, 1–13.
- Mohammadyan, M., Golaishani, F.Y., Yousefinejad, R., Boogaard, P.J., Heibati, B., 2016. Risk assessment of benzene among gas station refueling workers. Feb-Fresenius Environ. Bull. 3563.
- Moro, A.M., Brucker, N., Charão, M.F., Baierle, M., Sauer, E., Goethel, G., Barth, A., Nascimento, S.N., Gauer, B., Durgante, J., Amaral, B.S., Neto, F.R., Gioda, A., Garcia, S.C., 2017. Biomonitoring of gasoline station attendants exposed to benzene: effect of gender. Mutat. Res. Genet. Toxicol. Environ. Mutagen 813, 1–9.
- Moro, A.M., Brucker, N., Charão, M.F., Sauer, E., Freitas, F., Durgante, J., Bubols, G., Campanharo, S., Linden, R., Souza, A.P., Bonorino, C., Moresco, R., Pilger, D., Gioda, A., Farsky, S., Duschl, A., Garcia, S.C., 2015. Early hematological and immunological alterations in gasoline station attendants exposed to benzene. Environ. Res. 137, 349–356.
- Moro, A.M., Charão, M.F., Brucker, N., Durgante, J., Baierle, M., Bubols, G., Goethel, G., Fracasso, R., Nascimento, S., Bulcão, R., Gauer, B., Barth, A., Bochi, G., Moresco, R., Gioda, A., Salvador, M., Farsky, S., Garcia, S.C., 2013. Genotoxicity and oxidative stress in gasoline station attendants. Mutat. Res. Genet. Toxicol. Environ. Mutagen 754 (1), 63–70.
- Rinsky, R.A., Smith, A.B., Hornung, R., Filloon, T.G., Young, R.J., Okun, A.H., Landrigan, P.J., 1987. Benzene and leukemia. N. Engl. J. Med. 316, 1044–1050.
- Rushon, L., Schnatter, A.R., Tang, G., Glass, D.C., 2014. Acute myeloid and chronic lymphoid leukaemias and exposure to low-level benzene among petroleum workers. Br. J. Cancer 110, 783–787.
- Rutkowski, M.J., Sughrue, M.E., Kane, A.J., Mills, S.A., Parsa, A.T., 2010. Cancer and the complement cascade. Mol. Cancer Res. 8, 1453–1465.
- Santiago, F., Lima, S., Pinheiro, T., Silvestre, R.T., Otero, U.B., Tabalipa, M.M., Kosyakova, N., Ornellas, M.H., Liehr, T., Alves, G., 2017. Benzene poisoning, clinical and blood abnormalities in two Brazilian female gas station attendants: two case reports. BMC Res. Notes 10, 52.

- Schildberg, F.A., Klein, S.R., Freeman, G.J., Sharpe, A.H., 2016. Coinhibitory pathways in the B7-CD28 ligand-receptor family. *Immunity* 44 (5), 955–972.
- Schreiber, R.D., Old, L.J., Smyth, M.J., 2011. Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. *Science* 331, 1565–1570.
- Shafi, O., 2016. Inverse relationship between Alzheimer's disease and cancer, and other factors contributing to Alzheimer's disease: a systematic review. *BMC Neurol.* 16, 236–253.
- Smolik, R., Grzybek-Hryncewicz, K., Lange, A., Zatoński, W., 1973. Serum complement level in workers exposed to benzene, toluene and xylene. *Int. Arch. Occup. Environ. Health* 31, 243–247.
- Snyder, R., 2012. Leukemia and benzene. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 9, 2875–2893.
- Sun, P., Qiu, Y., Zhang, Z., Wan, J., Wang, T., Jin, X., Lan, Q., Rothman, N., Xia, Z.L., 2009. Association of genetic polymorphisms, mRNA expression of p53 and p21 with chronic benzene poisoning in a Chinese occupational population. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev.* 18, 1821–1828.
- Switchenko, J.M., Bulka, C., Ward, K., Koff, J.L., Bayakly, A.R., Ryan, P.B., Waller, L.A., Flowers, C.R., 2016. Resolving uncertainty in the spatial relationships between passive benzene exposure and risk of non-Hodgkin lymphoma. *Cancer Epidemiol.* 41, 139–151.
- Toledo, F., Wahl, G.M., 2006. Regulating the p53 pathway: in vitro hypotheses, in vivo veritas. *Nat. Rev. Cancer* 6, 909–923.
- Thomas, R., Hubbard, A.E., McHale, C.M., Zhang, L., Rappaport, S.M., Lan, Q., Rothman, N., Vermeulen, R., Guyton, K.Z., Jinot, J., Sonawane, B.R., Smith, M.T., 2014. Characterization of changes in gene expression and biochemical pathways at low levels of benzene exposure. *PLoS One* 9 (5), e91828.
- Trevisan, P., Da Silva, J.N., Da Silva, A.P., Rosa, R.F.M., Paskulin, G.A., Thiesen, F., de Oliveira, C.A., Zen, P.R., 2014. Evaluation of genotoxic effects of benzene and its derivatives in workers of gas stations. *Environ. Monit. Assess.* 186, 2195–2204.
- Upadhyay, R., Hammerich, L., Peng, P., Brown, B., Merad, M., Brody, J.D., 2015. Lymphoma: immune evasion strategies. *Cancers* 7, 736–762.
- Vousden, K.H., Lu, X., 2002. Live or let die: the cell's response to p53. *Nat. Rev. Cancer* 2, 594–604.
- Wan, J., Badhan, H.J., Winn, L., 2005. The role of c-MYB in benzene-initiated toxicity. *Chem. Biol. Interact.* 153, 171–178.
- Weisel, C.P., 2010. Benzene exposure: an overview of monitoring methods and their findings. *Chem. Biol. Interact.* 184, 58–66.
- Xiong, F., Li, Q., Zhou, B., Huang, J., Liang, G., Zhang, L.E., Ma, S., Qing, L., Liang, L., Su, J., Peng, X., Li, Q., Zou, Y., 2016. Oxidative Stress and Genotoxicity of Long-Term Occupational Exposure to Low Levels of BTEX in Gas Station Workers. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 13, 1212.
- Yoon, B.I., Li, G.X., Kitada, K., Kawasaki, Y., Igarashi, K., Kodama, Y., Inoue, T., Kobayashi, K., Kanno, J., Kim, D.Y., Inoue, T., Hirabayashi, Y., 2003. Mechanisms of benzene-induced hematotoxicity and leukemogenicity: cDNA microarray analyses using mouse bone marrow tissue. *Environ. Health Perspect.* 111, 1411.
- Zhang, G.H., Ji, B.Q., Li, Y., Zheng, G.Q., Ye, L.L., Hao, Y.H., Ren, J.C., Zhou, L.F., Xu, X.W., Zhu, Y., Xia, Z.L., 2016. Benchmark doses based on abnormality of WBC or micronucleus frequency in benzene-exposed Chinese workers. *J. Occup. Environ. Med* 58 (e39–e39).
- Zhu, Y., Shen, J., Xiao, Z., 2017. B7 Gene family: promising immunotherapeutic checkpoint in cancers. *Clin. Oncol.* 2, 1199.





**Effects of enzymatic polymorphisms on hematological and oxidative stress  
parameters in Brazilian workers exposed to benzene**

Manuscrito a ser submetido à revista Archives of Toxicology

---



**Effects of enzymatic polymorphisms on hematological and oxidative stress parameters in Brazilian workers exposed to benzene**

Elisa Sauer<sup>a,b</sup>, Bruna Gauer<sup>a,b</sup>, Angela Moro<sup>c</sup>, Mariele Charão<sup>d</sup>, Sabrina Nascimento<sup>a,b</sup>, Larissa Cestonaro<sup>a,b</sup>, Solange Cristina Garcia<sup>a,b\*</sup>

<sup>a</sup>Laboratório de Toxicologia (LATOX), Departamento de Análises, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brazil

<sup>b</sup>Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brazil.

<sup>c</sup>Faculdade Especializada na Área de Saúde do Rio Grande do Sul, Passo Fundo, RS, Brazil

<sup>d</sup>Instituto de Ciências das Saúde, Universidade Feevale, Novo Hamburgo, RS, Brazil

\*Corresponding author at: Avenida Ipiranga 2752, Santa Cecília, Porto Alegre, RS, CEP: 90610-000, Brazil. Tel.: +55 3308 5297; fax: +55 51 3308 5437.

E-mail address: [solange.garcia@ufrgs.br](mailto:solange.garcia@ufrgs.br) (Prof Dr Solange Cristina Garcia).

## ABSTRACT

Recent studies suggest the involvement of genetic polymorphisms in the individual susceptibility to benzene toxicity. Although several studies have focus on this area, there are gaps about this knowledge and the effects of enzymatic polymorphisms on benzene toxicity remains unclear. This study evaluated whether genetic polymorphisms have influence on classical hematological parameters,  $\delta$ -aminolevulinate dehydratase ( $\delta$ -ALA-D) activity and biomarkers of oxidative stress in individuals occupationally exposed to benzene. One hundred eighty nine gas station workers (GSW) and 127 workers non-occupationally exposed (NEG) participated in the study. Hematological parameters showed significant alterations between groups, although values remained within reference ranges.  $\delta$ -ALA-D activity was inhibited in the GSW group ( $p < 0.001$ ). Partial correlations demonstrated that lower  $\delta$ -ALA-D levels in the GSW group were associated with reduced hematocrit ( $r = 0.389$ ;  $p < 0.001$ ) and hemoglobin ( $r = 0.200$ ;  $p < 0.001$ ). Alterations on oxidative stress parameters were observed between the groups. Higher frequency of ALAD polymorphic alleles was observed in GSW group ( $p < 0.01$ ). Lower  $\delta$ -ALA-D activity was observed in individuals with ALAD polymorphic genotype ( $p < 0.05$ ). Additionally, higher GST and GPx activities were observed in individuals with polymorphic genotypes for CYP2E1 and GSTT1, respectively ( $p < 0.05$ ), demonstrating a possible protective effect of these both polymorphisms. No influence of GSTs and CYP2E1 polymorphisms were observed on urinary *trans, trans* muconic acid. This is the first study to evaluate ALAD polymorphism and to show higher polymorphic alleles in individuals occupationally exposed to benzene. Additionally, ALAD polymorphism was associated with lower  $\delta$ -ALA-D activity, which was associated with hematological alterations in the red blood series observed in the GSW group. Inhibition of this enzyme may result in anemia, a common hematotoxic effect caused by benzene; therefore, the presence of this polymorphism possibly characterizes individuals more susceptible to the hematotoxic effects of benzene.

Keywords: Benzene; occupational exposure; ALA-D; hematotoxicity.

## 1. Introduction

Benzene is a recognized carcinogen classified as Group I by the International Agency for Research on Cancer (IARC, 2012). Despite the efforts of regulatory agencies to reduce its levels of environmental and occupational exposure, benzene remains a ubiquitous environmental pollutant (Liu et al, 2016; Zhang et al, 2016).

Emissions from gasoline vehicles and evaporative loss from gasoline filling stations are an important sources of ambient benzene exposure (Bond, 1986; Snyder and Heidi, 1996; Dougherty et al, 2008). Gas station workers compose one of the major occupational risk groups, since they are chronically exposed to benzene during work shift (Galbraith et al., 2010; Moro et al., 2013; 2015 and 2017; Mohammadyan et al., 2016). Early toxic effects related to benzene exposure are observed in these subjects even at low levels of exposure (Moro et al, 2013, 2015 and 2017; Trevisan et al, 2014; Xiong et al, 2016).

Although the exact toxic mechanism has not been fully understood, it is widely accepted that the key of benzene toxicity resides in its metabolism, and its effects are mediated by electrophilic metabolites and reactive oxygen species (ROS) generated during its biotransformation, in particular through the alterations on signaling and oxidative pathways. In fact, different epidemiological studies, which evaluate early alterations in individuals occupationally exposed to benzene, indicate that benzene exposure is associated with oxidative balance (Moro et al, 2013; Costa et al, 2016; Fenga et al, 2017).

In brief, it has been well accepted that the biotransformation of benzene firstly involves its oxidation to benzene oxide through the action of cytochrome (P450) oxidase (Rappaport et al, 2009 and 2010). Benzene oxide undergoes subsequent rearrangements and/or oxidations, leading to the generation of other major reactive metabolites, or also to the conjugation with glutathione (GSH) by glutathione-S-transferase (GST) (Kim et al, 2006(a) and 2006(b)). Genes coding enzymes involved in benzene biotransformation are highly polymorphic, which may alter the formation, concentration and excretion of benzene metabolites, and therefore change the individual susceptibility to the toxic effects resulting from this exposure (Angelini et al, 2011).

Currently, polymorphisms in enzymes involved in the biotransformation of benzene, such as CYP and GSTs, are believed to predispose individuals to benzene

toxicity (Kim et al, 2007). Several studies have evaluated enzymatic polymorphisms in individuals occupationally exposed to benzene; however, most of them are mainly focused on the influence of polymorphisms on excretion levels of the urinary metabolites *trans, trans*-muconic acid and S-phenylmercapturic acid, on hematological alterations or also on biomarkers of DNA damage. There is a lack of studies evaluating the influence of enzymatic polymorphisms on biomarkers of oxidative stress, such as antioxidant enzymes, lipid damage biomarkers (e.g. malondialdehyde – MDA) and reduced glutathione (GSH).

In addition,  $\delta$ -aminolevulinatase dehydratase ( $\delta$ -ALA-D) is a fundamental enzyme involved in the synthesis of the hemoglobin heme group, hence its inhibition may ultimately contribute to the development of anemia (Baierle et al, 2010), a common hematotoxic effect resulting from benzene exposure (IARC, 2012). A recent study suggests that the enzymatic activity of  $\delta$ -ALA-D may be an early potential biomarker of damage in occupational exposure to benzene, given the significantly lower enzymatic activity observed in the occupationally exposed group when compared to a control group, and also its association with the higher exposure time of the workers (Moro et al, 2015). Besides, the enzyme  $\delta$ -ALA-D has been proposed as a parameter of oxidative stress, considering its constitution containing sulfhydryl groups that are highly sensitive to oxidation by pro-oxidant elements, leading to reduced enzyme activity (De Lucca et al, 2016).

Therefore, the aim of this study was to investigate the influence of enzymatic polymorphisms (ALAD, GSTT1, GSTM1, CYP2E1) on classical hematological parameters,  $\delta$ -ALA-D enzymatic activity and biomarkers of oxidative stress in Brazilian gas station workers (GSW) occupationally exposed to benzene.

## **2. Material and Methods**

### **2.1. Study population**

A total of 316 subjects were included in this study. One hundred and eighty nine gas station workers from the metropolitan region of the city of Porto Alegre, RS, Brazil represent the occupationally exposed group (gas station workers - GSW), including 145 men and 44 woman. The non-occupationally exposed group to benzene (NEG) was composed of 127 workers acting on administrative activities, including 108 men

and 19 woman, who lived and worked in the same region as the occupationally exposed group. Individuals with chronic diseases were not included in the study.

All subjects answered a questionnaire about general health, lifestyle, ethnicity, smoking status and history of exposure. This study was approved by the Research Ethics Committee of the Universidade Federal do Rio Grande do Sul (Registry CAAE n° 47190615.6.3001.5327). Informed consent was obtained from each participant.

## **2.2. Sample Collection**

Blood and urine samples were obtained from all of the study participants. The collection of samples was conducted at the end of the work shift, after at least three consecutive days of exposure. Venous blood samples were drawn by venipuncture. Three tubes of 2 mL containing EDTA as anticoagulant were obtained, as well as one 2-mL tube without anticoagulant and another 2-mL blood tube with heparin as anticoagulant. The first EDTA blood tube was used for blood cell counts, which was immediately stored at 4-8 °C after collection until further analyses. The second EDTA blood tube was stored at -80 °C until the DNA extraction, and the last one was centrifuged for 10 min at 2500 g, at room temperature; the plasma fraction was used to quantify the malondialdehyde (MDA) levels and the erythrocytes fraction was used to quantify the non-protein thiol levels. The blood tube without anticoagulant was centrifuged for 10 min at 2500 g, at room temperature, then the serum fraction was obtained to assess the levels of vitamin C. Heparinized whole blood was aliquoted and stored at -80 °C and, afterwards, used for the assessment of antioxidant enzymes and  $\delta$ -ALA-D activity/reactivation. Urine samples were stored at -80 °C until the quantification of trans, trans muconic acid (*t,t*- muconic acid), hippuric acid (HA), methylhippuric acid (mHA), phenylglyoxylic acid (PGA) and mandelic acid (MA) levels. Urine creatinine levels were analyzed before storage at -80°C.

## **2.3. Exposure assessment**

Personal passive samplers (SKC 575-002®) were used to evaluate airborne BTX (benzene, toluene and xylene) exposure. After collection, 2.5 ml dichloromethane were added to each sampler and mixed for 30 minutes in a shaker. The desorbed BTX was transferred to a vial and analyzed by gas chromatography coupled to flame ionization detector (GC-FID; Varian, Midlebourg, The Netherlands) and using OV-1

column (30 m x 0.32 mm x 1  $\mu$ m). The flow rate of carrier gas (helium) was 4 mL min<sup>-1</sup>. The initial oven temperature was set at 35 °C, maintained for 7 min, and then increased at 10 °C min<sup>-1</sup> up to 90 °C, which was maintained for 4 min, afterwards increased at 30 °C<sup>-1</sup> up to 150 °C, which was maintained until the end of analysis (18.5 min total run). The retention times were 4.6 for benzene, 9.1 for toluene and 12.0, 12.3 and 12.8 for o-, m-, and p-xylenes, respectively. The limits of detection (LOD) and quantification (LOQ) were 0.05 and 0.19  $\mu$ g mL<sup>-1</sup>, respectively.

Quantification of a urinary metabolite of benzene (*t, t*-muconic acid) was carried out by high-performance liquid chromatography with UV detection (HPLC-UV; Shimadzu, USA) after solid phase extraction (SPE) according to a previously described analytical method (Ducos et al., 1990), with modifications previously described by Moro et al. (2015).

Evaluation of urinary levels of hippuric acid (HA), methylhippuric acid (mHA), phenylglyoxylic acid (PGA), and mandelic acid MA, metabolites of toluene, xylene, styrene and ethylbenzene, respectively, were determined simultaneously by HPLC-UV using a (Knauer®, German), according to Bulcão et al. (2008).

The *t, t*-MA levels were expressed as  $\mu$ g g<sup>-1</sup> creatinine and HA, mHA, PGA, and MA levels as g g<sup>-1</sup> creatinine.

Urinary creatinine levels were measured using a MindRay BS 120 biochemical analyzer (MindRay®, China) using commercial kits (BioClin®, Belo Horizonte, MG, Brazil).

#### **2.4. Hematological parameters**

Hematological analyses (hemoglobin, hematocrit, red blood cell, white blood cells and platelet counts) were performed in whole blood collected with EDTA by a hematology analyzer (ABX Pentra XL 80 Horiba®, France).

$\delta$ -aminolevulinatase ( $\delta$ -ALA-D) activity was assayed in erythrocyte lysates according to a previously described method (Sassa, 1982). The enzymatic activity was also determined in the presence of the reducing agent dithiothreitol (DTT) to assess the reactivation index of  $\delta$ -ALA-D.

#### **2.5. Oxidative stress biomarkers**



### *Biomarker of lipid peroxidation*

Plasma malondialdehyde (MDA) levels were quantified according with our method described by Grotto et al. (2007), by HPLC with visible detection (Knauer®, Berlin, Germany).

### *Endogenous antioxidant*

Antioxidant enzymes activities were performed in 96-well microplates and measured by spectrophotometry in a microplate reader (SpectraMax M2, Molecular Devices). The enzymatic activity of glutathione peroxidase (GPx) was measured according to the method described by Paglia and Valentine (1967) and results were expressed as  $\mu\text{mol}$  of NADPH/min/mg of protein. Catalase (CAT) and glutathione S-transferase (GST) activities were determined as previously described (Aebi, 1984 and Habig et al, 1974, respectively). Activities were expressed as units per mg protein.

Levels of non-protein thiol groups in erythrocytes were determined by spectrophotometry at 412 nm, as previously described (Ellman, 1959). Results were adjusted by a ratio between hematocrit and hemoglobin values and expressed as mM GSH \* (Hematocrit/Hemoglobin).

### *Exogenous antioxidants*

The exogenous antioxidant vitamin C was quantified in serum by HPLC with UV detection (HPLC-UV) as previously developed in our laboratory and described by Baierle et al. (2012). Results are expressed as  $\text{mg L}^{-1}$ .

## **2.6. Genotyping of enzyme polymorphisms**

DNA extraction for genotyping was performed by a previously described method (Miller et al, 1999), from whole blood samples with EDTA. The  $\delta$ -ALA-D and CYP2E1 polymorphisms were determined by real-time polymerase chain reaction (PCR) using Taqman® probes for the detection of SNPs rs1800435 and rs38133867, respectively, through the StepOne® equipment (Applied Biosystems, Foster City, CA). The final reaction volume was 13  $\mu\text{l}$ , and the cycling was programmed for the samples to be heated for 30 seconds at 60 °C, followed by 10 minutes at 95 °C and incubation for 40 cycles of 15 seconds at 95 °C and 1 minute at 60 °C. In all reactions, negative control

were performed, and sequencing of the 3 different genotypes found in the PCR results for confirmation of the SNP was performed.

The null allele polymorphism of the GSTM1 and GSTT1 enzymes was determined using primers (5'-3') shown in table 1.

**Table 1.** Primers sequences

<b>Polymorphism</b>	<b>Primers sequence</b>
<b>GSTM1</b>	Forward 5'-GAACTCCCTGAAAAGCTAAAGC-3' Reversed 5'- GTTGGGCTCAAATATACGGTGG-3'
<b>GSTT1</b>	Forward 5'-TTCCTTACTGGTCCTCACATCTC-3' Reversed 5'-TCACCGGATCATGGCCAGCA-3'
<b>ALBUNIN</b>	Forward 5'-GCCCTCTGCTAACAAGTCCTAC-3' Reversed 5'-GCCCTAAAAAGAAAATCGCCAATC3'

The amplification reaction was performed using a PCR protocol on the Veriti Thermal Cycler® instrument (Applied Biosystems, Foster City, CA) with 100 ng of DNA and final reaction volume of 25 µL. Reactions occurred using 0.02 U/µL of Taq Polymerase in buffer containing 0.4 µM of each primer; 0.2 mM of each dNTPs; 10 mM tris-HCl pH 8.9; 50 mM KCl; and 2mM MgCl<sub>2</sub>. Samples were heated in the thermal cycler for 5 minutes at 95 °C, and incubations continued for 30 cycles of 30 seconds each at 95 °C, 45 seconds at 62 °C and 30 seconds at 72 °C. The 215 bp (GSTM1), 350 bp (albumin) and 480 bp (GSTT1) PCR products were visualized on 1.5% agarose gel stained with SYBR Safe (Thermo Fisher Scientific). A total of 10% of DNA samples were selected randomly for repeat analyses in order to verify the accuracy of the method, and the concordance rate was 100%.

## **2.7. Statistical analyses**

Data were analyzed using IBM SPSS Statistics software (version 22). A normality test was used to check data distribution, and each variable was evaluated using the Shapiro-Wilk test. Comparisons between the groups were carried out using the Student's t-test and Mann–Whitney U-test. The results are expressed as mean ±

standard error of the mean (SEM) or median (interquartile range), according to the distribution of the variables. Analyses of covariance (ANCOVA) were used to assess differences between groups and examine the influence of confounding factors (age, smoking and drinking habits) followed by Bonferroni's *post hoc* test. Partial correlation was carried out to evaluate the associations between pairs of variables with control by confounding factors. The distribution of genotypes and allelic frequencies was done using the chi-square statistic to compare the observed and expected counts according to the Hardy–Weinberg equilibrium. Chi-squared test was used to assess the genotypic distribution of polymorphisms between groups. Variables with a non-normal distribution were log transformed to be included in ANCOVA and partial correlations analysis. The level of significance used for all statistical tests was set at 5%.

### **3. Results**

#### **3.1. Characteristics of the studied population**

The characteristics of the study population obtained through questionnaire interviews are summarized in Table 2. Significant differences were observed for age, smoking and drinking between groups, therefore analysis of covariance (ANCOVA-one way) were used to verify the differences between the groups for exposure and effect biomarkers evaluated. Age, smoking and drinking habits were included as covariates.

**Table 2.** Characteristics of the study population

	NEG (n=127)	GSW (n=189)
Time of occupational exposure (months)	NA	35.77 ± 7.15
Age (years)	38.24 ± 1.13	32.55 ± 0.75 <sup>a</sup>
Male (n)	108 (85.03%)	145 (76.72%)
Female (n)	19 (14.96%)	44 (23.28%)
Smokers [n (%)]	11 (8.66%)	44 (23.28%) <sup>b</sup>
Alcohol eventual drinkers [n (%)]	91 (71.65%)	115 (60.84%) <sup>b</sup>
Ethnicity		
White [n (%)]	118 (92.91%)	162 (85.71%)
Brown [n (%)]	2 (1.57%)	12 (6.34%)
Black [n (%)]	7 (5.51%)	15 (7.93%)

Results of time of exposure and age are expressed as mean ± SEM

<sup>a</sup> $p < 0.001$  compared to non-occupationally exposed group (Mann-Whitney U-test)

<sup>b</sup> $p < 0.05$  compared to non-occupationally exposed group (Chi-squared test)

NA (not applicable)

NEG (non-occupationally exposed group)

GSW (gas station workers)

[n (%)]: total number found per group and in parenthesis the perceptual

### 3.2. Exposure assessment

Data of exposure assessment including BTX airborne levels and quantification of urinary metabolites of benzene (*t,t*- muconic acid), toluene (hippuric acid), xylene (methylhippuric acid), ethylbenzene (mandelic acid) and styrene (phenylglyoxylic acid) are reported in Table 3. Regarding the BTX airborne levels, GSW group was exposed to significantly higher concentrations of benzene and toluene compared to non-occupationally exposed group ( $p < 0.001$ ). In the same way, increased urinary levels of *t,t*- muconic acid and hippuric acid were observed in GSW group compared to non-occupationally exposed group ( $p < 0.001$ ). No detectable levels were found for airborne xylene levels and for the urinary metabolites of xylene, ethylbenzene and estyrene for both groups.

Although the median values of *t, t*- muconic acid were below the limits recommended by ACGIH ( $500 \mu\text{g g}^{-1}$  creatinine), analysis of the individual exposure values showed that 59 individuals from GSW group (31.21%) presented values above

500  $\mu\text{g g}^{-1}$  creatinine, while in the NEG only 6 individuals (4.72 %) had these values extrapolating the recommended limits. Spearman's correlation showed a positive association between airborne levels of benzene and toluene ( $r= 0.691$ ;  $p<0.001$ ). Additionally, a partial correlation, controlled by age, smoking and drinking, demonstrated positive association between benzene and toluene urinary metabolites, *t, t*-muconic acid and hippuric acid, respectively ( $r=0.493$ ;  $p<0.001$ ), showing a common source of exposure. Moreover, partial positive correlations were observed between exposure time and the urinary metabolites *t, t*-muconic acid ( $r=0.493$ ;  $p<0.001$ ) and hippuric acid ( $r=0.334$ ;  $p<0.001$ ).

**Table 3.** Airborne benzene and toluene and urinary biomarkers

	NEG (n=127)	GSW (n=189)
Benzene ( $\text{mg m}^{-3}$ )	0.04 (0.0 – 0.08)	0.15 <sup>a</sup> (0.09 – 0.46)
Toluene ( $\text{mg m}^{-3}$ )	0.13 (0.07 – 0.18)	0.33 <sup>a</sup> (0.19 – 0.55)
Xylene ( $\text{mg m}^{-3}$ )	NF	NF
<i>t, t</i> -muconic acid ( $\mu\text{g g}^{-1}$ creatinine)	92.05 (46.49 – 160.63 )	311.07 <sup>b</sup> (165.45 – 577.32)
Hippuric acid ( $\text{g g}^{-1}$ creatinine)	0.23 (0.12 – 0.44)	0.45 <sup>b</sup> (0.27 – 0.75)
Methylhippuric acid ( $\text{g g}^{-1}$ creatinine)	NF	NF
Mandelic acid ( $\text{g g}^{-1}$ creatinine)	NF	NF
Phenylglyoxylic acid ( $\text{g g}^{-1}$ creatinine)	NF	NF

Results are expressed as median (interquartile range)

<sup>a</sup>  $p<0.001$  compared to non-occupationally exposed group (Mann-Whitney U-test)

<sup>b</sup>  $p<0.001$  compared to non-occupationally exposed group (ANCOVA one-way)

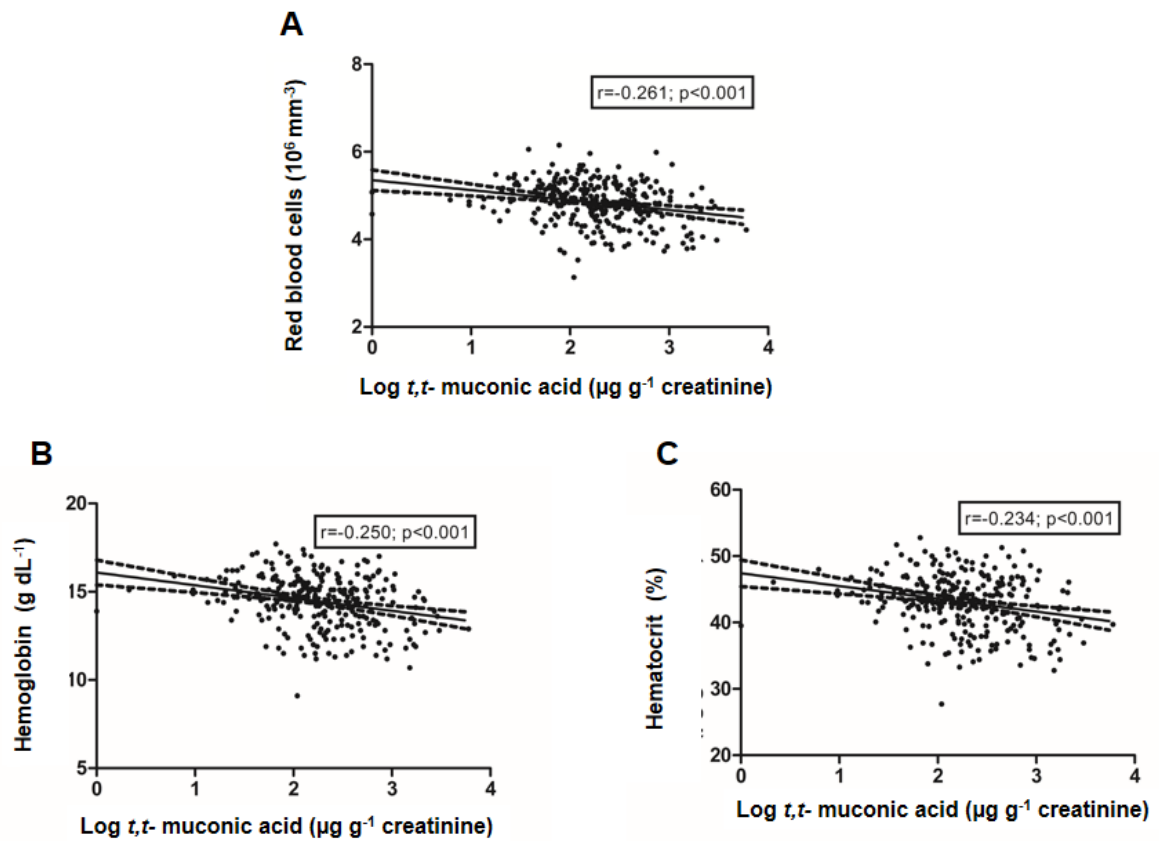
NF: not-found

NEG: non-occupationally exposed group

GSW: gas station workers

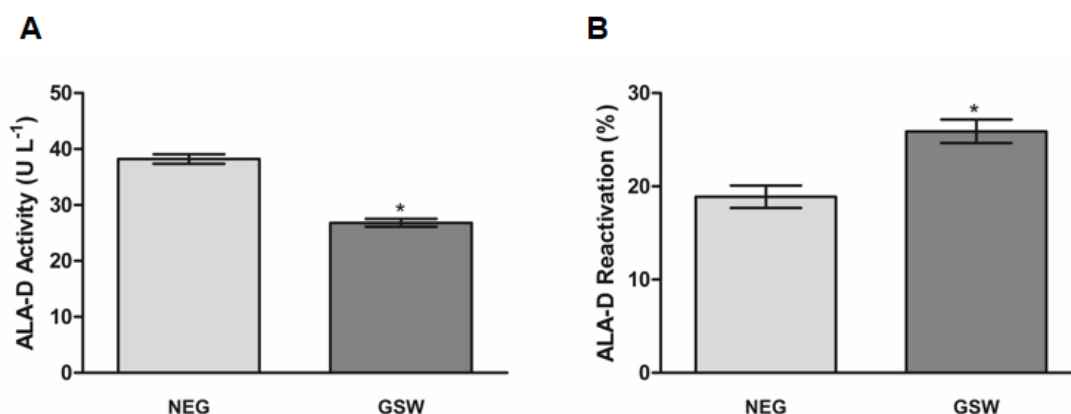
### 3.3. Hematological parameters

Considering that, there are different reference values for RBC according to gender (Failace et al, 2009), for the assessment of classical hematological parameters, the individuals were subdivided into their groups according to gender, i.e, GSW men group (GSW-m), GSW woman group (GSW-w), NEG men (NEG-m) and NEG woman (NEG-w). The results of classical hematological parameters are summarized in Table 4. Significant reductions of RBC ( $p<0.001$ ), Hb ( $p<0.001$ ) and HCT (%) ( $p<0.05$ ) were observed in the GSW-m group compared to NEG-m. No significant difference was observed in red cell parameters in the GSW-w group when compared to NEG-w. Regarding the white blood cells (WBC), increases in total WBC counts and percentage of lymphocytes were observed for both GSWs groups compared to the respective NEG groups ( $p<0.001$ ). Additionally, increased counts and percentages of neutrophils for both GSWs groups were found compared to each corresponding NEG group ( $p<0.05$ ). On the other hand, a decrease on basophils percentage was observed for both GSWs groups compared to NEG groups ( $p<0.001$ ). Despite that, all hematological parameters were within the reference values for adults (Failace, 2009). Other hematological parameters did not present significant differences among groups. Partial correlations, controlled by age, drinking and smoking habits, were performed between classical hematological parameters and parameters of exposure assessment, and showed a significant negative association between urinary levels of *t*, *t*-muonic acid vs RBC ( $r=-0.261$ ;  $p<0.001$ ), Hb ( $r=-0.250$ ;  $p<0.001$ ) and HCT ( $r=-0.234$ ;  $p<0.001$ ) (Figure 1A, 1B and 1C, respectively). Positive partial correlation was observed between Log-transformed time of exposure (in months) and WBC ( $r=0.200$ ;  $p<0.001$ ). No correlation was observed between urinary levels of hippuric acid and any hematological parameter.



**Figure 1.** Partial correlation controlled by age, smoking and drinking habits. (A) Red blood cells vs. log-transformed urinary levels of *t, t*- muonic acid ( $r=-0.261$ ;  $p<0.001$ ). (B) Hemoglobin levels vs. log-transformed urinary levels of *t, t*- muonic acid ( $r=-0.250$ ;  $p<0.001$ ). (C) Hematocrit vs. log-transformed urinary levels of *t, t*- muonic acid ( $r=-0.234$ ;  $p<0.001$ ).

Figure 2 shows the results of  $\delta$ -ALA-D activity and  $\delta$ -ALA-D reactivation index ( $\delta$ -ALA-D activity with DTT). Blood  $\delta$ -ALA-D activity was lower in GSW group ( $26.81 \pm 0.69$  U.L<sup>-1</sup>) compared to NEG ( $38.22 \pm 0.85$  U.L<sup>-1</sup>) ( $p<0.001$ ) (Figure 2A). The reactivation index of enzymatic activity was examined by testing the effect of DTT on the enzyme reactivation. Addition of DTT (2 mM) to the reaction media caused a higher recovery in  $\delta$ -ALA-D activity for GSW group ( $25.90 \pm 1.26\%$ ) compared to the recovery of non-occupationally exposed group ( $18.89 \pm 1.20\%$ ) ( $p<0.001$ ) (Figure 2B).



**Figure 2.** (A)  $\delta$ -Aminolevulinate dehydratase ( $\delta$ -ALA-D) activity and (B) reactivation index of  $\delta$ -ALA-D with DTT (2mM) in non-occupationally exposed group (n=127) and gas station workers (n=189). Results are expressed as mean  $\pm$  SEM. \* $p$ <0.001 compared to non-occupationally exposed group by ANCOVA one-way controlled by age, smoking and drinking habits.

Partial correlations demonstrated that  $\delta$ -ALA-D activity displayed negative associations with the exposure time,  $t$ ,  $t$ -muconic acid and with airborne benzene levels ( $r = -0.184$ ;  $r = -0.305$ ;  $r = -0.256$ , respectively;  $p < 0.001$ ). No  $\delta$ -ALA-D partial correlations were observed with hippuric acid or toluene airborne levels. Additionally, this model demonstrated that lower activity of  $\delta$ -ALA-D in GSW group was associated with reduced hematocrit ( $r = 0.389$ ;  $p < 0.001$ ) and hemoglobin ( $r = 0.200$ ;  $p < 0.001$ ).



**Table 4.** Hematological parameters

	NEG Male (n=108)	GSW Male (n=145)	Male reference values <sup>1</sup>	NEG Female (n=19)	GSW Female (n=44)	Female reference values <sup>1</sup>
Red blood cells (10 <sup>6</sup> mm <sup>-3</sup> )	5.03 ± 0.04	4.87 ± 0.04**	4.5 – 6.1	4.36 ± 0.07	4.33 ± 0.07	4.0 – 5.4
Hemoglobin (g dL <sup>-1</sup> )	15.50 ± 0.11	15.13 ± 0.11**	12.08 – 17.8	12.95 ± 0.20	12.57 ± 0.21	11.60 – 15.60
Hematocrit (%)	44.74 ± 0.32	43.17 ± 0.38*	39.0 – 53.0	39.09 ± 0.59	37.57 ± 0.20	36.0 – 48.0
White blood cells (10 <sup>3</sup> mm <sup>-3</sup> )	7.10 ± 0.16	8.07 ± 0.16**	3.6 – 11.0	6.46 ± 0.30	8.65 ± 0.31**	3.60 – 11.0
Lymphocytes (10 <sup>3</sup> mm <sup>-3</sup> )	2.42 ± 0.06	2.55 ± 0.06	1.0 – 4.5	2.41 ± 0.18	2.75 ± 0.13	1.0 – 4.5
Lymphocytes (%)	32.79 ± 0.57	35.24 ± 0.72*	-	32.10 ± 0.97	37.05 ± 1.91**	-
Monocytes (10 <sup>3</sup> mm <sup>-3</sup> )	0.55 ± 0.02	0.58 ± 0.02	0.1 – 1.0	0.51 ± 0.03	0.62 ± 0.06	0.1 – 1.0
Monocytes (%)	7.77 ± 0.19	7.24 ± 0.22	-	7.03 ± 0.49	8.20 ± 0.56	-
Neutrophils (10 <sup>3</sup> mm <sup>-3</sup> )	3.84 ± 0.13	4.45 ± 0.12*	1.5 – 7.0	3.30 ± 0.21	4.82 ± 0.20*	1.5 – 7.0
Neutrophils (%)	53.75 ± 0.79	56.43 ± 0.57*	-	51.06 ± 1.14	55.40 ± 1.01*	-
Eosinophils (10 <sup>3</sup> mm <sup>-3</sup> )	0.22 ± 0.14	0.21 ± 0.01	0.0 – 0.5	0.21 ± 0.05	0.19 ± 0.02	0.0 – 0.5
Eosinophils (%)	2.97 ± 0.15	2.95 ± 0.29	-	3.20 ± 0.66	2.09 ± 0.23	-
Basophils (10 <sup>3</sup> mm <sup>-3</sup> )	0.02 ± 0.00	0.02 ± 0.00	0.0 – 0.2	0.03 ± 0.01	0.26 ± 0.01	0.0 – 0.2
Basophils (%)	0.26 ± 0.02	0.22 ± 0.02**	-	0.47 ± 0.07	0.27 ± 0.07**	-
Platelets (10 <sup>3</sup> mm <sup>-3</sup> )	241.01 ± 5.72	246.72 ± 5.20	140.0 – 400.0	252.10 ± 8.55	276.65 ± 10.10	140.0 – 400.0

Results are expressed as mean ± SEM;

\* $p < 0.05$  compared to non-occupationally exposed group by ANCOVA one-way controlled by age, smoking and drinking habits;

\*\* $p < 0.001$  compared to non-occupationally exposed group by ANCOVA one-way controlled by age, smoking and drinking habits;

<sup>1</sup>According to Failace et al. (2009)

### 3.4. Oxidative stress parameters

The lipid damage biomarker MDA was significantly higher in GSW group compared to the NEG ( $p<0.001$ ) (Table 5). Regarding endogenous antioxidants, reduced enzymatic activities of CAT, GPx, and GST were observed in GSW group compared to NEG ( $p<0.05$ ). In the same way, the non-protein thiol levels (GSH) were decreased in GSW group compared to NEG ( $p<0.001$ ) (Table 5). Additionally, serum levels of the exogenous antioxidant vitamin C were also quantified and showed a decrease in vitamin C levels in GSW group compared to NEG ( $p<0.05$ ). Partial correlations between parameters of exposure assessment and oxidative stress were controlled by age, smoking and drinking habits, and are shown in Table 6. Besides, partial correlations among oxidative stress parameters were evaluated. MDA levels showed negative correlations with GST activity ( $r=-0.352$ ;  $p<0.001$ ), GSH ( $r=-0.232$ ;  $p<0.001$ ) and vitamin C ( $r=-0.220$ ;  $p<0.001$ ). Moreover, GSH levels were positively correlated with CAT ( $r=0.406$ ;  $p<0.001$ ), GPx ( $r=0.342$ ;  $p<0.001$ ) and GST ( $r=0.213$ ;  $p<0.001$ ).

**Table 5.** Parameters of oxidative stress and antioxidants

	NEG (n=127)	GSW (n=189)
MDA ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )	5.97 $\pm$ 0.13	7.69 $\pm$ 0.19**
CAT (U CAT $\text{mg}^{-1}$ protein)	9.58 $\pm$ 0.38	8.73 $\pm$ 0.22*
GPx ( $\mu\text{mol NADPH min}^{-1}$ $\text{mg}^{-1}$ protein)	26.30 $\pm$ 0.92	22.65 $\pm$ 0.50*
GSH (mM HCT $\text{Hb}^{-1}$ )	0.86 $\pm$ 0.03	0.68 $\pm$ 0.01**
GST (U GST $\text{mg}^{-1}$ protein)	3.62 $\pm$ 0.26	3.01 $\pm$ 0.09*
MDA ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )	5.97 $\pm$ 0.13	7.69 $\pm$ 0.19**
Vitamin C ( $\text{mg L}^{-1}$ )	6.03 $\pm$ 0.32	4.77 $\pm$ 0.30*

\*  $p<0.05$  compared to non-occupationally exposed group (ANCOVA one-way controlled by age, smoking and drinking habits)

\*\*  $p<0.001$  compared to non-occupationally exposed group (ANCOVA one-way controlled by age, smoking and drinking habits)

HCT: Hematocrit

Hb: Hemoglobin

**Table 6.** Partial correlations between parameters of exposure assessment and oxidative stress

	Log – TE	Log <i>t,t</i> – MA	Log - Benzene airborne	Log – HA	Log – Toluene airborne
	R	R	R	R	R
CAT (U CAT mg <sup>-1</sup> protein )	-0.174 <sup>b</sup>	-0.098	-0.134 <sup>a</sup>	-0.157 <sup>a</sup>	-0.130 <sup>a</sup>
GPx (µmol NADPH min <sup>-1</sup> mg <sup>-1</sup> protein)	-0.166 <sup>b</sup>	-0.148 <sup>a</sup>	-0.193 <sup>b</sup>	-0.087	-0.146 <sup>a</sup>
GSH (mM HCT Hb <sup>-1</sup> )	-0.418 <sup>c</sup>	-0.292 <sup>b</sup>	-0.196 <sup>c</sup>	-0.204 <sup>c</sup>	-0.088
GST (U GST mg <sup>-1</sup> protein)	-0.120	-0.110	-0.011	-0.074	-0.040
MDA (µmol L <sup>-1</sup> )	0.177 <sup>b</sup>	0.118 <sup>b</sup>	0.088	0.155 <sup>a</sup>	0.059
Vitamin C (mg L <sup>-1</sup> )	-0.018	-0.072	0.017	-0.084	-0.064

<sup>a</sup>  $p < 0.05$

<sup>b</sup>  $p < 0.01$

<sup>c</sup>  $p < 0.001$

HA: Hippuric acid

Hb: Hemoglobin

HCT: Hematocrit

TE: Exposure time in months

*t,t*-MA: trans, trans muconic acid

### 3.5. Genotypic distribution

The calculation of Hardy-Weinberg Equilibrium was used to verify the genotype and allele frequencies. All genes evaluated in this study (CYP2E1, GSTM1, GSTT1, CYP2E1 and ALAD) were in accordance with Hardy–Weinberg equilibrium. Table 7 showed the genotypic distribution of genes evaluated according to the groups of this study.

**Table 7.** Genotypic distribution by groups

Genotype	NEG		GSW	
	N	Percent (%)	N	Percent (%)
<b>Total cases</b>	127	100	189	100
<b>GSTT1 null</b>				
Null	28	22.05	46	24.34
Present	99	77.95	143	75.66
<b>GSTM1 null</b>				
Null	61	48.03	89	47.09
Present	66	51.97	100	52.91
<b>CYP2E1 (rs38133867)</b>				
CYP2E1-1 (GG)	116	90.82	166	87.83
CYP2E1-2 (GC)	11	9.18	22	11.64
CYP2E1-3 (CC)	0	0	1	0.53
CYP2E1-2/3	11	9.18	23	12.17
<b>ALAD (rs1800435)</b>				
ALAD1-1 (CC)	115	90.47	150	79.83*
ALAD1-2 (CG)	11	8.73	37	18.51*
ALAD2-2 (GG)	1	0.79	2	1.06
ALAD2-1/ALAD2-2	12	9.52	39	19.57*

\* $p < 0.05$  compared to non-occupationally exposed group (ANCOVA one-way controlled by age, smoking and drinking habits)

The presence of the null allele of the GSTT1 gene was observed in 46 individuals (24.34%) in the GSW group and 28 individuals (22.05%) in the non-occupationally exposed group. For the GSTT1 gene, 89 individuals (47.09%) were carrying the null allele in the GSW group and 61 individuals (48.09%) in the NEG. No

significant difference was observed between the groups for the presence of the null allele for both GSTs genes evaluated ( $p>0.05$ ).

According to genotyping of CYP2E1, 166 individuals (87.83%) from GSW group and 116 individuals (90.82%) from the NEG presented CYP2E1-1 genotype, while 22 individuals (11.64%) from GSW group presented CYP2E1-1 and 11 individuals (9.28%) from NEG presented CYP2E1-2. Only one individual from GSW group presented CYP2E1-3. Individuals carrying the GC (CYP2E1-2) and CC (CYP2E1-3) alleles were grouped into a single genotype group which was named CYP2E1-2 and individuals that carry the GG genotype were kept named as CYP2E1-1. No significant difference was observed for CYP2E1 genotyping between the GSW group and NEG ( $p>0.05$ ).

Genotyping of the ALAD showed that 150 individuals from the GSW group (79.83%) had ALAD1-1 (CC) genotype, whereas 115 individuals (90.47%) had this genotype in the non-exposed group. For ALAD1-2 (CG) genotype, 37 participants from GSW group (18.42%) and 11 participants from the non-exposed group (8.73%) were found. Two individuals from the GSW group (1.06%) presented the genotype ALAD2-2 (GG) and only one individual from NEG (0.79%). Individuals carrying the CG (ALAD1-2) and GG (ALAD2-2) alleles were grouped into a single genotype group, named ALAD-2, and individuals that carry the CC genotype were named ALAD-1. There was a significant increase in the presence of the ALAD-2 genotype in the GSW group when compared to the non-exposed group (Table 4) ( $p<0.05$ ).

Individuals from both groups of this study (GSW and NEG) were grouped as a single sample and divided into two allelic groups according the genotype for GSTs (null or present allele), CYP2E1 (1 or 2) and ALAD (ALAD-1 or ALAD-2) to assess the influence of genotypes observed on parameters of exposure assessment, hematological and oxidative stress (Table 8).

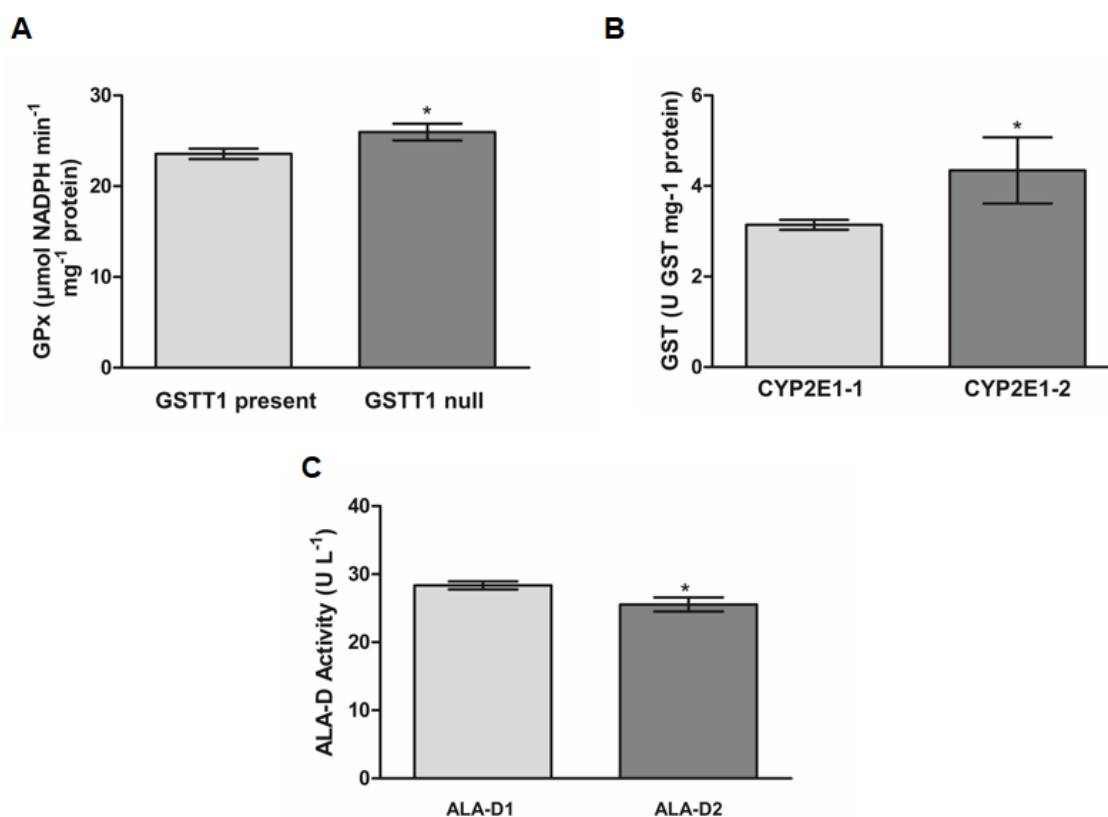
**Table 8.** Individuals divided according to genotypes

<b>Genotype</b>	<b>N</b>	<b>Percent (%)</b>
<b>Total Cases</b>	316	100
<b>GSTT1</b>		
<b>GSTT1 null</b>	74	23.42
<b>GSTT1 present</b>	242	76.58
<b>GSTM1</b>		
<b>GSTT1 null</b>	150	47.47
<b>GSTT1 present</b>	166	52.53
<b>CYP2E1 (rs38133867)</b>		
<b>CYP2E1-1 (GG)</b>	282	89.24
<b>CYP2E1-2 (GC)/CYP2E1-3 (GG)</b>	34	10.76
<b>ALAD (rs1800435)</b>		
<b>ALAD-1 (CC)</b>	265	83.86
<b>ALAD-2 (CG e GG)</b>	51	16.14

No significant differences were found for the parameters of exposure assessment and hematological between the two allelic groups for both GSTs gene evaluated. Higher GPx enzymatic activity on individuals from GSTT1 null group ( $25.72 \pm 0.92 \mu\text{mol NADPH min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{protein}$ ) compared to GSTT1 present group ( $23.57 \pm 0.58 \mu\text{mol NADPH min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{protein}$ ) was found ( $p < 0.05$ ). According to CYP2E1 genotyping, no significant difference was observed in exposure assessment and hematological parameters between the two allelic groups. Higher GST activity was observed in the CYP2E1-2 group ( $4.34 \pm 0.73 \text{ U mg}^{-1} \text{ protein}$ ) compared to CYP2E1-1 group ( $3.14 \pm 0.11 \text{ U mg}^{-1} \text{ protein}$ ) (Figure 3B) ( $p < 0.05$ ).

Considering the grouping of the individuals in the two genotype classes (ALAD-1 and ALAD-2), ALAD genotype had a statistically significant effect on blood  $\delta$ -ALA-D enzymatic activity. Lower  $\delta$ -ALA-D enzymatic activity was observed on individuals from ALAD-2 genotype ( $25.56 \pm 1.04 \text{ U L}^{-1}$ ) compared to the individuals from ALA-D1 genotype ( $28.35 \pm 0.61$ ) (Figure 3C) ( $p < 0.05$ ). No significant difference was observed between the genotypic group ALA-D1 ( $22.83 \pm 0.98 \text{ U L}^{-1}$ ) and ALA-D2 ( $21.83 \pm 2.06$

U L<sup>-1</sup>) for  $\delta$ -ALA-D reactivation index. Additionally, the influence of the two allelic groups of ALAD gene polymorphism was evaluated on the classical hematological parameters, oxidative stress parameters and exposure assessment parameters, and no significant difference was observed.



**Figure 3.** (A) Glutathione peroxidase (GPx) activity in allelic groups GSTT1 present (n=242) and GSTT1 null (n= 74) (B) Glutathione S-transferase (GST) activity in allelic groups CYP2E1-1 (n=282) and CYP2E1-2 (n=34) (C)  $\delta$ -Aminolevulinate dehydratase ( $\delta$ -ALA-D) activity in allelic groups ALA-D1 (n=265) and ALA-D2 (n=51). \* $p < 0.05$  compared to non-occupationally exposed group by ANCOVA one-way controlled by age, smoking and drinking habits.

#### 4. Discussion

The quantitative risk assessment of exposure to low levels of benzene is still a challenging exercise, considering the number of critical factors involved and roles

that are not yet fully understood. Functional genetic polymorphisms of enzymes that act on benzene biotransformation may modulate the risk of adverse effects. These genetic polymorphisms can modify both the exposure-risk relationships, in which case they may be considered as biomarkers of susceptibility, or the exposure-biomarker relationships, in the latter case modulating the levels of biomarkers of internal dose or of early effect (De Palma and Manno, 2014; Carbonari et al, 2016). In this study, we evaluated the effect of polymorphisms of key enzymes of benzene metabolism in classically altered parameters such as hematological parameters and biomarkers of oxidative stress and enzymatic activity of  $\delta$ -ALA-D in occupationally exposed individuals to low levels of benzene.

The results reported in the present study are in accordance with previous studies and demonstrate that gas station workers, as expected, are exposed to higher levels of airborne benzene compared to a non-occupationally exposed group, and consequently, urinary levels of benzene urinary biomarker, *t,t*-muconic acid, were increased in gas station workers (Wiwanitkit et al, 2001; Fustinoni et al, 2012; Moro et al, 2013; Göethel et al, 2014). In the same way, higher toluene airborne levels and its urinary biomarker of exposure, hippuric acid, were observed in gas station workers. Taken together, the presence of a positive association between airborne benzene and airborne toluene, in addition to the positive association of urinary *t, t*-muconic acid and hippuric acid levels indicate a common source of exposure, as also observed in a previous study (Moro et al, 2015).

Despite the higher levels of exposure biomarkers observed in the individuals occupationally exposed compared to non-occupationally exposed group, the median values for airborne benzene and toluene, as well as their respective urinary biomarkers, were within the values preconized by ACGIH (2014), evidencing low levels of exposure. These results corroborate with previous studies which show that levels of benzene exposure had been decreasing considerably over the years, leading to exposure levels below the recommended limits (Weisel et al, 2010; Moro et al, 2015 and 2017; Fenga et al, 2017), possibly due to the efforts of regulatory agencies to reduce the levels of exposure to this carcinogen agent. However, recent epidemiological studies about the occupational exposure to benzene reported early alterations related to this exposure even at low levels of exposure. The most common



alterations observed in individuals occupationally exposed to benzene include hematological alterations, and changes in biomarkers of oxidative and DNA damages (Uzma et al, 2010; Bahadar et al, 2014; Göethel et al, 2014; Costa et al, 2016; Fenga et al, 2017).

Our results from hematological parameters showed that benzene occupational exposure lowered red blood cell hemoglobin and hematocrit in occupationally exposed males compared to non-occupationally exposed males. Although these parameters were slightly reduced in females occupationally exposed to benzene, in comparison to non-occupationally exposed females, no significant differences were observed in the red cell parameters between the female groups, probably due to the small number of participants of the female group in this study. Regarding leukocytes, alterations in white blood cells counts, lymphocytes percentages, and both neutrophils counts and percentages, when the two pairs of gender groups are compared. Reduced red blood cell counts, hemoglobin levels and hematocrit were negatively associated with *t*, *t*-muconic acid, while WBC count was positively associated with the time of exposure. In spite of the differences observed in this study, these parameters remained within the reference values. In fact, despite the well-recognized hematotoxic effect of benzene, it is well established that alterations in the blood cells counts are not sensitive indicators of early toxic effects of this exposure. Our results are in accordance with previous studies that found alterations in hematological parameters in individuals occupationally exposed to benzene compared with individuals non-occupationally exposed. However, the results remained within the reference values (Tunsaringkarn et al, 2013; Ibrahim et al, 2014; Moro et al, 2017).

Oxidative stress is defined as an imbalance between oxidants and antioxidants in favor of the oxidants, leading to a disruption of redox signaling and control and/or molecular damage (Sies, 2007). Regarding the oxidative status, our data showed alterations in all oxidative stress parameters analyzed in individuals occupationally exposed compared to non-occupationally exposed. Levels of the major biomarker of lipid peroxidation (MDA) were significantly increased, while the enzymatic activities of antioxidant enzymes, levels of non-protein thiol levels, and of the exogenous antioxidant vitamin C were significantly decreased in GSW group compared to NEG, demonstrating a characteristic picture of imbalance in oxidative state in individuals

occupationally exposed to benzene. Partial correlation analysis between oxidative status parameters and exposure assessment parameters (exposure time, benzene and toluene levels in the air, and urinary exposure biomarkers), demonstrated associations between increased lipid peroxidation and injury of antioxidant defenses with higher indexes of exposure. These results, together with previous studies that demonstrate changes in different markers of oxidative stress in occupationally exposed workers to benzene, make it clear that the biotransformation of benzene with consequent formation of oxygen reactive species (ROS) is a crucial point of its toxicity (Moro et al, 2013; Xiong et al, 2016; Martinez et al, 2018). Continuous production reactive species during benzene metabolism may induce toxicity to key cellular components including lipids, proteins, carbohydrates and DNA, as demonstrated by previous studies (Pandey et al, 2008; Badham et al, 2010a and 2010b; Uzma et al, 2010; Angelini et al, 2011; Fenga et al, 2017).

Furthermore,  $\delta$ -ALA-D activity was lower in the GSW group compared to the non-occupationally exposed group. It is known that in pro-oxidative situations, the enzyme  $\delta$ -ALA-D may be inhibited (Gonçalves et al, 2009; Rocha et al, 2012), due to its sulfhydryl groups that are extremely sensitive to oxidizing agents (Farina et al, 2003). The inhibited  $\delta$ -ALA-D activity was negatively associated with higher benzene exposure (time of exposure, airborne benzene and urinary excretion of *t*, *t* – muconic acid), demonstrating that the occupational exposure to benzene is directly related to the inhibition of this enzyme. Our results are in accordance with previous data published by Moro et al, (2015), who showed for the first time lower  $\delta$ -ALA-D activity in individuals occupationally exposed to benzene. These findings represent an important contribution to a deeper understanding of benzene's mechanism of toxicity, which has not been fully clarified.  $\delta$ -ALA-D inhibition due to oxidation of the its sulfhydryl groups by ROS may compromise heme biosynthesis and ultimately lead to the development of anemia (Baierle et al, 2010), a common toxic effect from benzene exposure (IARC, 2012). Moreover, this inhibition results from an accumulation of the substrate 5-aminolevulinic acid (ALA), a pro-oxidant compound, thus contributing to an increase in the production of ROS (Gonçalves et al, 2009; Rocha et al, 2012; Farina et al, 2016). Moreover,  $\delta$ -ALA-D reactivation index has been used for investigation of ALA-D inhibition by oxidizing agents (Grotto et al, 2010). The involvement of oxidant

species in the inhibition of the enzymatic activity of  $\delta$ -ALA-D is demonstrated in this study by the use of the reducing reagent DTT, a classical thiol groups reducer utilized in  $\delta$ -ALA-D reactivation activity assay to prevent and/or revert the  $\delta$ -ALA-D activity when the inhibition is caused by oxidizing agents (Valentini et al, 2007). In our findings,  $\delta$ -ALA-D reactivation activity was significantly increased in GSW group compared to NEG, demonstrating that the oxidation of thiol groups is associated with the  $\delta$ -ALA-D inhibition in the individuals occupationally exposed to benzene.

CYP2E1 is involved in the first step, phase I reactions, of benzene biotransformation pathway (Kim et al, 2007; Rappaport et al, 2009). To date, it has not been possible to identify an overall effect of the polymorphisms of this gene on the enzymatic function of CYP2E1 (Qu et al, 2005). Consequently, current studies investigating CYP2E1 polymorphisms are focused on their effects on the excretion levels of the biomarkers of benzene exposure and present conflicting results. While some studies demonstrate the influence of polymorphic alleles on the excretion of benzene metabolites, either increasing or decreasing their excretions (Fustinoni et al, 2005 and Kim et al, 2007, respectively), other authors did not find any influence of these polymorphisms on the levels of excretion of these metabolites (Buthbumrung et al, 2008; Hoet et al, 2009; Carbonari et al, 2014). In this study, although there is no significant difference between groups regarding genotype of CYP2E1, we observed a higher frequency of polymorphic alleles in GSW compared to the no occupationally exposed group. Our results agree with the latter studies, and we did not observe any influence of CYP2E1 enzymatic polymorphism on levels of excretion of *t*, *t*-muconic acid. It is believed that these inconsistent results are due to the questionable effect of the CYP2E1 genotype on the prediction of CYP2E1 enzymatic activity, as well as the rare frequency of the variant allele that is low among Caucasians and African-Americans (1–5%), and much higher in Asian populations (19–28%), thus affecting the power of the statistical tests (Stubbins and Wolf, 1999). In this study, we investigated for the first time the influence of the variant alleles from gene coding CYP2E1 in parameters of oxidative stress, and found higher GST enzymatic activity in individuals with variant alleles for CYP2E1 compared to individuals with wild-type allele.

The GSTs are phase II enzymes involved in the detoxification reactions. The GST family consists of several gene subfamilies of which GSTP1, GSTM1, and GSTT1 are the most important ones (Singh et al, 2011). Both GSTT1 and GSTM1 are involved in detoxification of benzene to S-phenylmercapturic acid (SPMA) (Kim et al, 2006; Schnatter et al, 2012). The frequencies of null GSTT1 and GSTM1 in this study were 23.42% and 47.47%, respectively, and are in accordance with previous data reported by Nasser et al. (2015). In relation to the frequency of the null alleles of GSTT1 between groups, although there is no significant difference, we observed a higher frequency of null alleles in GSW compared to the not occupationally exposed group, these results are in agreement with the reports from Nourozzi et al (2018). Considering their participation in the formation of SPMA, numerous studies focused on evaluating the effect of GSTs polymorphisms on the excretion of this metabolite, and as well reviewed by Carbonari et al (2016), polymorphisms in genes encoding for GSTs influence SPMA excretion rates. In this study, we evaluated the effect of these polymorphisms in oxidative stress and considering the grouping according to genotypes, lower GPx activity was observed in individuals that presented null allele for GSTT1. No other influence of these enzymatic polymorphisms was observed on the biomarkers evaluated in this study.

Regarding the ALAD polymorphism, several polymorphisms of this gene have been identified until now. The most studied, and assessed in the present study, is the one leading to the formation of two alleles designated as ALAD-1 and ALAD-2, codominant and of Mendelian transmission, discovered by Petrucci et al. (1982), named "ALAD G177C" (rs1800435). The changing of only one nucleotide in position 177 in the ALAD-2 allele results in the replacement of asparagine by lysine and synthesis of the ALAD2 isoenzyme. For the first time, this polymorphism has been evaluated in individuals occupationally exposed to benzene, and higher polymorphic alleles were observed in the exposed group compared to non-occupationally exposed. When the individuals were considered as a single sample and grouped according to the ALAD genotype, our results showed that in the population studied, the prevalence of the less common variant (ALAD-2 – CG and GG) was 16.24%. This findings are in accordance with data reported by Fujihara et al (2009), who evaluated the ethnic variation in genotype frequencies of ALAD and showed that the prevalence of ALAD-

2 ranged from 1% to 20% in Caucasian and Asian populations. Subjects who carried the variant allele for ALAD (ALAD-2) polymorphism displayed significant lower  $\delta$ -ALA-D activity than those who had the ALAD-1 genotype. Our results corroborate the previous report by Da Cunha Martins Jr et al (2015), who also observed lower  $\delta$ -ALA-D activity in Brazilian battery workers that carried the genotype ALAD-2.

The main limitation of our study was that genetic polymorphism of all enzymes in biotransformation pathway of benzene were not investigated. In addition, the evaluation of SPMA as a biomarker of exposure to additional benzene could aid in the observation of other important associations. Further studies using a large sample of participants and evaluating the major polymorphisms in all benzene metabolizing enzymes could help to elucidate the influence of enzymatic polymorphisms in occupationally exposed individuals to benzene.

In conclusion, our results clearly show the influence of the ALAD gene polymorphism on the reduction of the erythrocyte enzymatic activity of the  $\delta$ -ALA-D enzyme. To our knowledge, this is a pioneer finding in workers occupationally exposed to benzene. Moreover, considering that inhibition of this enzyme may result in anemia, a common hematotoxic effect caused by benzene, the presence of this polymorphism possibly characterizes individuals as more susceptible to the hematotoxic effects of benzene. In addition, the inhibition of this enzyme results in the accumulation of its pro-oxidant substrate that may exacerbate the oxidative effects from this exposure. Additional studies with a larger sample of participants evaluating this enzymatic polymorphism are needed to confirm these findings.

### **Conflict of interest**

The authors declare that there are no conflicts of interest.

### **Acknowledgments**

The authors would like to thank all the participants who volunteered for this study, the volunteers from RS, Brazil, especially Mr. Sérgio Arantes (Banrisul), who were essential for the development of this study. This work was supported by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio Grande do Sul, through the grants provided to S.C. Garcia.

Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (CAPES) provided a PhD research fellowship to Elisa Sauer. Solange C Garcia is a recipient of CNPq research fellowship.

## References

ACGIH (2014) TLVs and BEIs based on the documentation of the threshold limit values for chemical substances and physical agents and biological indices. In: Proceedings of the American Conference of Governmental Industrial Hygienists, Cincinnati

Aebi, H. Catalase in vitro (1984) *Methods in Enzym.* 105: 121-126

Angelini S, Kumar R, Bermejo J L, Maffei F, Barbieri A, Graziosi F, Carbone F, Cantelli-Forti G, Violante F S, Hemminki K, Hrelia P (2011) Exposure to low environmental levels of benzene: evaluation of micronucleus frequencies and S-phenylmercapturic acid excretion in relation to polymorphisms in genes encoding metabolic enzymes. *metabolic enzymes Mutat. Res.* 719: 7-13

Badham H J, Renaud S J, Wan J, Winn L M (2010) Benzene-initiated oxidative stress: effects on embryonic signaling pathways, *Chem. Biol. Interact.* 184: 218–221.

Bahadar H, Mostafalou S, Abdollahi M (2014) Current understandings and perspectives on non-cancer health effects of benzene: a global concern. *Toxicol Appl Pharmacol* 276: 83-94

Baierle M, Bairros A V D, Moreira A P L, Bulcão R P, Roehrs M, Freitas F A Durgante J, Brucker N, Charão M F, Garcia S C (2012). Quantificação sérica de vitamina C por CLAE-UV e estudo de estabilidade. 35: 403-407.

Baierle M, Valentini J, Paniz C, Moro A M, Barbosa F, Garcia S C (2010) Possíveis efeitos do cobre sanguíneo sobre parâmetros hematológicos em idosas. *J. Bras. Patol. Med. Lab.*, 46: 463-470

Bond A E (1986) Self-service station vehicle refueling exposure study. In: Proceedings of the 1986 EPA/APCA Symposium on Measurement of Toxic Air Pollutants, Air Pollution Control Association, Pittsburgh, PA, pp. 458–466

Bulcão R P, Santa Maria, L, Charão M F, Moro A M, Roehrs M, Garcia S C, Limberger R P (2008) Quantificação simultânea de indicadores biológicos de exposição a solventes orgânicos por cromatografia líquida de alta eficiência. *Quím Nova* 31: 1343-1348

- Buthbumrung N, Mahidol C, Navasumrit P, Promvijit J, Hunsonti P, Autrup H, Ruchirawat M (2008) Oxidative DNA damage and influence of genetic polymorphisms among urban and rural schoolchildren exposed to benzene. *Chem. Biol. Interact.* 172(3): 185–194
- Carbonari D, Chiarella P, Mansi A, Pignini D, Iavicoli S, Tranfo G (2016) Biomarkers of susceptibility following benzene exposure: influence of genetic polymorphisms on benzene metabolism and health effects. *Biomark Med.* 10(2):145-63
- Carbonari D, Proietto A, Fioretti M, Tranfo G, Paci E, Papacchini M, Mansi A (2014) Influence of genetic polymorphisms on t,t-MA/S-PMA ratio in 301 benzene exposed subjects. *Tox. Lett.* 231: 205–212
- Costa C, Ozcagli E, Gangemi S, Schembri F, Giambo F, Androutsopoulos V, Tsatsakis A, Fenga C (2016) Molecular biomarkers of oxidative stress and role of dietary factors in gasoline station attendants. *Food Chem Toxicol* 90: 30-35
- De Lucca L, Rodrigues F, Jantsch L, Neme W, Gallarreta F, Gonçalves T (2016) Oxidative profile and d-aminolevulinic acid dehydratase activity in healthy pregnant women with iron supplementation, *Int. J. Environ. Res. Public Health* 13: 463
- De Palma G, Manno M (2014) Metabolic polymorphisms and biomarkers of effect in the biomonitoring of occupational exposure to low-levels of benzene: state of the art. *Toxicol Lett* 231(2):194-204
- Dougherty D, Garte S, Barchowsky A, Zmuda J, Taioli E. (2008) NQO1, MPO, CYP2E1, GSTT1 and GSTM1 polymorphism and biological effects of benzene exposure--a literature review. *Toxicol Lett.* 10;182(1-3)
- Ducos P, Gaudin R, Robert A, Francin J M, Maire C (1990) Improvement in HPLC analysis of urinary trans, trans-muconic acid, a promising substitute for phenol in the assessment of benzene exposure. *Int Arch Occup Environ Health* 62: 529-534
- Ellman G L (1959) Tissue sulfhydryl groups. *Arch. Biochem. Biophys.* 82: 70–77
- Failace, R. Hemograma – manual de interpretação. Porto Alegre: Artmed, 2009. Farris, G M, Robinson S N, Wong B A, Wong V A, Shah R (1997). Effects of benzene on splenic, thymic, and femoral lymphocytes in mice. *Toxicology* 118: 137-148.
- Farina M, Brandão R, Lara F S, Soares F A, Souza D O, Rocha J B T (2003) Mechanisms of the inhibitory effects of selenium and mercury on the activity of delta-aminolevulinic acid dehydratase from mouse liver, kidney and brain, *Toxicol. Lett.* 139: 55–66

Fenga C, Gangemi S, Teodoro M, Rapisarda V, Golokhvast K, Docea A, Costa C (2017) 8-Hydroxydeoxyguanosine as a biomarker of oxidative DNA damage in workers exposed to low-dose benzene. *Toxicol Rep* 31: 291-295

Fujihara J, Agusa T, Yasuda T, Soejima M, Kato H, Panduro A, Koda Y, Kimura-Kataoka K, Takeshita H (2009) Ethnic variation in genotype frequencies of  $\alpha$ -aminolevulinic acid dehydratase (ALAD). *Tox Lett* 191: 236–239

Fustinoni S, Consonni D, Campo L, Buratti M, Colombi A, Pesatori A C, Bonzini M, Bertazzi P A, Foà V, Garte S, Farmer P B, Levy L S, Pala M, Valerio F, Fontana V, Desideri A, Merlo D F (2005) Monitoring low benzene exposure: comparative evaluation of urinary biomarkers, influence of cigarette smoking and genetic polymorphisms. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 14(9): 2237–2244

Fustinoni S, Rossella F, Polledri E, Bollati V, Campo L, Byun H M, Agnello L, Consonni D, Pesatori A C, Baccarelli A, Bertazzi P A (2012) Global DNA methylation and low-level exposure to benzene. *Med Lav.* 103(2):84-95

Galbraith D, Gross S A, Paustenbach D (2010) Benzene and human health: a historical review and appraisal of associations with various diseases. *Crit Rev Toxicol* 40: 1-46

Göethel G, Brucker N, Moro A M, Charão M F, Fracasso R, Barth, Bubols G, Durgante J, Nascimento S, Baierle M, Saldiva P H, Garcia S C (2014) Evaluation of genotoxicity in workers exposed to benzene and atmospheric pollutants. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen* 770: 61-65

Gonçalves T L, Benvegno D M, Bonfanti G, Frediani A V, Rocha J B T (2009) DeltaALA-D activity is a reliable marker for oxidative stress in bone marrow transplant patients, *BMC Cancer* 9: (138) 1471-2407

Grotto D, Santa Maria L D, Boeira S, Valentini J, Charão M F, Moro A M, Nascimento P C, Pomblum V J, Garcia S C (2007) Rapid quantification of malondialdehyde in plasma by high performance liquid chromatography-visible detection. *J Pharm Biomed Anal.* (2):619-24.

Grotto D, Valentini J, Fillion M, Passos C J, Garcia S C, Mergler D, Barbosa J F (2010) Mercury exposure and oxidative stress in communities of the Brazilian Amazon. *Sci. Total Environ.* 408, 806–811.



Habig W H, Pabst M J, Fleischner G, Gatmaitan Z, Arias I M, Jakoby W B (1974) The identity of glutathione S-transferase B with ligandin, a major binding protein of liver. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 71(10): 3879-3882.

Hoet P , De Smedt E, Ferrari M, Imbriani M, Maestri L, Negri S, De Wilde P, Lison D, Haufroid V (2009) Evaluation of urinary biomarkers of exposure to benzene: correlation with blood benzene and influence of confounding factors. *Int. Arch. Occup. Environ. Health* 82: 985–995

Ibrahim K S, Amer N M, El-dossuky E A, Emara A M, El-Fattah Ael-S, Shahy E M (2012) Hematological effect of benzene exposure with emphasis of muconic acid as a biomarker. *Toxicol Ind Health*. 30(5):467-74

International Agency for Research on Cancer (2012) Agents Classified by the IARC Monographs 1, 103

Kim S, Lan Q, Waidyanatha S, Chanock S, Johnson B A, Vermeulen R, Smith M T, Zhang L, Li G, Shen M, Yin S, Rothman N, Rappaport S M (2007) Genetic polymorphisms and benzene metabolism in humans exposed to a wide range of air concentrations. *Pharmacogenet. Genomics* 17(10): 789–801

Kim S, Vermeulen R, Waidyanatha S, Johnson B A, Lan Q, Smith M T, Zhang L, Li G, Shen M, Yin S, Rothman N, Rappaport S M (2006) Modeling human metabolism of benzene following occupational and environmental exposures. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev*. 15(11): 2246–2252

Kim S, Vermeulen R, Waidyanatha S, Johnson B A, Lan Q, Rothman N, Smith M T, Zhang L, Li G, Shen M, Yin S, Rappaport S M (2006) Using urinary biomarkers to elucidate dose-related patterns of human benzene metabolism. *Carcinogenesis* 27(4): 772–781

Liu Y, Chen X, Shi Y, Zhang J, Zhang H, Zhang F, Zhu B, (2016) Plasma microRNA expression in workers occupationally exposed to benzene. *Public Health Emerg* 1:3

Martínez-Rodríguez J L, Gutiérrez-Hernández R, Reyes-Estrada C A, Granados-López A J, Arcos-Ortega T, López J A (2018) Quantitative measurement of oxidative damage in erythrocytes as indicator in benzene intoxications. *Toxicol Mech Methods*. 28(6):450-460.

Miller D N, Bryant J E, Madsen E L, Ghiorse W C (1999) Evaluation and optimization of DNA extraction and purification procedures for soil and sediment samples. *Appl Environ Microbiol*. 65(11):4715-4724.

Mohammadyan M, Golafshani F Y, Yousefinejad R, Boogaard P J, Heibati B (2016) Risk assessment of benzene among gas station refueling workers. *Feb-Fresenius environmental bulletin*, 3563.

Moro A M, Brucker N, Charão M F, Baierle M, Sauer E, Goethel G, Barth A, Nascimento S N, Gauer B, Durgante J, Amaral B S, Neto F R, Gioda A, Garcia S C (2017) Biomonitoring of gasoline station attendants exposed to benzene: Effect of gender. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen* 813: 1-9

Moro A M, Brucker N, Charão M F, Sauer E, Freitas F, Durgante J, Bubols G, Campanharo S, Linden R, Souza A P, Bonorino C, Moresco R, Pilger D, Gioda A, Farsky S, Duschl A, Garcia S C (2015) Early hematological and immunological alterations in gasoline station attendants exposed to benzene. *Environ Res* 137: 349-356

Moro A M, Charão M F, Brucker N, Durgante J, Baierle M, Bubols G, Goethel G, Fracasso R, Nascimento S, Bulcão R, Gauer B, Barth A, Bochi G, Moresco R, Gioda A, Salvador M, Farsky S, Garcia S C (2013) Genotoxicity and oxidative stress in gasoline station attendants. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen* 754(1): 63-70

Nasseri G, Zahedi T, Mousavi-Kazerooni F, Saadat M (2015) (Prevalence of null genotypes of glutathione S-transferase T1 (GSTT1) and M1 (GSTM1) in seven Iranian populations. *Iran J Public Health* 44:1655–1661

Nourozi M A, Neghab M, Bazzaz J T, Nejat S, Mansoori Y, Shahtaheri S J (2017) Association between polymorphism of GSTP1, GSTT1, GSTM1 and CYP2E1 genes and susceptibility to benzene-induced hematotoxicity. *Arch Toxicol*. In press

Paglia D E, Valentini W N (1967) Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J. Lab Clin Med*. 70: 158-169

Pandey M, Bajpayee D, Parmar R, Kumar S K, Rastogi N, Mathur P, Thorning, M. de Matas, Shao Q, Anderson D, Dhawan A (2008) Multipronged evaluation of genotoxicity in Indian petrol-pump workers. *Environ. Mol. Mutagen*. 49: 695–707

Petrucci R, Leonardi A, Battistuzzi G (1982) The genetic polymorphism of deltaaminolevulinate dehydratase in Italy. *Hum. Genet*. 60: 289–290.

Qu Q, Shore R, Li G, Su L, Jin X, Melikian A A, Roy N, Chen L C, Wirgin I, Cohen B, Yin S, Li Y, Mu R (2005) Biomarkers of benzene: urinary metabolites in relation to individual genotype and personal exposure. *Chem. Biol. Interact*. 153–154, 85–95

Rappaport S M, Kim S, Lan Q, Li G, Vermeulen R, Waidyanatha S, Zhang L, Yin S, Smith M T (2010) Human benzene metabolism following occupational and environmental exposures. *Chemico-biological interac* 184(1): 189-195.

Rappaport S M, Kim S, Lan Q, Vermeulen R, Waidyanatha S, Zhang L, Li G, Yin S, Hayes R B, Rothman N, Martyn T, Smith M T (2009) Evidence that humans metabolize benzene via two pathways. *Environ. Health Perspect.* 117(6), 946–952.

Rocha J B T, Saraiva R A, Garcia S C, Gravina F S, Nogueira C W (2012) Aminolevulinate dehydratase (delta-ALA-D) as marker protein of intoxication with metals and other pro-oxidant situations, *Toxicol. Res.* 1: 85–102

Sassa S (1982) Delta-aminolevulinic acid dehydratase assay. *Enzyme* 28: 133-45

Schnatter A R, Glass D C, Tang G, Irons R D, Rushton L (2012) Myelodysplastic syndrome and benzene exposure among petroleum workers: an international pooled analysis *J Natl. Cancer. Inst.* 104(22):1724-37

Sies H (2007) Biological redox systems and oxidative stress. *Cell Mol Life Sci.* 64(17): 2181-2188.

Singh S, Kumar V, Singha P, Thakur S, Banerjee B D, Rautelaa R S, Grovera S S, Rawata D S, Pash S T, Jain S K, Rai A (2011) Genetic polymorphisms of GSTM1, GSTT1 and GSTP1 and susceptibility to DNA damage in workers occupationally exposed to organophosphate pesticides. *Mutat Res* 725:36–42

Snyder R, Hedli C C (1996). An overview of benzene metabolism. *Environ. Health Perspect.* 104, 1165–1171

Stubbins M J, Wolf C R (1999) Chapter 21. Additional polymorphisms and cancer. *IARC Sci Publ.* 148:271-302.

Trevisan P, Da Silva J N, Da Silva A P, Rosa R F M, Paskulin G A, Thiesen F, de Oliveira C A, Zen P R (2014) Evaluation of genotoxic effects of benzene and its derivatives in workers of gas stations. *Environ Monit Assess* 186: 2195-2204

Tunsaringkarn T, Soogarun S, Palasuwan A (2013) Occupational exposure to benzene and changes in hematological parameters and urinary trans, trans-muconic acid. *Int J Occup Environ Med.* 4(1): 45-9

Uzma N, Kumar B S, Hazari M A (2010) Exposure to benzene induces oxidative stress, alters the immune response and expression of p53 in gasoline filling workers. *Am. J. Ind. Med.* 53: 1264–1270

Valentini J, Schmitt G C, Grotto D, Santa Maria L D, Boeira S P, Piva S J, Brucker N, Bohrer D, Pomblum V J, Emanuelli T, Garcia S C (2007) Human erythrocyte  $\delta$ -aminolevulinic acid dehydratase activity and oxidative stress in hemodialysis patients. *Clin. Biochem.* 40, 591–594

Weisel C P (2010) Benzene exposure: an overview of monitoring methods and their findings. *Chem Biol Interact* 184: 58-66

Wiwanitkit V, Suwansaksri J, Nasuan P (2001) Urine trans,trans-muconic acid as a biomarker for benzene exposure in gas station attendants in Bangkok, Thailand. *Ann Clin Lab Sci.* 31(4):399-401.

Xiong F, Li Q, Zhou B, Huang J, Liang G, Zhang L E, Ma S, Qing L, Liang L, Su J, Peng X, Li Q, Zou Y (2016) Oxidative Stress and Genotoxicity of Long-Term Occupational Exposure to Low Levels of BTEX in Gas Station Workers. *Int J Environ Res Public Health* 13: 1212

Zhang G H, Ji B Q, Li Y, Zheng G Q, Ye LL, Hao Y H, Ren J C, Zhou L F, Xu X W, Zhu Y, Xia Z L (2016) Benchmark Doses Based on Abnormality of WBC or Micronucleus Frequency in Benzene-Exposed Chinese Workers. *J Occup Environ Med* 58: e39-e

## PARTE III





## DISCUSSÃO

---

Apesar da reconhecida ação hematotóxica, imunotóxica e carcinogênica do benzeno, o mecanismo completo através do qual esse hidrocarboneto aromático causa esses efeitos tóxicos à saúde humana ainda não é totalmente esclarecido. Até o momento, sabe-se que a chave da sua toxicidade reside no seu metabolismo, no qual ocorre a formação de metabólitos eletrofilicos juntamente com EROS que são responsáveis por causar danos a biomoléculas orgânicas fundamentais para o correto funcionamento do organismo, incluindo os lipídios, proteínas e DNA (ATSDR, 2007; BAHADAR *et al.*, 2014).

Apesar dos esforços para redução dos níveis de exposição ao benzeno, este solvente continua sendo um predominante contaminante ambiental, amplamente utilizado nas indústrias e como componente da gasolina (THOMAS *et al.*, 2014; LIU *et al.*, 2016; ZHANG *et al.*, 2016). Os níveis de exposição ao benzeno vêm decrescendo nos últimos anos, entretanto, os efeitos tóxicos decorrentes dessa exposição são observados em indivíduos expostos mesmo a baixos níveis de exposição a esse solvente (WEISEL *et al.*, 2010; MORO *et al.*, 2015 e 2017; FENGA *et al.*, 2017)

Portanto, o presente estudo teve como principal objetivo avançar nessa linha e aprofundar o conhecimento relativo ao mecanismo de hematotoxicidade, imunotoxicidade e carcinogenicidade do benzeno, visando a evidenciação de biomarcadores precoces de dano.

Para tanto, foram avaliados um grupo de trabalhadores de postos de combustíveis do estado do Rio Grande do Sul, e um grupo não exposto ocupacionalmente a agentes químicos, composto por trabalhadores com atividades administrativas desse mesmo estado.

No capítulo I, buscou-se avaliar a expressão gênica e proteica das principais moléculas coestimulatórias do sistema imune, B7.1 e B7.2, sistema complemento (SC) e gene supressor tumoral p53. Monitoramento ambiental demonstrou níveis aumentados de benzeno no ar nos amostradores oriundos do grupo exposto ocupacionalmente quando comparado àqueles do grupo não exposto. Os níveis de

benzeno no ar, foram mais baixos que os níveis máximos permitidos pela ACGIH, assim como os encontrados por estudos recentes realizados com trabalhadores de postos de combustíveis (MORO *et al.*, 2015; LI *et al.*, 2016; XIONG *et al.*, 2016). Além disso, observamos maiores níveis urinários de *AttM* no grupo exposto ocupacionalmente quando comparado ao grupo não exposto.

Avaliação da expressão proteica das moléculas B7.1 e B7.2 demonstrou redução na expressão de ambas nos trabalhadores expostos ocupacionalmente ao benzeno. Esses resultados corroboram com os resultados previamente publicados por nosso grupo de pesquisa (MORO *et al.*, 2015). Essa redução estava associada aos maiores níveis de excreção do *AttM* bem como ao maior tempo de exposição ocupacional, confirmando a influência da exposição ao benzeno na redução da expressão destas moléculas. Adicionalmente, no presente estudo, a expressão gênica relativa dessas moléculas foi avaliada através dos níveis de mRNA por PCR em tempo real em células mononucleares. Em concordância com os resultados de expressão proteica, os níveis de expressão gênica das moléculas coestimulatórias B7.1 e B7.2 estavam reduzidos nos trabalhadores expostos ocupacionalmente ao benzeno quando comparado ao grupo não exposto. Estes dados demonstram que a alteração na expressão das principais moléculas coestimulatórias do sistema imune na exposição crônica ao benzeno ocorre não somente a nível proteico, mas também a nível gênico, pré-transcricional.

Além disso, observou-se através de modelo de correlação parcial, associação negativa entre os níveis de expressão gênica do B7.1 e níveis urinários de *AttM*, tempo de exposição e níveis de benzeno no ar. Da mesma forma, os níveis de expressão do B7.2 foram negativamente associados a maiores níveis de excreção de *AttM*, tempo de exposição e níveis de benzeno no ar.

A participação das moléculas coestimulatórias, B7.1 e B7.2 na modulação imune por linfócitos T constitui, possivelmente, uma das vias de comunicação celular mais relevante. A ausência ou depleção da expressão dessas moléculas resulta em diminuição da resposta imune, ou ainda na produção de células T anérgicas, culminando em ineficiente vigilância imunológica (DOLEN e ESENDAGLI, 2013; ABBAS *et al.*, 2014). Nessa linha, alteração na expressão de B7.1 e B7.2 é considerada um dos principais mecanismos de escape de células tumorais em relação



à vigilância imune (CEERAZ *et al.*, 2013; SHARMA e ALLISON, 2015; JANAKIRAM *et al.*, 2016).

A exposição ocupacional ao benzeno está relacionada ao desenvolvimento de leucemias e outras neoplasias hematológicas (MCHALE, 2012). Alguns estudos demonstraram redução significativa na expressão dessas moléculas em pacientes portadores de leucemias (COSTELLO *et al.*, 1998; DAI *et al.*, 2009). Sendo assim, sugere-se que a redução na expressão dessas moléculas em trabalhadores expostos ocupacionalmente ao benzeno possa ser considerada como um potencial mecanismo de imunotoxicidade e carcinogenicidade do benzeno, tendo em vista o papel chave dessas moléculas na prevenção imune ao desenvolvimento de neoplasias malignas.

Considerando a importância do sistema complemento tanto na imunidade inata como adaptativa, os níveis séricos das proteínas C3 e C4 dessa via foram avaliadas, e seus níveis estavam reduzidos nos indivíduos expostos ocupacionalmente quando comparados aos não expostos ocupacionalmente. Além disso, foram observadas associações negativas entre os níveis séricos de C3 *versus* tempo de exposição, bem como, entre os níveis séricos de C4 e níveis urinários de *AtfM* urinário. Essa redução significativa nos níveis de C3 e C4 no grupo exposto ocorre possivelmente devido ao maior nível de ativação da cascata complemento em decorrência da exposição ocupacional crônica ao benzeno, resultando no maior consumo das proteínas C3 e C4. Estes resultados estão de acordo com os achados prévios de Smolik e colaboradores (1973), entretanto, pela primeira vez essa redução foi associada aos níveis de exposição ao benzeno. Considerando a relação entre a inflamação crônica, consumo dos componentes do sistema complemento e o desenvolvimento de neoplasias, esses achados podem auxiliar a evidenciar um biomarcador precoce de efeito imunotóxico na exposição ocupacional ao benzeno, entretanto estudos adicionais que avaliem outros componentes do sistema imunológico, bem como outros biomarcadores de inflamação são necessários para compreender como o benzeno atua nessa via.

Estudos experimentais em modelos animais têm demonstrado que o p53 apresenta função importante no mecanismo de toxicidade do benzeno (BOLEY *et al.*, 2002; Yoon *et al.*, 2003; KAWASAKI *et al.*, 2009). Nossos dados indicaram uma redução significativa dos níveis relativos de mRNA do p53 nos trabalhadores

ocupacionalmente expostos. Adicionalmente, os níveis de expressão do p53 estavam negativamente correlacionados a maiores níveis de exposição ao benzeno, maiores níveis de excreção do *AtfM* e maior tempo de exposição. O modelo de regressão linear revelou o tempo de exposição como melhor preditor para redução nos níveis de expressão gênica do p53, demonstrando que a exposição ocupacional ao benzeno de forma crônica é responsável por causar tal prejuízo. O p53 atua como guardião do genoma através da promoção da interrupção do ciclo celular, apoptose e ativação de genes de reparo quando necessários. De fato, sua função encontra-se alterada em mais de 50% de todos os tumores e sua alteração encontra-se relacionada a piores prognósticos (CHI, 2016). Portanto, trata-se de outra importante via de defesa do organismo frente ao desenvolvimento tumoral que encontra-se prejudicada em indivíduos ocupacionalmente expostos ao benzeno.

Interessantemente, nossos resultados demonstraram a partir de modelo de correlação parcial, fortes associações entre os níveis reduzidos de expressão gênica das moléculas do sistema imunológico avaliados em nosso estudo (B7.1 e B7.2) e o p53, sugerindo que a fragilidade no sistema imune tem um papel chave na carcinogenicidade do benzeno.

No capítulo II, avaliou-se os polimorfismos enzimáticos em genes que codificam enzimas chave na biotransformação do benzeno, CYP2E1, GSTM1 e GSTT1, e no gene codificante para a enzima  $\delta$ -ALA-D. Além disso, foram avaliados parâmetros hematológicos e parâmetros clássicos de estresse oxidativo, incluindo a avaliação da atividade enzimática da  $\delta$ -ALA-D, e os potenciais efeitos da presença de alelos polimórficos sobre esses parâmetros analisados foram investigados.

Os resultados referentes ao monitoramento ambiental e biomonitoramento, estavam de acordo com os resultados previamente demonstrados no capítulo I, ou seja, os indivíduos trabalhadores de postos de combustíveis apresentaram maiores níveis de exposição ao benzeno, observado tanto pelos níveis desse solvente no ar como através do biomarcador de exposição avaliado, *AtfM*.

Parâmetros hematológicos clássicos foram avaliados através de hemograma completo. A comparação entre os grupos foi realizada, nesse caso, subdividindo-se os grupos de acordo com o sexo, tendo em vista os valores de referência diferentes para homens e mulheres no hemograma. Algumas diferenças significativas foram

observadas entre os grupos, como reduções significativas na contagem total de células vermelhas (RBC), hemoglobina (Hb) e hematócrito (HCT) para os indivíduos do sexo masculino do grupo exposto ocupacionalmente. Também foi observado um aumento na contagem de células brancas (WBC), porcentagem e contagem total de neutrófilos e porcentagem de linfócitos para os grupos de expostos ocupacionalmente de ambos os sexos comparados aos seus referentes grupos de não expostos ocupacionalmente. Apesar destas diferenças observadas, as médias de todos os parâmetros avaliados estavam dentro dos respectivos valores de referência. Nossos resultados estão de acordo com resultados prévios, e corroboram com o conhecimento de que os parâmetros hematológicos, avaliados através do hemograma, não possibilitam a detecção precoce de danos causados pelo benzeno, tendo em vista que os valores dos indivíduos expostos, na maioria dos casos, permanecem dentro dos valores de referência (ROTHMAN *et al.*, 1996; MORO *et al.*, 2015; SWAEN *et al.*, 2010 e CASALE *et al.*, 2016).

Portanto, a fim de avaliar um potencial biomarcador precoce de dano hematológico na exposição ocupacional ao benzeno, foi quantificada a atividade enzimática da enzima  $\delta$ -ALA-D, bem como seus índices de reativação através da adição do reagente redutor ditioneitol (DTT). A  $\delta$ -ALA-D é uma enzima envolvida na síntese eritropoiética dos grupamentos heme da hemoglobina (ROCHA *et al.*, 2012, BAIERLE *et al.*, 2014). Observou-se inibição na atividade enzimática da  $\delta$ -ALA-D no grupo ocupacionalmente exposto, e este resultado está de acordo com os achados prévios do nosso grupo de pesquisa (MORO *et al.*, 2015). Essa inibição pode ser prejudicial à síntese dos grupamentos heme da hemoglobina, bem como resultar em quadros de anemia (BAIERLE *et al.*, 2010), um efeito hematotóxico comum na exposição ocupacional ao benzeno (BAHADAR *et al.*, 2014). De fato, apesar dos valores de hemoglobina estarem dentro dos valores de referência para ambos os grupos de estudo, foram encontrados níveis mais baixos de hemoglobina nos trabalhadores expostos ocupacionalmente, os quais por sua vez estavam correlacionados com maiores níveis de *A<sub>1</sub>*M urinário. Nossos resultados sugerem que a avaliação da atividade enzimática da  $\delta$ -ALA-D pode ser útil como biomarcador precoce de dano hematológico causado pela exposição ao benzeno. Adicionalmente,

a inibição dessa atividade enzimática nos permite inferir que, provavelmente, essa alteração seja parte chave do mecanismo de hematotoxicidade do benzeno.

Além disso, a  $\delta$ -ALA-D vem sendo utilizada como biomarcador de dano oxidativo por requerer grupos tiólicos (-SH) reduzidos para sua atividade (VALENTINI *et al.*, 2007), os quais são altamente sensíveis à oxidação por elementos pró-oxidantes. O envolvimento de grupos -SH na inibição da  $\delta$ -ALA-D foi avaliado testando o efeito de DTT sobre a enzima, o qual causou um aumento na sua atividade em ambos os grupos, entretanto, a reativação enzimática foi maior no grupo exposto quando comparado ao grupo não exposto, o que demonstra maiores níveis de oxidação dos grupos -SH no grupo exposto. Sabendo que a inibição desta enzima acarreta no acúmulo de seu substrato, o ALA, um potencial pró-oxidante (PRINC *et al.*, 1998), o estresse oxidativo pode aumentar indiretamente, caracterizando dessa forma, um ciclo pró-oxidativo.

Os níveis de MDA, principal produto de peroxidação lipídica, estavam significativamente aumentados no grupo exposto ocupacionalmente e correlacionados positivamente a maiores níveis de excreção de *A<sub>1</sub>M* e maior tempo de exposição. Esses resultados estão de acordo com estudos prévios (GEORGIEVA *et al.*, 2002; UZMA *et al.*, 2010; MORO *et al.*, 2013), demonstrando claramente aumento da oxidação nos indivíduos expostos ao benzeno.

Paralelamente, as atividades das enzimas que compõem o sistema antioxidante endógeno, CAT, GPx e GST, foram avaliadas e observou-se atividades reduzidas no grupo exposto ocupacionalmente. Na mesma linha, os níveis dos grupamentos tiólicos não proteicos, estavam reduzidos no grupo exposto e associados tanto ao tempo de exposição quanto aos níveis urinários de *A<sub>1</sub>M*, bem como, aos níveis de benzeno no ar. Grupamentos tiólicos não proteicos são considerados, conjuntamente, como o principal antioxidante endógeno não enzimático, e atuam não somente como doadores imediatos de elétrons para neutralizar o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e lipoperóxidos, mas também como sequestradores de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (LEICHTWEIS e JI, 2001; ASHFAQ *et al.*, 2006). O possível mecanismo para a redução observada é o consumo dos grupamentos tiólicos não proteicos durante a biotransformação do benzeno que produz diretamente o ácido fenilmercaptúrico (SMITH *et al.*, 1989) ou benzoquinona indiretamente (BRUNMARK e

CADENAS, 1988). Nossos resultados vão ao encontro de dados presentes na literatura e demonstram o envolvimento do benzeno no desequilíbrio das defesas antioxidantes endógenas, demonstrando o consumo desses antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos, que atuam na tentativa de proteger as células frente aos radicais livres produzidos durante a biotransformação do benzeno.

Em relação aos níveis séricos de vitamina C, antioxidante exógeno avaliado nesse estudo, para ambos os grupos, os resultados apresentaram-se dentro dos valores de referência (BURTIS *et al.*, 2009). Entretanto, foi observada diminuição significativa nos níveis de vitamina C no grupo exposto ocupacionalmente quando comparado ao grupo não exposto. Provavelmente há maior consumo desse antioxidante nos indivíduos expostos ocupacionalmente como uma medida protetiva do organismo frente aos danos oxidativos decorrentes dessa exposição. Entretanto, outros antioxidantes exógenos podem estar envolvidos nesse processo, ou ainda a diferença na ingestão alimentar entre os grupos pode também ser um fator interferente nesse parâmetro.

Esses dados, tomados em conjunto com os dados relativos da inibição da atividade enzimática da  $\delta$ -ALA-D e seu maior índice de reativação na presença do agente redutor DTT, compõem um quadro clássico de desequilíbrio oxidativo no grupo exposto ocupacionalmente ao benzeno.

Em relação às análises dos polimorfismos enzimáticos observou-se que o genótipo do gene ALAD revelou diferença significativa entre os grupos, com aumento significativo no percentual de portadores do alelo mutado no grupo ocupacionalmente exposto. Adicionalmente, os participantes foram divididos em dois grupos alélicos para comparação da atividade enzimática, ou seja, indivíduos portadores do genótipo normal e indivíduos portadores de genótipo polimórfico. Observou-se redução significativa da atividade enzimática nos indivíduos portadores do genótipo polimórfico para o gene ALAD, demonstrando, pela primeira vez, o efeito direto desse polimorfismo sobre a atividade enzimática da  $\delta$ -ALA-D em trabalhadores expostos ocupacionalmente ao benzeno. Considerando os efeitos hematotóxicos do benzeno, principalmente sua ação no desenvolvimento de anemia e, ainda, a influência da inibição da  $\delta$ -ALA-D frente ao desenvolvimento de anemia, o polimorfismo no gene codificante para a  $\delta$ -ALA-D que resulta diretamente na inibição da atividade

enzimática, trata-se, possivelmente, de um importante marcador de suscetibilidade aos efeitos hematotóxicos do benzeno.

Tanto a GSTM1 quanto a GSTT1 estão envolvidas na detoxificação do óxido de benzeno a SPMA. As suas variantes genéticas consistem na completa deleção do gene com conseqüente alteração da atividade enzimática (STRANGE *et al.*, 2000). No presente estudo, não foi observada diferença significativa entre os grupos em relação aos genótipos tanto da GSTM1 quanto da GSTT1, apesar do aumento observado na frequência de alelos nulos para o gene GSTT1 no grupo dos indivíduos ocupacionalmente expostos. Quando os participantes do estudo foram agrupados conforme o seu genótipo (positivo ou nulo), não foi observada diferença significativa para os níveis de *AtfM* entre os genótipos para os dois genes avaliados, GSTM1 e GSTT1. Esses resultados estão de acordo com estudos prévios que não encontraram qualquer influência dos genótipos das GSTs na excreção do *AtfM*, uma vez que a formação do *AtfM* é independente dessa via enzimática (FUSTIONINI *et al.*, 2005; LIN *et al.*, 2008; MANINI *et al.*, 2010; CARBONARI *et al.*, 2014).

Por outro lado, inúmeros estudos revisados e documentados por Carbonari e colaboradores (2016) vêm mostrando a influência dos genótipos da GSTM1 e GSTT1 nos níveis de excreção do SPMA. Portadores do alelo nulo, tanto para GSTM1 quanto para a GSTT1 apresentam redução nos níveis urinários de SPMA. Essa redução pode ser explicada pela redução na atividade enzimática da GST em indivíduos que apresentam genótipo nulo, reduzindo a taxa de biotransformação do benzeno em SPMA.

Adicionalmente, considerando o agrupamento dos indivíduos conforme os genótipos de GSTM1 e GSTT1, avaliamos a influência da ocorrência desses polimorfismos sobre os parâmetros do estresse oxidativo e observamos que os indivíduos portadores do alelo nulo para o gene GSTT1 apresentaram menor atividade enzimática da GPx. Nenhuma outra influência foi observada em relação à ocorrência desses polimorfismos sobre os demais parâmetros avaliados nesse estudo.

A avaliação do genótipo do CYP2E1 não demonstrou diferença significativa entre a frequência dos alelos polimórficos no grupo exposto e no grupo não exposto ocupacionalmente. Até o presente momento, não foram identificados quaisquer efeitos dos genótipos do CYP2E1 na sua correspondente atividade enzimática (QU *et al.*,

2005; CARBONARI *et al.*, 2016). Desta forma, os estudos são focados em avaliar a influência deste polimorfismo nos níveis de excreção dos biomarcadores de exposição ao benzeno, com resultados conflitantes. Enquanto alguns estudos demonstram diminuição dos níveis de excreção do *AtfM* na presença do alelo polimórfico (CHOI *et al.*, 2003; KIM *et al.*, 2007), outros demonstram aumento dos níveis de excreção (FUSTINONI *et al.*, 2005). Estes resultados contraditórios podem ser explicados tanto pelo questionável efeito do genótipo sobre a atividade enzimática do CYP2E1, bem como devido à baixa frequência dos alelos polimórficos na população caucasiana (1-5%) e muito maiores nas populações orientais (19-28%) (DE PALMA e MANO, 2014). A baixa frequência do alelo variante do CYP2E1 pode afetar o poder estatístico dos estudos de coorte realizados, em sua maioria, com reduzido número de participantes (CARBONARI *et al.*, 2016). No presente estudo, quando os participantes foram agrupados de acordo com o seu genótipo (normal ou polimórfico) a fim de avaliar a influência do polimorfismo na excreção do *AtfM*, não foram observadas diferenças significativas para os níveis urinários de *AtfM* entre os grupos alélicos. Interessantemente, considerando o agrupamento genotípico observamos maior atividade da enzima GST nos indivíduos portadores de alelos polimórficos.

A falta da avaliação do SPMA como biomarcador de exposição ao benzeno pode ser considerada uma das principais limitações desse estudo. Além disso, consideramos que um estudo com um amplo número de participantes, e que avalie os polimorfismos de todas as enzimas que atuam na biotransformação do benzeno possam evidenciar de forma mais clara a influência de cada polimorfismo sobre o metabolismo do benzeno. Entretanto, no presente estudo confirmamos os resultados pioneiros publicados pelo nosso grupo de pesquisa e demonstramos a importância de considerar a atividade enzimática da  $\delta$ -ALA-D como potencial biomarcador precoce de dano hematológico causado pela exposição ao benzeno. Adicionalmente, através da avaliação do polimorfismo enzimático do gene ALAD demonstramos, pela primeira vez, um potencial biomarcador de suscetibilidade ao benzeno, especialmente em relação aos danos hematotóxicos.

Por fim, conforme demonstrado nos dados apresentados no capítulo I, nosso estudo contribuiu para o avanço no conhecimento relativo aos mecanismos de imunotoxicidade e carcinogenicidade do benzeno, tendo em vista que foram

observadas alterações significativas em importantes vias de sinalização envolvidas na carcinogenicidade. Estudos futuros são necessários para avançar ainda mais nessa linha do conhecimento, incluindo estudos que avaliem um maior número de indivíduos expostos e estudos *in vitro* utilizando cultura celular para auxiliar no completo entendimento relacionado a atuação do benzeno nessas vias.



## CONCLUSÕES

---

- Indivíduos trabalhadores de postos de combustíveis encontram-se expostos ocupacionalmente a maiores níveis de benzeno no ar no ambiente ocupacional quando comparados a indivíduos com atividades ocupacionais administrativas sem histórico de exposição a solventes;
- A exposição ocupacional ao benzeno prejudica a vigilância imune através da supressão da expressão proteica e gênica das principais moléculas coestimulatórias do sistema imune (B7.1 e B7.2), demonstrando que a evasão imune pode estar relacionada com a carcinogenicidade do benzeno;
- O sistema complemento parece ser uma das vias pela qual o benzeno induz imunotoxicidade, uma vez que níveis de C3 e C4 encontram-se significativamente reduzidos nos indivíduos expostos ocupacionalmente;
- A redução da expressão do gene supressor tumoral p53 pode estar relacionada com mecanismos de progressão tumoral decorrente da exposição ocupacional ao benzeno;
- Exposição ocupacional ao benzeno, mesmo a baixos níveis, resulta em alterações em biomarcadores de dano oxidativo, confirmando esse mecanismo de toxicidade;
- A atividade enzimática da  $\delta$ -ALA-D encontra-se inibida nos indivíduos expostos ocupacionalmente ao benzeno e pode estar relacionada ao mecanismo de hematotoxicidade dessa exposição;
- O polimorfismo no gene ALAD inibe a atividade enzimática da  $\delta$ -ALA-D, e foi encontrado com maior frequência no grupo exposto, sugerindo esse polimorfismo como potencial marcador de suscetibilidade aos efeitos hematotóxicos do benzeno;
- O polimorfismo enzimático dos genes GSTM1 e GSTT1 não influenciam na excreção urinária de *AtfM*, possivelmente pelo fato das GSTs não atuarem na via de formação do *AtfM*;

- O polimorfismo enzimático para o gene CYP2E1 não prediz com confiança alterações nos níveis de *AtM* para expostos ocupacionalmente ao benzeno.

## PERSPECTIVAS

---

- Avaliar o biomarcador urinário de exposição ocupacional ao benzeno: ácido S-fenilmercaptúrico;
- Avaliar polimorfismos enzimáticos para os genes P53 e OGG1;
- Avaliar *in vitro* a expressão de moléculas coestimulatórias B7.1 e B7.2 em células dendríticas tratadas com os principais metabólitos do benzeno (hidroquinona, benzoquinona e catecol) a fim de identificar o metabólito com maior influência sobre a expressão dessas moléculas;



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

- ABBAS, et al. Cellular and molecular immunology. **Elsevier Health Sciences**, 2014.
- ACGIH, 2014. TLVs and BEIs based on the documentation of the threshold limit values for chemical substances and physical agents and biological indices. In: Proceedings of the American Conference of Governmental Industrial Hygienists, Cincinnati.
- AEBI, H. Catalase in vitro. **Methods. in Enzym.**, v. 105, p. 121-126, 1984.
- AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO (ANP). Resolução Nº 40 DE 25/10/2013. **Diário Oficial na União**, 2013
- ALI-OSMAN, F. et al. Molecular cloning, characterization, and expression in *Escherichia coli* of full-length cDNAs of three human glutathione S-transferase Pi gene variants. Evidence for differential catalytic activity of the encoded proteins. **J. Biol. Chem.**, v. 272, n. 15, p. 10004-100012, 1997.
- ALLAVENA, P. et al. Molecular links between inflammation. **Syst Biology of Cancer**, p. 273, 2015.
- AMORIM, L.C.A. O uso de biomarcadores na avaliação da exposição ocupacional a substâncias químicas. **Rev. Bras. Med. Trab.**, v. 1, n.2, p. 124-132, 2003.
- ANGELINI, S. et al. Exposure to low environmental levels of benzene: evaluation of micronucleus frequencies and S-phenylmercapturic acid excretion in relation to polymorphisms in genes encoding metabolic enzymes. **Mutat. Res.**, v. 719, n. 1, p. 7-13, 2011.
- ANGELINI, S. et al. Environmental exposure to benzene, micronucleus formation and polymorphisms in DNA-repair genes: a pilot study. **Mutat. Res.**, v.743, n.99, p.104, 2012.
- ANGERER, J. et al. Human biomonitoring: state of the art. **Int. J. Hyg. Environ. Health**, v. 210, p. 201-228, 2007.
- ANJOS, R. B. Avaliação de HPA e BTEX no solo e água subterrânea, em postos de revenda de combustíveis: estudo de caso na cidade de Natal RN [dissertação]. Natal (RN): **Universidade Federal do Rio Grande do Norte**, 2012.
- ARNOLD, S. M. et al. The use of biomonitoring data in exposure and human health risk assessment: benzene case study. **Critic. Rev. Toxicol.**, v. 43, n. 2, p. 119-153, 2013.
- ASHFAQ, S. et al. The relationship between plasma levels of oxidized and reduced thiols and early atherosclerosis in healthy adults. **J. Am. Coll. Cardiol.**, v. 47, n. 5, p. 1005-1011, 2006.

ATSDR – Agency for Toxic Substances and Disease Registry. **Toxicological Profile for Benzene**. Atlanta, Georgia: Agency for Toxic Substances and Disease Registry, 2007.

ATSDR – Agency for Toxic Substances and Disease Registry. **Case studies in Environmental Medicine: Benzene toxicity**. Atlanta, Georgia: Agency for Toxic Substances and Disease Registry, 2014

ATSDR – Agency for Toxic Substances and Disease Registry. **Addendum To The Toxicological Profile for Benzene**. Atlanta, Georgia: Agency for Toxic Substances and Disease Registry, 2015.

ATSDR – Agency for Toxic Substances and Disease Registry. **The priority list of hazardous substances that will be the candidates for toxicological profiles**. Disponível em: <<http://www.atsdr.cdc.gov/spl/>>. Acessado em 22 fev. 2017.

AYALA, A. et al. Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. **Oxi. Med. Cell. Long.**, v. 2014.

BAAN, R. et al. A review of human carcinogens—part F: chemical agents and related occupations. **Lancet Oncol.**, v.10, n.12, p.1143-1144, 2009.

BAHADAR, H. et al. Current understandings and perspectives on non-cancer health effects of benzene: a global concern. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, v. 276, n. 2, p. 83-94, 2014.

BAIERLE, M. et al. Possíveis efeitos do cobre sanguíneo sobre parâmetros hematológicos em idosos. **J. Bras. Patol. Med. Lab.**, v. 46, n. 6, p. 463-470, 2010.

BAIERLE, M. et al. Are delta-aminolevulinatase inhibition and metal concentrations additional factors for the age-related cognitive decline? **Int. J. Environ. Res. Public Health**, v. 11, n. 10, p. 10851-10867, 2014.

BARATA-SILVA, C. et al. Benzene: reflections on public health, environmental presence and biological indicators used for the determination of exposure. **Cadernos Saúde Coletiva**, v. 22, n. 4, p. 329-342, 2014.

BARBOSA, K.B.F. et al. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de Nutrição**, v. 23, n. 4, p. 629-643, 2010.

BARREIROS, A.L.B.S.; DAVID, J.M. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Quím. Nova**, v. 29, n. 1, p. 113-123, 2006.

BRANDÃO, M. M. et al. Phenotype analysis of lymphocytes of workers with chronic benzene poisoning. **Immunol. Lett.**, v.15, n. 101(1), p. 65-70, 2005

BRASIL. Ministério do Trabalho. Norma regulamentadora nº 15. Program

BRASIL. Ministério do Trabalho e Emprego. Portaria nº 10, de 8 de Setembro de 1994. **Diário Oficial da União**, 1994.

BRASIL. Ministério do Trabalho e Emprego. Acordo e legislação sobre o benzeno. **São Paulo: Fundacentro**, 1995.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria nº 2.914, de 12 de dezembro de 2011. Dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. **Diário Oficial da União**, 2011.

BIRONAITE, D. et al. Stimulation of endothelial IL-8 (eIL-8) production and apoptosis by phenolic metabolites of benzene in HL-60 cells and human bone marrow endothelial cells. **Chem. Biol. Interact.**, v. 149, n. 2, p. 177-188, 2004.

BOGADI-ŠARE, A. et al. Study of some immunological parameters in workers occupationally exposed to benzene. **Int. Arch. Occup. Environ. Health.**, v. 73, n. 6, p. 397-400, 2000.

BOLEY, S. E. et al. p53 heterozygosity alters the mRNA expression of p53 target genes in the bone marrow in response to inhaled benzene. **Toxicol. Sci.**, v. 66, n. 2, p. 209-215, 2002.

BOLLATI, V. et al. Changes in DNA methylation patterns in subjects exposed to low-dose benzene. **Cancer Res.** v.1, n. 67, p. 876-880, 2007

BOTTO, M. et al. Complement in human diseases: lessons from complement deficiencies. **Mol. Immunol.**, v. 46, n. 14, p. 2774-2783, 2009.

BRUNMARK, A.; CADENAS, E. Reductive addition of glutathione to p-benzoquinone, 2-hydroxy-p-benzoquinone, and p-benzoquinone epoxides. Effect of the hydroxy-and glutathionyl substituents on p-benzohydroquinone autoxidation. **Chem. Biol. Interact.**, v. 68, n. 3-4, p. 273-298, 1988.

BUDNIK, L.T.; BAUER, X. The assessment of environmental and occupational exposure to hazardous substances by biomonitoring. **Dtsch. Arztebl. Int.**, v. 106, n. 6, p. 91-97, 2009.

BULKA, C. et al. Residence proximity to benzene release sites is associated with increased incidence of non-Hodgkin lymphoma. **Cancer**, v. 119, n. 18, p. 3309-3317, 2013.

BURTIS, C. *et al.* **Fundamentos de Química Clínica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

CAMPAGNA, M. et al. Analysis of potential influence factors on background urinary benzene concentration among a non-smoking, non-occupationally exposed general population sample. **Int. Arch. Occup. Environ. Health.**, v. 87, n. 7, p. 793-799, 2014.

CARBONARI, D. et al. Biomarkers of susceptibility following benzene exposure: influence of genetic polymorphisms on benzene metabolism and health effects. **Biomark. Med.**, v. 10, n. 2, p. 145-163, 2016.

CARBONARI, D. et al. Influence of genetic polymorphism on t, t-MA/S-PMA ratio in 301 benzene exposed subjects. **Toxicol. Lett.**, v. 231, n. 2, p. 205-212, 2014.

CASALE, T. et al. Workers exposed to low levels of benzene present in urban air: Assessment of peripheral blood count variations. **Chemosphere**, v. 152, p. 392-398, 2016.

CEERAZ, S. et al. B7 family checkpoint regulators in immune regulation and disease. **Trends. Immunol.**, v. 34, n. 11, p. 556-563, 2013.

CHANVAIVIT, S. et al. Exposure assessment of benzene in Thai workers, DNA-repair capacity and influence of genetic polymorphisms. **Mutat. Res. Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.**, v. 626, n. 1, p. 79-87, 2007

CHEN, Y. et al. Genetic polymorphisms involved in toxicant-metabolizing enzymes and susceptibility to benzene poisoning. **J. Toxicol.**, v. 1, p. 003, 2007.

CHI, K.R. The dark side of the human genome. **Nature**, v. 538, p. 275–277

CHOI, J.H. et al. CYP2E1 and NQO1 genotypes, smoking and bladder cancer. **Pharmacogenetics.**, v. 13, n. 6, p. 349-355, 2003.

COCCO, P. et al. Trans, trans-Muconic acid excretion in relation to environmental exposure to benzene. **Int. Arch. Occup. capítul. Health**, v. 76, n. 6, p. 456-460, 2003.

Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) Resolução nº 273 de 29 de novembro de 2000. Estabelece diretrizes para o licenciamento ambiental de postos de combustíveis e serviços e dispõe sobre a prevenção e controle da poluição dos postos revendedores de combustíveis. **Diário Oficial da União**, 2000.

Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA). Resolução nº 396, de 3 de abril de 2008. Dispõe sobre a classificação e diretrizes ambientais para o enquadramento das águas subterrâneas e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, 2008.

COSTELLO, R. T. et al . Regulation of CD80/B7-1 and CD86/B7-2 molecule expression in human primary acute myeloid leukemia and their role in allogenic immune recognition. **Eur. J. Immunol.**, v.28, n.18, p. 90-103, 1998.

COTINGUIBA, G.G. et al. Método de avaliação da defesa antioxidante: uma revisão de literatura. **Cient. Ciênc. Biol. Saúde**, v. 15, n. 3, p. 231-237, 2013.

COTTICA, D.; GRIGNANI, E. Evolution of technology and occupational exposures in petrochemical industry and in petroleum refining. **G. Ital. Med. Lav. Ergon.**, v. 35, n. 4, p. 236-243, 2012.



COUSSENS, L. M.; WERB, Z. Inflammation and cancer. **Nature**, v. 420, n. 6917, p. 860-867, 2002.

COUTRIM, M. X. et al. Avaliação dos métodos analíticos para a determinação de metabólitos do benzeno como potenciais biomarcadores de exposição humana ao benzeno no ar. **Quím. Nova**, v. 23, n. 5, p. 653, 2000.

DA CUNHA MARTINS JR, A. et al. Effects of lead exposure and genetic polymorphisms on ALAD and GPx activities in Brazilian battery workers. **J Toxicol Environ Health A**, v. 78, n. 16, p. 1073-1081, 2015.

DAI, Z.S. et al. Defective expression and modulation of B7-2/CD86 on B cells in B cell chronic lymphocytic leukemia. **Int. J. Hematol.**, v. 89, n. 5, p. 656-663, 2009.

DALLE-DONNE, I. et al. Protein carbonylation in human diseases. **Trends Mol. Med.**, v. 9, n. 4, p. 169-176, 2003.

DE PALMA, G. et al. Biomarkers of exposure to aromatic hydrocarbons and methyl tert-butyl ether in petrol station workers. **Biomarkers**, v. 17, n. 4, p. 343-351, 2012.

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

DIRECTIVE, Council. 98/70/EC of the European Parliament and of the Council of 13 October 1998 relating to the quality of petrol and diesel fuels and amending Council Directive 93/12. **EEC**, 1998.

DIRECTIVE, HAVE ADOPTED THIS. Directive 2000/69/EC of the European Parliament and of the Council of 16 November 2000 relating to limit values for benzene and carbon monoxide in ambient air. **Official Journal L**, v. 313, n. 13/12, p. 0012-0021, 2000.

DOLEN, Y.; ESENDAGLI, G. Myeloid leukemia cells with a B7-2+ subpopulation provoke Th-cell responses and become immuno-suppressive through the modulation of B7 ligands. **Eur. J. Immunol.**, v. 43, n. 3, p. 747-757, 2013.

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

ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (EPA). Ambient water quality criteria for benzene.

ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (EPA). Carcinogenic effects of Benzene: an update (Final). Washington, DC: US Environmental Protection Agency; 1998. (EPA/600/ P-97/001F). 74.

ESENSTEN, J. H. et al. CD28 costimulation: from mechanism to therapy. **Immunity**, v. 44, n. 5, p. 973-988, 2016.

FARRIS, G. M. et al. Benzene-induced hematotoxicity and bone marrow compensation in B6C3F1 mice. **Fundam. Appl. Toxicol.**, v. 36, n. 2, p. 119-129, 1997.

FENGA, C. et al. (2017) 8-Hydroxydeoxyguanosine as a biomarker of oxidative DNA damage in workers exposed to low-dose benzene. **Toxicol. Rep.**, v.31, p. 291-295

FRACASSO, M. E. et al. Low air levels of benzene: correlation between biomarkers of exposure and genotoxic effects. **Toxicol. Lett.**, v. 192, n. 1, p. 22-28, 2010.

FUSTINONI, S. et al. Monitoring low benzene exposure: comparative evaluation of urinary biomarkers, influence of cigarette smoking, and genetic polymorphisms. **Cancer Epidemiol. Biomarkers.**, v. 14, n. 9, p. 2237-2244, 2005.

GAGNÉ, S. Determination of trans, trans-muconic acid in workers' urine through ultra-performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. **Biomed. Chromatogr.**, v. 27, n. 5, p. 664-668, 2013.

GALBRAITH, D. Benzene and human health: a historical review and appraisal of associations with various diseases. **Critic. Rev. Toxicol.**, v. 40, n. sup2, p. 1-46, 2010.

GALM, O. et al. The fundamental role of epigenetics in hematopoietic malignancies. **Blood rev.**, v. 20, n. 1, p. 1-13, 2006.

GAO, A. et al. Methylation of PARP-1 promoter involved in the regulation of benzene-induced decrease of PARP-1 mRNA expression. **Toxicol. Letters.**, v. 195, n. 2, p. 114-118, 2010.

GEORGIEVA, T. et al. Possibilities to control the health risk of petrochemical workers. **Int. Arch. Occup. Environ. Health**, v. 75, p. 21-26, 2002.

GHITTORI, S. et al. Urinary excretion of unmetabolized benzene as an indicator of benzene exposure. **J. Toxicol. Environ. Health Part A Current Issues.**, v. 38, n. 3, p. 233-243, 1993.

GOERING, P. L. Lead-protein interactions as a basis for lead toxicity. **Neurotoxicology**, v. 14, n. 2-3, p. 45-60, 1993

GÖETHEL, G. et al. Evaluation of genotoxicity in workers exposed to benzene and atmospheric pollutants. **Mutat. Res. Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.**, v. 770, p. 61-65, 2014.

GONÇALVES, et al. Association between occupational exposure to benzene and chromosomal alterations in lymphocytes of Brazilian petrochemical workers removed from exposure. **Environ. Monit. Assess.**, v. 188, n. 6, p.334

GREAVES, P.; GRIBBEN, J. G. The role of B7 family molecules in hematologic malignancy. **Blood**, v. 121, n. 5, p. 734-744, 2013.

GREINER, J. et al. Simultaneous expression of different immunogenic antigens in acute myeloid leukemia. **Exp. Hematol.**, v. 28, n. 12, p. 1413-1422, 2000.

GRIVENNIKOV, S. et al. Immunity, inflammation, and cancer. **Cell**, v. 140, n. 6, p. 883-899, 2010.

GROTTO D. et al. Rapid quantification of malondialdehyde in plasma by high performance liquid chromatography-visible detection. **J. Pharm. Biom. Anal.**, v. 43, p. 619-24, 2007.

GUO, R. F; WARD, P. A. Role of C5a in inflammatory responses. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 23, p. 821-852, 2005.

HAN, X. F; ZHOU, H. H. Polymorphism of CYP450 and cancer susceptibility. **Acta Pharmacol. Sin.**, v. 21, n. 8, p. 673-679, 2000.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646-674, 2011.

HARRIS, C.C. p53 tumor suppressor gene: at the crossroads of molecular carcinogenesis, molecular epidemiology, and cancer risk assessment. **Environ. Health. Perspect.**, 104, 1996

HECK, J. E. et al. Risk of leukemia in relation to exposure to ambient air toxics in pregnancy and early childhood. **Int. J. Hyg. Environ. Health**, v. 217, n. 6, p. 662-668, 2014.

HOET, P. et al. Evaluation of urinary biomarkers of exposure to benzene: correlation with blood benzene and influence of confounding factors. **Int. Arch. Occup. Environ. Health**, v. 82, n. 8, p. 985-995, 2009.

HOLECKOVÁ, B. et al. Chromosomal aberrations in humans induced by benzene. **Ann. Agric. Environmental Med.**, v. 11, n. 2, p. 175-179, 2003.

HSIEH, G. C. et al. Subclinical effects of groundwater contaminants. IV. Effects of repeated oral exposure to combinations of benzene and toluene on regional brain monoamine metabolism in mice. **Arch. Toxicol.**, v. 64, n. 8, p. 669-676, 1990.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. IARC, 2012. **Agents Classified by the IARC Monographs**, v. 1, p. 103, 2014.

IRONS, R. D. et al. Integrating WHO 2001–2008 criteria for the diagnosis of Myelodysplastic Syndrome (MDS): A case–case analysis of benzene exposure. **Chem. Biol. Interact.**, v. 184, n. 1, p. 30-38, 2010.

JANAKIRAM, M. et al. Immune checkpoint blockade in human cancer therapy: lung cancer and hematologic malignancies. **Immunotherapy**, v. 8, n. 7, p. 809-819, 2016.

JENKINS, M. K. et al. The ups and downs of T cell costimulation. **Immunity (Cambridge, Mass.)**, v. 1, n. 6, p. 443-446, 1994.

JOHNSON, E. S. et al. A critique of benzene exposure in the general population. **Sci Total Environ.**, v. 374, n. 2, p. 183-198, 2007.

KAŠUBA, V. et al. Cytogenetic changes in subjects occupationally exposed to benzene. **Chemosphere**, v. 40, n. 3, p. 307-310, 2000.

KAWASAKI, Y. et al. Benzene-induced hematopoietic neoplasms including myeloid leukemia in Trp53-deficient C57BL/6 and C3H/He mice. **Toxicol. Sciences**, p. kfp107, 2009.

KHALADE, A. et al. Exposure to benzene at work and the risk of leukemia: a systematic review and meta-analysis. **Environ. Health**, v. 9, n. 1, p. 31, 2010.

KIM, J. Y. et al. Urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine as a biomarker of oxidative DNA damage in workers exposed to fine particulates. **Environ. Health. Perspect.**, v. 112, n. 6, p. 666, 2004.

KIM, S. et al. Modeling human metabolism of benzene following occupational and environmental exposures. **Cancer Epidemiol. Biomarkers**, v. 15, n. 11, p. 2246-2252, 2006.

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

KIRKELEIT, J. et al. Benzene exposure on a crude oil production vessel. **Ann. Occup. Hyg.**, v. 50, n. 2, p. 123-129, 2006.

KIRKELEIT, J. et al. Effects of benzene on human hematopoiesis. **Open Hematol. J.**, v. 2, p. 87-102 2008.

KOCH, F.P. et al. Influence of class M1 glutathione S-transferase (GST Mu) polymorphism on GST M1 gene expression level and tumor size in oral squamous cell carcinoma. **Oral Oncol.**, v. 46, n. 2, p. 128-133., 2010.

LAN, Q. et al. Hematotoxicity in workers exposed to low levels of benzene. **Science**, v. 306, n. 5702, p. 1774-1776, 2004.

LAN, Q. et al. Lymphocyte toxicity and T cell receptor excision circles in workers exposed to benzene. **Chem. Biol. Interact.**, v. 30, p. 153-154, 2005

LEICHTWEIS, S. e JI, L. L. Glutathione deficiency intensifies ischaemia-reperfusion induced cardiac dysfunction and oxidative stress. **Acta Physiology Scandinavian**, v. 179, p. 1-10, 2001.

LEZAMA, R. V. et al. A model for the induction of aplastic anemia by subcutaneous administration of benzene in mice. **Toxicology**, v. 162, n. 3, p. 179-191, 2001.

LI, J. et al. MGMT Hypomethylation Is Associated with DNA Damage in Workers Exposed to Low-dose Benzene. **Biomarkers**, n. just-accepted, p. 1-26, 2016.

LI, J. et al. Prognostic value of programmed cell death ligand 1 expression in patients with head and neck cancer: A systematic review and meta-analysis. **PloS One** v.12, n. 6, 2017

LIN, L-C. et al. Association between GST genetic polymorphism and dose-related production of urinary benzene metabolite markers, trans, trans-muconic acid and S-phenylmercapturic acid. **Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.**, v. 17, n. 6, p. 1460-1469, 2008.

LIN, W-W.; KARIN, M. A cytokine-mediated link between innate immunity, inflammation, and cancer. **J. Clin. Invest.**, v. 117, n. 5, p. 1175-1183, 2007.

LIU, Y. et al. Plasma microRNA expression in workers occupationally exposed to benzene. **Public Health Emerg.**, p. 1:3, 2016

LOVREGLIO, Piero et al. Biomarkers of internal dose for the assessment of environmental exposure to benzene. **J. Environ. Monit.**, v. 13, n. 10, p. 2921-2928, 2011.

LU, Y. et al. Role of CYP2E1 polymorphisms in breast cancer: a systematic review and meta-analysis. **Cancer Cell Int.**, v. 17, n. 1, p. 11, 2017.

MANINI, P. et al. Occupational exposure to low levels of benzene: biomarkers of exposure and nucleic acid oxidation and their modulation by polymorphic xenobiotic metabolizing enzymes. **Toxicol. Lett.**, v. 193, n. 3, p. 229-235, 2010.

MANNO, M. et al. Biomonitoring for occupational health risk assessment (BOHRA). **Toxicol. Lett.**, v. 192, v. 1, p. 3-16, 2010.

MARCHETTI, M. D. Tratamento de águas subterrâneas contaminadas com BTEX utilizando processo oxidativo de Fenton. **Tese de Doutorado**. Universidade de São Paulo, 2009.

MARKIEWSKI, M. M. e LAMBRIS, J. D. Is complement good or bad for cancer patients? A new perspective on an old dilemma. **Trends Immunol.**, v. 30, n. 6, p. 286-292, 2009.

MCHALE, C.M et al. Current understanding of the mechanism of benzene-induced leukemia in humans: implications for risk assessment. **Carcinogenesis**, v. 33, n. 2, p. 240-252, 2012.

- MELKI, J. R. et al. Concurrent DNA hypermethylation of multiple genes in acute myeloid leukemia. **Cancer Res.**, v. 59, n. 15, p. 3730-3740, 1999.
- MENDES, M. et al. Occupational regulation for benzene: an approach on risk and exposure in gas stations. **Ver. Bras. de Saúde. Ocup.**, 42, 2017
- MERLE, N. S. et al. Complement system part I—molecular mechanisms of activation and regulation. **Front Immunol.**, v: 2, n:6, p:262, 2015.
- MONKS, T. J. et al. The fate of benzene-oxide. **Chem. Biol. Interact.**, v. 184, n. 1, p. 201-206, 2010.
- MOREAU, R.L.M.; SIQUEIRA, M.E.P.B. **Toxicologia analítica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2016.
- MORO A. M. et al. Effects of low-level exposure to xenobiotics present in paints on oxidative stress in workers. **Sci. Total. Environ.**, v.15, n. 408, p. 4461-467, 2010
- MORO, A. M. et al. Genotoxicity and oxidative stress in gasoline station attendants. **Mutat. Res. Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.**, v. 754, n. 1, p. 63-70, 2013.
- MORO, A. M. et al. Early hematological and immunological alterations in gasoline station attendants exposed to benzene. **Environ. Res.**, v. 137, p. 349-356, 2015.
- MORO, A. M. et al. Biomonitoring of gasoline station attendants exposed to benzene: Effect of gender. **Mutat. Res. Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.** v. 813, p. 1-9, 2017.
- MOURA-CORREA, M. J.; SANTANA, V. Benzene occupational exposure estimates in Brazil using a job-exposure matrix. **Occup. Environ. Med.**, v. 71, n. Suppl 1, p. A89-A89, 2014.
- NATIONAL INSTITUTE FOR OCCUPATIONAL SAFETY AND HEALTH (NIOSH). Pocket Guide to Chemical Hazards. **United States: NIOSH**, p. 26, 2007.
- NIKI, E. Biomarkers of lipid peroxidation in clinical material. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1840, n. 2, p. 809-817, 2014.
- NOUROZI, M. A. et al. Association between polymorphism of GSTP1, GSTT1, GSTM1 and CYP2E1 genes and susceptibility to benzene-induced hematotoxicity. **Arch. Toxicol.**, v. 92, n.6, p. 1983-1990. 2018
- OGA, S. et al. **Fundamentos de Toxicologia**. São Paulo: Atheneu, 2014.
- PARDOLL, D. M. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. **Nat. Rev. Cancer**, v:4, n:12, p.252-264, 2012
- PENG, C.; JC N. G. The Role of Epigenetic Changes in Benzene-Induced Acute Myeloid Leukaemia. **J. Clin. Epigenet.**, 2016.

PETRUCCI R. et al. The genetic polymorphism of deltaaminolevulinatase dehydratase in Italy. **Hum. Genet.**, 60: 289–290, 1982

PRINC, F. G. et al. In vivo protection by melatonin against delta-aminolevulinic acid-induced oxidative damage and its antioxidant effect on the activity of haem enzymes. **J. Pineal. Res.**, v. 24, n. 1, p. 1-8, 1998.

PROTANO, C. et al. Urinary trans, trans-muconic acid and S-phenylmercapturic acid are indicative of exposure to urban benzene pollution during childhood. **Sci. Total Environ.**, v. 435, p. 115-123, 2012.

QU, Q. et al. Biomarkers of benzene: urinary metabolites in relation to individual genotype and personal exposure. **Chem. Biol. Interact.**, v. 153, p. 85-95, 2005.

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

RASERA, I. M. Toxicidade do benzeno, fontes de contaminação e análises laboratoriais [monografia]. **Novo Hamburgo (SC): Centro Universitário Feevale. Instituto de Ciências da Saúde**, 2009.

REKHADEVI, P. V. et al. Determination of genetic damage and urinary metabolites in fuel filling station attendants. **Environ. Mol. Mut.**, v. 52, n. 4, p. 310-318, 2011.

Ren, J. C. et al. MTHFR Gene Polymorphism Is Associated With DNA Hypomethylation and Genetic Damage Among Benzene-Exposed Workers in Southeast China. **J Occup. Environ. Med.**, v. 60, n. 4, p.188-192, 2018

ROCHA, J. B. T. et al. Aminolevulinatase dehydratase ( $\delta$ -ALA-D) as marker protein of intoxication with metals and other pro-oxidant situations. **Toxicol. Res.**, v. 1, p. 85-102, 2012.

ROSS, D. Metabolic basis of benzene toxicity. **Eur. J. Haematol.**, v. 57, n. S60, p. 111-118, 1996.

ROSS, G. D. Immunobiology of the complement system: an introduction for research and clinical medicine. **Academic Press**, 2014.

ROTHMAN, N. et al. Hematotoxicity among Chinese workers heavily exposed to benzene. **Am. J. Ind. Med.**, v. 29, n. 3, p. 236-246, 1996.

RUTKOWSKI, M. J. et al. Cancer and the complement cascade. **Mol. Cancer Res.**, v. 8, n. 11, p. 1453-1465, 2010.

SAHMEL, J. et al. An analysis of workplace exposures to benzene over four decades at a petrochemical processing and manufacturing facility (1962–1999). **J Toxicol Environ Health A.**, v. 76, n. 12, p. 723-746, 2013.

SAFARINEJAD, M.R. et al. Glutathione S-transferase gene polymorphisms (GSTM1, GSTT1, GSTP1) and prostate cancer: a case-control study in Tehran, Iran. **Prostate Cancer and Prostatic Diseases**, n. 14, p. 105–113, 2011.

SARMA, J. V.; WARD, P. A. The complement system. **Cell Tissue Res.**, v. 343, n. 1, p. 227-235, 2011.

SCHALLER, M. The behavioral immune system. **The handbook of evolutionary psychology**, 2016.

SCHILDBERG, F. A. et al. Coinhibitory pathways in the B7-CD28 ligand-receptor family. **Immunity**, v. 44, n. 5, p. 955-972, 2016.

SCHNATTER, A. R. et al. Myelodysplastic syndrome and benzene exposure among petroleum workers: an international pooled analysis. **J Natl Cancer Inst.**, v. 104, n. 22, p. 1724-1737, 2012.

SHARMA, P.; ALLISON, J. P. The future of immune checkpoint therapy. **Science**, v. 348, n. 6230, p. 56-61, 2015.

SIES, H. Oxidative stress: a concept in redox biology and medicine. **Redox Biol.**, v. 4, p. 180-183, 2015.

SJÖBERG, A. P. et al. Complement activation and inhibition: a delicate balance. **Trends Immunol.**, v.30, n.2, p. 83-90, 2009

SMITH, M. T. et al. Peroxidase-dependent metabolism of benzene's phenolic metabolites and its potential role in benzene toxicity and carcinogenicity. **Environ. Health Perspect.**, v. 82, p. 23, 1989.

SMITH, M. T. Advances in understanding benzene health effects and susceptibility. **Ann. Rev. Public. Health**, v. 31, p. 133-148, 2010.

SMOLIK, R. et al. Serum complement level in workers exposed to benzene, toluene and xylene. **Int. Arch. Occup. Environ. Health.**, v. 31, n. 3, p. 243-247, 1973.

SNYDER, R.; HEDLI, C. C. An overview of benzene metabolism. **Environ. Health Perspect.**, v. 104, n. 6, p. 1165, 1996.

SNYDER, R. Leukemia and benzene. **Int. Arch. Occup. Environ. Health**, v. 9, n. 8, p. 2875-2893, 2012.

SONG, Z. et al. Association of glutathione S-transferase T1, M1, and P1 polymorphisms in the breast cancer risk: a meta-analysis. **Ther. Clin. Risk Manag.**, v. 12, p. 763-769, 2016.

SRBOVA, J. et al. Absorption and elimination of inhaled benzene in man. **Arch. Indust. Hyg. Occupational. Med.**, v. 2, n. 1, p. 1-8, 1950.



STEINMAUS, C. et al. Meta-analysis of benzene exposure and non-Hodgkin lymphoma: biases could mask an important association. **Occup. Environ. Med.**, v. 65, n. 6, p. 371-378, 2008.

STRANGE, R. C. et al. Glutathione S-transferase: genetics and role in toxicology. **Toxicol. Lett.**, v. 112, p. 357-363, 2000.

SWAEN, G. M. H et al. Low level occupational benzene exposure and hematological parameters. **Chem. Biol. Interact.**, v. 184, n. 1, p. 94-100, 2010.

THOMAS, R. et al. Characterization of changes in gene expression and biochemical pathways at low levels of benzene exposure. **PloS one**, v. 9, n. 5: e91828, 2014

TRAVIS, L. B. et al. Hematopoietic malignancies and related disorders among benzene-exposed workers in China. **Leuk. Lymph.**, v. 14, n. 1-2, p. 91-102, 1994.

TUNSARINGKARN, T. et al. Occupational exposure of gasoline station workers to BTEX compounds in Bangkok, Thailand. **Int. J. Occup. Environ. Med.**, v. 3, n. 3 July, 2013.

UNSWORTH, D. J. Complement deficiency and disease. **J. Clin. Pathol.**, v. 61, n. 9, p. 1013-1017, 2008.

UZMA, N. et al. Exposure to benzene induces oxidative stress, alters the immune response and expression of p53 in gasoline filling workers. **Am. J. Ind. Med.**, v. 53, n. 12, p. 1264-1270, 2010.

VALENTINI, J. et al. Human erythrocyte delta-aminolevulinatase activity and oxidative stress in hemodialysis patients. **Clin. Biochem.**, v. 40, n. 9-10, p. 591-594, 2007

VOLLMER, M. et al. Expression of human leucocyte antigens and co-stimulatory molecules on blasts of patients with acute myeloid leukaemia. **Br. J. Haematol.**, v. 120, n. 6, p.1000-1008, 2003.

VOUSDEN, K.H; LU, X. Live or let die: the cell's response to p53. **Nat. Rev. Cancer**, n. 2, p. 594–604, 2002.

WALLIS, R. Interactions between mannose-binding lectin and MASPs during complement activation by the lectin pathway. **Immunobiology**, v. 212, n. 4, p. 289-299, 2007.

WALPORT, M. J. Complement. **N England J Med.**, v. 344, n. 14, p. 1058-1066, 2001.

WAN, J. et al. The role of c-MYB in benzene-initiated toxicity. **Chem. Biol. Interact.**, v. 153, p. 171-178, 2005.

WAUGH, D. J.J. et al. The interleukin-8 pathway in cancer. **Clin. Cancer Res.**, v. 14, n. 21, p. 6735-6741, 2008.

WEISEL, C. P. Benzene exposure: an overview of monitoring methods and their findings. **Chem. Biol. Interact.**, v. 184, n. 1, p. 58-66, 2010.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Benzene. In: Air quality guidelines for Europe. 2nd ed. Copenhagen: WHO; 2000. Disponível: [http://www.euro.who.int/\\_\\_data/assets/pdf\\_file/0005/74732/E71922.pdf](http://www.euro.who.int/__data/assets/pdf_file/0005/74732/E71922.pdf)

XING, C. et al. Microsomal epoxide hydrolase (EPHX1) polymorphisms are associated with aberrant promoter methylation of ERCC3 and hematotoxicity in benzene-exposed workers. **Environ. Mol. Mutagen.**, v. 54, n. 6, p. 397-405, 2013.

XIONG, F. et al. Oxidative Stress and Genotoxicity of Long-Term Occupational Exposure to Low Levels of BTEX in Gas Station Workers. **Int. J. Environ. Res. Public Health**, v. 13, n. 12, p. 1212, 2016.

YANG, J. et al. PTEN methylation involved in benzene-induced hematotoxicity. **Exp. Mol. Pathol.**, v. 96, n. 3, p. 300-306, 2014.

YOON, B-I. L. et al. Mechanisms of benzene-induced hematotoxicity and leukemogenicity: cDNA microarray analyses using mouse bone marrow tissue. **Environ. Health Perspect.**, v. 111, n. 11, p. 1411, 2003.

YOON, J.H. et al. A brief review of relationship between occupational benzene exposure and hematopoietic cancer. **Ann. Occup. Environ. Med.**, V. 10, p.30-33, 2018.

ZHANG, L. et al. The nature of chromosomal aberrations detected in humans exposed to benzene. **Crit. Rev. Toxicol.**, v. 32, n. 1, p. 1-42, 2002.

ZHANG, L. et al. Systems biology of human benzene exposure. **Chem. Biol. Interact.**, v. 184, n. 1, p. 86-93, 2010.

ZHANG, L. et al. Chromosome-wide aneuploidy study (CWAS) in workers exposed to an established leukemogen, benzene. **Carcinogenesis**, v. 32, n. 4, p. 605-612, 2011.

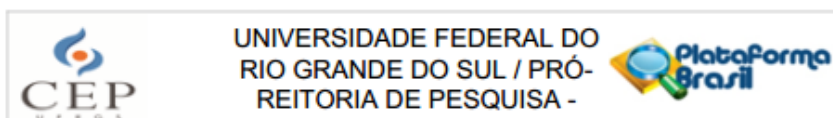
ZHANG, G. H. et al. Benchmark Doses Based on Abnormality of WBC or Micronucleus Frequency in Benzene-Exposed Chinese Workers. **J. Occup. Environ. Med.**, v. 58: e39-e, 2016.

ZHAO, Z-G. et al. The characteristics and immunoregulatory functions of regulatory dendritic cells induced by mesenchymal stem cells derived from bone marrow of patient with chronic myeloid leukaemia. **Eur. J. Cancer**, v. 48, n. 12, p. 1884-1895, 2012.

ZHOU, Y. et al. Maternal benzene exposure during pregnancy and risk of childhood acute lymphoblastic leukemia: a meta-analysis of epidemiologic studies. **PloS one**, v. 9, n. 10, p. e110466, 2014.

## ANEXOS

### ANEXO I – Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da UFRGS.



#### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

##### DADOS DA EMENDA

**Título da Pesquisa:** AVALIAÇÃO DA POTENCIAL IMUNOTOXICIDADE NA EXPOSIÇÃO OCUPACIONAL AO BENZENO

**Pesquisador:** Solange Cristina Garcia

**Área Temática:**

**Versão:** 5

**CAAE:** 47190615.6.0000.5347

**Instituição Proponente:** Universidade Federal do Rio Grande do Sul

**Patrocinador Principal:** Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul

##### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 1.814.826

##### Apresentação do Projeto:

Trata-se de emenda ao projeto original em que é solicitada a inclusão do Hospital de Clínicas de Porto Alegre como instituição co-participe para a realização de análises do material já coletado.

##### Projeto Original:

O benzeno é um constituinte da gasolina e apresenta efeitos hematotóxicos, genotóxicos e imunotóxicos, sendo que atendentes de postos de gasolina podem ter um potencial maior ao desenvolvimento de câncer pela exposição crônica a baixas concentrações de benzeno. O objetivo do projeto é avaliar, in vitro e in vivo, o impacto da exposição ao benzeno sobre a resposta imunológica. Após cálculo amostral, serão convidados a participar do estudo indivíduos expostos cronicamente ao benzeno (atendentes de postos de gasolina, n=100) e pessoas não expostas aos benzeno (atividades administrativas, n=50). Serão coletadas amostras de urina (para determinação da exposição ao benzeno) e de sangue (para determinação dos efeitos do benzeno) dos indivíduos. A partir do sangue será analisado o hemograma e a expressão de moléculas de adesão em monócitos. Adicionalmente, os monócitos serão obtidos do sangue e destinados para outros ensaios in vitro (capacidade de diferenciação, responsividade a interferon gama e à exposição ao benzeno).

##### Situação do Parecer:

Aprovado

##### Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Endereço: Av. Paulo Gama, 110 - Sala 317 do Prédio Anexo 1 da Reitoria - Campus Centro  
Bairro: Farróupilha CEP: 90.040-060  
UF: RS Município: PORTO ALEGRE  
Telefone: (51)3308-3738 Fax: (51)3308-4085 E-mail: etica@propesq.ufrgs.br

PORTO ALEGRE, 10 de Novembro de 2016

Assinado por:  
**MARIA DA GRAÇA CORSO DA MOTTA**  
(Coordenador)

## **ANEXO II - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).**

### **TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO NÃO EXPOSTOS OCUPACIONALMENTE**

Você está sendo convidado a participar da pesquisa “Avaliação da Potencial Imunotoxicidade na Exposição Ocupacional ao Benzeno”. Este trabalho tem como pesquisadora responsável a professora Dr<sup>a</sup>. Solange Cristina Garcia da Faculdade de Farmácia da UFRGS. Frentistas de postos de gasolina encontram-se diariamente expostos ao benzeno (componente na gasolina, presente no ar de postos de gasolina). O qual é reconhecido por seu alto potencial causador de prejuízos a saúde do trabalhador exposto, inclusive câncer. Por este motivo, este trabalho pretende avaliar alguns efeitos desta exposição ao benzeno sobre a saúde desses trabalhadores.

Sabendo que no seu ambiente trabalho não há presença desse composto, você está sendo convidado a participar do grupo controle (sem exposição) para que possamos comparar os resultados obtidos dos indivíduos expostos com indivíduos não expostos. Se você aceitar participar desse estudo, será realizada uma entrevista com questionário sobre o uso de medicamentos, seus hábitos de vida, seu histórico familiar de doenças e seu estado de saúde atual. Este questionário será realizado no dia da coleta e deve necessitar de aproximadamente 20 minutos para ser preenchido.

Também será realizada a coleta de amostras biológicas (sangue, urina e células da mucosa da boca). Esta coleta será realizada no seu local de trabalho, em um único dia que será agendado com você conforme sua disponibilidade. Realizaremos alguns exames que são de rotina em laboratório de análises clínicas, como hemograma, exames de avaliação dos rins e fígado, e alguns outros que somente realizamos no laboratório de Toxicologia na Faculdade de Farmácia da UFRGS. Para a coleta de sangue, o material utilizado é único para cada indivíduo. Será coletada uma amostra de 20 mL de sangue, cerca de 4 colheres de chá. No momento da coleta de sangue poderá haver alguma dor leve decorrente da perfuração da pele. Complicações da coleta de sangue são raras, mas é possível que ocorra algum tipo de mal estar e até mesmo desmaios. Poderá aparecer hematoma no local da punção de sangue, o qual desaparece em alguns dias. Com as amostras de sangue, faremos hemograma, avaliaremos se há alterações no fígado e rins, avaliaremos possíveis danos no DNA e também avaliaremos seu sistema imune. Quanto ao procedimento para coleta de urina, o indivíduo participante terá que urinar em um pequeno frasco coletor de urina e este é o único desconforto que pode vir a ocorrer. Você deverá urinar apenas a quantidade que for capaz no momento da coleta, desprezando o primeiro jato de urina para não ocorrer contaminação microbológica, e o volume não precisa exceder a metade do frasco de coleta. Com as amostras de urina, avaliaremos se há alterações nos rins e também avaliaremos possíveis danos no DNA. Quanto à coleta de células da mucosa da boca, os indivíduos participantes poderão sofrer de algum desconforto do procedimento e há o risco eventual, embora pequeno, de lesão da mucosa, uma vez que se constitui de uma coleta simples, realizada com uma pequena escova de coleta de células bucais (semelhante a uma escova de dentes) através de

movimentos circulares contra o interior de cada bochecha. Anteriormente à coleta de células da mucosa, o indivíduo será orientado a realizar bochecho com água mineral disponibilizada pela equipe de pesquisa, minimizando os riscos de contaminação. Esta coleta será utilizada para a análise de dano ao DNA. No dia da coleta, você receberá um amostrador passivo que deverá ficar pendurado em sua roupa durante toda sua jornada de trabalho deste dia. Este amostrador é pequeno, do tamanho de um broche e não deve interferir na realização de suas atividades de trabalho. O amostrador tem a função de coletar ao longo do dia alguns dos componentes do ar a que você fica exposto. No final do seu dia de trabalho, recolheremos este amostrador para que possamos analisar tais compostos.

Você irá receber os resultados dos exames realizados. A entrega dos resultados será realizada no seu local de trabalho em data e horário que lhe for mais conveniente. Entraremos em contato para agendarmos a entrega dos mesmos. Caso seja observado alguma alteração significativa nos resultados de seus exames, faremos o possível para lhe fornecer exames mais aprofundados que estejam a nosso alcance ou então lhe encaminhar para o atendimento adequado. A participação no estudo poderá não trazer um benefício direto a você. A sua participação nesse estudo irá contribuir para o aumento do conhecimento sobre este assunto e os resultados irão auxiliar na tomada de medidas preventivas para a melhoria da qualidade de vida dos trabalhadores expostos ao benzeno. O material biológico coletado será armazenado de forma codificada. Após a realização das análises previstas neste projeto, as amostras serão armazenadas. Este material, além de ser utilizado neste estudo, poderá ser utilizado em outros estudos futuros do nosso grupo. Neste caso, um novo projeto de pesquisa será submetido para apreciação do Comitê de Ética em Pesquisa e você será chamado para reconsentir como uso do material. Sua participação na pesquisa é totalmente voluntária, ou seja, não é obrigatória. Caso você decida não participar, ou ainda, desistir de participar e retirar seu consentimento, não haverá nenhum prejuízo ao atendimento que você recebe ou possa vir a receber nas instituições envolvidas. Você poderá solicitar a retirada das informações e do material biológico a qualquer momento, bastando solicitar por escrito ao responsável pelo projeto. Não está previsto nenhum tipo de pagamento pela sua participação na pesquisa e você não terá nenhum custo com respeito aos procedimentos envolvidos. Caso ocorra alguma intercorrência ou dano, resultante de sua participação na pesquisa, você receberá todo o atendimento necessário, sem nenhum custo pessoal. Garantimos a sua não identificação e o caráter confidencial dos resultados. Os resultados serão divulgados de forma agrupada, sem a identificação dos indivíduos que participaram do estudo.

Você terá garantia de acesso, em qualquer etapa da pesquisa, aos profissionais responsáveis pela mesma, para esclarecimentos de eventuais dúvidas, contatando a Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Solange Cristina Garcia pelo telefone (51) 3308-5297. A pesquisadora Elisa Sauer também poderá ser contatadas pelo telefone (51) 3308- 5297 ou pelo email elisa-sauer@hotmail.com. Também poderá contatar o comitê de ética em pesquisa, que aprovou este projeto, para esclarecimento de dúvidas:

Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal Do Rio Grande do Sul, Sala 317, Anexo 1 do prédio da reitoria da UFRGS, ou através do telefone (51) 33083738. Esse Termo é assinado em duas vias, sendo uma para o participante e outra para os pesquisadores.

( ) Aceito que minhas amostras sejam armazenadas para pesquisas futuras.

( ) Não aceito que minhas amostras sejam armazenadas para pesquisas futuras.

Nome do Participante: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

Nome do Pesquisador: \_\_\_\_\_ (pesquisador que aplicou o Termo)

Assinatura: \_\_\_\_\_

Local e data: \_\_\_\_\_

### **ANEXO III - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).**

#### **TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO FRENTISTAS**

Você está sendo convidado a participar da pesquisa “Avaliação da Potencial Imunotoxicidade na Exposição Ocupacional ao Benzeno”. Este trabalho tem como pesquisadora responsável a professora Dr<sup>a</sup>. Solange Cristina Garcia da Faculdade de Farmácia da UFRGS.

Em seu ambiente de trabalho, você está diariamente exposto ao benzeno, componente da gasolina, o qual é reconhecido por causar sérios problemas em seres humanos, inclusive câncer. Por este motivo, este trabalho pretende avaliar alguns efeitos desta exposição ao benzeno sobre a sua saúde. Se você aceitar participar desse estudo, será realizada uma entrevista com questionário sobre o uso de medicamentos, seus hábitos de vida, seu histórico familiar de doenças e seu estado de saúde atual. Este questionário será realizado no dia da coleta e deve necessitar de aproximadamente 20 minutos para ser preenchido.

Também será realizada a coleta de amostras biológicas (sangue, urina e células da mucosa da boca). Esta coleta será realizada no seu local de trabalho, em um único dia que será agendado com você conforme sua disponibilidade. Realizaremos alguns exames que são de rotina em laboratório de análises clínicas, como hemograma, exames de avaliação dos rins e fígado, e alguns outros que somente realizamos no laboratório de Toxicologia na Faculdade de Farmácia da UFRGS. Para a coleta de sangue, o material utilizado é único para cada indivíduo. Será coletada uma amostra de 20 mL de sangue, cerca de 4 colheres de chá. No momento da coleta de sangue poderá haver alguma dor leve decorrente da perfuração da pele. Complicações da coleta de sangue são raras, mas é possível que ocorra algum tipo de mal estar e até mesmo desmaios. Poderá aparecer hematoma no local da punção de sangue, o qual desaparece em alguns dias. Com as amostras de sangue, faremos hemograma, avaliaremos se há alterações no fígado e rins, avaliaremos possíveis danos no DNA e também avaliaremos seu sistema imune. Quanto ao procedimento para coleta de urina, o indivíduo participante terá que urinar em um pequeno frasco coletor de urina e este é o único desconforto que pode vir a ocorrer. Você deverá urinar apenas a quantidade que for capaz no momento da coleta, desprezando o primeiro jato de urina para não ocorrer contaminação microbiológica, e o volume não precisa exceder a metade do frasco de coleta. Com as amostras de urina, avaliaremos se há alterações nos rins e também avaliaremos possíveis danos no DNA. Quanto à coleta de células da mucosa da boca, os indivíduos participantes poderão sofrer de algum desconforto do procedimento e há o risco eventual, embora pequeno, de lesão da mucosa, uma vez que se constitui de uma coleta simples, realizada com uma pequena escova de coleta de células bucais (semelhante a uma escova de dentes) através de movimentos circulares contra o interior de cada bochecha. Anteriormente à coleta de células da mucosa, o indivíduo será orientado a realizar bochecho com água mineral disponibilizada pela equipe de pesquisa, minimizando os riscos de contaminação. Esta coleta será utilizada para a análise de dano

ao DNA. No dia da coleta, você receberá um amostrador passivo que deverá ficar pendurado em sua roupa durante toda sua jornada de trabalho deste dia. Este amostrador é pequeno, do tamanho de um broche e não deve interferir na realização de suas atividades de trabalho. O amostrador tem a função de coletar ao longo do dia alguns dos componentes do ar a que você fica exposto. No final do seu dia de trabalho, recolheremos este amostrador para que possamos analisar tais compostos.

Você irá receber os resultados dos exames realizados. A entrega dos resultados será realizada no seu local de trabalho em data e horário que lhe for mais conveniente. Entraremos em contato para agendarmos a entrega dos mesmos. Caso seja observado alguma alteração significativa nos resultados de seus exames, faremos o possível para lhe fornecer exames mais aprofundados que estejam a nosso alcance ou então lhe encaminhar para o atendimento adequado. A participação no estudo poderá não trazer um benefício direto a você. A sua participação nesse estudo irá contribuir para o aumento do conhecimento sobre este assunto e os resultados irão auxiliar na tomada de medidas preventivas para a melhoria da qualidade de vida dos trabalhadores expostos ao benzeno. O material biológico coletado será armazenado de forma codificada. Após a realização das análises previstas neste projeto, as amostras serão armazenadas. Este material, além de ser utilizado neste estudo, poderá ser utilizado em outros estudos futuros do nosso grupo. Neste caso, um novo projeto de pesquisa será submetido para apreciação do Comitê de Ética em Pesquisa e você será chamado para reconseguir como uso do material. Sua participação na pesquisa é totalmente voluntária, ou seja, não é obrigatória. Caso você decida não participar, ou ainda, desistir de participar e retirar seu consentimento, não haverá nenhum prejuízo ao atendimento que você recebe ou possa vir a receber nas instituições envolvidas. Você poderá solicitar a retirada das informações e do material biológico a qualquer momento, bastando solicitar por escrito ao responsável pelo projeto. Não está previsto nenhum tipo de pagamento pela sua participação na pesquisa e você não terá nenhum custo com respeito aos procedimentos envolvidos. Caso ocorra alguma intercorrência ou dano, resultante de sua participação na pesquisa, você receberá todo o atendimento necessário, sem nenhum custo pessoal. Garantimos a sua não identificação e o caráter confidencial dos resultados. Os resultados serão divulgados de forma agrupada, sem a identificação dos indivíduos que participaram do estudo.

Você terá garantia de acesso, em qualquer etapa da pesquisa, aos profissionais responsáveis pela mesma, para esclarecimentos de eventuais dúvidas, contatando a Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Solange Cristina Garcia pelo telefone (51) 3308-5297. A pesquisadora Elisa Sauer também poderá ser contatada pelo telefone (51) 3308- 5297 ou pelo email elisa-sauer@hotmail.com. Também poderá contatar o comitê de ética em pesquisa, que aprovou este projeto, para esclarecimento de dúvidas:

Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal Do Rio Grande do Sul, Sala 317, Anexo 1 do prédio da reitoria da UFRGS, ou através do telefone (51) 33083738. Esse Termo é assinado em duas vias, sendo uma para o participante e outra para os pesquisadores.

( ) Aceito que minhas amostras sejam armazenadas para pesquisas futuras.

( ) Não aceito que minhas amostras sejam armazenadas para pesquisas futuras.

Nome do Participante: \_\_\_\_\_



Assinatura: \_\_\_\_\_

Nome do Pesquisador: \_\_\_\_\_ (pesquisador que aplicou o Termo)

Assinatura: \_\_\_\_\_

Local e data: \_\_\_\_\_

## ANEXO IV – Questionário

### QUESTIONÁRIO DE AVALIAÇÃO

#### Avaliação da Potencial Imunotoxicidade na Exposição Ocupacional ao Benzeno

Entrevistador: \_\_\_\_\_

#### DADOS GERAIS.

##### Código da amostra:

Idade: \_\_\_\_\_ Data de nascimento: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Etnia: \_\_\_\_\_

Profissão: \_\_\_\_\_

Função: \_\_\_\_\_

Local de trabalho (posto/ponto): \_\_\_\_\_

Tempo que exerce a função: \_\_\_\_\_

Número de horas diárias de permanência no trabalho? \_\_\_\_\_

Turno: (1) Manhã (2) Tarde (3) Noite

Jornada de Trabalho Semanal: \_\_\_\_\_

Função Anterior: \_\_\_\_\_

Tempo da função anterior: \_\_\_\_\_

#### DADOS DE DIAGNÓSTICO

Como você acha que está o seu estado geral de saúde?

( ) Muito bom ( ) Bom ( ) Mau ( ) Muito mau

#### Portador de doenças crônicas?

( ) Sim ( ) Não

#### Se sim, qual(ais) delas:

( ) Hipertensão

( ) Tuberculose

( ) Diabetes

( ) Sífilis

( ) Hipercolesterolemia

( ) HIV

( ) Câncer

( ) Hepatite

( ) Doenças respiratórias

( ) Doenças Auto-imunes

Faz uso de medicamentos? Quais? Por quanto tempo?

---

---

---

Faz uso de Polivitamínicos? \_\_\_\_\_

**Apresenta alguns destes sintomas?**

- |   |  |
|---|--|
| <input type="checkbox"/> dor de cabeça            | <input type="checkbox"/> tontura             |
| <input type="checkbox"/> vertigem                 | <input type="checkbox"/> dor de estômago     |
| <input type="checkbox"/> dor pernas               | <input type="checkbox"/> irritação olhos     |
| <input type="checkbox"/> irritação nariz          | <input type="checkbox"/> irritação pele      |
| <input type="checkbox"/> lesão nas mãos           | <input type="checkbox"/> coceira             |
| <input type="checkbox"/> alergia                  | <input type="checkbox"/> palpitações         |
| <input type="checkbox"/> bronquite                | <input type="checkbox"/> falta de ar         |
| <input type="checkbox"/> rinite alérgica          | <input type="checkbox"/> dor coluna          |
| <input type="checkbox"/> cansaço                  | <input type="checkbox"/> problemas auditivos |
| <input type="checkbox"/> dor muscular             | <input type="checkbox"/> sonolência          |
| <input type="checkbox"/> alteração salivação      | <input type="checkbox"/> tremores            |
| <input type="checkbox"/> insônia                  | <input type="checkbox"/> alteração humor     |
| <input type="checkbox"/> distúrbios respiratórios |  |
| <input type="checkbox"/> outros sintomas :        |  |

---

**HISTÓRICO FAMILIAR**

Indique as doenças familiares mais relevantes dos seus avós, tios e irmãos: Hipertensão arterial, infarto do miocárdio, derrame cerebral (AVC), diabetes mellitus
Avós:
Tios:
Irmãos:
Sobre o seu pai: Está vivo ( ) Idade:    anos. Doenças: Falecido ( ) Idade:    anos. Causa de morte:
Sobre a sua mãe: Está viva ( ) Idade:    anos. Doenças: Falecida ( ) Idade:    anos. Causa de morte:

### HÁBITOS DE VIDA

FUMO: ( ) Nunca fumou ( ) Fumante ( ) Ex-fumante

Se sim, quantos cigarros por dia? \_\_\_\_

Com que idade começou a fumar? \_\_\_\_\_ anos

Ex-fumante

Se sim, quantos cigarros por dia? \_\_\_\_\_

Há quanto tempo parou de fumar? \_\_\_\_\_ anos \_\_\_\_ meses

Mora com alguém que é fumante? ( ) SIM ( ) NÃO

### ETILISMO

Faz uso de bebidas alcoólicas? ( ) SIM ( ) NÃO

Qual a frequência, a quantidade e o tipo de bebida (por semana)?

\_\_\_\_\_

Fez uso de bebidas alcoólicas nos últimos 2 dias? Qual? \_\_\_\_\_

### REINCIDÊNCIA DE INFECÇÕES? ( ) SIM ( ) NÃO

Quais:

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

### ATIVIDADES FÍSICAS

Pratica regularmente atividades físicas ( ) SIM ( ) NÃO

Qual atividade e com que frequência?